



HAL
open science

PCR multiplexe et biopuce pour la détection rapide d'agents infectieux

Laëtitia Villiers

► **To cite this version:**

Laëtitia Villiers. PCR multiplexe et biopuce pour la détection rapide d'agents infectieux. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1184 . tel-03383665

HAL Id: tel-03383665

<https://theses.hal.science/tel-03383665>

Submitted on 18 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre NNT : 2020LYSE1184

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale 205
École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Biochimie

Soutenue publiquement le 08 octobre 2020 par :

Laëtitia VILLIERS

PCR multiplexe et biopuce pour la détection rapide d'agents infectieux

Devant le jury composé de :

Loïc BLUM	Professeur – ICBMS, Lyon	Examineur
Carole CHAIX	Directeur de Recherche – ISA, Lyon	Examinatrice
Emmanuelle LAURENCEAU	Maître de conférence – Ecole Centrale, Lyon	Rapporteur
Christophe MARQUETTE	Directeur de Recherche – ICBMS, Lyon	Directeur de thèse
Max MAURIN	Professeur –CHU, Grenoble	Rapporteur
Franck MOLINA	Directeur– Sys2Diag, Montpellier	Rapporteur
Benjamin CORGIER	Directeur R&D – AXO Science, Lyon	Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. Frédéric FLEURY

M. Hamda BEN HADID

M. REVEL

M. Philippe CHEVALIER

M. Jean-François MORNEX

M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Faculté d'Odontologie

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté de Médecine Lyon Est

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)

Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

Doyenne : Mme Dominique SEUX

Doyenne : Mme Carole BURILLON

Doyen : M. Gilles RODE

Directeur : M. Xavier PERROT

Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)

Département Informatique

Département Mécanique

Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)

Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)

Institut National du Professorat et de l'Education

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Observatoire de Lyon

Polytechnique Lyon

UFR Biosciences

UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et

Sportives (STAPS)

UFR Faculté des Sciences

Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO

Directeur : M. Behzad SHARIAT

Directeur M. Marc BUFFAT

Directeur : Gérard PIGNAULT

Directeur : M. Nicolas LEBOISNE

Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Directeur : M. Christophe VITON

Directrice : Mme Isabelle DANIEL

Directeur : Emmanuel PERRIN

Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER

Directeur : M. Yannick VANPOULLE

Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI



L'ensemble des travaux constituant cette thèse a été réalisé :

Au sein de l'équipe GEMBAS de l'ICBMS à l'Université Claude Bernard Lyon 1, sous la direction du Dr Christophe Marquette ainsi qu'au sein de l'entreprise AXO Science dirigée par M. Othello Chartier dans le cadre d'une convention CIFRE

**Équipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires**

UMR 5246 Université Lyon 1 / CNRS

Bâtiment Lederer

1 rue Victor Grignard

69100 Villeurbanne - France



AXO Science SAS

36bis rue de Bruxelles

69100 Villeurbanne - France



AXO Science

À l'aide du financement du projet européen H2020 PHC10



Au sein de l'École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé



Remerciement

De nombreuses personnes ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Je souhaiterais adresser mes remerciements dans un premier temps aux membres du jury dans leur ensemble pour les échanges très constructifs que nous avons pu avoir. Je souhaite remercier le Dr Emmanuelle Laurenceau, le Pr Max Maurin ainsi que le Dr Franck Molina qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour le temps consacré à l'analyse et la critique de ce travail. Je remercie également le Dr Carole Chaix pour avoir accepté de faire partie du jury et pour l'examen de cette thèse et finalement le Pr Loïc Blum pour avoir accepté d'être président de ce jury et pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je souhaite ensuite sincèrement remercier mes encadrants le Dr Christophe Marquette et le Dr Benjamin Corgier. Christophe, un grand merci pour m'avoir proposé un sujet aussi challenging et intéressant que celui-ci. Merci pour tes conseils et remarques toujours très pertinents. Merci pour m'avoir accordé ton entière confiance et m'avoir permis de réaliser autant de choses. Benjamin, un grand merci pour la confiance que tu m'as accordée et ton soutien. Tu avais raison ça a été très formateur parfois et j'ai beaucoup appris.

Je remercie le Dr Joël Lachuer et le Dr Tristan Lefebure pour leur participation à mon comité de suivi de thèse et les conseils qu'ils m'ont apportés.

Je souhaite remercier chaleureusement tous les membres d'AXO Science dans leur ensemble: Othello, Samuel, Benjamin, Stéphanie, Vincent et Laurent pour leur accueil plus que chaleureux et leur soutien tout au long de cette thèse. Vous avez tous contribué au succès de cette thèse par votre humour et votre bonne humeur au quotidien. Je remercie plus particulièrement mes collègues de bureau Vincent et Stéphanie pour tous les bons moments passé ensemble et les nombreux conseils et les corrections apportés à ce manuscrit. Je n'oublie pas non plus Clément qui a été mon tout premier stagiaire.

Je tiens à remercier ensuite tous les membres de l'équipe GEMBAS dans leur ensemble pour leur soutien et leurs nombreux mots d'encouragement. Je remercie tout particulièrement Chloé,

Julien, Nicolas, Layth, Sébastien, Thomas, Romain et Laurent pour leur accueil, leur bonne humeur communicative, leur gentillesse à toute épreuve et tous les conseils qu'ils m'ont apportés.

Je tiens également à remercier tous les membres du projet FAPIC pour les nombreuses interactions et discussions que nous avons pu avoir. Je souhaite plus particulièrement remercier Rui et Séverine ainsi que l'équipe à Warwick pour leur accueil chaleureux lors de mes deux séjours là-bas.

Ces remerciements n'auraient pas été complets sans remercier mes amis et plus particulièrement Fabien, Lorraine, Claire et Alexis pour leur soutien et leur encouragement notamment lors de la rédaction de ce manuscrit. Je souhaite également remercier ma famille et Marie pour leur soutien tout au long de cette thèse. Merci à mes frères Guillaume (merci pour les corrections) et Damien (merci pour le programme) pour m'avoir toujours soutenue dans tout ce que je fais. Et last but not least comme on dit, je tiens à remercier mes parents Rémy et Isabelle pour leur retour sur ce manuscrit, pour leur soutien sans faille et pour m'avoir donné toutes les chances et les opportunités pour arriver où je suis maintenant.

J'ai également une pensée particulière pour mon grand-père qui n'a pas pu voir l'aboutissement de ce travail.

Table des matières

Liste des abréviations	13
Liste des tableaux	15
Liste des figures	19
Introduction générale.....	23
Chapitre 1 : Bactériémie, choc septique et diagnostic clinique	25
1. Infection bactérienne et bactériémie	27
1.1 L’homme vit au contact de bactéries	27
1.2 Bactériémie et choc septique	27
1.3 Pathogènes impliqués dans les infections du sang	34
2 Méthode de diagnostic actuelle utilisée en clinique pour l’identification des pathogènes	37
2.1 Réalisation d’enrichissement bactérien : Hémoculture	37
2.2 Identification des bactéries	40
2.3 Limitations.....	42
Chapitre 2 : Antibiotiques et résistance aux antibiotiques	45
1 Origine des antibiotiques	47
1.1 Pré « ère des antibiotiques modernes »	47
1.2 « Eres des antibiotiques modernes ».....	47
2 Mécanismes d’actions des antibiotiques	50
2.2 Mécanismes d’action des différentes classes d’antibiotiques.....	52
3 Gènes de résistance aux antibiotiques.....	60
3.1 Impact des résistances aux antibiotiques	60
3.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques	62
3.3 Localisation des gènes de résistance	70
3.4 Facteurs favorisant l’augmentation et la propagation des résistances aux antibiotiques.....	72
3.5 Recherche de nouveaux médicaments	76
4 Méthodes de diagnostic actuellement employées pour les résistances aux antibiotiques.	78
Chapitre 3 : Etat des lieux des tests commerciaux disponibles sur le marché	81
1 Méthode de diagnostic suite à une hémoculture	83
1.1 Gène codant pour l’ARN 16S.....	83
1.2 Amplification des acides nucléiques et étape de post amplification	84
1.3 Test sans amplification préalable de l’ADN.....	91

1.4	Spectrométrie de masse	94
1.5	Test en cours de développement.....	96
2	Méthode de diagnostic directement sur les échantillons de sang.....	100
2.1	Amplification des acides nucléiques et post amplification	100
2.2	Tests actuellement en phase de développement	104
3	Bilan sur les techniques d'identification des pathogènes impliqués dans les cas d'infections du sang	106
	Principe du projet de thèse	109
	Matériels et Méthodes	115
1	Matériels	117
1.1	Instruments	117
1.3	Supports	117
1.4	Réactifs	117
1.5	séquences oligonucléotidiques	118
2	Méthodes.....	118
2.1	Paramètres utilisés pour les logiciels.....	118
2.2	Evaluation des performances du test développé en présence de souches bactériennes	119
2.3	Préparation des solutions stocks de souches bactériennes et des échantillons de sang	122
2.4	Test des performances des deux plateformes avec une validation analytique et une validation préclinique	128
2.5	Extraction des acides nucléiques	129
2.6	PCR multiplexes	130
2.7	Test d'hybridation haut-débit automatisé	131
2.8	Imagerie des biopuces et extraction des données	134
	Chapitre 4 : Choix des cibles et construction des PCR multiplexes	135
1	Choix des différentes cibles du projet.....	137
1.1	Choix des pathogènes et des gènes de résistance	137
1.2	Constitution des panels de cibles pour les PCR multiplexes.....	138
2	Conception des séquences oligonucléotidiques de chaque panel : amorces et sondes ...	142
2.1	Critères de conception des sondes et des amorces	142
2.2	Conception des amorces et sonde pour le panel 1	143
2.3	Conception des sondes et des amorces pour le panel 2	155
2.4	Conception des sondes et amorces pour le panel 3	158
3	Optimisation des conditions expérimentales des protocoles de PCR et d'analyse.....	164

3.1	Optimisation du protocole d'analyse	164
3.2	Optimisation du protocole de PCR.....	166
Chapitre 5 : Interprétation analytique des résultats obtenus		177
1	Résultats obtenus sur les différents panels.....	179
1.1	Images obtenues sur le panel 2	179
1.2	Images obtenues sur le panel 3	182
1.3	Images obtenues sur le panel 1	185
1.4	Caractéristiques des sondes conditionnant l'observation des signaux	193
1.5	Contrôles négatifs pour les panels 1 et 2	196
2	Mise en place d'une méthode d'analyse des résultats obtenus avec les trois panels	197
2.1	Mise en place d'un système de seuils pour les panels 2 et 3	197
2.2	Développement d'un système d'analyse pour le panel 1	208
3	Conception du programme de reconnaissance des pathogènes du panel 1	214
3.1	Transcription des intensités extraites avec AXOware en intensités relatives, utilisées dans l'analyse automatique.....	214
3.2	Détermination des sondes utilisées et de leurs intervalles d'intensité relative pour l'établissement des signatures servant à la reconnaissance des pathogènes.....	218
3.3	Développement d'une analyse automatique pour l'identification des pathogènes..	221
3.4	Résumé du processus d'analyse des résultats.....	229
Chapitre 6 : Etudes des performances du test développé.....		231
1	Etude des performances du test développé avec de l'ADN extrait de souches bactériennes et sur l' <i>AXObot</i>	233
1.1	Estimation du nombre de copies de génome	233
1.2	Evaluation de la sensibilité et de la spécificité du test développé	234
1.3	Espèces utilisées pour valider la spécificité	243
1.4	Détermination des capacités de détection du test	245
1.5	Infections polymicrobiennes.....	249
2	Validation analytique	252
2.1	Validation analytique du <i>Pathodoc</i> (Plateforme 2)	254
2.2	Validation analytique pour la Plateforme 1 : <i>SelectNA plus / PathoRobot</i> , thermocycleur, <i>AXObot</i>	261
3	Validation préclinique.....	267
3.1	Définition de la qualification des échantillons	268
3.2	Tests avec des échantillons de patients congelés.....	269
3.3	Tests avec des échantillons de patient congelés de moins de trois mois.....	274
3.4	Tests avec des échantillons frais de patient	275

3.5	Tests avec l'extraction et la PCR réalisées au sein de l'hôpital d'Hasselt	280
3.6	Tests complémentaires	283
3.7	Essais afin d'améliorer l'identification des pathogènes à AXO Science	285
3.8	Identification des résistances	286
3.9	Conclusions concernant les performances du test développé.....	293
	Conclusion générale et perspectives.....	295
	Annexes.....	299

Liste des abréviations

I'ACCP/ SCCM	<i>American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine</i>
AIT	<i>Austrian Institute of Technology</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
C2CA	<i>Circle to Circle Amplification</i>
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CoNS	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative
CRIS	Center for Innovation in Regulatory Science
Ct	Cycle de seuil (<i>cycle threshold</i>)
DeltaG	Enthalpie libre
EBSL	Bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi
ELISA	<i>Eenzyme-linked immunosorbent assay</i>
HRP	Peroxydase de raifort (<i>horseradish peroxidase</i>)
FAPIC	<i>Fast Assay for Pathogen Identification and Characterization</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
kb	Kilobases
LoB	Limite du blanc (<i>Limit of Blank</i>)
LoD	Limite de détection (<i>Limit of detection</i>)
MALDI- TOF	Spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
Muscle	<i>MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation</i>
pABA	Acide para-aminobenzoïque
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)

pb	Paire de bases
PBP2a	<i>Penicillin binding protein 2a</i> (PLP2a pour protéine liant les pénicillines en français)
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDR	Bactéries jugées résistantes à presque tous les antimicrobiens disponibles (<i>pan drugs resistant</i>)
PLP	<i>Padlocks probes</i>
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (<i>Pattern recognition receptor</i>)
rpm	Tour par minutes (<i>rotation per minute</i>)
RDP	<i>The Ribosomal Database Project</i>
SIRS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
ssp.	Plusieurs espèces non identifiées au sein d'un genre (<i>species plurimae</i>)
SSU	Petite sous unité du ribosome (<i>Small subunit rRNA</i>)
Ta	Température d'hybridation (<i>annealing temperature</i>)
Tm	Température de demi-dénaturation (<i>melting temperature</i>)
ua	Unité arbitraire
UFC/ml	Unité formant colonies par millilitre
μM	Micromolaire (micromole/litre)
%GC	Pourcentage en bases Guanine et Cytosine

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemple de micro-organismes isolés à partir d'hémocultures pour tout type de bactériémie en Angleterre et pour des bactériémies d'acquisition communautaire ou associés aux soins au Danemark	36
Tableau 2 : Pourcentage de bouteilles sous et sur remplies détectées dans plusieurs pays, adapté de Lamy et al. (86)	42
Tableau 3 : Année d'introduction en clinique et d'observation des premières résistances, adapté de Iredell et al.(150)	61
Tableau 4 : Liste des cibles détectées dans chacun des trois panels disponibles sur la plateforme ePlex (GenMark, Etats-Unis) (250)	86
Tableau 5 : Cibles détectées par le test Unyvero Blood culture (BCU).....	88
Tableau 6 : Cibles détectées par les tests Verigene BC-GP et Verigene BC-GN.....	93
Tableau 7 : Caractéristiques des différents tests de diagnostics après hémoculture présentés dans le chapitre 3	98
Tableau 8 : Caractéristiques des différents tests de diagnostics à partir d'un échantillon de sang présentés dans le chapitre 3	105
Tableau 9 : Membre du consortium du projet FAPIC	112
Tableau 10 : Espèces bactériennes (cibles et espèces de validation) utilisées au cours du test	120
Tableau 11 : Conditions de culture des organismes utilisés lors de la phase de validation analytique, la composition détaillée des bouillons de culture est indiquée en annexe 2.....	124
Tableau 12 : Composition du mix de chacune des PCR multiplexes	130
Tableau 13 : Programme de PCR commun aux trois panels	130
Tableau 14 : Exemple de scores finaux déterminés par les cliniciens pour différents pathogènes	137
Tableau 15 : Liste des gènes de résistance et familles d'antibiotique associées, identifiés dans le panel 3.	141
Tableau 16 : Spécificité et couverture des sondes du panel 1, déterminée avec la banque de donnée Silva	145
Tableau 17 : Taux de couverture des couples d'amorces nouvellement définies pour les cibles du panel 1 par rapport aux couples d'amorces de référence	150

Tableau 18 : Taux de couverture et spécificité des séquences oligonucléotidiques (sondes et amorces) du panel 2.....	156
Tableau 19 : Variants des gènes de résistance détectés en théorie par le panel 3.....	159
Tableau 20 : Calcul de la Ta selon les deux formules pour les 3 panels.....	168
Tableau 21 : Différences au niveau des séquences oligonucléotidiques entre l'amplicon théorique et la séquence des sondes : Exemple pour <i>Citrobacter farmeri</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> et <i>Cronobacter sakazakii</i>	182
Tableau 22 : Proximité des séquences oligonucléotides et signaux sur les sondes. Exemple pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> souche NCTC 13437.....	190
Tableau 23 : Vérification des critères d'exclusions émis par Matveeva et al. ainsi que Wu et al. sur les sondes sur lesquelles des signaux sont observés pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	195
Tableau 24 : Seuils de détection déterminés pour le panel 2 pour les deux plateformes (AXObot et Pathodoc).....	200
Tableau 25 : Seuils de détection déterminés pour le panel 3 pour les deux plateformes (AXObot et Pathodoc).....	207
Tableau 26 : Combinaison pour l'identification de <i>Clostridium butyricum</i>	220
Tableau 27 : Combinaisons présentant des sondes communes : Exemple pour <i>Streptococcus</i> spp.	221
Tableau 28 : Identification de <i>Staphylococcus aureus</i> par l'intermédiaire de deux combinaisons	223
Tableau 29 : Création d'une deuxième combinaison pour l'identification de <i>Bacteroides fragilis</i> dans le cas d'infection polymicrobienne.....	225
Tableau 30 : Sondes présentes dans les combinaisons de chaque cible du panel 1	226
Tableau 31 : Identification des cibles du panel 1 à partir d'ADN extrait de souches.....	235
Tableau 32 : Identification des cibles du panel 2 à partir d'ADN extrait de souches.....	239
Tableau 33 : Identification des cibles du panel 3 à partir d'ADN extrait de souches.....	241
Tableau 34 : Détection des « espèces de validation » par le logiciel de reconnaissance	244
Tableau 35 : Combinaisons de pathogènes les plus significatives dans les cas d'infections polymicrobiennes	250
Tableau 36 : Evaluation de la détection des pathogènes dans le cadre d'infections polymicrobiennes par le test développé	251
Tableau 37 : Pathogènes utilisés au cours de la validation analytique des deux plateformes	252
Tableau 38 : Exemple de résultats obtenus lors de la validation analytique du Pathodoc	256

Tableau 39 : Résultats de l'étude préliminaire réalisée avant la validation analytique sur la plateforme 1.....	261
Tableau 40 : Exemple de résultats obtenus lors de la validation analytique de la plateforme 1 (SelectNa plus/PathoRobot, thermocycleur, AXObot)	263
Tableau 41 : Performances de la plateforme 1 au cours de la validation analytique et en incluant ou excluant les qPCR négatives	264
Tableau 42 : Résultats obtenus pour la validation préclinique de la plateforme 1, avec des échantillons de sang congelés et anciens.....	270
Tableau 43 : Résultats obtenus pour les 8 échantillons de patients congelés dont l'ancienneté est inférieure à 3 mois	275
Tableau 44 : Exemple de résultats obtenus avec des échantillons de sang frais pour la validation préclinique.....	277
Tableau 45 : Résultats obtenus pour la validation préclinique avec des échantillons dont l'extraction et les PCR ont été réalisées au sein de l'hôpital de Hasselt	281
Tableau 46 : Exemple de résultats obtenus concernant les gènes de résistance lors de la validation préclinique de la plateforme 1	288

Liste des figures

Figure 1 : Etapes de formation d'un biofilm, adapté de Tremblay et al. (15)	29
Figure 2 : Interrelation entre le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), la septicémie et une infection comme décrit en 1992, d'après Bone et al. (27).....	32
Figure 3 : A : BacT ALERT 3D, B: Bouteille d'hémoculture du BacT ALERT 3D et C : Changement de couleur du capteur lors d'une modification du pH (75)	39
Figure 4 : Composition de la paroi bactérienne des bactéries Gram positives et Gram négatives, adapté de Pajerski et al. (78)	40
Figure 5 : A : Vitek [®] 2 BioMérieux et B : Carte d'identification du Vitek [®] 2	41
Figure 6 : Frise chronologique de la découverte des familles d'antibiotique, adapté de Lewis (103)	49
Figure 7 : Caractéristiques des générations de céphalosporines obtenues par addition de différentes molécules à l'acide 7-ACA, adapté de Ribeiro da Cunha et al. (99).....	51
Figure 8 : Différents composés de la famille des quinolones, issus du 1,8-naphthyridone	52
Figure 9 : Représentation schématique du ribosome procaryote 70S lié à trois ARN de transfert (ARNt), adapté d'Arenz et Wilson (118)	53
Figure 10 : Antibiotiques ciblant la synthèse des peptidoglycanes, adapté de Abrahams et Besra (131)	55
Figure 11 : Structures des différentes familles de bêta-lactamines, adapté de Bush et Bradford (141)	58
Figure 12 : Schéma récapitulatif des différents modes d'action des antibiotiques, adapté de Lewis (144)	59
Figure 13 : Mécanismes de résistances aux antibiotiques développés par les bactéries, adapté de Lewis(144).....	69
Figure 14 : Connections entre les antibiotiques en médecine vétérinaire, humaine et l'environnement	76
Figure 15 : Réalisation d'un antibiogramme avec A : une diffusion sur milieux gélosés de disques imprégnés d'un antibiotique, B : des bandelettes imprégnées d'un gradient continu d'antibiotique (237).....	79
Figure 16 : Cassette du test FilmArray [®] (245).....	85
Figure 17 : Technologie eSensor (GenMark, Etats Unis), adapté de Pierce et Hodinka (255)87	

Figure 18 : A : Principe de la PCR et l'hybridation sur biopuce utilisées au sein de la plateforme IC System et B : Représentation de la cassette iC.....	90
Figure 19 : Principe de l'identification bactérienne par MALDI-TOF adapté de Croxatto et al. (276)	95
Figure 20 : Déroulé du test MagicPlex™ Sepsis (SeeGene, Corée du sud).....	101
Figure 21 : Principe de fonctionnement du test IRIDICA (Abbott Molecular), adapté de Jordana-Lluch et al. (302)	103
Figure 22 : Schéma récapitulatif des principales méthodes de détection actuelles des infections du sang.....	107
Figure 23 : Principe du test développé au sein du projet FAPIC	111
Figure 24 : Présentation des deux plateformes développées au sein du projet FAPIC.	113
Figure 25 : Incubateur pour la culture des bactéries anaérobies	123
Figure 26 : Protocole de réalisation du comptage des colonies sur boîte de pétri.....	127
Figure 27 : Méthode d'extraction des pathogènes par la technologie MoLYsis™	129
Figure 28 : Plan de dépôt des sondes en fond de puits pour le panel 3	131
Figure 29 : Plan de dépôt des sondes en fond de puits pour le panel 1	132
Figure 30 : Plan de dépôt des sondes en fond de puits pour le panel 2	132
Figure 31 : Déroulé des étapes d'hybridation des amplicons sur la biopuce	133
Figure 32 : Positionnement de la grille d'AXOware sur les images de la biopuce	134
Figure 33 : Séquences incomplètes à l'extrémité du gène codant pour l'ARN 16S : Exemple d'Enterococcus spp. et Pseudomonas aeruginosa	154
Figure 34 : Dépôt en fond de puits des matrices de taille 11x11	164
Figure 35 : Intensité des signaux détectés sur les sondes suivant trois températures de fin de rampe pour l'hybridation sur biopuce : 60°C, 65°C et 70°C	165
Figure 36 : Test de deux valeurs de concentrations finales d'amorces dans la PCR du panel 1 : 0,1 µM et 0,3 µM	166
Figure 37 : Test de différentes températures d'hybridations pour la PCR: 49,5°C, 51°C et 52,5°C avec des concentrations finales d'amorces dans la PCR de 0,1 µM et 0,3 µM.....	169
Figure 38 : Test d'un rapport d'asymétrie des amorces sur l'intensité des signaux observés sur les sondes du panel 1	170
Figure 39 : Evaluation de l'augmentation de la concentration finale en amorces dans la PCR sur l'intensité des signaux du panel 2	171
Figure 40 : Evaluation de l'augmentation de la concentration finale en amorce dans la PCR sur l'intensité des signaux du panel 3	172

Figure 41 : Electrophérogramme obtenu sur le Bioanalyzer 2100 d'Agilent permettant de vérifier l'impact de l'augmentation de la concentration finale en amorce sur les cibles aad, mcr1 et TEM.....	173
Figure 42 : Intensité des signaux sur les sondes selon le nombre de cycle de la PCR.....	174
Figure 43 : Impact de l'huile sur l'intensité des signaux détectés sur la biopuce pour les trois panels.....	176
Figure 44 : Exemple de pathogènes présentant des signaux spécifiques sur la biopuce du panel 2.....	179
Figure 45 : Observation de signaux non attendus sur la sonde E. coli en présence d'espèce de validation : Exemple de <i>Citrobacter farmeri</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> et <i>Cronobacter sakazakii</i>	180
Figure 46 : Exemple de détection des cibles du panel 3 avec des pathogènes contenant un nombre variable de gènes de résistance	183
Figure 47 : Electrophérogramme obtenu sur le Bioanalyzer 2100 d'Agilent et permettant de comparer un échantillon négatif amplifié avec l'ancien (A) et le nouveau mix d'amorces (B) dont la concentration finale en amorces est supérieure.....	185
Figure 48 : Exemple de pathogènes présentant des signaux spécifiques sur la biopuce.....	186
Figure 49 : Exemple de pathogènes présentant un nombre de signaux plus important que prévu sur la biopuce	186
Figure 50 : Exemple de pathogènes présentant un très grand nombre de signaux sur la biopuce	187
Figure 51 : Comparaison des signaux sur les sondes entre bactéries cibles et espèces de validation : Exemple de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	188
Figure 52 : Emcombrement stérique tel que présenté par Halperin et al (366).....	195
Figure 53 : Images correspondant à l'analyse d'un échantillon de sang dont le diagnostic est négatif (contrôles négatifs) sur les panels 1 (A) et 2 (B) pour le Pathodoc.	196
Figure 54 : Détermination des seuils du panel 2 : Exemple d' <i>Escherichia coli</i>	198
Figure 55 : Détermination d'un seuil d'intensité sur la sonde E. cloacae pour l'identification d' <i>Escherichia coli</i>	199
Figure 56 : Détermination des seuils pour les cibles identifiées par le panel 2.....	201
Figure 57 : Détermination des seuils du panel 3 : Exemple du gène de résistance bla _{NDM} 202	
Figure 58 : Exemple de seuils déterminés pour les cibles identifiées par le panel 3	206
Figure 59 : Exemple de signatures obtenues pour différents pathogènes cibles du panel 1 .	209
Figure 60 : Conservation des signatures des pathogènes selon la quantité d'ADN dans la PCR et les souches utilisées.....	210

Figure 61 : Utilisation de la méthode des signatures dans le cas d'infections polymicrobiennes	211
Figure 62 : Comparaison des signatures obtenues pour une même souche entre le Pathodoc et l'AXObot	212
Figure 63 : Exemple d'obtention des intensités relatives dans le cas d'Escherichia coli.....	215
Figure 64 : Intensités relatives sur les 50 sondes du panel 1 dans différentes conditions : Exemple de Staphylococcus aureus	217
Figure 65 : Distinction entre espèces cibles et espèces de validation avec les intervalles d'intensité : Exemple de Clostridium spp.	219
Figure 66 : Résumé du processus d'analyse des résultats avant rendu d'un diagnostic.....	230
Figure 67 : Variation de l'intensité des signaux sur les sondes suivant la quantité d'ADN incorporée dans la PCR.....	246
Figure 68 : Capacité de détection des pathogènes (panel 1 et 2).....	248
Figure 69 : Capacité de détection des gènes de résistance (panel 3).....	249
Figure 70 : Validation analytique des deux plateformes : Pathodoc et SelectNA plus/Pathorobot, thermocycleur, AXObot.....	254
Figure 71 : Capacité de détection observée pour les pathogènes testés lors de la validation analytique du Pathodoc	258
Figure 72 : Capacité de détection observée pour les gènes de résistance testés lors de la validation analytique du Pathodoc	259
Figure 73 : Capacité de détection observée pour les pathogènes testés lors de la validation analytique de la plateforme 1	265
Figure 74 : Capacité de détection observée pour les pathogènes testés lors de la validation analytique de la plateforme 1	266
Figure 75 : Validation préclinique de la plateforme haut-débit SelectNA plus, thermocycleur et AXObot.....	267
Figure 76 : Intensités détectées sur les sondes pour des pathogènes dont un volume inférieur de solution d'ADN a été introduit dans la PCR	286

Introduction générale

Au cours des dernières décennies, l'introduction des antibiotiques et de la vaccination combinée avec de meilleures prises en charge des patients et de meilleurs outils de diagnostic a entraîné une diminution significative des décès dû aux maladies infectieuses. Parmi les cas d'infection possibles, des bactéries peuvent se retrouver dans la circulation sanguine (bactériémie) et aboutir à des cas de sepsis. Le traitement de ces infections présente des difficultés avec l'émergence des cas de résistance aux antibiotiques. Il existe plusieurs tests de diagnostic sur le marché permettant l'identification des pathogènes et des gènes de résistance aux antibiotiques directement à partir d'échantillons de patients ou à partir d'hémoculture mais ceux-ci présentent plusieurs limitations.

La première partie de ce manuscrit portera sur les infections du sang et plus particulièrement sur les bactériémies, les cas de sepsis ainsi que les pathogènes impliqués. Puis, un récapitulatif des différentes familles d'antibiotiques et leurs modes d'actions sera effectué. Les mécanismes de résistance mis en place par les bactéries ainsi que la problématique de l'augmentation des résistances aux antibiotiques ces dernières années seront développés. Finalement, les tests de diagnostics utilisés en routine en clinique ainsi que les tests actuellement sur le marché permettant d'effectuer un diagnostic directement à partir d'échantillons de sang ou à partir d'hémoculture seront détaillés. Par la suite, les différentes étapes de développement de notre test de diagnostic seront détaillées. Dans un premier temps, les processus de conception des séquences des sondes et des amorces ainsi que les étapes d'optimisation des protocoles et la conception du logiciel d'analyse des données seront développés avant de finir par les performances du test et les conclusions générales de ce travail.

Chapitre 1 : Bactériémie, choc septique et diagnostic clinique

1. Infection bactérienne et bactériémie

1.1 L'homme vit au contact de bactéries

L'homme vit constamment entouré de bactéries, que ce soit dans son environnement proche ou directement à son contact avec par exemple des bactéries présentes sur sa peau ou dans son système digestif. Le tube digestif abrite de 10^{13} à 10^{14} micro-organismes, bactéries, virus et champignons non pathogènes qui constituent le microbiote intestinal (1). L'impact global de ces bactéries commensales sur l'organisme hôte n'est pas encore totalement connu. En plus du rôle du microbiote intestinal dans la formation de la barrière intestinale ou la maturation du système immunitaire (2), des études récentes ont montré une forte corrélation entre une dysbiose du microbiote intestinale, c'est à dire un dérèglement du microbiote intestinal et l'obésité (3), l'autisme et la dépression (4), ou encore le diabète de type 2 (5).

Des centaines d'espèces coexistent, ainsi que différentes souches au sein d'une même espèce, en raison des mutations qui apparaissent en réponse à des stimuli environnementaux, comme la compétition avec l'hôte, avec les autres bactéries par exemple ou l'exposition à des antibiotiques (6). Des souches, dans certaines conditions, peuvent également devenir pathogènes pour l'homme en traversant les barrières naturelles de l'organisme, ou en profitant d'un affaiblissement des défenses immunitaires. Ils sont alors appelés pathogènes opportunistes.

Parmi ces infections, l'infection bactérienne sanguine ou bactériémie est définie par la présence de micro-organismes viables dans le sang.

1.2 Bactériémie et choc septique

1.2.1 Il existe différents types de bactériémies

La présence de bactéries dans la circulation sanguine, appelée bactériémie transitoire, peut-être temporaire et peut se faire à travers une coupure par exemple ou lors du brossage des dents (7). Elle est sans conséquence pour l'homme si son système immunitaire parvient à

neutraliser ces bactéries. Cependant, ceci n'est pas toujours le cas et chez des personnes âgées ou immuno-déprimées, ces bactéries peuvent échapper au système immunitaire.

Certaines bactériémies peuvent être nosocomiales, et sont définies par une hémoculture positive à partir de prélèvements effectués plus de 48 heures après l'admission du patient à l'hôpital. Dans les cas contraires, elles sont dites d'acquisition communautaire. Elles sont principalement dues à la dissémination de bactéries à partir d'un foyer d'infection primaire comme cela est le cas pour l'endocardite (8). L'endothélium vasculaire est habituellement très résistant aux infections. Cependant, les lésions mécaniques de cet endothélium, par exemple en cas de circulation sanguine turbulente, peuvent entraîner une exposition de la matrice protéique extracellulaire sous-jacente et ainsi entraîner des inflammations locales sujettes à la colonisation bactérienne (9).

Les bactériémies peuvent être également acquises au sein des hôpitaux notamment suite à la réalisation d'actes médicaux invasifs, comme par exemple la pose de corps étrangers comme des cathéters (10). Dans une étude menée en France par l'Institut de veille Sanitaire en 2012, 33% des infections du sang recensées provenaient des voies veineuses centrales visant à cathétériser une veine de gros calibre (11).

1.2.2 Formation de biofilm

La contamination bactérienne de cathéter peut aboutir à la formation d'un biofilm dès 24 heures après l'insertion du dispositif. Un biofilm est un regroupement de micro-organismes adhérents entre eux et à une surface, et intégré dans une matrice extracellulaire protectrice. La formation du biofilm s'effectue en plusieurs étapes présentées dans la **figure 1**.

Dans un premier temps, suite à l'insertion du cathéter, la surface de celui-ci se recouvre d'un film composé de macromolécules organiques riches en protéines comme le fibrinogène et la thrombine (12). Ce film va favoriser la colonisation par des bactéries dites pionnières. Cette colonisation dépend également des caractéristiques physico-chimiques des surfaces comme la rugosité ou l'hydrophobicité (13) ainsi que la présence de molécules ou de structures particulières à la surface de la bactérie comme un flagelle ou des *fimbriae* (14). Les *fimbriae*

sont des *pilis* de petite taille, qui sont eux même des excroissances de la membrane externe et qui permettent aux bactéries de se mouvoir et d'adhérer à un substrat.

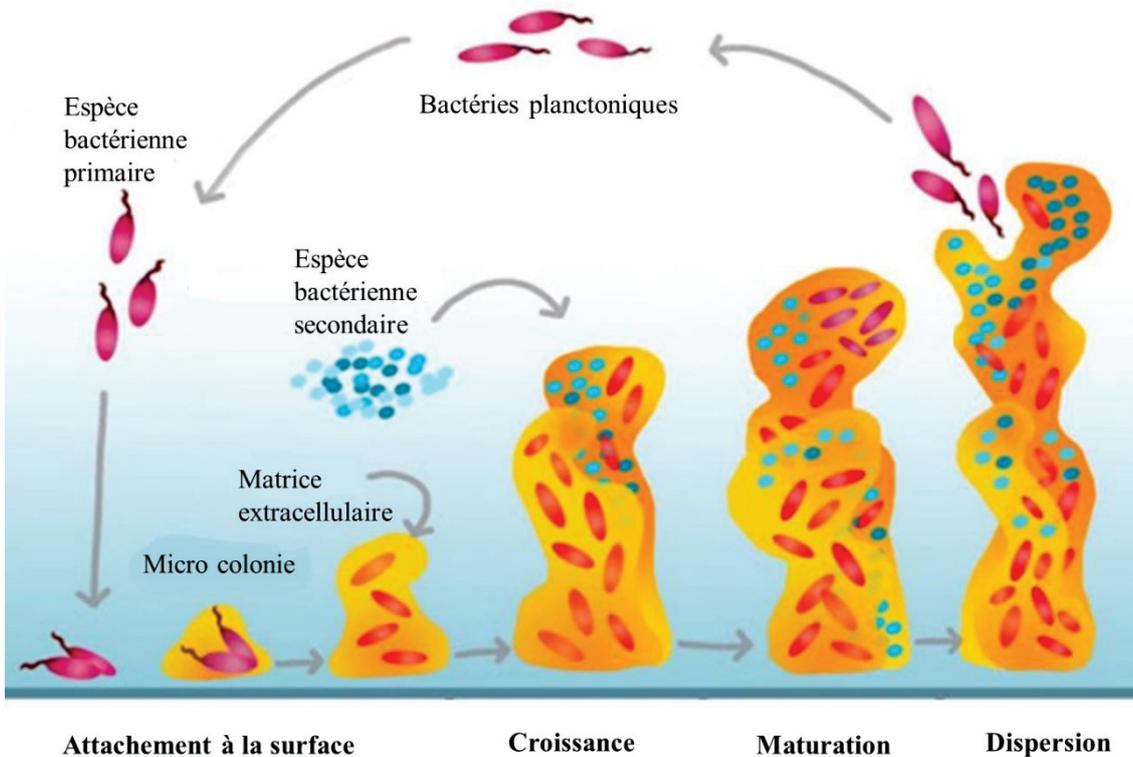


Figure 1 : Etapes de formation d'un biofilm, adapté de Tremblay et al. (15)

Ces bactéries pionnières vont favoriser l'arrivée d'autres bactéries en proposant des sites d'adhésions supplémentaires. Les bactéries se multiplient ensuite et produisent la matrice extracellulaire qui maintiendra la stabilité du biofilm et lui donnera sa forme tridimensionnelle. Cette matrice hydratée est constituée de polysaccharides, de protéines, d'ADN extracellulaire et de lipides (16,17) et varie selon les micro-organismes présents dans les biofilms mais aussi selon les forces de cisaillement subies, la température et la disponibilité des nutriments (15–17).

Lorsque le biofilm arrive à maturité, les bactéries issues du biofilm et sous formes planctoniques, peuvent se disperser et se propager dans le corps humain via le sang par exemple, entraînant un choc septique. La matrice extracellulaire protège également les micro-organismes contre les agressions extérieures comme les défenses immunitaires de l'hôte ou les antibiotiques

(17,18). Cet aspect, détaillé dans le chapitre suivant, rend le traitement des infections en lien avec des biofilms particulièrement difficile.

1.2.3 Pathophysiologie de la septicémie

L'issue potentiellement fatale de cette infection du sang, en moyenne dans 15 à 35% des cas, dépend pour beaucoup de son aggravation vers un état clinique appelé sepsis (19).

Lors d'une infection bactérienne, la réponse immunitaire fait intervenir des composants du système immunitaire inné comme les neutrophiles ou les macrophages, et le recrutement de cellules immunitaires circulantes comme les cellules dendritiques. Ces cellules reconnaissent des motifs bactériens conservés associés aux agents pathogènes (PAMP ou motifs moléculaires associés aux pathogènes) comme des lipopolysaccharides ou la flagelline, par l'intermédiaire de récepteurs à la surface de cellules immunitaires comme les macrophages (PRR ou récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires). Cette interaction entre PRR et PAMP initie une cascade de signalisation intracellulaire qui conduit à la production de cytokine, initiant ainsi la cascade immuno-inflammatoire (20,21). Cette libération très importante de cytokines est appelé choc cytokinique (21).

La libération de cytokines a pour effet d'induire l'inflammation et de recruter de nouvelles cellules immunitaires. Ce processus localisé est nécessaire pour lutter contre l'infection, mais en cas de sepsis, cette réponse inflammatoire est totalement dérégulée et peut conduire à deux issues : un excès de tissus endommagés lors de la phase pro-inflammatoire ou, une immunosuppression et une sensibilité augmentée pour des infections secondaires (22).

La septicémie se caractérise dans un premier temps par un état inflammatoire déclenché généralement par les agents pathogènes et qui a pour but l'élimination de ces mêmes pathogènes (23,24). Puis, après 24 à 48 heures, un état anti-inflammatoire, déclenché par l'hôte pour favoriser la réparation des tissus est observé (21,22). Lors de cet état, les patients développent des caractéristiques similaires à une immunosuppression. Cette phase est connue sous le nom d'immuno-paralysie, induite par la septicémie, c'est la source de la majorité des décès liés au choc septique (25).

Cependant, il semble que la septicémie soit plus complexe que la succession d'une phase inflammatoire et anti-inflammatoire. En effet, il semblerait qu'il y ait plutôt une présence simultanée de ces deux phases (20,25). Chez la plupart des patients immunocompétents, le commencement de la septicémie se caractérise par une prédominance de la phase pro-inflammatoire, suivie d'une phase d'immuno-paralysie. Mais, chez les patients immunodéprimés, la phase pro-inflammatoire peut être moins importante, voire absente, le commencement de la septicémie se traduisant alors directement par la phase d'immuno-paralysie (26).

1.2.4 Sepsis et choc septique

En 1992, la conférence de consensus de l'ACCP/SCCM (*American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine*), a proposé un cadre général pour définir la septicémie et la réponse systémique à l'infection en introduisant le concept du SIRS : le syndrome de réponse inflammatoire systémique. Il est caractérisé par la présence d'au moins deux des critères suivant : une température corporelle supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C, une fréquence cardiaque supérieure à 90 pulsations par minute, une pression artérielle en CO₂ inférieure à 32 mmHg (hypotension) ou une fréquence respiratoire supérieur à 20 mouvements respiratoires par minute et enfin une anomalie au niveau des globules blancs, dont le nombre est alors soit supérieur à 12000 /mm³ soit inférieur à 4000 /mm³, ou dont la population est composée pour plus de 10% de globules blancs immatures (27).

Lors de cette conférence, il a également été souligné que la présence de SIRS n'est pas propre à la septicémie, mais peut être observée dans de nombreux autres cas d'inflammation comme la pancréatite ou des lésions tissulaires (**figure 2**). Cependant, lorsqu'une infection est également mise en évidence, le diagnostic de sepsis associé à une bactériémie ou sepsis, plus générique est alors posé (27). Cette dénomination de sepsis remplace peu à peu le terme de septicémie.

Trois stades de gravité croissante sont ainsi définis : sepsis, sepsis sévère et choc septique. Le sepsis a été définie comme la présence des critères du SIRS présentés ci-dessus et d'une infection présumée ou prouvée. Le sepsis sévère est défini comme un sepsis accompagné

d'un dysfonctionnement d'au moins un organe et le choc septique comme un sepsis combiné à une hypotension artérielle persistante (pression artérielle systolique inférieure à 90 mmHg) et des signes d'hypoperfusion (diminution du débit sanguin) ou de dysfonctionnement d'organe persistant malgré une réhydratation (27).

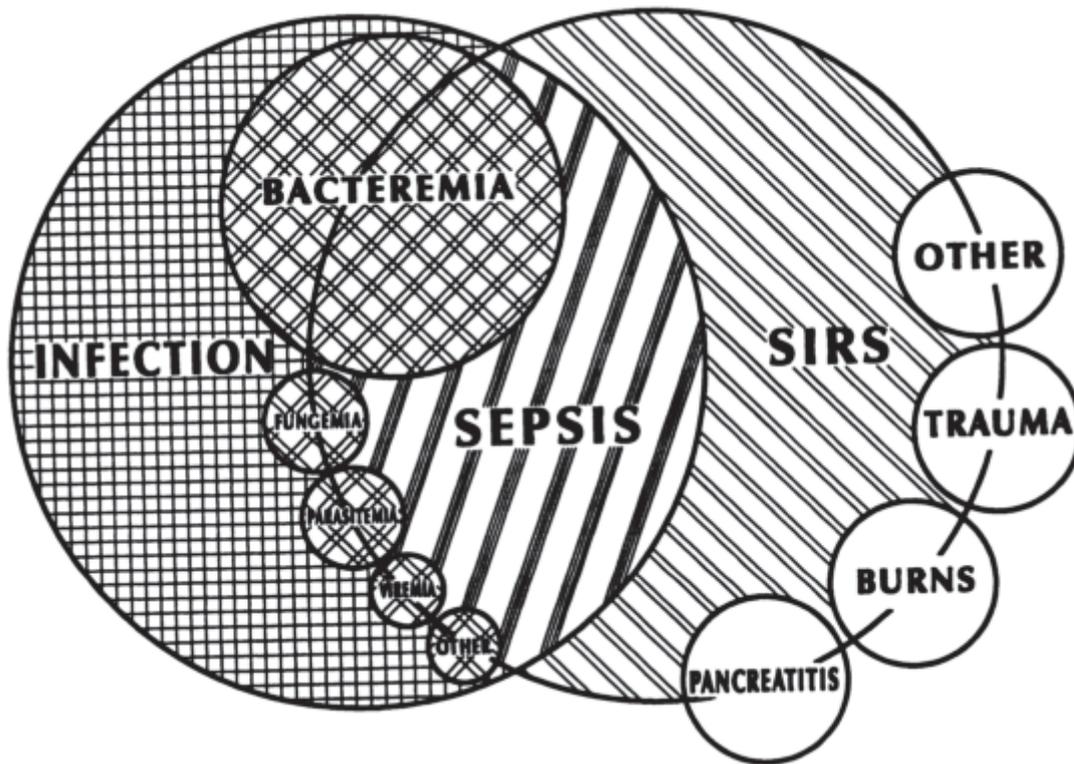


Figure 2 : Interrelation entre le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), la septicémie et une infection comme décrit en 1992, d'après Bone et al. (27)

En 2001, des critères supplémentaires caractérisant le SIRS ont été définis sans pour autant être uniquement applicable au sepsis (28). Puis en 2016, une nouvelle conférence s'est tenue et la définition du sepsis a été modifiée pour se rapprocher de la définition qui était au préalable utilisée uniquement pour les cas de sepsis sévère. Le sepsis se définit désormais comme l'association d'une infection, d'une réponse de l'hôte et du dysfonctionnement d'un organe (29).

Pour les patients présentant un sepsis présumé, il est préconisé d'administrer une antibiothérapie à large spectre, efficace contre la plupart des germes pouvant être la source de l'infection, dans l'heure suivant la suspicion (30). Puis, cette antibiothérapie est ajustée en fonction des résultats microbiologiques obtenus. Elle est administrée dès lors que les prélèvements pour mettre en évidence la présence d'un pathogène ont été effectués (30).

Il est en effet couramment admis que tout délai dans l'administration d'une antibiothérapie adaptée augmente la mortalité (31). Kumar et al. ont montré qu'une antibiothérapie inadaptée réduit d'un facteur 5 les chances de survie, dans le cas d'un choc septique (32). Ferrer et al., en cas de sepsis sévère ou de choc septique, ont montré, une augmentation linéaire du risque de mortalité en fonction du temps de retard dans l'administration d'un traitement antibiotique, pendant les 6 premières heures après identification (33).

1.2.5 Incidence et mortalité des bactériémies et du sepsis

La mortalité est de l'ordre de 10 à 20% au premier stade du sepsis, 20 à 50% en cas de sepsis sévère et 40 à 80% pour le choc septique (28). Ces dernières années cependant, une diminution des cas de mortalité a été observée dans les cas de sepsis les plus graves, avec notamment la mise en place de processus de soins groupés (34-36). L'incidence annuelle du sepsis sévère est de l'ordre de 1 à 300 cas pour 100 000 personnes (22,37). C'est une cause fréquente (2%) d'admission à l'hôpital et environ 50% requiert une hospitalisation aux services de soins intensifs (22). Les caractéristiques cliniques du sepsis sévère varient fortement en fonction de plusieurs facteurs notamment les caractéristiques du patient comme son âge, le site et la gravité de l'infection et l'évolution du sepsis avant traitement (22). Tous ces facteurs influencent la réponse du patient aux traitements administrés (38). Dans le cas des sepsis, les conséquences à long terme sont également présentes. Une étude a montré que les personnes âgées ayant survécu à un sepsis sévère sont jusqu'à trois fois plus susceptibles de développer des troubles cognitifs et des déficiences fonctionnelles par rapport aux témoins âgés n'ayant pas eu de sepsis (39).

Selon différentes études, les bactériémies sont 30 à 45% communautaires, 15 à 30% nosocomiales et 25 à 50% associées à des soins médicaux (40,41). L'incidence annuelle des bactériémies dans les pays occidentaux se situe entre 100 et 200 cas pour 100 000 personnes (41–43) et leur mortalité comprise entre 15 et 35% (40,41,44). Cependant, ces taux varient fortement selon l'âge des patients, avec un âge moyen des patients atteints de bactériémie de 65 ans (40,42). Il existe également une disparité notable entre les hommes et les femmes, les hommes représentant la majorité des patients bactériémiques (45,46).

Ces dernières années, une évolution des facteurs influençant cette maladie, a été observée au travers d'études épidémiologiques. Dans un premier temps, l'incidence du sepsis et le nombre de décès liés au sepsis ont augmenté, bien que le taux de mortalité global chez les patients atteints de sepsis soit en baisse (46). Ceci peut s'expliquer par une meilleure prise en charge des patients mais un vieillissement de la population qui présente notamment plus de comorbidités, c'est-à-dire la présence d'autres maladies qui s'ajoutent à la maladie principale (41,46). Une évolution ces dernières années des pathogènes détectés dans les cas d'infections du sang ou de sepsis a également été observée. Martin et Moss, dans une étude aux Etats-Unis entre 1979 et 2000 ont montré dans les cas de sepsis, une prédominance des bactéries Grams positives par rapport aux bactéries Grams négatives à partir de 1987 et une augmentation de près de 200% des sepsis dû à des champignons (46). Dans leurs études, entre 2003 et 2006, Anderson et al. ont montré que *Staphylococcus aureus* était la cause la plus fréquente des infections du sang d'origine communautaire dans six centres aux Etats-Unis alors qu'avant 2000, c'était *Escherichia coli* (40). En Europe, c'est *Escherichia coli* qui est prédominante par rapport à *Staphylococcus aureus* (42,47).

1.3 Pathogènes impliqués dans les infections du sang

En cas de bactériémie, la fréquence d'identification des organismes Gram positifs a augmenté ces dernières années et ils sont maintenant presque aussi présents que les infections dues à des organismes Gram négatifs (46,48,49). Le type de micro-organisme à l'origine du sepsis est important dans l'issue de la maladie. Une méta-analyse de 510 études a révélé que les sepsis occasionnés par des bactéries Gram négatives étaient associés à une mortalité plus élevée que ceux occasionnés par des bactéries Gram positives (50).

Les bactéries Gram négatives rencontrées dans les cas de bactériémie sont principalement des *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.* et *Enterobacter spp.* Les pathogènes à Gram positifs associés sont essentiellement des *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.* et *Staphylococcus spp.*, en particulier *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline. Le **tableau 1** présente un exemple des micro-organismes observés pour tout type de bactériémie, suite à des hémocultures effectuées à différentes périodes et au sein de deux pays, le Danemark et l'Angleterre. Bien que les infections bactériennes restent la principale cause de sepsis, les virus et les champignons peuvent également être impliqués en particulier chez les patients immunodéprimés (51).

Les pathogènes identifiés dans le cas de bactériémie varient selon les études. Par exemple, May et al. ont identifié *Staphylococcus aureus* (20,5%) et *Pseudomonas aeruginosa* (20%) comme pathogènes prédominants aux Etats-Unis ainsi qu'une forte proportion de champignon (19%) dont les *Candida*, responsables de 17% des sepsis (52).

Des infections polymicrobiennes, c'est-à-dire des infections associées à deux micro-organismes ou plus peuvent être également présentes. Entre 4 et 25,2% des infections dans le sang sont polymicrobiennes (19,40,41,53,54). Le taux de mortalité est généralement plus important dans le cas d'infections polymicrobiennes, mais dépend des micro-organismes impliqués (55–57). Wang et al. ont montré que dans le cas d'infections polymicrobiennes avec *Acinetobacter baumannii*, le taux de mortalité à quatorze jours était de 71,4% lorsque ce pathogène est associé à *Escherichia coli*, 50% à *Pseudomonas aeruginosa* et 37,5% à des bactéries du genre *Enterobacter spp.* (57).

Tableau 1 : Exemple de micro-organismes isolés à partir d'hémocultures pour tout type de bactériémie en Angleterre et pour des bactériémies d'acquisition communautaire ou associées aux soins au Danemark

	Danemark, bactériémie d'acquisition communautaire (%) (41)			Danemark, bactériémie associée aux soins (%) (41)			Angleterre, toutes bactériémies (%) (42)	
	2000-2002	2003-2005	2006-2008	2000-2002	2003-2005	2006-2008	2004	2008
Gram négatif								
<i>E.coli</i>	32,4	34,0	33,5	29,0	29,2	28,6	18,8	23,3
<i>Enterobacter spp.</i>	0,8	0,9	1,9	2,7	2,8	2,6	2,4	2,3
<i>Klebsiella spp.</i>	3,6	6,2	6,1	6,7	7,3	6,6	5,6	6,0
<i>P.aeruginosa</i>	0,7	0,9	1,1	2,4	1,7	6,1	-	-
Autre Gram négatif	8,8	8,3	9,7	8,3	9,0	9,8	6,1	6,4
Gram positif								
<i>S.aureus</i>	8,8	9,8	8,1	16,8	12,7	15,7	17,0	12,1
<i>CoNS</i>	13,8	8,3	6,9	12,6	7,1	6,5	13,5	14,2
<i>S.pneumoniae</i>	15,2	15,8	13,0	6,6	8,7	6,8	5,4	4,8
<i>Enterococcus spp.</i>	1,1	1,9	3,1	2,0	2,6	4,1	8,1	6,3
Autre Gram positif	8,8	8,3	10,3	6,9	11,1	5,5	4,0	4,1
Champignon	0,3	0,5	0,7	1,2	0,0	0,6	-	-
Infections polymicrobiennes	5,9	5,1	5,7	4,9	7,9	7,1	-	-
Autre pathogènes	-	-	-	-	-	-	19,1	19,9

Parmi les pathogènes rencontrés dans les cas de bactériémies, six pathogènes : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*, connu également sous le terme ESKAPE, présentent un nombre croissant de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques (58). Une étude menée par Marturano et al. aux Etats -Unis a montré que les agents pathogènes ESKAPE constituent près de la moitié des espèces dans les infections du sang et sont associés à des durées de séjour, des coûts liés aux soins et à une mortalité plus élevés (59).

Les mécanismes de résistances aux antibiotiques seront évoqués dans le **chapitre 2**.

2 Méthode de diagnostic actuelle utilisée en clinique pour l'identification des pathogènes

2.1 Réalisation d'enrichissement bactérien : Hémoculture

Le nombre de bactéries dans le sang, même en cas de bactériémie avérée, est très faible et inférieur à 10 UFC/ml (60) et souvent même inférieur à 1 UFC/ml (61,62). Une phase d'enrichissement des micro-organismes à partir de l'échantillon sanguin est donc réalisée afin d'augmenter le nombre de bactéries disponibles notamment pour la réalisation des tests phénotypiques. Actuellement, la méthode de référence utilisée pour le diagnostic des infections du sang repose sur l'hémoculture.

2.1.1 Caractéristiques des prélèvements de sang effectués

Plusieurs prélèvements ou paires d'hémocultures d'au minimum 20 ml de sang sont dilués dans des milieux d'hémocultures (anaérobie et aérobie) et incubés un à plusieurs jours. Le volume de sang prélevé est associé à la probabilité de détecter un patient atteint de bactériémie. En effet, en cas d'endocardite par exemple, une charge en micro-organismes plus élevée est présente dans le sang et les hémocultures seront positives même si de petits volumes de sang sont prélevés pour la culture. Cependant, avec la plupart des autres infections, des charges en micro-organismes plus faibles sont présentes et des volumes plus importants de sang sont nécessaires pour augmenter la probabilité de détection (63). La sensibilité de l'hémoculture est directement dépendante du volume de sang prélevé et mis en culture.

Deux études ont montré, en examinant plusieurs prélèvements de sang sur 24 heures, que parmi les patients présentant une bactériémie, environ 70% présentaient des cultures positives après le premier prélèvement, 85% après le deuxième, 97% après le troisième et plus de 99% après le quatrième (64,65). Le sang peut être prélevé en une seule fois où réparti en plusieurs fois, le taux de bactérie présent dans le sang ne variant pas suivant le moment du prélèvement. Li et al. ont en effet démontré qu'aucune différence dans le rendement des hémocultures ne pouvait être observée, que les échantillons soient collectés dans un délai de 24 heures, simultanément ou séparément (66). Prélever le sang nécessaire à un test efficace en seule fois semble une bonne stratégie afin de limiter les possibilités de contamination,

cependant il peut être difficile de prélever un très grand volume de sang (au moins 40 ml) en une seule fois, surtout chez les personnes âgées (67).

Les échantillons de sang sont souvent prélevés par ponction veineuse périphérique qui présente des taux de contaminations moins importants (1 à 7%) que lors de l'utilisation de cathéter intraveineux (3 à 13%) (68). Afin de limiter les contaminations, il est notamment conseillé de désinfecter le haut des bouteilles pour les hémocultures. De plus, la source la plus fréquente de contamination est la peau du patient, au niveau du site où le sang sera obtenu. Même si l'endroit du prélèvement est désinfecté, celui-ci n'est pas totalement stérile. Selwyn et Hellis ont montré qu'environ 20% des bactéries cutanées se trouvent dans les couches profondes de la peau et sont protégées par les follicules, des crevasses ou des lipides (69).

Deux hémocultures positives sont souvent demandées dans le cas de pathogènes considérés comme des contaminants courants, comme *Staphylococcus epidermidis* présent sur la peau, afin de confirmer la réelle présence de ce pathogène dans le sang. Ceci permet d'éviter d'attribuer l'étiologie à un pathogène non présent dans le sang et ainsi éviter les conséquences pour le patient de l'administration d'un mauvais traitement antibiotique (70).

Finalement, dans la mesure du possible, le prélèvement sanguin devra être réalisé avant toute administration d'antibiotiques afin d'éviter l'inhibition de la croissance des micro-organismes mis en culture par ceux-ci (71).

2.1.2 Déroulé de l'hémoculture

Il existe de nombreuses procédures possibles pour réaliser les hémocultures. Cependant, la plupart des laboratoires utilisent des systèmes d'incubation et de détection automatisés en raison de leur plus grande efficacité et de leur faible risque de contamination. Ces automates fonctionnent avec différents milieux de cultures notamment pour les bactéries anaérobies. Généralement, une hémoculture différente est réalisée pour les bactéries aérobies et pour les bactéries anaérobies.

Trois systèmes sont représentés en majorité : BD Bactec™ (Becton Dickinson, Etats-Unis), BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, France) et VersaTREK® (TREK Diagnostic Systems, Etats-Unis). Ces trois automates présentent des différences au niveau de la détection de la croissance des micro-organismes. Le BacT/ALERT® 3D utilise un capteur colorimétrique dont la couleur passe du gris au jaune en présence du CO₂ produit par les micro-organismes en croissance (**figure 3**). Le BD Bactec™ possède un capteur qui, toutes les dix minutes, détecte une augmentation de la fluorescence proportionnelle à la quantité de CO₂ présent. Et finalement, le VersaTREK mesure les changements de pression dans le flacon induit par la production de gaz par les micro-organismes (72). Généralement, une température de 35°C à 37°C est utilisée (73).

Des différences sont observées au niveau des performances de ces trois automates (72). Fiori et al. ont par exemple démontré que le BD BACTEC possédait un meilleur taux d'identification pour les bactéries Gram négatives, tandis que le BacT/ALERT® 3D présente un meilleur taux de détection des bactéries Gram positives (74).



Figure 3 : A : BacT ALERT 3D, B: Bouteille d'hémoculture du BacT ALERT 3D et C : Changement de couleur du capteur lors d'une modification du pH (75)

L'incubation est rarement prolongée au-delà de cinq jours sauf en cas de suspicion d'une infection du sang provoquée par un micro-organisme à croissance lente comme les champignons (62). Les pathogènes les plus fréquents sont pour la plupart du temps détectés entre 12 et 36 heures (76)

2.2 Identification des bactéries

Lorsqu'une bouteille en hémoculture est positive, une coloration de Gram est effectuée, puis les surnageants sont étalés sur milieu solide et mis en culture afin d'obtenir des colonies bactériennes individualisées après 24 heures, voir 48 heures pour les tests de sensibilité aux antibiotiques. Ces tests de sensibilité seront détaillés dans le **chapitre 2**.

2.2.1 Coloration de Gram

La coloration de Gram repose sur une composition différente de la paroi bactérienne, Les bactéries sont récupérées puis fixées sur une lame de microscope. Ce frottis est ensuite coloré avec du violet de gentiane ou du cristal violet. Ce colorant se fixe sur les composés cytoplasmiques de toutes les bactéries. Puis un rinçage à l'alcool est effectué qui permet de décolorer les bactéries Gram négatives, dont la paroi pauvre en peptidoglycane est perméable à l'alcool (**figure 4**). Les bactéries Gram positives quant à elles, conservent la coloration violette acquise précédemment du fait de l'épaisse paroi de peptidoglycane qui les entoure. Une nouvelle coloration par la fuscine ou la safranine peut être réalisée afin de faciliter l'observation des bactéries Gram négatif qui apparaissent alors roses (77).

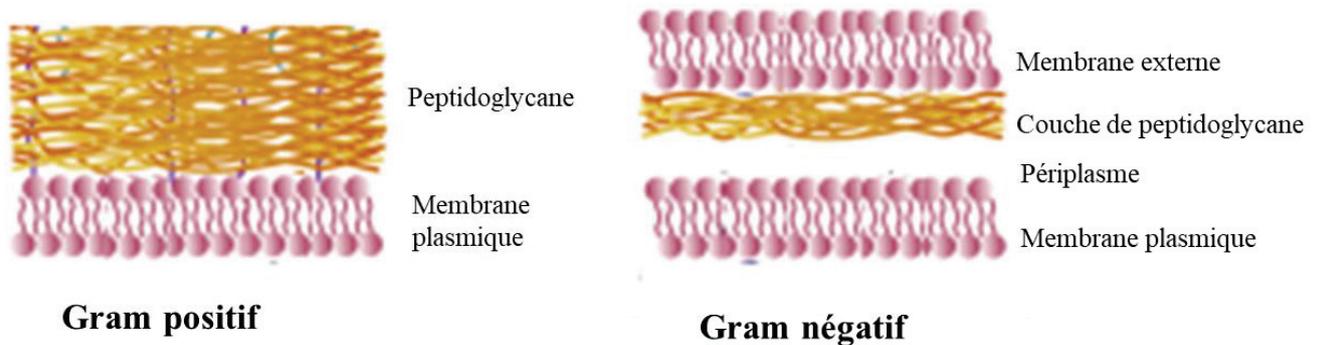


Figure 4 : Composition de la paroi bactérienne des bactéries Gram positives et Gram négatives, adapté de Pajerski et al. (78)

La morphologie des bactéries est également observée au microscope. Ces observations permettent d'éliminer d'éventuels faux-positifs en confirmant la présence de bactéries et apportent un premier niveau d'identification qui permet d'ajuster l'antibiothérapie donnée aux patients.

2.2.2 Culture sur milieu solide puis identification

En cas de croissance sur milieu solide, une identification bactérienne peut être effectuée. Celle-ci peut être réalisée à l'aide de méthodes phénotypiques qui reposent le plus souvent sur des tests biochimiques comme des tests de fermentation, des tests enzymatiques ou la capacité à croître en présence de substrats particuliers. Ces tests étaient initialement unitaires, puis ont été inclus dans des galeries miniaturisées comme les galeries API (bioMérieux, France). Ces tests peuvent être maintenant réalisés au moyen de systèmes automatisés tels que le Vitek[®] 2 (BioMérieux, France), MicroScan WalkAway[®] (Beckman Coulter, Etats-Unis) ou le BD Phoenix[™] (Becton Dickinson, Etats-Unis) et permettent de connaître le genre et l'espèce bactérienne de l'isolat (**figure 5**). Ils sont également associés à un logiciel permettant la comparaison des résultats avec une base de données intégrée (79).

Les cartes d'identification bactérienne sont séparées des cartes d'antibiogrammes sur le système Vitek[®] 2. Cependant, les plaques du MicroScan[®] ou les galeries du Phoenix existent sous 3 formats : identifications seules, antibiogrammes seuls ou identification et antibiogramme inclus dans le même support. Ces cartes sontensemencées de manière automatique, sauf pour le MicroScan[®], puis, incubées dans l'étuve interne des automates à une température de 35°C à 37°C et pour une durée variable de 2 à 6 heures (79).

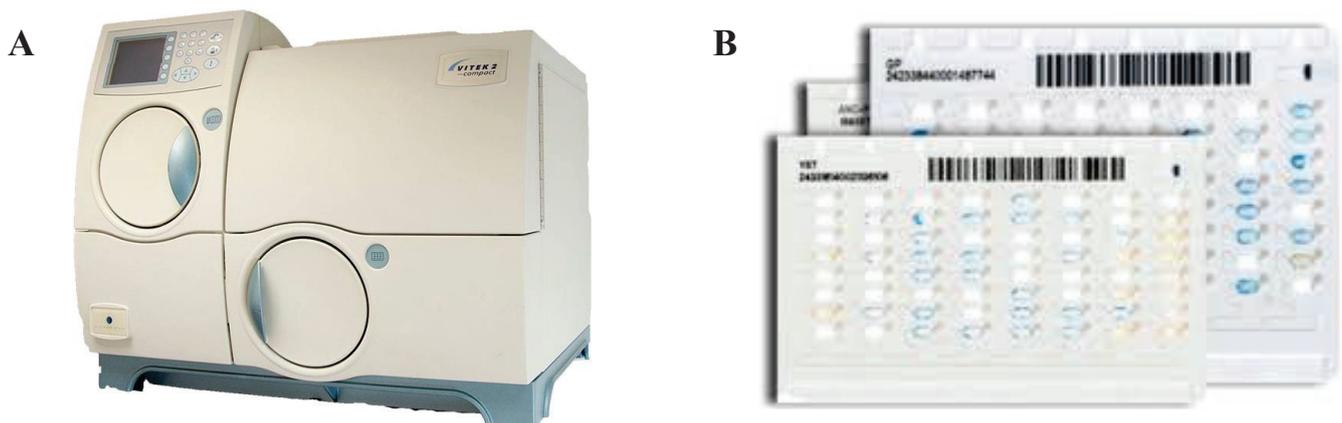


Figure 5 : A : Vitek[®] 2 BioMérieux et B : Carte d'identification du Vitek[®] 2

2.3 Limitations

Différentes limitations des méthodes de diagnostic présentées ci-dessus peuvent être observées.

Tout d'abord, environ la moitié des patients présentant une infection du sang ne sont pas positifs par hémoculture. Plusieurs raisons peuvent être évoquées : des organismes qui sont difficiles à cultiver ou la prise d'un traitement antibiotique avant la prise de sang (80,81). Les organismes difficiles à cultiver requièrent souvent des nutriments spéciaux dans les milieux de culture et présentent une croissance très lente comme *Mycobacterium spp.* (minimum 4 semaines) (82). Le taux de contamination des échantillons ne devrait pas dépasser 3%, cependant, des taux supérieurs à 6% ou plus sont régulièrement observés (83–85).

De plus, les bouteilles contenant les milieux pour l'hémoculture doivent contenir 8 à 10 ml de sang selon les recommandations du fabricant. Cependant, les prélèvements sanguins sur les patients peuvent être inférieurs à 20 ml et ces bouteilles sont souvent insuffisamment remplies (86). Ces bouteilles peuvent être aussi, dans des cas plus rares sur remplies avec un volume supérieur à 10 ml. Lamy et al. ont recensé les pourcentages de bouteilles sous ou sur remplies présentées dans différentes publications (**tableau 2**) et mis en évidence que ce problème touchait plusieurs pays dans le monde (86).

Tableau 2 : Pourcentage de bouteilles sous et sur remplies détectées dans plusieurs pays, adapté de Lamy et al. (86)

Pour la Corée du sud, 97,9% des bouteilles ont un volume inférieur à 8 ml dont 39,8% inférieur à 3 ml.

Pays	Bouteilles sous remplies		Bouteilles sur remplies		Référence
	Seuil (ml)	Pourcentage (%)	Seuil (ml)	Pourcentage (%)	
France	<8	65	>10	13	(87)
Belgique	<8	26,2-36	>12	7,6-12,8	(85)
Pays bas	<8	55,3	-	-	(88)
Belgique	<8	28	>12	23,02	(89)
Corée du sud	<8	97,9	>10	0,3	(90)
	<3	39,8	-	-	
Taiwan	<7	28,3	>10	13,3	(91)
Etats-Unis	<5	20	-	-	(92)

Un volume insuffisant, comme vu précédemment peut entraîner des faux négatifs. A l'inverse, un volume trop important peut donner lieu à des faux positifs (93). De plus, un seul prélèvement sanguin est souvent effectué et le volume sanguin trop faible ne permet alors pas de répéter les résultats dans le cas de résultats négatifs ou de présence de pathogènes contaminants (94).

Et finalement, une autre limite concerne le temps de rendu des résultats. Environ 24 heures sont nécessaires pour obtenir une hémoculture positive, 24 heures supplémentaires pour la croissance sur milieu solide des bactéries et finalement environ 24 heures de plus pour la réalisation des tests de susceptibilité.

Chapitre 2 : Antibiotiques et résistance aux antibiotiques

1 Origine des antibiotiques

1.1 Pré « ère des antibiotiques modernes »

Les hommes ont été exposés aux antibiotiques bien avant leurs utilisations actuelles. Des traces de tétracycline, par exemple ont été trouvées dans des restes de squelettes humains de Nubie soudanaise datant de 350 à 550 avant J.-C. Cette présence ne peut s'expliquer que par une exposition à des composés contenant de la tétracycline, via leurs régimes alimentaires comme la consommation de grains fermentés, contaminés par plusieurs espèces de *Streptomyces* (95). La présence de la tétracycline dans ces populations aurait peut-être eu un effet protecteur, le taux de maladies infectieuses comme l'ostéomyélite, documenté dans cette région était faible par rapport à d'autres populations, à cette même époque (96,97).

1.2 « Ère des antibiotiques modernes »

1.2.1 Découverte des premiers antibiotiques

Le commencement de « l'ère des antibiotiques modernes » est souvent associé aux noms de Paul Ehrlich et Alexander Fleming. Paul Ehrlich a recherché des colorants ayant une affinité spécifique pour les bactéries mais pas pour les tissus humains ou animaux, puis il a essayé de trouver des substances toxiques, comme l'arsenic, avec ces mêmes propriétés discriminatoires afin de cibler les maladies infectieuses et tuer les micro-organismes responsables (98). En 1909, et suite aux travaux de Fritz Schaudinn et Eric Hoffmann qui ont identifié la bactérie responsable de la syphilis : *Treponema pallidum*, il trouve avec son équipe un antibiotique contre la syphilis, une maladie qui était endémique et presque incurable à ce moment-là (99,100).

Alexander Fleming quant à lui a accidentellement découvert la pénicilline en 1928 lorsqu'à son retour de vacances, il a remarqué qu'un champignon, *Penicillium notatum*, avait contaminé une plaque de culture de bactéries du genre *Staphylococcus spp.* et que le champignon avait créé des zones exemptes de bactéries aux endroits où il avait poussé sur la plaque (101). En 1940, une équipe d'Oxford dirigée par Howard Florey et Ernest Chain a publié un protocole permettant la purification de quantité de pénicilline suffisante pour des tests

cliniques, protocole qui conduira à la production et à la distribution en masse de pénicilline en 1945 (102).

Le mot antibiotique a cependant été utilisé pour la première fois dans les années 1940 par Selman Waksman. Il a découvert de très nombreux antibiotiques comme l'actinomycine, la streptothricine, la fumigacine, la clavacine et la streptomycine en exploitant la capacité des bactéries à produire leurs propres antibiotiques (99). En 1937, Selman Waksman remarque que des bactéries du sol, les *Actinomycètes*, inhibent la croissance d'autres bactéries, et que les mécanismes mis en œuvre pourraient servir de base pour une plateforme de dépistage (identifiée sous le nom plateforme de Waksman) des organismes producteurs d'antibiotique (103).

Il a défini le terme antibiotique comme suit: «Un antibiotique est une substance chimique, produite par des micro-organismes, qui a la capacité d'inhiber la croissance et voir de détruire des bactéries et autres micro-organismes » (104). Aujourd'hui, à cette définition se sont rajoutées deux autres significations c'est-à-dire (I) un produit chimique organique d'origine naturelle ou synthétique qui inhibe ou tue les bactéries pathogènes; (II) toute substances antimicrobiennes (105).

1.2.2 D'un contrôle des infections au développement des résistances aux antibiotiques

L'apport des médicaments, associé à des avancées dans les techniques aseptiques, a joué un rôle très important dans la lutte contre les infections. En effet, <1% des décès en Angleterre étaient dus à des maladies infectieuses en 1945, contre environ 25% en 1900 (106). La plupart des classes d'antibiotiques utilisées aujourd'hui ont été identifiées dans les années 1940-1960 (**figure 6**) et il était admis à l'époque que les maladies infectieuses seraient bientôt un « problème de santé publique contrôlé » (99).

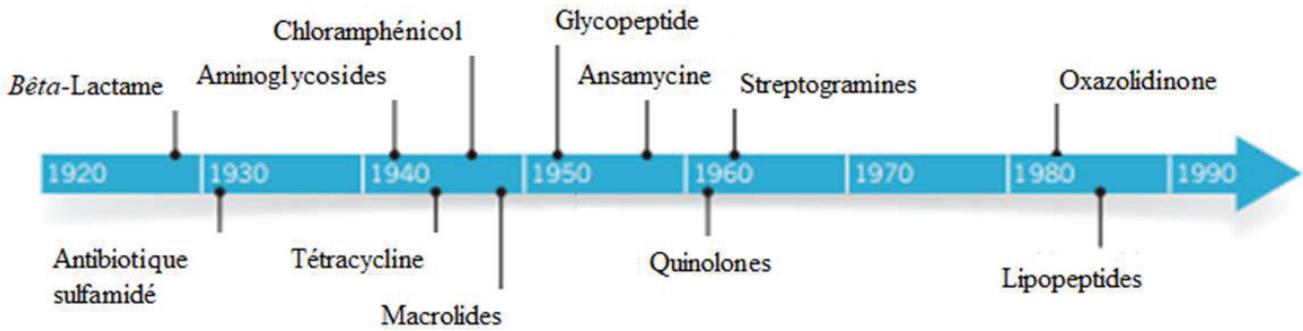


Figure 6 : Frise chronologique de la découverte des familles d'antibiotique, adaptée de Lewis (103)

Depuis, très peu de nouveaux d'antibiotiques ont été découverts. En effet, depuis ces cinquante dernières années, seul deux classes d'antibiotiques, les oxazolidinones (avec le linézolide par exemple) et les lipopeptides, (avec la daptomycine par exemple) ont été découvertes et mises sur le marché (107).

Ceci s'explique en partie par un désintérêt des grandes entreprises pharmaceutiques dans la recherche de nouveaux médicaments. En effet, les compagnies investissent des sommes conséquentes en plus de nombreuses années de travail pour découvrir et développer de nouveaux médicaments. Payne et al. en utilisant des statistiques fournies par le CRIS (*Center for Innovation in Regulatory Science*) ont estimé à 14 ans le temps nécessaire pour la mise sur le marché d'un antibiotique (108). Il est également estimé à 200 millions de dollars la somme nécessaire pour qu'une nouvelle molécule atteigne les étapes de commercialisation, avec le risque que cet antibiotique reste peu commercialisé du fait de l'apparition rapide de résistances ou au contraire, dû à son efficacité et son utilisation comme antibiotique de dernier recours, afin de limiter l'apparition des résistances (109).

En parallèle, la taille du marché est restée stable malgré les prévisions de croissance de celui-ci. Très peu d'antibiotiques potentiels ont également atteint le stade du développement clinique et l'approbation de mise sur le marché des médicaments devient de plus en plus difficile (110). En effet, il est demandé une très grande polyvalence aux antibiotiques comparé à d'autres médicaments. Ceux-ci doivent pouvoir cibler de nombreuses espèces bactériennes, localisées dans différents parties du corps humain, tout en étant non toxique pour l'homme et avec un risque minimum que des résistances apparaissent rapidement (107).

2 Mécanismes d'actions des antibiotiques

Les antibiotiques sont généralement qualifiés de bactéricides lorsqu'ils tuent les bactéries, ou bactériostatique (comme les tétracyclines, le triméthoprimine ou les macrolides) quand ils inhibent leur croissance sans les tuer.

2.1 Existence de différents types d'antibiotiques

Historiquement, la plupart des antibiotiques découverts sont produits par des bactéries provenant du sol, comme les *Actinomycètes* étudiés avec la plateforme de Walkman, et sont le résultat évolutif de pressions sélectives. Cependant, l'efficacité des antibiotiques, leurs stabilités chimiques ou l'innocuité thérapeutique ne sont pas toujours adéquat pour une utilisation en clinique et peuvent souvent être améliorées par semi-synthèse (99).

2.1.1 Antibiotiques semi-synthétiques

Les antibiotiques semi-synthétiques sont des antibiotiques obtenus par transformation chimique de composés naturels. Ces transformations permettent notamment d'améliorer l'efficacité thérapeutique ou la réduction des effets secondaires. Par exemple, la semi-synthèse des céphalosporines a permis de réduire l'incidence des effets secondaires, et a permis de fournir un site supplémentaire pour des modifications chimiques. La céphalosporine C a d'abord été identifiée comme un métabolite de *Cephalosporium acremonium* en 1948, puis, l'acide 7-ACA (acide 7-aminocephalosporanique), précurseur de nombreuses céphalosporines semi-synthétiques présentées dans la **figure 7**, a été obtenu à partir de son hydrolyse en conditions acides (111).

Ces transformations ont également permis d'aboutir à la synthèse de nouveaux antibiotiques, qui plus tard ont été découvert comme déjà existants dans la nature. C'est le cas de la semi-synthèse de la tétracycline en 1953, obtenu à partir de l'hydrogénolyse catalytique de la chlorotétracycline (découverte en 1948), et dont des traces ont été découvertes dans les squelettes humains de Nubie soudanaise (112).

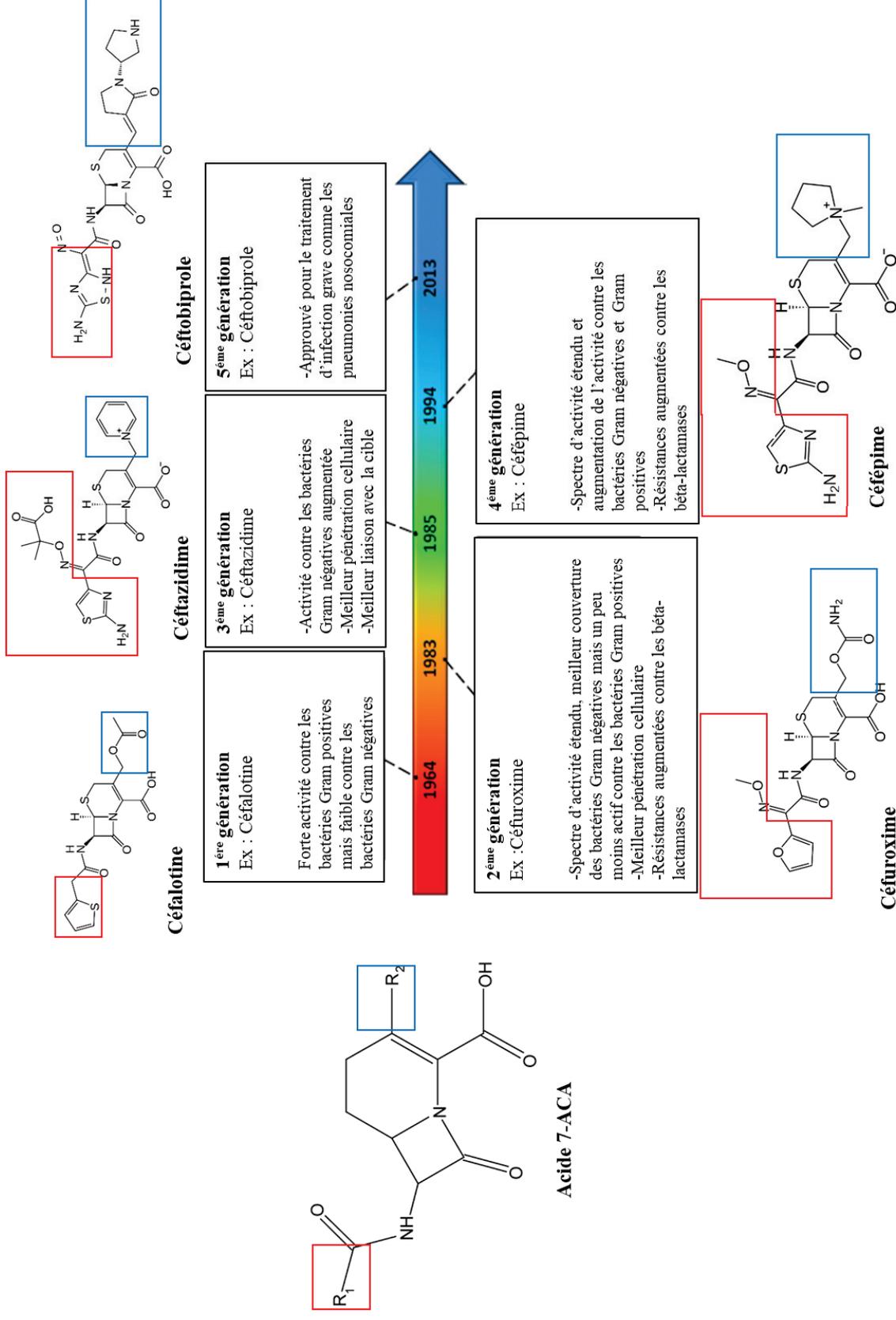


Figure 7 : Caractéristiques des générations de céphalosporines obtenues par addition de différents molécules à l'acide 7-ACA, adapté de Ribeiro da Cunha et al. (99)

2.1.2 Antibiotiques synthétiques

Les antibiotiques synthétiques sont entièrement produits par des procédés industriels de synthèse chimique. La famille d'antibiotiques des quinolones, par exemple, a été découverte de façon inattendue. En effet, le premier représentant de cette classe, le 1,8-naphthyridone a été obtenu en tant que sous-produit lors de la synthèse d'un antipaludique, la chloroquine, dans les années 1960 (113). La structure des quinolones a été adaptée selon les besoins cliniques et s'est développée selon deux voies parallèles : les naphthyridones (avec le noyau naphthyridine d'origine du 1,8-naphthyridone) et les fluoroquinolones, qui possède un atome de fluor en position 6 et pour lesquelles un atome de carbone remplace un atome d'azote en position 8 du noyau naphthyridine (**figure 8**) (114). Les quinolones font parties des familles d'antibiotiques les plus prescrites (115).

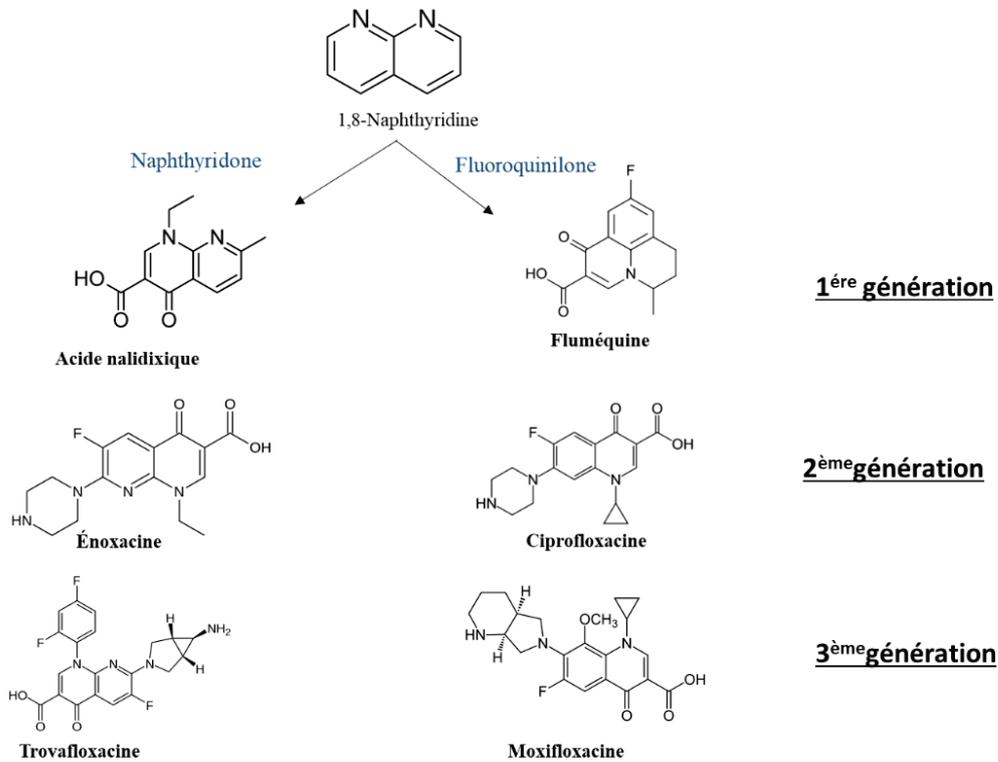


Figure 8 : Différents composés de la famille des quinolones, issus du 1,8-naphthyridone

2.2 Mécanismes d'action des différentes classes d'antibiotiques

Les antibiotiques ciblent des fonctions essentielles à la croissance des bactéries, et agissent par exemple en inhibant des voies métaboliques ou en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire, la synthèse des acides nucléiques ou la synthèse des protéines.

2.2.1 Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques

Les quinolones, famille d'antibiotiques synthétiques dont le premier membre a été découvert en 1962, ciblent l'ADN gyrase et la topoisomérase IV en se liant à des domaines spécifiques afin de stabiliser le complexe ADN-enzyme bloquant ainsi la réplication de l'ADN (116).

La rifampicine est une molécule à large spectre qui appartient à la famille des ansamycines et qui inhibe la transcription au niveau de son initiation par blocage de l'ARN polymérase ADN dépendante (117).

2.2.2 Inhibition de la synthèse des protéines

Le ribosome permet de traduire l'ARN messager (ARNm) en séquence polypeptidique pour la synthèse des protéines de la cellule. Les ribosomes bactériens 70S sont composés de deux sous-unités, une petite sous-unité 30S et une grande sous-unité 50S (**figure 9**). Plusieurs classes d'antibiotiques ciblent la synthèse des protéines par le ribosome bactérien.

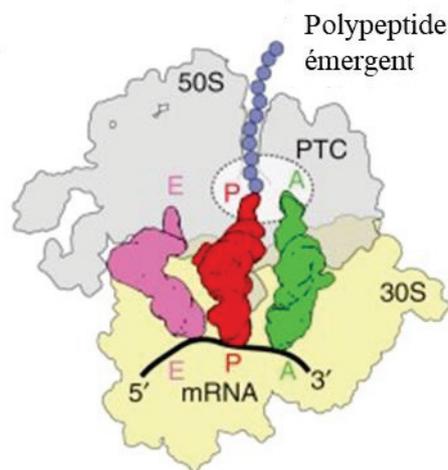


Figure 9 : Représentation schématique du ribosome procaryote 70S lié à trois ARN de transfert (ARNt), adapté d'Arenz et Wilson (118)

Le ribosome est constitué de deux sous-unités, la sous-unité 30S (jaune), la sous-unité 50S (grise). Il y a trois sites de liaisons aux ARNt appelés : Site A (ARNt dans le site A en vert), site P (rouge) et site E (rose). Le site A lie l'ARNt aminoacylé (portant un acide aminé estérifié), le site P est occupé par l'ARNt portant le polypeptide pendant l'élongation ou l'ARNt initiateur lors de l'initiation, alors que le site E est le site de sortie ou se lie seul ARNt désacylé ou non chargé sortant. Le ribosome porte également un centre de décodage (CD) situé dans le site A qui veille à l'exactitude des interactions entre l'anti-codon de l'ARNt et le codon de l'ARNm et le centre de peptidyltransférase (PTC) qui catalyse le processus de formation des liaisons peptidiques.

Les macrolides, dont les premiers membres ont été découverts à la fin des années 1940, début des années 1950, sont une famille d'antibiotiques à large spectre (bien que l'activité contre les bactéries à Gram négatif soit limitée) qui se lient à la grande sous-unité 50S au niveau du tunnel de sortie du peptide néosynthétisé (119). Les antibiotiques d'origine synthétique comme les oxazolidinones, développés au début des années 1980, se lient également à la sous-unité 50S (120), comme le chloramphénicol, isolé en 1947. Cependant, ce dernier est rarement prescrit à cause de problèmes de toxicité, entraînant notamment des problèmes d'anémie et d'anémie aplasique (destruction des cellules précurseurs dans la moelle osseuse) (121).

Les tétracyclines, famille d'antibiotiques à large spectre découverte en 1948, se lient à la petite sous-unité 30S et bloquent stériquement la reconnaissance du codon d'initiation de l'ARNm par l'anticodon de l'ARN chargé (122).

Les aminoglycosides ont été parmi les premiers antibiotiques découverts et utilisés en clinique. Ce sont des antibiotiques à large spectre qui se lient au site A de la sous-unité 30S permettant à des ARNt non reconnus de se lier et conduisant à une mauvaise lecture de l'ARNm et à une synthèse de protéines défectueuses (123).

2.2.3 Inhibition des voies métaboliques

Une des voies métaboliques ciblées est la voie de synthèse des folates ou acide folique. Le blocage de cette voie entraîne la mort des cellules par manque de thymine (124).

La dihydrofolate réductase catalyse la réduction de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique, qui intervient dans de nombreuses réactions biochimiques dont notamment la synthèse de la thymine (125). Le triméthoprime est un inhibiteur compétitif de la dihydrofolate réductase. C'est l'un des antibiotiques le plus utilisé au monde, cependant son efficacité est souvent limitée par sa faible solubilité dans l'eau et sa toxicité limitant la dose (126).

La dihydroptéroate synthase produit le 7,8-dihydroptéroate, un intermédiaire dans la voie de synthèse des folates à partir du 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptéridine pyrophosphate et de l'acide para-aminobenzoïque (pABA) (127). Les sulfamides ou sulfonamides sont des analogues structurels et des inhibiteurs compétitifs du pABA (128). Ces antibiotiques ont été

parmi les premiers antibiotiques utilisés jusqu'à la fin des années 1940 lorsque des alternatives (telles que la pénicilline) sont devenues disponibles (129).

2.2.4 Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire

Les antibiotiques ayant un impact sur la paroi cellulaire inhibent la synthèse du peptidoglycane, un composant majeur de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Le peptidoglycane a pour fonction principale de préserver l'intégrité cellulaire notamment lors de la division cellulaire, tout en servant de point d'ancrage à d'autres composants cellulaires comme des protéines et l'acide téichoïque. Son absence provoque dans la plupart des cas la mort de la bactérie par lyse cellulaire (130).

2.2.4.1 Synthèse du peptidoglycane

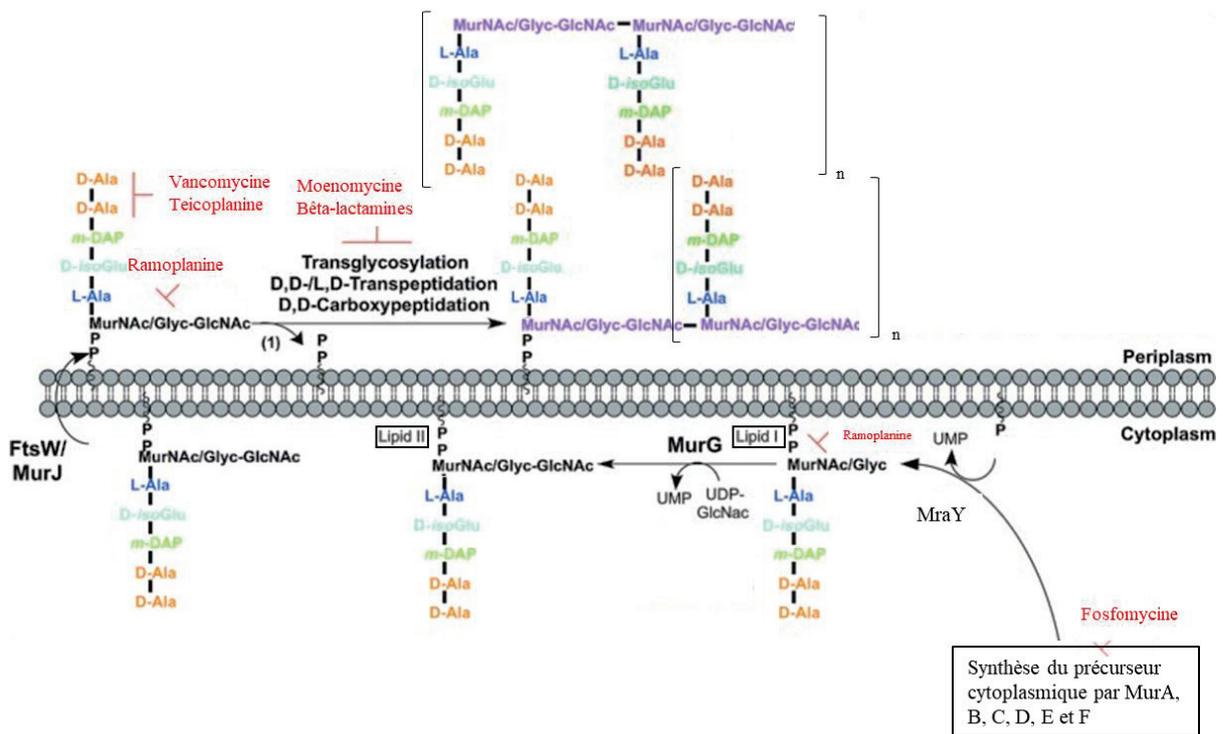


Figure 10 : Antibiotiques ciblant la synthèse des peptidoglycanes, adapté de Abrahams et Besra (131)

Les antibiotiques sont indiqués en rouge.

La synthèse du peptidoglycane s'effectue en différentes étapes comme présenté dans la **figure 10**. Après la synthèse de son précurseur cytoplasmique par les enzymes Mur A, B, C, D, E et F dans le cytoplasme, le lipide I, associé à la membrane plasmique, est généré par *MraY*. Puis, *MurG* synthétise le lipide II par ajout de GlcNAc au lipide I. Le lipide II est transloqué dans le périplasma grâce à une flipase qui n'a pas été totalement identifiée même s'il semble admis qu'il s'agirait de *MurJ* ou de *FtsW* (131). Du côté du périplasma, les glycosyltransférases assemblent et allongent les chaînes glycanes (transglycosylation), et les transpeptidases réticulent leurs chaînes peptidiques (transpeptidation). Finalement, les DD carboxypeptidases éliminent la D-Ala terminale du peptidoglycane mature (carboxypeptidation) (131,132). Les protéines de liaison à la pénicilline (PBP) catalysent la transglycosylation, la transpeptidation, voir même pour certaines la DD-carboxypeptidation (133). Les antibiotiques mentionnés dans la **figure 10** agissent à différents niveaux de la synthèse du peptidoglycane.

2.2.4.2 Différents modes d'action des antibiotiques ciblant la synthèse du peptidoglycane

MraY est une enzyme membranaire qui catalyse la première étape d'association du peptidoglycane à la membrane. Il n'y a aucun antibiotique cliniquement approuvé qui cible cette enzyme mais des nucléosides tels que les tunicamycines, les liposidomycines et les mureidomycines ont été rapportés comme étant des inhibiteurs compétitifs de *MraY* (134).

La fosfomycine est un antibiotique à spectre large découvert en 1969 qui inhibe la synthèse du peptidoglycane dans les premières étapes en se liant de manière covalente au groupe thiol d'une cystéine du site actif de l'enzyme *MurA* (135).

La ramoplanine, appartenant à la famille des lipoglycopeptides et agissant contre les bactéries Gram positives a été découvert en 1984. La ramoplanine inhibe l'action de *MurG* en se liant au lipide I et empêche également la polymérisation des lipides II (136).

Certains glycopeptides, comme la vancomycine (découvert en 1953) et la teicoplanine (découvert en 1978), se lient à la terminaison D-Ala-D-Ala du pentapeptide après translocation, empêchant sa polymérisation. Ces glycopeptides sont des antibiotiques utilisés pour des infections impliquant des bactéries Gram positives multi-résistantes comme *Staphylococcus aureus* ou *Enterococcus faecalis* (137).

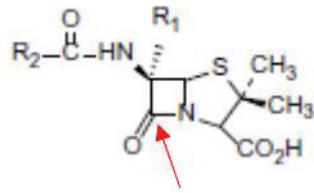
La moenomycine appartenant à la famille des phosphoglycolipides, a été décrite pour la première fois en 1965 et agit en inhibant directement les peptidoglycanes glycosyltransférases impliquées dans l'avant-dernière étape de biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne (138). La moenomycine a été largement utilisée comme promoteur de croissance animale mais n'a jamais été utilisée en clinique en raison de ces propriétés physicochimiques, notamment un temps de demi-vie très long (139).

2.2.4.3 Les bêta-lactamines

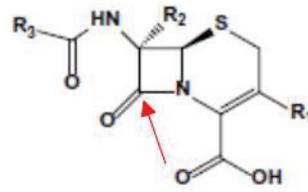
Les bêta-lactamines, sont des antibiotiques à large spectre, dérivant de la pénicilline et qui inhibent la synthèse de peptidoglycane en se liant aux transpeptidases. De nombreux bêta-lactamines ont été développées ces dernières années et possèdent toutes un noyau bêta-lactame au sein de leur structure moléculaire. Le cycle bêta-lactame possède une homologie structurale avec l'extrémité D-Ala–D-Ala du peptidoglycane, bloquant ainsi le site actif de l'enzyme PBP (136), affaiblissant ainsi la paroi de la bactérie et entraînant finalement une cytololyse, c'est-à-dire la mort de la bactérie par pression osmotique (140).

Cette classe d'antibiotiques se compose d'un grand nombre de composés semi-synthétiques pouvant être classés en 4 sous familles, les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes. Les cycles et chaînes latérales ajoutés au noyau bêta-lactames caractérisent l'appartenance à l'une ou l'autre des sous familles (**figure 11**).

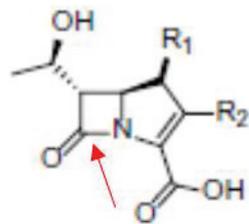
Les bêta-lactamines représentent la classe d'antibiotiques la plus utilisée avec 65% des prescriptions d'antibiotiques injectables aux États-Unis (141). La sensibilité des bactéries à cette classe d'antibiotiques varie considérablement suivant l'affinité des peptidases, la stabilité en présence de bêta-lactamases et la perméabilité de la membrane externe dans le cas de bactéries à Gram négatif (136), les bêta-lactamases étant des enzymes qui détruisent la liaison amide du noyau bêta-lactame. Les carbapénèmes présentent une stabilité importante par rapport à l'activité bêta-lactamase et un spectre d'activité le plus étendu (142). Ils sont souvent utilisés en tant qu'antibiotique de dernier recours contre les bactéries Gram négatives multi-résistantes (143).



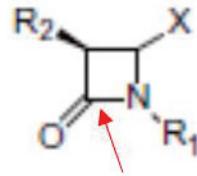
Pénicilline



Céphalosporine



Carbapénème



Monobactame

Figure 11 : Structures des différentes familles de bêta-lactamines, adapté de Bush et Bradford (141)

Le noyau bêta-lactame est indiqué par une flèche rouge

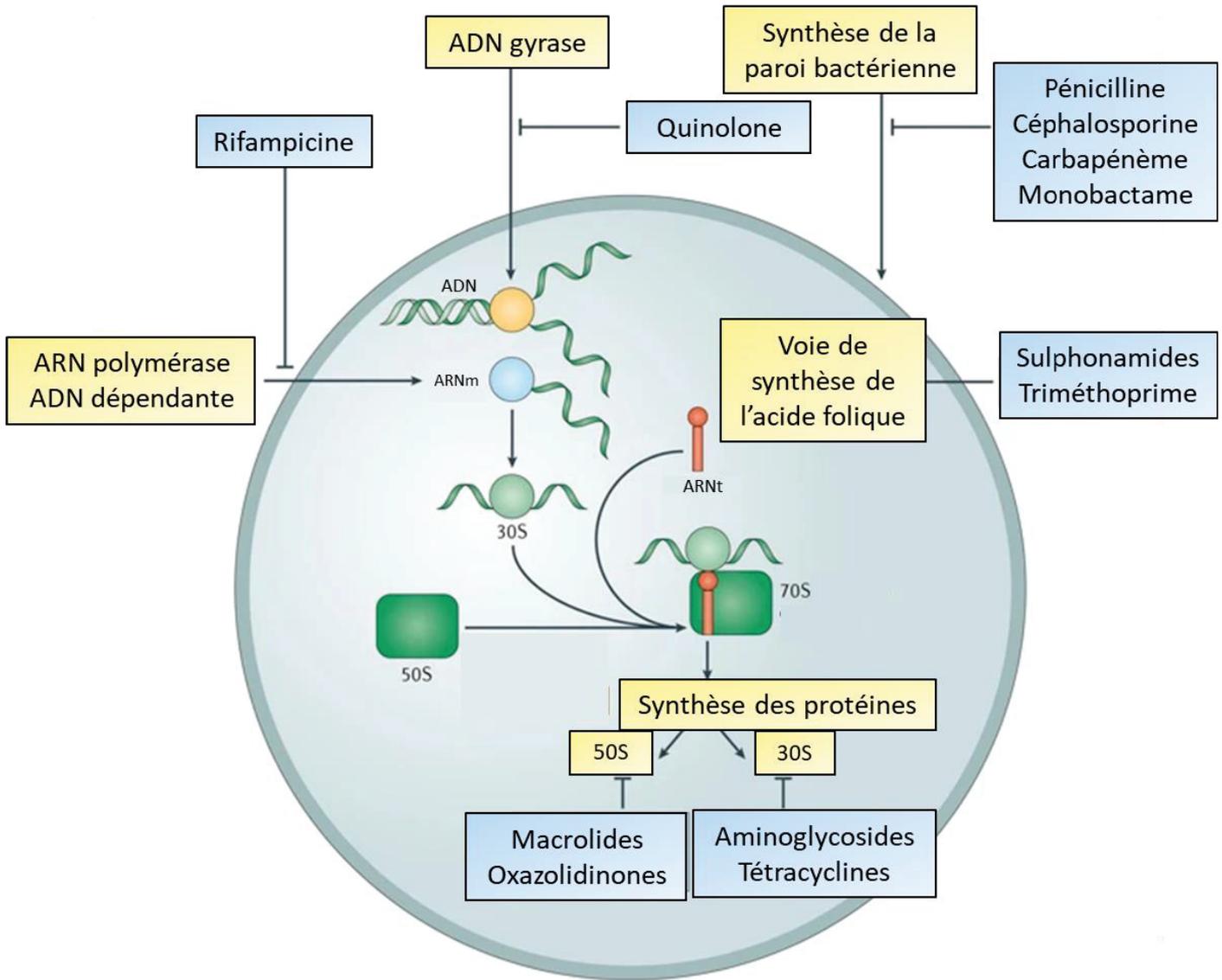


Figure 12 : Schéma récapitulatif des différents modes d'action des antibiotiques, adapté de Lewis (144)

Les familles d'antibiotiques sont indiquées en bleu tandis que leurs modes d'action sont précisés en jaune.

3 Gènes de résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques, dont une liste non-exhaustive a été mentionnée ci-dessus, présentent donc plusieurs stratégies d'action contre les bactéries (**figure 12**). L'émergence des micro-organismes résistants, voire multi-résistants (c'est à dire présentant une diminution de la sensibilité vis-à-vis de plusieurs classes d'antibiotiques), entraîne une diminution des possibilités thérapeutiques pour traiter les patients infectés par ce type d'organismes.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel qui se produit lorsque des micro-organismes sont exposés à des antibiotiques. Sous la pression sélective des antibiotiques, les bactéries sensibles sont tuées ou inhibées, tandis que les bactéries qui sont naturellement résistantes ou qui ont acquis une résistance aux antibiotiques ont plus de chances de survivre et de se multiplier. Les phénomènes de résistance aux antibiotiques étaient déjà présents dans l'environnement bien avant l'âge d'or des antibiotiques (145). Par exemple, D'Costa et son équipe ont reconstruit à partir d'une étude métagénomique d'ADN isolé dans des sédiments du pergélisol béringien vieux de 30 000 ans des gènes codants pour la résistance aux bêta-lactamines. Parmi ces gènes, ils ont étudié la structure et la fonction de l'élément de résistance à la vancomycine *vanA* et ont montré sa similitude avec les variantes modernes (146).

3.1 Impact des résistances aux antibiotiques

3.1.1 Observation des résistances aux antibiotiques

Les résistances aux antibiotiques ont été observées très peu de temps après leurs introductions en clinique (**tableau 3**).

Chaque année, aux Etats-Unis, près de 3 millions de personnes acquièrent des infections graves engendrées par des bactéries résistantes à un ou plusieurs des antibiotiques destinés à traiter ces infections. Au moins 35 000 personnes meurent chaque année des suites directes de ces infections résistantes aux antibiotiques (147). Les durées et coûts des traitements sont également plus importants dans le cas d'infections dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques. Des estimations, en cas d'une augmentation continue de la résistance d'ici 2050, tablent au niveau mondial sur la mort de 10 millions de personnes chaque année et un coût

évalué jusqu'à 100 milliard de dollars (148). L'Organisation Mondiale pour la Santé craint même l'avènement d'une ère post-antibiotiques, dans laquelle les infections courantes et les blessures mineures pourraient être fatales (149).

Tableau 3 : Année d'introduction en clinique et d'observation des premières résistances, adapté de Iredell et al.(150)

CTX-M : cefotaximase, IMP : imipenemase, KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, MRSA : méticilline résistant *Staphylococcus aureus*, NDM : New Delhi métallobéta lactamase, TEM, SHV et OXA : bêta-lactamases, VRE=vancomycine résistant *Enterococci*, VRSA=vancomycine résistant *Staphylococcus aureus* et VIM=Verona integron codant pour une métallobéta-lactamase.

Famille d'antibiotique	Année d'introduction en clinique	Résistance	Année d'observation des résistances
Bêta-lactamine : Pénicilline	1941	CTX-M	1990
		IMP	1988
		KPC	1996
		NDM	2009
		OXA	1971
		SHV	1979
		TEM	1966
		VIM	1997
Glycopeptide : vancomycine	1955	VRSA	1997
		VRE	1989
Colistine	1954	Colistine	1964
Méthicilline	1961	MRSA	1963
Sulfonamides	1937	Sulfonamides	1942
Ciprofloxacine	1983	Ciprofloxacine	1984
Linezoïde	1996	Linezoïde	2001
Tigecycline	1999	Tigecycline	2005

3.1.2 Bactéries multi-résistantes

De nombreuses bactéries associées aux infections ces dernières années sont devenues multi-résistantes. Les agents pathogènes « ESKAPE » pour *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*, mentionnés précédemment sont différenciés des autres agents pathogènes en raison de leur résistance accrue aux antibiotiques couramment utilisés. Ils sont

responsables de la majorité des infections nosocomiales et sont capables «d'échapper» à l'action des antibiotiques (151). Les antibiotiques efficaces contre les organismes « ESKAPE » diminuent d'année en année (152).

De plus, des bactéries qualifiées de « *pandrug resistant* » (PDR) c'est-à-dire des bactéries jugées résistantes à presque tous les antimicrobiens disponibles dans le commerce sont de plus en plus mentionnées dans la littérature (153). Sur les 81 études examinées par Karakonstantis et al., 47 (58%) ont été publiées au cours des 5 dernières années et 526 isolats d'organismes PDR ont été signalés (154). L'émergence de bactéries multi résistantes a conduit à la réintroduction d'anciens antibiotiques comme la colistine (155).

Actuellement, les carbapénèmes, la colistine et la tigécycline sont utilisés comme antibiotiques de dernier recours pour traiter des infections bactériennes mortelles. Cependant, des résistances à ces antibiotiques sont de plus en plus observées ces dernières années (143).

3.1.3 Biofilms et antibiotiques

Les biofilms bactériens contribuent à la persistance d'infections graves en raison de leur capacité à protéger de l'action des antibiotiques les bactéries qui le constituent. Plusieurs études ont montré que les mécanismes pour lutter contre les antibiotiques qui seront présentés ci-dessous, ne sont pas les mêmes au sein du biofilm ou au niveau des bactéries sous formes planctoniques (156,157). En effet, les mécanismes de résistance aux antibiotiques au sein des biofilms sont (I) une pénétration lente ou incomplète des antibiotiques dans le biofilm (158), (II) un microenvironnement chimique altéré dans le biofilm (159) et (III) l'hétérogénéité des populations (bactéries à croissance rapide ou lente) (160). Quelques études suggèrent que le transfert horizontal de matériels génétiques, qui participe à la diffusion des gènes de résistance au sein des populations bactériennes, serait plus efficace au sein des biofilms par rapport aux formes planctoniques (161).

3.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Différentes stratégies sont employées par les bactéries afin de lutter contre les effets des antibiotiques. Elles consistent à modifier la perméabilité de la paroi bactérienne, à expulser les

antibiotiques de la cellule, à modifier de manière enzymatique l'antibiotique ou la cible de celui-ci (ARN polymérase, ribosome).

3.2.1 Imperméabilité aux antibiotiques

La majorité des antibiotiques ont des cibles intracellulaires, impliquant l'entrée de la molécule dans la bactérie par diffusion à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique ou à travers des porines, présentes sur la membrane externe des bactéries Gram négatives. Les bêta-lactames et les quinolones, molécules hydrophiles, ne peuvent traverser la membrane externe que par les porines (162). Il existe différents types de porines classés en fonction de leur activité (non spécifique, spécifique ou sélective), leur structure fonctionnelle et leur régulation et expression (163–165). Les bactéries ont développé des mécanismes leur permettant de bloquer la diffusion de ces antibiotiques comme par exemple une modification du niveau d'expression des porines, un changement de types de porines exprimées par la bactérie ou finalement des mutations ou modifications altérant le fonctionnement des porines (162).

Klebsiella pneumoniae possède principalement deux types de porines OmpK35 et OmpK36 (qui possède une taille de canal plus petit). L'expression de ces deux principales porines est fortement liée à la sensibilité aux bêta-lactamines et les souches où ces deux porines ne sont pas exprimées présentent des niveaux élevés de résistance aux bêta-lactamines (166,167).

3.2.2 L'efflux des antibiotiques

Les bactéries possèdent des pompes à efflux, capable d'expulser les antibiotiques hors de la cellule, limitant ainsi l'accumulation des molécules au contact de leurs cibles. Ces pompes à efflux peuvent être spécifiques d'une famille d'antibiotiques comme la tétracycline ou la fosfomycine (pompes à efflux codées respectivement par les gènes *tet* et *abaF*) (168), ou avoir une spécificité envers plusieurs familles d'antibiotiques, et permettant de transporter hors de la cellule des antibiotiques variés, rendant la bactérie multi-résistante. Il existe 5 grandes familles de pompes à efflux, qui varient selon leurs conformations structurales, la source d'énergie

nécessaire, les molécules qui sont expulsées et le type de bactéries dans lesquels elles sont distribuées : La famille des RND (*resistance nodulation division*), la famille des MFS (*major facilitator superfamily*), la famille des ABC (*ATP binding cassette*), la famille des SMR (*small multidrug resistance*) et la famille des MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) (169,170). Les pompes à efflux se rencontrent chez presque toutes les bactéries et à l'exception des RND que l'on ne trouve que chez les bactéries Gram-négatives, les autres familles de pompe à efflux se rencontrent chez les bactéries Gram-positives et négatives (171).

3.2.3 Altération des antibiotiques

Une des stratégies bactériennes la plus efficace pour contrer l'effet des antibiotiques consiste à produire des enzymes qui altèrent ou qui éliminent les antibiotiques. Trois enzymes sont principalement impliquées : les bêta-lactamases, les enzymes modifiant les aminosides et les chloramphénicol acétyltransférases

3.2.3.1 Altération chimiques des antibiotiques

Les enzymes modifiant les aminosides (AME) modifient de manière covalente les groupes hydroxyles ou aminos de la molécule d'aminoside ou aminoglycoside. Plusieurs AME ont été décrites à ce jour et elles sont classées selon leur activité catalytique (acétyltransférase, adényltransférase ou phosphotransférase). Elles sont devenues le mécanisme prédominant de résistance aux aminosides dans le monde (172). Certaines de ces enzymes ont évolué et possèdent même plus d'une seule activité. En effet, l'*aac(6')aph(2'')*, qui se trouve principalement dans les organismes Gram positifs, est une enzyme bifonctionnelle (activités d'acétylation et phosphotransférase) conférant une résistance de haut niveau à tous les aminosides à l'exception de la streptomycine. Elle est largement distribuée au sein des entérocoques et des staphylocoques (173).

La modification enzymatique du chloramphénicol est principalement due à l'activité des chloramphénicol acétyltransférases (CAT). Plusieurs gènes codant pour des CAT ont été décrits et classés en deux catégories (*catA* et *catB*), une catégorie entraînant généralement une forte résistance et l'autre une résistance moindre (174). Cette différence peut s'expliquer par le

fait que les types A et B présentent une similitude de seulement 10% au niveau de leurs séquences des acides aminés et présente des structures tertiaires très différentes (175,176).

3.2.3.2 Elimination de l'antibiotique

Le principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines repose sur la destruction de ces composés par l'action des bêta-lactamases, qui clivent la liaison amide du cycle bêta-lactame, rendant l'antibiotique inefficace. Les gènes codants pour les bêta-lactamases sont généralement appelés *bla*, suivis du nom de l'enzyme spécifique (par exemple *blaSHV*). Il existe un nombre important de bêta-lactamases (plus de 1000 en 2016 (172)) qui sont répertoriées selon deux systèmes de classification, le système Ambler (structurel) et le système Bush-Jacoby-Medeiros (fonctionnel). Le système de classification Ambler qui sépare ces enzymes en quatre classes (A,B,C et D) sera décrit ci-dessous (177).

3.2.3.2.1 Classe A d'Ambler

La plupart des enzymes de classe A sont inhibées par l'acide clavulanique. Elles comprennent une large gamme de protéines possédant différentes activités catalytiques comme les pénicillinases (TEM-1 et SHV-1) qui hydrolysent uniquement la pénicilline, des EBSL (Bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi) qui hydrolysent les pénicillines, les céphalosporines de 3^{ème} génération et les monobactames (CTX-M) et finalement les carbapénémases qui hydrolysent les carbapénèmes (KPC, IMI) (172). Initialement rencontrée chez *Klebsiella pneumoniae*, KPC est maintenant présente chez de très nombreuses bactéries à Gram négatif comme *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.* ou *Pseudomonas aeruginosa* (172).

3.2.3.2.2 Classe B d'Ambler

Les enzymes de classe B sont également connues sous le nom de métallo bêta-lactamases car elles utilisent un ion métallique comme cofacteur lors de l'élimination des antibiotiques. Elles sont inhibées par la présence d'agents chélateurs d'ions tels que l'EDTA et, comme les carbapénémases de classe A, ils sont actifs contre une large gamme de bêta-

lactamines, y compris les carbapénèmes. Les carbapénémases de classe B les plus importantes d'un point de vue clinique sont IMP, VIM, SPM et NDM. La prévalence de ces enzymes et leur identification dans les cas d'infection grave augmentent très rapidement et ceci dans le monde entier (178).

3.2.3.2.3 Classe C d'Amber

Les bêta-lactamases de cette classe sont également appelées céphalosporinases. Cette classe d'enzymes entraîne une résistance à toutes les bêta-lactames à l'exception des carbapénèmes. AmpC est un des exemples les plus connus appartenant à cette classe d'enzyme (179).

3.2.3.2.4 Classe D d'Amber

Les bêta-lactamases de la classe D comprennent une large gamme d'enzymes, initialement différenciées des pénicillinases de classe A en raison de leur capacité à hydrolyser l'oxacilline (OXA) et leur faible inhibition par l'acide clavulanique. De nombreuses variantes d'OXA ont été décrites, certaines rencontrées mondialement. De plus, bien que les enzymes de classe D soient particulièrement répandues chez *Acinetobacter baumannii*, elles ont été signalées dans de nombreux autres organismes cliniquement pertinents, tels que *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (180).

3.2.4 Altération de la cible thérapeutique

Afin d'éviter l'effet de certains antibiotiques, les bactéries peuvent également altérer leurs cibles en empêchant l'antibiotique d'atteindre le site de liaison (appelée également mécanisme de protection de la cible) ou en le modifiant, diminuant ainsi l'affinité de l'antibiotique pour celui-ci.

3.2.4.1 Mécanismes de protection de la cible

Les mécanismes de protection de la cible peuvent intervenir au niveau de la fixation des antibiotiques sur le ribosome ou sur l'ADN gyrase. Dans le cas des mécanismes de résistances

à la tétracycline, des protéines comme Tet(M) ou Tet(O) appartenant à la superfamille des GTPases, agissent comme des homologues des facteurs d'élongation utilisés dans la synthèse des protéines (181). Ils interagissent avec le ribosome et délogent la tétracycline de son site de liaison (182).

Dans le cas des mécanismes de résistances aux quinolones, le pentapeptide Qnr agit comme un homologue de l'ADN et entre en compétition avec celui-ci au niveau du site de sa liaison à l'ADN gyrase et à la topoisomérase IV. Ceci diminue ainsi les probabilités de former et stabiliser le complexe ADN-quinolone clivé par la gyrase, complexe qui est létal pour la bactérie (183).

3.2.4.2 Mécanismes de modification de la cible

Les mécanismes de modification de la cible peuvent consister en des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour le site ciblé par les antibiotiques, des altérations enzymatiques du site de liaison, comme par exemple, l'addition de groupes méthyle et le remplacement ou le contournement de la cible d'origine (184).

3.2.4.2.1 Mutations ponctuelles

Plusieurs exemples de mutations ponctuelles peuvent être cités. Dans les cas de résistances aux rifampicines, une mutation ponctuelle au niveau du gène *rpoB* est observée, réduisant l'affinité de l'antibiotique pour sa cible. La rifampicine se lie à la sous unité bêta de l'ARN polymérase, codée par le gène *rpoB*. Dans les cas de résistances aux oxazolidinones et plus particulièrement pour les linzolidés, une mutation ponctuelle dans le domaine V de l'ARN 23S qui intervient dans la formation de la sous unité 50S du ribosome est notamment observée, résultant en une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour la cible (117).

3.2.4.2.2 Altérations enzymatiques

Dans les cas d'altérations enzymatiques de la cible, l'un des exemples le plus documenté est la méthylation du ribosome catalysée par une enzyme codée par les gènes *erm* (*erythromycin ribosome methylation*), qui se traduit par une résistance aux macrolides. En effet, la liaison de la molécule antimicrobienne à sa cible est altérée et l'expression des gènes *erm* confère

également une résistance croisée à d'autres antibiotiques comme les lincosamides et les streptogramine B (185).

3.2.4.2.3 Remplacement de la cible

Dans les cas de remplacement de la cible, les bactéries sont capables de développer de nouvelles cibles qui accomplissent des fonctions biochimiques similaires à la cible d'origine mais ne sont pas inhibées par l'antibiotique.

Comme mentionnée précédemment, les bêta-lactames perturbent la synthèse de la paroi cellulaire par l'inhibition des PBP. La résistance à la méthicilline chez *Staphylococcus aureus* s'effectue par l'acquisition d'un gène étranger, *mecA*, qui code pour le PBP2a (*Penicillin binding protein 2a*), un PBP qui a une faible affinité pour les bêta-lactamines (172).

La résistance à la vancomycine chez les entérocoques s'effectue à travers l'acquisition d'un groupe de gènes *van*, codant pour une machinerie biochimique qui modifie la synthèse du peptidoglycane soit en modifiant le dernier D-Ala en D-lactate (diminuant l'affinité de l'antibiotique d'un facteur 1000) ou en D-sérine (l'affinité est beaucoup moins affectée que dans le cas précédent), ou encore en détruisant les précurseurs de terminaison D-Ala-D-Ala pour empêcher la vancomycine de se lier à ceux-ci (186).

Dans le cas des antibiotiques agissant sur la voie de synthèse de l'acide folique, différentes stratégies peuvent être mises en place par la bactérie. En plus de mutations dans les gènes induisant une modification des enzymes comme la dihydrofolate réductase, des mutations peuvent apparaître dans la région promoteur du gène codant cette enzyme, aboutissant à une surexpression du gène et à une quantité accrue d'enzyme empêchant l'inhibition de la voie par les antibiotiques (187).

Les différents mécanismes de résistances évoqués précédemment sont résumés **figure 13**.

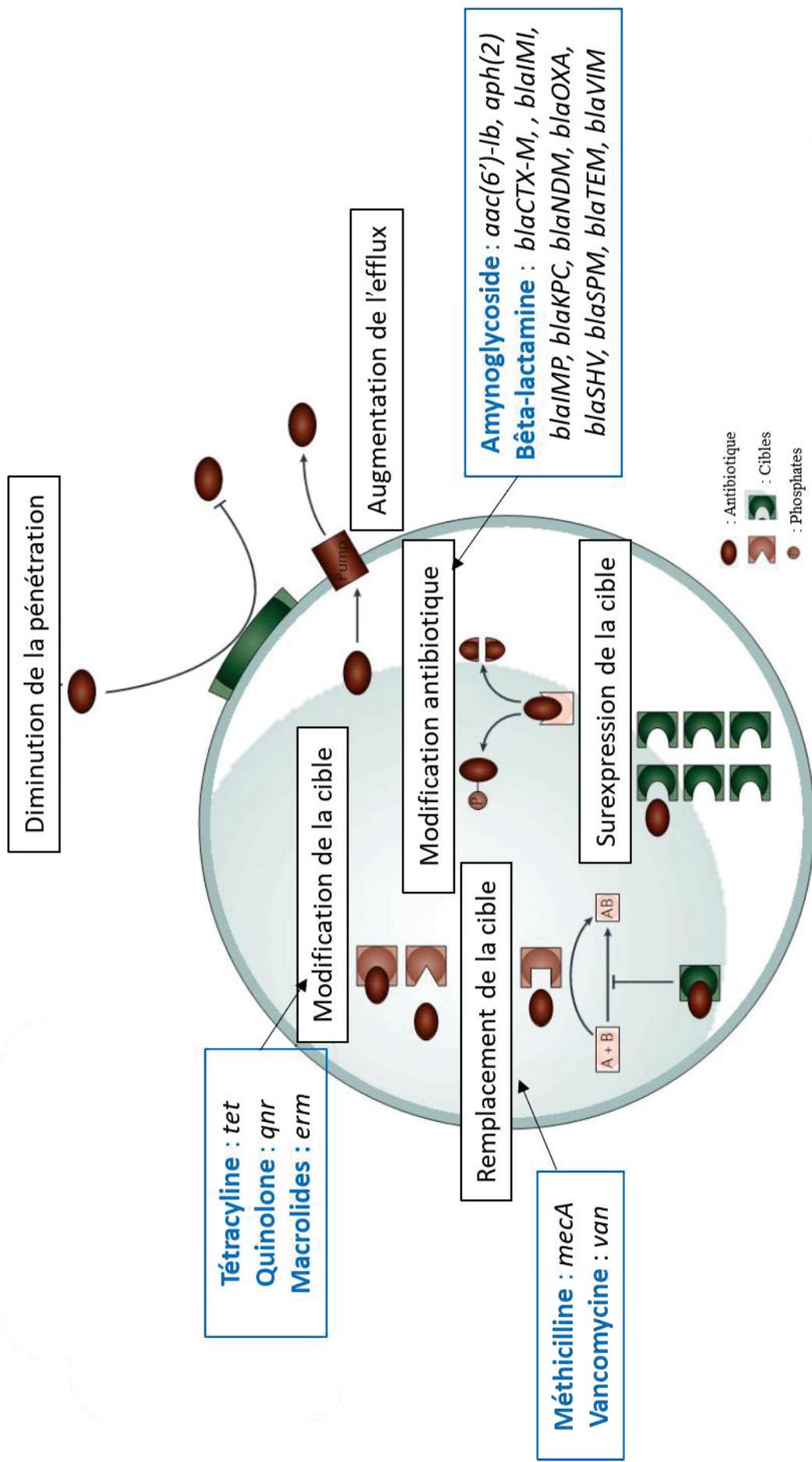


Figure 13 : Mécanismes de résistances aux antibiotiques développés par les bactéries, adapté de Lewis(144)

Un exemple non exhaustif de familles d'antibiotiques (en bleu) impactées par ces différents mécanismes ainsi que les gènes de résistance impliqués sont présentés ici.

3.3 Localisation des gènes de résistance

3.3.1 Résistances codées par le chromosome

Les mécanismes de résistances aux antibiotiques des bactéries peuvent être naturels ou intrinsèques à celle-ci. C'est alors un caractère stable, qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée et est transmis à la descendance (transfert vertical) avec pour support génétique le chromosome bactérien. C'est le cas par exemple du gène de résistance à la vancomycine (188) ou à l'imipénème (*blaIMI*) (142). Les bactéries peuvent également acquérir de nouveaux mécanismes de résistance par mutation ou par transfert de gène horizontal. En raison de la pression de sélection imposée par l'utilisation des antibiotiques, des mutations peuvent apparaître au sein d'une population. Ces mutations ponctuelles peuvent aboutir à des altérations du site actif de l'enzyme comme dans le cas du gène *blaSHV* par exemple, entraînant dans certains cas une modification de l'affinité pour certains substrats. Ramdani-Bouguessa et al. ont montré que l'enzyme SHV-99 possède une affinité plus élevée que SHV-1 pour l'aztréoname suite à la substitution d'une asparagine par une glycine (Asp104->Gly) (189).

3.3.2 Transferts horizontaux de matériel génétique

Les transferts horizontaux de matériels génétiques permettent la diffusion rapide des résistances aux antibiotiques et constituent une menace importante dans les cas d'infection pour l'Homme, du fait de leur expression et leur diffusion accrues.

3.3.2.1 Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires qui se répliquent indépendamment du chromosome bactérien (initié à partir d'une région appelée site ORI) et qui sont capables d'être transférés horizontalement entre les bactéries par conjugaison. Au cours de la conjugaison, du matériel génétique est transféré d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse par l'intermédiaire d'un pilus, appendice se situant majoritairement à la surface des bactéries Gram négatives (190). Les plasmides peuvent conférer à leur hôte des aptitudes qui dans certains cas leur donnent un avantage sélectif, comme la résistance à un antibiotique et seront conservé dans la population (191). Il existe une grande variété de plasmides qui diffèrent selon les apports à leur hôte ou les mécanismes qui les maintiennent dans la population. Il existe

par exemple des mécanismes permettant de contrôler le nombre de copies au sein de la bactérie et assurer leurs répartitions au cours de la division cellulaire (192). Certains plasmides ne se répliquent que dans certains taxons bactériens proches, tandis que d'autres peuvent se répliquer au sein de genres bactériens assez divers (193).

Les plasmides jouent un rôle clé dans la dissémination des gènes de résistance parmi les pathogènes cliniques, participant à l'émergence des bactéries multi-résistantes. Un exemple est le gène de résistance *ampC*. Il est codé sur les chromosomes de nombreuse *Enterobacteriaceae* mais sont souvent mal exprimés, conduisant à peu ou pas de résistance phénotypique (194). Cependant, la diffusion d'AmpC et son activité sont considérablement augmentées lorsque le gène est localisé sur un plasmide (195). Ces transferts ont notamment lieu au sein du microbiote intestinal des patients (196).

Il existe différents types de plasmides : les plasmides conjugatifs ou autotransférable qui codent pour l'ensemble des processus entrant en jeu lors de la conjugaison, les plasmides transférables qui ne peuvent diffuser par conjugaison qu'en présence d'un plasmide conjugatif et finalement les plasmides dit non mobilisables. Smillie et al., dans leur étude, ont observé que seulement la moitié des plasmides seraient en fait transmissibles (197).

3.3.2.2 Les transposons

Les transposons sont des éléments mobiles d'ADN capables de se transférer entre un chromosome et un plasmide ou entre deux plasmides au sein de la même cellule. Les transposons jouent également un rôle important dans la dissémination des résistances. Un exemple connu est l'apparition au cours des années 1970 de la résistance aux pénicillines au sein des genres *Haemophilus* et *Neisseria*, alors que toutes ces bactéries étaient préalablement sensibles aux pénicillines. Cette résistance serait dû à l'arrivée, probablement par transformation, c'est-à-dire l'intégration d'un fragment d'ADN étranger dans une cellule, d'un plasmide portant le transposons Tn3 qui code pour l'enzyme TEM. (198,199).

Les gènes codants les enzymes CTX-M, qui sont répartis en 4 grands groupes, étaient initialement rencontrés sur le chromosome des bactéries environnementales appartenant aux genres *Kluyvera* spp. (200). Ils sont maintenant associés à des transposons pouvant se trouver

sur un très grand nombre de plasmides différents, participant ainsi à sa diffusion massive et rapide (172).

3.3.2.3 Les intégrons

Une cassette de gènes est un petit élément mobile (0,5 à 1 kb) constitué d'un à deux gènes. Les cassettes de gènes peuvent exister sous forme circulaire libre mais non répliquative mais elles se trouvent généralement insérées dans un intégron en suivant une orientation précise permettant l'expression des gènes la composant. Incapables d'autoréplication, les intégrons sont obligatoirement portés par un plasmide ou un chromosome. Plusieurs cassettes peuvent se retrouver dans un intégron, participant à la résistance à plusieurs antibiotiques. Les intégrons sont répartis en différentes classes qui varient en fonction de la nature des gènes codant pour l'intégrase. Une grande variété de cassettes de gènes contenant des gènes de résistance a été identifiée. C'est par exemple le cas de celles portant des gènes codant pour des bêta-lactamases ou des AME (193).

Les enzymes de type VIM (*Verona integron-encoded metallo beta-lactamase*), décrites pour la première fois à la fin des années 1990 chez *Pseudomonas aeruginosa* se sont depuis propagées dans le monde entier et au sein de nombreuses espèces bactériennes différentes, notamment grâce à leurs associations avec des intégrons de classe 1 (201).

3.4 Facteurs favorisant l'augmentation et la propagation des résistances aux antibiotiques

3.4.1 Surconsommation d'antibiotiques

La surutilisation des antibiotiques mais aussi leur utilisation de manière inappropriée, tout comme l'automédication, c'est-à-dire la prise de médicament sans avis médical, joue un rôle important dans l'augmentation du nombre d'agents pathogènes résistants aux antibiotiques ces dernières années (202). L'utilisation répandue des antibiotiques entraîne une forte pression de sélection sur les bactéries avec une diffusion rapide des gènes de résistance au sein des populations. Par exemple, au cours de ces dernières années, un changement dans la population de *Salmonella typhi* a été observée avec la prolifération rapide et étendue de l'haplotype H58, multi-résistant aux traitements de premières lignes comme les fluoroquinolones (203).

En plus du domaine médical, les antibiotiques sont également largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Par exemple, 80% (en masse) de la consommation totale d'antibiotiques aux États-Unis est réalisé par les animaux d'élevages (204). De plus, 52% des antibiotiques vendus à l'industrie alimentaire américaine sont également utilisés comme actifs thérapeutiques chez l'Homme (205). Seuls les carbapénèmes, les streptogramines et les glycopeptides ne sont utilisés que pour les traitements chez l'Homme (206). L'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance, c'est à dire comme des substances anabolisantes permettant d'accroître la masse musculaire à des fins d'amélioration de performances physiques et/ou économiques (207) a été complètement interdit en Europe depuis 2006, mais reste une pratique courante dans plusieurs pays, notamment aux États-Unis (208). Les antibiotiques sont également utilisés dans le domaine de l'agriculture. La streptomycine est ainsi utilisée afin de prévenir le feu bactérien, une maladie touchant notamment les pommiers et poiriers, et causée par une bactérie nommée *Erwinia amylovora* (209).

3.4.2 Diffusion des antibiotiques chez l'humain

Des bactéries résistantes ou multi-résistantes sont observées au sein du microbiote intestinal. Le résistome qui se définit comme l'ensemble des gènes de résistance à un ou plusieurs antibiotiques donnés dans un environnement donné, est établi à la naissance ou dans les premiers mois. Moore et ses collègues ont signalé la présence de gènes de résistance à 14 sur 18 antibiotiques testés, dans un échantillon de 22 nourrissons et enfants en bonne santé sans exposition préalable aux antibiotiques (210).

Ces résistances pourraient être acquises de différentes façons. Des bactéries résistantes exogènes (c'est-à-dire se trouvant en dehors de l'hôte) peuvent être acquises par celui-ci et coloniser l'épithélium intestinal. Des bactéries précédemment sensibles peuvent devenir résistantes suite à l'apparition de mutants résistants (par exemple suite à des pressions de sélection) ou suite à des transferts d'éléments génétiques mobiles (196).

Hu et al. tout comme Forslund et al. ont montré les possibles liens entre les gènes de résistance aux antibiotiques présents dans le microbiote intestinale et l'utilisation massive d'antibiotiques (211,212). Cependant, d'autres phénomènes peuvent rentrer en jeu comme la co-sélection des gènes de résistance avec les métaux. En effet, les gènes de résistance aux métaux et aux antibiotiques se retrouvent souvent sur un même plasmide, pouvant jouer un rôle

important dans le maintien et la prolifération des résistances aux antibiotiques. Ces métaux lourds sont présents dans l'environnement (213) mais peuvent également se retrouver chez l'homme (214).

Finalement, l'utilisation d'antibiotiques chez les animaux peut contribuer à l'émergence de résistance aux antibiotiques chez les humains, notamment au travers de la chaîne alimentaire (215).

3.4.3 Diffusion des antibiotiques dans l'environnement et les élevages

Ces antibiotiques peuvent se retrouver dans l'environnement, notamment dans l'eau. Dans un premier temps, les antibiotiques peuvent être rejetés dans l'environnement au travers des usines de traitement des eaux usées. En effet, les antibiotiques ne sont que partiellement métabolisés à l'intérieur du corps humain et les métabolites résultant peuvent conserver leur activité antibiotique (216,217). Pour certains antibiotiques tels que les bêta-lactames ou les quinolones par exemple, leurs excrétion, c'est-à-dire leurs rejet hors de l'organisme après administration, dépasse généralement les 50% de la dose administrée (218). Ces métabolites ne sont pas toujours éliminés au sein des usines de retraitement des eaux usées et peuvent se retrouver dans les eaux traitées qui rejoignent les rivières ou les boues d'épuration qui seront épandues (219,220).

Comme chez l'homme, des antibiotiques partiellement métabolisés, administrés aux animaux d'élevages, peuvent se retrouver, via les excréments, rejetés dans les lisiers et atteindre les eaux de surfaces (221). L'eau qui circule au niveau des sols et contenant potentiellement des antibiotiques participe à la dissémination dans l'environnement des résistances aux antibiotiques. Dans le sol, la ciprofloxacine peut persister pendant plus de 90 jours avec une dégradation minimale et un effet important sur la résistance des micro-organismes présents dans le sol (218).

Les eaux de surface peuvent également être des sources d'eau potable pour la population. Ranjbar et Sami ont évalué la présence d'*Escherichia coli* productrice de bêta-lactamase à spectre étendu dans les eaux de surface en Iran. Un total de 38,5% des *Escherichia coli* isolées ont été déterminées comme étant des souches productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (222).

Il est difficile de déterminer exactement l'impact de la présence des antibiotiques sur les bactéries présentes dans les sols et le développement de bactéries résistantes. Cela dépend de très nombreux facteurs tels que la concentration en antibiotique, sa biodisponibilité, la nature de l'environnement (eau, boue d'épuration, sol) ou la mobilité des bactéries (223–225). Cependant, Girardi et al. ont montré l'apparition du gène de résistance *qnrS* chez des bactéries dans un sol traité par la ciprofloxacine, après 14 jours d'exposition (226). De nombreux gènes de résistance observés chez les agents pathogènes en clinique ont pour origine les organismes présents dans les sols ou microbiote environnemental. En effet, dans des conditions appropriées, qui reste encore à définir en détail, ces gènes de résistance peuvent éventuellement être transférés à des micro-organismes pathogènes via un transfert horizontal d'éléments mobiles (227).

Une des résistances actuellement surveillée est la résistance à la colistine. Cet antibiotique est utilisé depuis de nombreuses années en médecine vétérinaire pour la prévention des maladies infectieuses et en tant que promoteur de croissance. Cet antibiotique a également été réintroduit en clinique, souvent en tant que médicament de dernier recours. La prévalence globale de cette résistance dans les isolats cliniques est encore assez faible mais elle a fortement augmenté ces dernières années (228). Avant 2015, tous les mécanismes de résistance à la colistine observés étaient codés sur le chromosome (gène *mcr-1*). Après 2015, les premiers cas de résistance à la colistine médiée par les plasmides ont été observés. Au vu des risques potentiels de sélection de résistance à la colistine chez l'Homme, l'Agence Européenne du Médicament a notamment recommandé en juin 2016, une réduction de 65% de l'usage de la colistine en Europe (229).

Les connections entre les antibiotiques en médecine vétérinaire et humaine et l'environnement sont schématisées dans la **figure 14**.

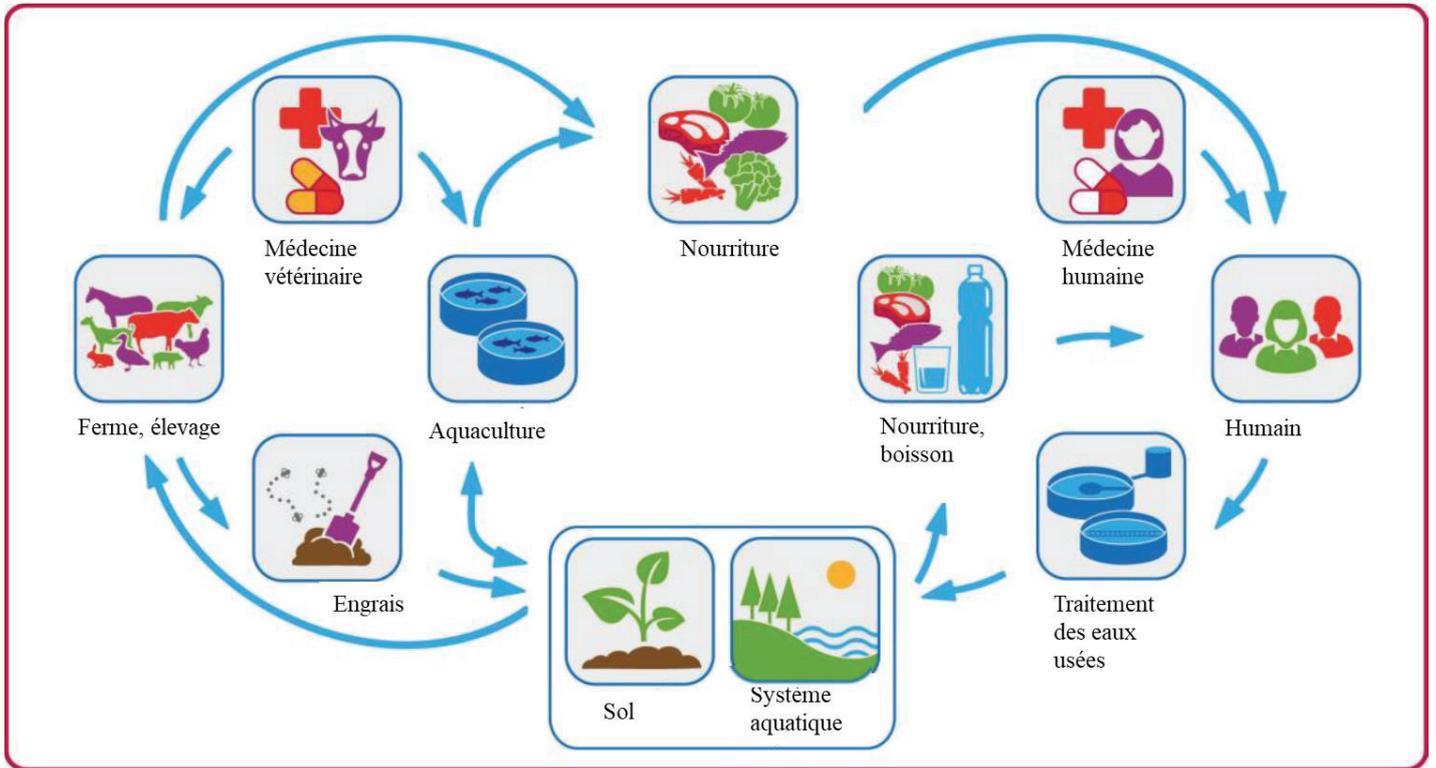


Figure 14 : Connexions entre les antibiotiques en médecine vétérinaire, humaine et l'environnement

3.5 Recherche de nouveaux médicaments

Avec la diminution de la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques et le développement de la biologie moléculaire, une nouvelle stratégie basée sur la génomique a été adoptée dans les années 1990. Des séquences du génome de souches pathogènes et non pathogènes sont comparées, afin d'identifier de nouvelles cibles essentielles à la survie des agents pathogènes. Une fois leurs nécessités démontrées, la cible est clonée, surexprimée et incorporé dans un test de criblage à haut-débit afin de rechercher des agents de liaison à partir de bibliothèques de composés chimiques. Cependant, plusieurs limites à cette approche ont pu être observées (99).

En effet, du fait de la faible perméabilité des membranes bactériennes, certains inhibiteurs potentiels sont incapables d'atteindre leurs cibles. De plus toutes les cibles n'ont pas pu être facilement clonées, purifiées et incorporées au criblage *in vitro*. Finalement, aucun

nouvel antibiotique n'a été découvert avec cette méthode et un retour à un criblage des bactéries suivant la méthode employé par Waksman au cours de l'âge d'or des antibiotiques est prôné (103,107).

Cette méthode de criblage se déroule en plusieurs étapes (99) :

- **Test de susceptibilité aux antibiotiques** : Evaluation des interactions entre des potentiels antibiotiques et des micro-organismes.
- **Vérification de la toxicité** : Vérification de la toxicité d'un candidat par des tests sur des cellules humaines.
- **Identification et caractérisation du mode d'action** : Utilisation des techniques moléculaires et d'outils de génomique pour identifier la cible d'un candidat ou son mode d'action.
- **Optimisation et développement pré-clinique** : Amélioration (1) du spectre d'activité, (2) de la toxicité et (3) de la pharmacocinétique (devenir de l'antibiotique dans l'organisme) et de la pharmacodynamique (action de l'antibiotique sur l'organisme)

Des études préalables peuvent être réalisées afin de restreindre la liste des potentiels candidats à tester. Ainsi, 303 gènes ont été définis comme étant essentiel à la culture sur des milieux riches tandis que 258 gènes supplémentaires ont été jugés essentiels dans les cas de conditions de stress telles que la privation de nutriments dans des modèles *in vitro*. La validité de ces gènes en tant que cibles a ensuite été confirmée *in vivo* à travers des approches de mutagenèse de certains pathogènes. Ceci a permis de révéler plusieurs gènes candidats ayant un rôle au niveau de la virulence, de la réponse au stress bactérien, de la biosynthèse des nutriments ou encore dans les fonctions d'attachement médiées par les pili (230,231).

Au-delà des antibiotiques, des alternatives thérapeutiques comme des anticorps thérapeutiques, des probiotiques, des bactériophages ou des peptides antimicrobiens ou antibiofilm sont également envisagées et étudiées (232,233).

4 Méthodes de diagnostic actuellement employées pour les résistances aux antibiotiques

Afin d'identifier les éventuelles résistances aux antibiotiques présentes au sein d'un pathogène issu d'un échantillon clinique, un antibiogramme est réalisé. Il consiste à déterminer la sensibilité et la résistance aux antibiotiques d'une bactérie à l'origine d'un processus infectieux. Il permet de classer les souches et de guider le clinicien dans le choix de l'antibiotique / des antibiotiques à utiliser.

La diffusion en milieu gélosé permet de mesurer des diamètres d'inhibition de la croissance d'une bactérie autour d'un disque imprégné d'antibiotique et de les comparer à des diamètres critiques. Une pastille de papier contenant une quantité fixée d'antibiotique est déposée à la surface d'une gélose (**figure 15**). L'antibiotique diffuse ensuite du papier vers la gélose verticalement et horizontalement créant ainsi un gradient de concentration homogène décroissant du bord de la pastille vers l'extérieur. Au cours de la croissance de la bactérie à tester, préalablement ensemencée, des halos d'inhibition de la croissance se forment autour des pastilles. Des droites de concordances spécifiques à un antibiotique donné permettent à partir du diamètre de ces halos de déduire la concentration minimale inhibitrice (CMI) c'est-à-dire la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C (234).

Si la CMI mesurée est en deçà de la concentration critique basse, la souche est déclarée sensible, si elle est supérieure à la concentration critique haute, elle est déclarée résistante et entre les deux, elle est intermédiaire. Ces concentrations critiques sont répertoriées dans des documents de référence comme ceux établis par le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (235).

En plus des tests sur milieux solides avec des disques imprégnés, la CMI peut être également déterminée avec des bandelettes imprégnées d'un gradient continu de l'antibiotique à tester (**figure 15**) comme l'Etest® (bioMérieux, France), ou lors de la mise au contact d'un inoculum bactérien standardisé avec des concentrations croissantes d'antibiotiques en milieu liquide. Finalement la CMI peut être aussi déterminée avec les automates présentés dans le **chapitre 1** par le biais des « cartes d'antibiogramme » communes ou non avec celles de

l'identification de l'isolat cliniques. Ces cartes sont constituées d'une série de puits réactionnels contenant différentes dilutions d'un antibiotique donné (236).

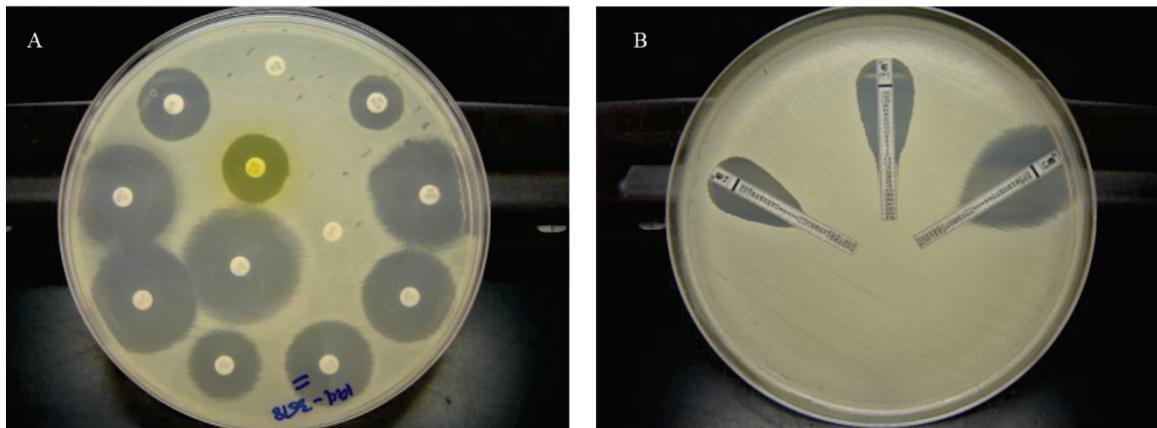


Figure 15 : Réalisation d'un antibiogramme avec A : une diffusion sur milieux gélosés de disques imprégnés d'un antibiotique, B : des bandelettes imprégnées d'un gradient continu d'antibiotique (237)

Afin de limiter les délais actuels nécessaire pour l'identification des pathogènes et de leurs potentiels mécanismes de résistances aux antibiotiques, des méthodes alternatives présentées dans le **chapitre 3** sont développées.

Chapitre 3 : Etat des lieux des tests commerciaux disponibles sur le marché

1 Méthode de diagnostic suite à une hémoculture

À ce jour, les systèmes d'hémoculture automatisés restent prépondérants pour la détection du ou des agent(s) pathogène(s) impliqué(s) dans le sepsis, même si ces hémocultures présentent quelques limites, évoquées dans le **chapitre 1**. Des méthodes alternatives ont été développées pour diminuer les délais entre l'obtention d'un résultat positif en hémoculture et le rendu d'un diagnostic. En effet, il faut généralement un délai de 3 à 5 jours avant que le traitement empirique et à large spectre donné aux patients soit restreint et totalement adapté au pathogène identifié, or ces délais peuvent être impliqué dans l'observation d'une mortalité plus élevée et l'émergence de résistances aux antibiotiques (238).

L'ensemble des performances des tests présentés ci-dessous sera présenté dans le **tableau 7**.

1.1 Gène codant pour l'ARN 16S

De nombreux tests se basent sur l'amplification de régions conservées de l'ADN comme le gène codant pour l'ARN 16S. Ce gène qui code pour un des éléments de la sous-unité 30S du ribosome bactérien est largement présent chez toutes les espèces bactériennes, ce qui fait du gène codant pour l'ARN 16S une cible pour les études phylogénétiques et la taxonomie (239). Ce gène, dont la taille est d'environ 1550 pb, est composé de régions variables et conservées. Neuf régions nommées V1 à V9 et dites « hypervariables » sont communément admises (240). Ces régions présentent une grande diversité de séquences et peuvent être utilisées pour l'identification de différentes bactéries ou genres bactériens (241). Le nombre de copies du gène codant pour l'ARN 16S au sein des bactéries dépend du genre ou de l'espèce. Entre une à quinze copies, présentes chacune au sein d'un opéron différent, peuvent être retrouvées chez un individu avec parfois des différences au niveau de la séquence du gène entre ces différentes copies (242,243).

Plusieurs tests de diagnostic présentés ci-dessous ciblent le gène codant pour l'ARN 16S pour l'identification des pathogènes.

1.2 Amplification des acides nucléiques et étape de post amplification

En plus de l'amplification des acides nucléiques, il existe une étape de post-amplification pour compléter l'identification des pathogènes comme le séquençage des amplicons ou l'utilisation de biopuce.

1.2.1 qPCR ou PCR en temps réel

Des plateformes analytiques telles que le GeneXpert[®] (Cepheid, Etats-Unis) ou le BDmax[™] (BD Diagnostics, Canada) sont des plateformes permettant de réaliser l'ensemble des étapes nécessaires à un diagnostic : une extraction des acides nucléiques suivie de leur amplification par PCR en temps réel (qPCR). Le test Xpert[®] MRSA/SA BC (Cepheid, Etats-Unis) permet de détecter trois cibles, les gènes *spa*, *mecA* et la cassette SCCmec qui sont nécessaires pour l'identification des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline. Le BD MAX[™] StaphSR Assay (BD Diagnostics, Canada) permet d'identifier et de différencier les *Staphylococcus aureus* sensibles et résistants à la méthicilline (244).

Ces plateformes sont robustes et le temps de manipulation reste minimal. Cependant elles restent chères à l'achat.

1.2.2 PCR multiplexe nichée suivie d'une analyse de la courbe de fusion de l'ADN

Biofire[®] (FilmArray[®] (Biomérieux, France) permet l'identification de 6 bactéries Gram positives (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus pneumoniae*), 10 bactéries Gram négatives (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus spp.*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae complex*), 5 espèces de *Candida* et des gènes de résistance *mecA*, *vanA*, *vanB* et *blaKPC* (245). Une extraction de l'ADN, une amplification par PCR nichée ("nested PCR") et analyse de la courbe de fusion de l'ADN sont effectuées en une heure au sein d'un environnement fermé appelé une cassette, (**figure 16**).

La PCR « nichée » s'effectue en deux étapes (deux PCR) successives. Une première PCR permet d'amplifier toutes les cibles du panel. La deuxième PCR permet l'amplification de chaque cible individuellement à l'aide d'un couple d'amorces situées à l'intérieur du produit de la première PCR. De nombreuses évaluations et comparaisons avec d'autres technologies ont été effectuées pour ce test (246–248). Au cours de la PCR, un marqueur fluorescent sensible à l'hybridation de l'ADN, le LCGreen[®], est incorporé dans les amplicons d'ADN au fur et à mesure de leur synthèse et c'est la fluorescence issue du complexe ADN double brin LCGreen[®] qui est détectée (249).

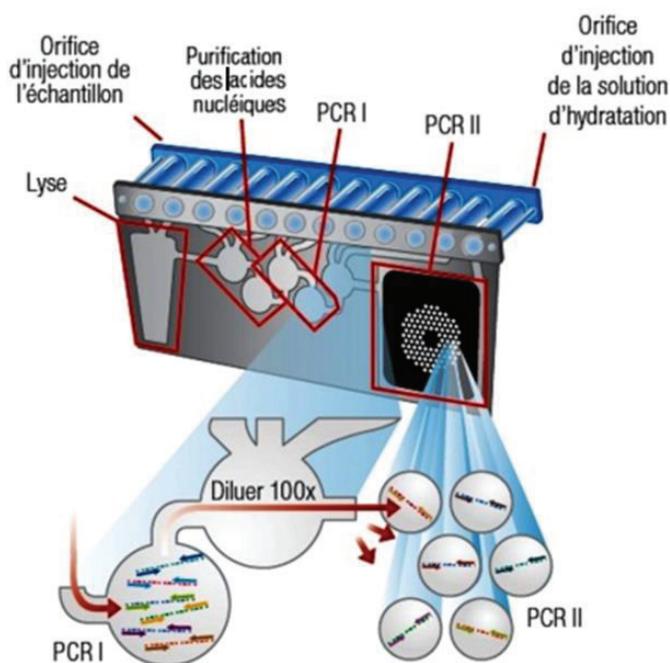


Figure 16 : Cassette du test FilmArray[®] (245)

Ce test peut être réalisé avant les résultats de la coloration de Gram. Cependant, un faible nombre de gènes de résistance sont identifiés.

1.2.3 PCR multiplexe suivie d'une détection par eSensor (GenMark, Etats-Unis)

La plateforme ePlex[™] (GenMark, Etats-Unis) est un système automatisé fonctionnant avec des cassettes. Contrairement au test FilmArray, une coloration de Gram après l'hémoculture positive est au préalable nécessaire afin de savoir qu'elle option disponible sur cette plateforme sera testée. Le test pour les bactéries Gram négatives (BCID-GN) permet

d'identifier 21 cibles, 6 gènes de résistance et un « Pan-GP » et « Pan-Candida ». Le test pour les bactéries Gram positives (BCID-GP) permet d'identifier 20 cibles, 4 gènes de résistance, ainsi que « Pan-GN » et « Pan-Candida ». Les 3 cibles « Pan-GN, Pan-GP et Pan Candida » permettent d'identifier des infections mixtes à Gram positif et à Gram négatif. Et finalement, le test pour les champignons (BCID-FP) permet d'identifier 16 champignons (**tableau 4**) (250).

Tableau 4 : Liste des cibles détectées dans chacun des trois panels disponibles sur la plateforme ePlex (GenMark, Etats-Unis) (250)

	ePlex BCID-GP	ePlex BCID-GN	ePlex BCID-FP
Micro-organisme	<i>Bacillus cereus</i> groupe	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>
	<i>Bacillus subtilis</i> groupe	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Candida auris</i>
	<i>Corynebacterium</i>	<i>Citrobacterspp</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
	<i>Cutibacterium acnes</i> (<i>Propionibacterium acnes</i>)	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Candida famata</i>
	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterobacter</i> (non-cloacae complex)	<i>Candida glabrata</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	<i>Candida guilliermondii</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida kefyr</i>
	<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Candida krusei</i>
	<i>Listeriaspp</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
	<i>Micrococcus spp</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> groupe	<i>Cryptococcus gattii</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Fusarium spp</i>
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Proteus spp</i>	<i>Rhodotorula spp</i>
	<i>Streptococcus spp</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
	<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Streptococcus anginosus</i> groupe	<i>Salmonella spp</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Serratia spp</i>		
<i>Streptococcus pyogenes</i> (GAS)	<i>Serratia marcescens</i>		
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
Gène de résistance	<i>mecA</i>	<i>CTX-M</i>	
	<i>mecC</i>	<i>IMP</i>	
	<i>vanA</i>	<i>KPC</i>	
	<i>vanB</i>	<i>NDM</i>	
		<i>OXA (OXA-23 et OXA-48)</i>	
	<i>VIM</i>		
Cibles Pan	Pan Gram-Negative	Pan Gram-Positive	
	Pan <i>Candida</i>	Pan <i>Candida</i>	

Cette plateforme s'appuie sur l'électromouillage pour effectuer l'extraction et l'amplification des acides nucléiques suivie de détection de cibles à l'aide de la technologie eSensor (251). L'électromouillage relève du domaine de la microfluidique et repose sur la modification des propriétés de mouillage d'une surface, c'est-à-dire le comportement d'un liquide en contact avec une surface solide généralement hydrophobe, suite à l'application d'un champ électrique. Les gouttelettes d'échantillon et de réactifs sont transférés de manière programmable au sein d'un réseau d'électrodes (252,253).

La détection des cibles s'effectue à l'aide de la technologie eSensor. Cette technologie est basée sur les principes de l'hybridation compétitive de l'ADN et de la détection électrochimique. Après amplification de l'ADN au cours de la PCR, une digestion de celui-ci par une exonucléase est effectuée pour créer des amplicons mono-brins. Ces amplicons s'hybrident dans un premier temps sur des sondes conjuguées au ferrocène (sonde signal). Puis le complexe amplicons/sondes signal s'hybride à une deuxième sonde (sonde de capture) liée à une électrode en or, le ferrocène est alors à proximité des électrodes (**figure 17**). Une différence de potentiel est ensuite appliquée aux bornes des électrodes et le courant faradique résultant, c'est-à-dire le courant généré par la réduction ou l'oxydation d'une substance chimique au niveau d'une électrode, est évalué par voltampérométrie (254).

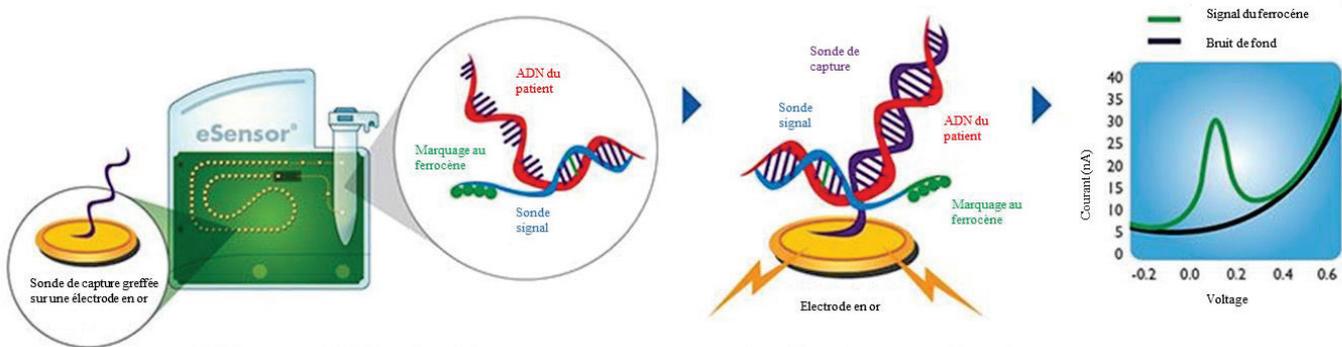


Figure 17 : Technologie eSensor (GenMark, Etats Unis), adapté de Pierce et Hodinka (255)

1.2.4 PCR multiplexe suivie d'une détection sur biopuce

1.2.4.1 Le test Unyvero Blood Culture (BCU)

Le système Unyvero (Curetis GmbH, Allemagne) est une plateforme de diagnostic moléculaire pour la détection de bactéries et de champignons, ainsi que des marqueurs de résistance aux antibiotiques. Il est composé de l'Unyvero lysator qui permet de lyser les échantillons cliniques, l'Unyvero analyzer qui peut traiter jusqu'à deux cartouches Unyvero dans lesquelles s'effectue la purification de l'ADN, les PCR multiplexes et l'hybridation sur biopuce et finalement l'Unyvero cockpit qui permet de gérer ces deux instruments et qui sert d'interface utilisateur. Le test Unyvero Blood Culture (BCU) permet la détection de plus de 35

pathogènes et 16 gènes de résistance en moins de cinq heures, directement à partir d'une hémoculture positive (**tableau 5**) (256).

Tableau 5 : Cibles détectées par le test Unyvero Blood culture (BCU)

Pathogène	Pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Corynebacterium spp.</i>
<i>Staphylococcus à coagulase négative (CoNS)</i>	<i>Mycobacterium spp.</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Propionibacterium acne</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Streptococcus pyogenes/dysgalactiae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Issatchenkia orientalis (Candida krusei)</i>
<i>Citrobacter freundii/koseri</i>	<i>Candida spp</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus spp</i>
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	Résistance
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>ermA</i>
<i>Proteus spp.</i>	<i>mecA</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>mecC</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>vanA</i>
<i>Klebsiella variicola</i>	<i>vanB</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>aac(6')/aph(2'')</i>
<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	<i>aacA4</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>blaCTX-M</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>blaIMP</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>blaKPC</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>blaNDM</i>

Ce test présente un des panels de cibles disponible (pathogènes et gènes de résistance) le plus large du marché.

1.2.4.2 Le test Sepsis Flow Chip

Le test Sepsis Flow Chip (Master diagnostica, Espagne) est composé d'une PCR multiplexe qui utilise des amorces biotinylées suivie d'une hybridation inverse sur une membrane. Les sondes spécifiques des cibles détectées se trouvent sur et à l'intérieur des pores de la matrice et la réaction a donc lieu dans un environnement tridimensionnel (257). Les signaux positifs sont visualisés via une réaction immuno-enzymatique colorimétrique par la

plateforme d'hybridation HS24, celle-ci possédant une caméra intégrée qui capture l'image de la puce qui est ensuite analysée par le logiciel hybrisoft qui identifie les motifs de points qui apparaissent sur la membrane (258). Ce test permet l'identification de 7 bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp.* et *Enterococcus spp.*), 10 bactéries Gram-négatives (*Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganni*, *Proteus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* *Pseudomonas aeruginosa* et, *Neisseria meningitidis*) *Candida albicans*, et 20 gènes de résistance (*blaCTX*, *blaSHV*, *blaSME*, *blaKPC*, *blaNMC/IMI*, *blaGES*, *blaIMP*, *blaGIM*, *blaVIM*, *blaSPM*, *blaSIM*, *blaNDM*, *blaOXA-23*, *blaOXA-24*, *blaOXA-48*, *blaOXA-51*, *blaOXA-58*, *mecA* et *vanA/B*) (258).

Ce test ne nécessite pas d'effectuer une coloration de Gram avant son utilisation.

1.2.4.3 Le test Prove-it Sepsis

Le test Prove-it Sepsis (Mobidiag, Finlande) permet l'identification de 50 micro-organismes (au travers des gènes *gyrB* et *parE*) ainsi que le gène de résistance *mecA* en se basant sur la PCR multiplexe et l'hybridation sur biopuce (259). Un nouveau test est actuellement en cours de développement (260).

1.2.4.4 La plateforme IC-System

La plateforme IC-System (ICubate Etats-Unis) se compose d'un processeur automatisé (iC-Processor), d'un lecteur (iC-Reader) et d'une cassette de test à usage unique qui contient tous les réactifs nécessaires à la lyse cellulaire, l'extraction d'acide nucléique, l'amplification des cibles et l'hybridation d'amplicons sur une biopuce. La PCR est effectuée en deux étapes de manière similaire à la PCR nichée. Dans un premier temps, des amorces sont utilisées pour enrichir les cibles. Ces amorces contiennent des sites d'amorçage intégrés pour la deuxième PCR ainsi que des séquences dites « index » pour l'étape d'hybridation. Une deuxième PCR est ensuite effectuée à l'aide d'amorces fortement concentrées et présentant un rapport asymétrique (261). L'hybridation s'effectue en deux étapes. Dans un premier temps les amplicons s'hybrident sur des sondes de capture immobilisées possédant une séquence complémentaire

puis, une seconde sonde libre de détection spécifique marquée par fluorescence s'hybride sur la cible après la capture (**figure 18**) (262).

Le test iC-GPC permet la détection de 5 bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, et *Enterococcus faecium*) et 3 gènes de résistance *mecA*, *vanA* et *vanB* (262). Le test iC-GN permet l'identification de 8 bactéries Gram négatives (*Acinetobacter baumannii* complexe, *Enterobacter cloacae* complexe, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.* et *Serratia marcescens*), ainsi que de 3 gènes de résistance *blaKPC*, *blaNDM* et *blaCTX-M-1* (263).

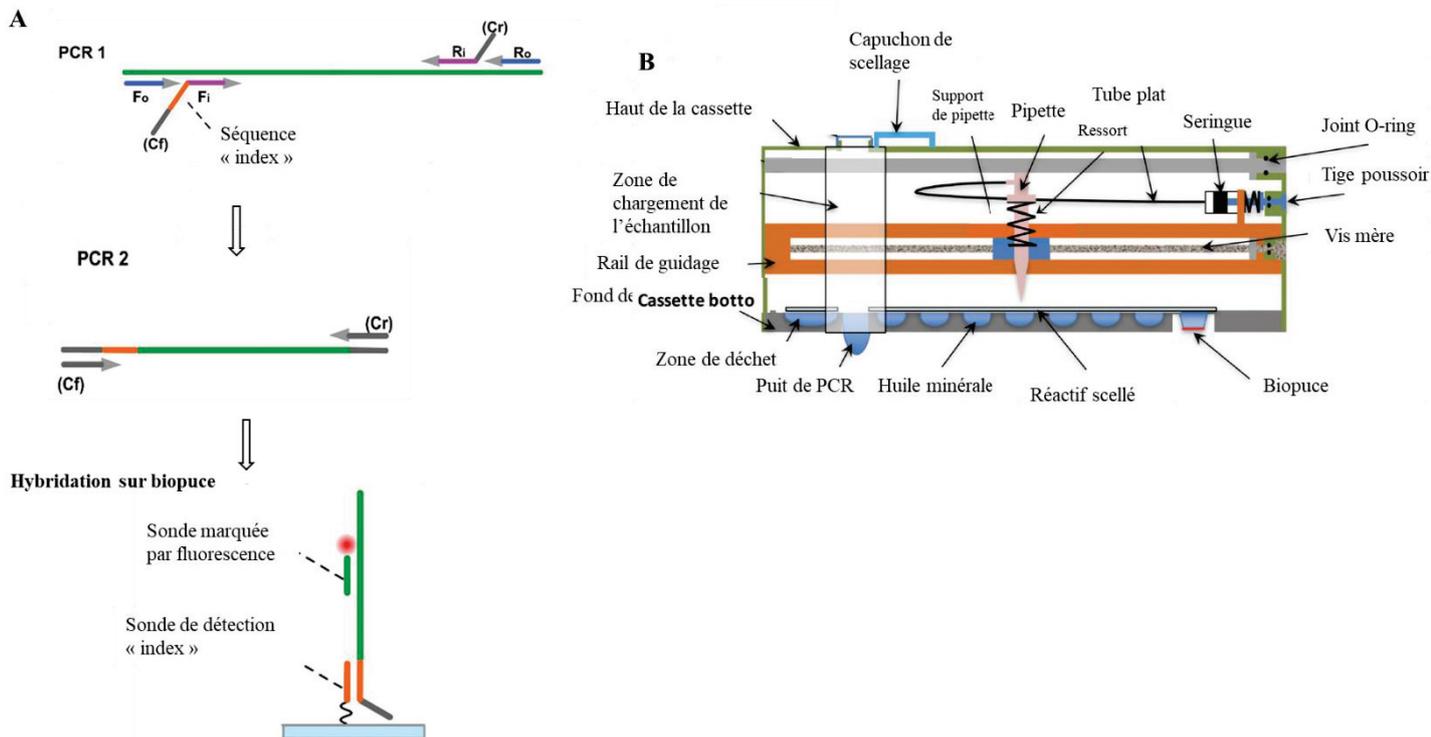


Figure 18 : A : Principe de la PCR et l'hybridation sur biopuce utilisées au sein de la plateforme IC System et B : Représentation de la cassette iC

A : Fi et Ri contiennent des sites d'amorçage intégrés (Cf et Cr) pour les amorces de la deuxième PCR ainsi que les séquences « Index » (en orange) utilisées lors de l'étape d'hybridation sur biopuce.

Peu de publications sont actuellement disponibles pour évaluer ce test.

1.2.5 PCR multiplexe suivie d'un test ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Le test Hyplex BloodScreen PCR ELISA (Amplex BioSystems, Allemagne) permet la détection du gène de résistance *mecA* ainsi que de 7 bactéries Gram-positives (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* et *Enterococcus faecalis/Enterococcus faecium*) et 3 bactéries Gram-négatives (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella spp.*) en ciblant le gène codant pour l'ARN 16S après une hémoculture positive. Les amplicons sont ensuite ajoutés à des plaques microtitration dans lesquelles se trouvent des sondes de capture. Un test ELISA est ensuite effectué (264). Les amplicons sont biotinylés et lors du test ELISA, les anticorps conjugués à la HRP (Peroxydase de raifort) se lient aux complexes sondes de capture/amplicons biotinylés et après une incubation avec le tétraméthylbenzidine (TMB) un précipité opaque est formé. La quantification du signal est alors réalisée par lecture de densité optique (265). Le test complet, étape d'extraction de l'ADN comprise, dure entre 4,5 et 6 heures.

Peu de publications sont actuellement disponibles pour évaluer ce test

1.3 Test sans amplification préalable de l'ADN

D'autres tests développés pour l'identification des pathogènes et résistances aux antibiotiques à partir d'une hémoculture positive s'effectuent sans amplification préalable de l'ADN des micro-organismes.

1.3.1 Hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

L'hybridation fluorescente *in situ* consiste à identifier un organisme après hybridation de sondes marquées par un fluorophore à l'ADN ou à l'ARN, puis en visualisant les échantillons au microscope confocal. Après hémoculture, les cellules sont immobilisées sur une lame de verre puis rendues perméables suite à un bain d'éthanol afin de permettre l'hybridation des sondes sur la séquence nucléotidique ciblée, avant lecture des résultats au microscope (248). Les agents pathogènes sont identifiés en une à deux heures (266). Les sondes d'acides nucléiques peptidiques (PNA) sont similaires aux sondes FISH mais le squelette d'ADN qui est

chargé négativement est remplacé par un squelette en polyamide ou « peptide » non chargé. Ce changement structurel améliore l'hybridation de la sonde à la cible (267).

Le test AdvanDX QuickFISH® (OpGen®, Etats-Unis), basé sur la technique du PNA-FISH, cible le gène codant pour l'ARN 16S pour identifier directement les organismes en trente minutes. Par le biais de quatre panels, le AdvanDX QuickFISH® peut identifier des espèces du genre *Enterococcus spp.*, des bactéries Grams négatives (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*) et des espèces du genre *Candida spp.*.

Il peut également identifier et différencier *Staphylococcus aureus* d'autres *Staphylocoque* à coagulase négative. Le test XpressFISH® (AdvanDx, Etats-Unis) quant à lui permet d'identifier rapidement les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (*mecA*) (268).

Le test Accelerate PhenoTest™ (Accelerate diagnostics, Etats-Unis) permet après une filtration sur gel et une hybridation *in situ*, d'identifier par fluorescence des espèces bactériennes en une heure. Une microscopie automatisée permet de réaliser un test de susceptibilité aux antibiotiques en cinq heures grâce à une analyse morphocinétique des cellules bactériennes vivantes en faisant correspondre les résultats à des profils de croissance de référence (269,270).

Aucune amplification de l'ADN n'est nécessaire pour ces tests mais un nombre limité de sondes peuvent être utilisées.

1.3.2 Hybridation sur biopuce

Le test Verigene® (Nanosphere, Etats-Unis) utilise les propriétés plasmoniques des nanoparticules d'or pour détecter les pathogènes. Les acides nucléiques extraits d'une hémoculture positive sont incubés avec des sondes de capture spécifiques des agents pathogènes ciblés, immobilisées sur une surface. Un deuxième jeu de sondes, conjuguées à des nanoparticules d'or et dont les séquences sont complémentaires à l'ADN ciblé, s'hybrident ensuite sur ce complexe (271). Le test Verigene BC-GP permet la détection en moins de trois

heures de 13 pathogènes ainsi que de trois gènes de résistance. Le test Verigene BC-GN permet quant à lui l'identification de 9 pathogènes et de 6 gènes de résistance (**tableau 6**) (272).

Tableau 6 : Cibles détectées par les tests Verigene BC-GP et Verigene BC-GN

Test BC-GP	Test BC-GN
Pathogène	Pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Citrobacter spp.</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Proteus spp.</i>
<i>Staphylococcus spp.</i>	Gène de résistance
<i>Streptococcus spp.</i>	<i>blaCTX-M</i>
<i>Micrococcus spp.</i>	<i>blaIMP</i>
<i>Listeria spp.</i>	<i>blaKPC</i>
Gène de résistance	<i>blaNDM</i>
<i>mecA</i>	<i>blaOXA</i>
<i>vanA</i>	<i>blaVIM</i>
<i>vanB</i>	

1.3.3 Génération et amplification de matrice enzymatique

Le test Cognitor[®] Minus (Momentum Bioscience Ltd., Royaume-Uni) est effectué sur des échantillons de sang négatifs après plus de 12 heures d'incubation et permet d'exclure la présence de bactéries et de champignons dans les échantillons de sang, avec une valeur prédictive négative de 99,5% (273). Ce test se base sur la génération et l'amplification de matrice enzymatique (EGTA) en détectant l'activité de l'ADN polymérase d'un grand nombre de bactéries et de champignons et permet d'arrêter le traitement antibiotique des patients rapidement en cas d'échantillon négatif. Dryden et al. ont montré que l'exclusion rapide d'une infection du sang chez le patient, par rapport aux hémocultures négatives après 5 jours peut être un outil puissant dans la gestion des antibiotiques et des patients (274).

Ce test permet, dans un premier temps, de distinguer les organismes vivants des cellules de l'hôte permettant ainsi de diminuer le bruit de fond résultant de l'activité enzymatique des autres cellules de l'hôte. Puis, suite à une lyse des cellules microbiennes, l'activité de l'ADN polymérase est alors détectée en utilisant un substrat d'ADN synthétique exclusif (274).

1.3.4 Test rapide pour l'identification de *Staphylococcus aureus*

Des tests rapides ont été développés pour identifier *Staphylococcus aureus*, un des pathogènes les plus rencontrés dans les cas de sepsis. Ces tests se basent sur les propriétés spécifiques du micro-organisme, comme par exemple, la présence de coagulase, qui est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin et qui est absente chez d'autres staphylocoques. Des tests d'agglutination tels que Staphaurex™ (ThermoFisher Scientific, Etats-Unis) par exemple peuvent être utilisés afin de discriminer *Staphylococcus aureus* des autres staphylocoques. Au cours de ces tests, des particules de latex, portant des anticorps reconnaissant un ou plusieurs antigènes de surface de *Staphylococcus aureus* tels que les protéines A ou des polysaccharides. (275).

Ces tests sont souvent suivis d'un second test permettant d'identifier la protéine PBP2a qui est un marqueur de résistance à la pénicilline (gène *mecA*). Des tests immunochromatographiques tels qu'Alere™ PBP2a (Abbott, Etats-Unis) peuvent par exemple être réalisés à partir de cultures.

1.4 Spectrométrie de masse

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse s'est peu à peu imposée dans les laboratoires microbiologiques en tant que complément aux techniques jusqu'à lors utilisées en routine pour l'identification des pathogènes. La spectrométrie de masse permet d'identifier et de quantifier les molécules en analysant les rapports masse / charge (m/z) des ions, le spectre de masse alors obtenu peut être interprété pour déterminer l'identité des différentes molécules au sein d'un échantillon. Un spectromètre de masse est composé de trois ensembles : (a) une source d'ions pour ioniser et transférer les molécules d'ions de l'échantillon en une phase gazeuse, (b) un analyseur de masse qui sépare les ions selon leur rapport m/z et (c) un dispositif de détection pour suivre les ions séparés (276) (**figure 19**).

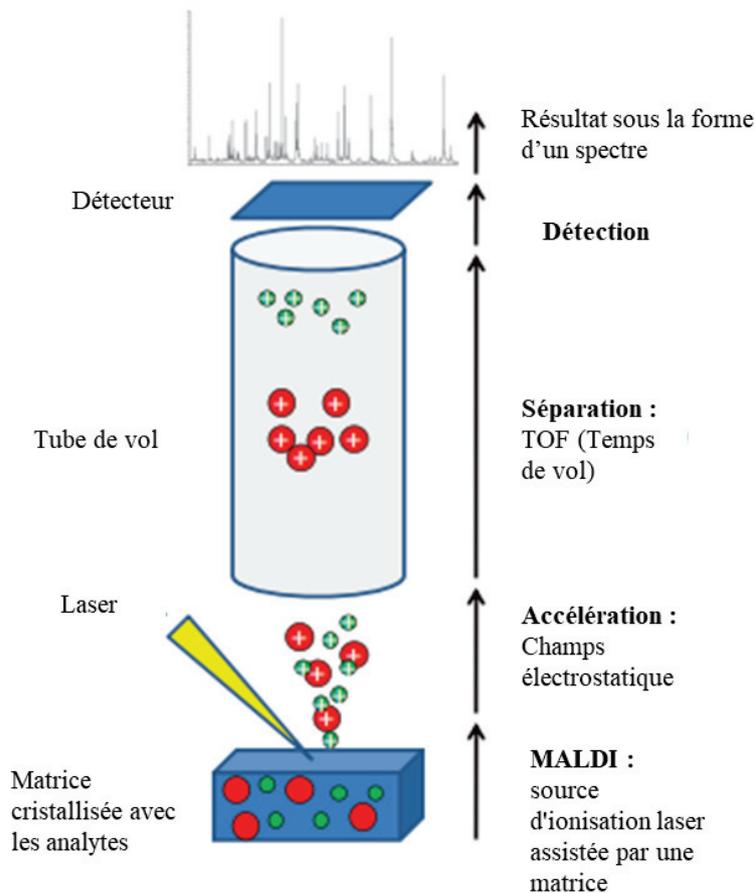


Figure 19 : Principe de l'identification bactérienne par MALDI-TOF adapté de Croxatto et al. (276)

L'échantillon est mélangé avec une matrice sur une plaque métallique conductrice. Après cristallisation de la matrice et de l'analyte, la plaque métallique est introduite dans le spectromètre de masse et est bombardée de brèves impulsions laser. Les molécules ionisées sont accélérées par un champ électrostatique et éjectées à travers un tube de vol métallique jusqu'à ce qu'elles atteignent un détecteur situé à l'autre extrémité du tube. Les ions, ainsi séparés selon leur TOF, créent un spectre de masse composé de pics d'intensité variable qui constitue une signature et qui est comparée à une base de données pour l'identification des bactéries selon l'espèce ou le genre.

Le MALDI-TOF pour « *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight* » est un appareil de spectroscopie de masse capable d'identifier de manière rapide et précise de nombreuses bactéries Gram positives et négatives. Le MALDI est une technique d'ionisation au cours de laquelle une matrice comme l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque, qui possède une forte absorption optique dans la gamme de la longueur d'onde du laser utilisé, absorbe l'énergie des lasers ultraviolets pour créer des ions à partir de molécules de haut poids moléculaire avec une fragmentation minimale. Le rapport m/z

peut être déterminé par le TOF des ions, c'est-à-dire le temps de vol nécessaire aux différents ions pour atteindre le détecteur, les plus petits arrivant en premier (276).

La majorité des échantillons testés sont cultivés sur milieu solide, puis une seule colonie est sélectionnée. Cependant, il est possible de réaliser une identification bactérienne par cette technique directement à partir d'une hémoculture positive, en séparant les bactéries des cellules sanguines suite à une centrifugation à faible vitesse ou en utilisant des détergents comme le SDS (Laurylsulfate de sodium) (277). Des kits commerciaux comme le MBT Sepsityper™ (Bruker, Etats-Unis) pour la préparation des échantillons sont également disponibles. L'un des principaux avantages de l'utilisation du MALDI-TOF pour l'identification des bactéries est le délai de réalisation, qui est réduit de 24 à 48 h à moins d'une heure. Cependant, l'identification dans les cas d'infections polymicrobiennes, bien que possible, reste difficile (278).

Le MALDI TOF peut également être utilisé pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques des pathogènes. L'hydrolyse du noyau des bêta-lactames par la bêta-lactamase conduit à un gain de masse de 18 Da qui peut être facilement détecté par le MALDI TOF (279,280). De même, des études ont montré qu'un signal à 2415 m/z correspondait à un petit peptide, fortement associé aux *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA). Ce signal n'est obtenu que dans 37% des MRSA, dû aux différents mécanismes de résistances mais la spécificité est élevée (98%) (281). Le kit MBT STAR®-Carba IVD (Bruker Daltonics, Etats-Unis) utilisé en parallèle avec le logiciel MBT STAR-BL IVD permet une identification rapide des carbapénémases de classe A, B ou D chez les bactéries Gram négatives (282).

Cette technique est rapide et sensible mais requiert un temps de manipulation important. Dans certains pays, notamment dans les laboratoires de bactériologie des pays développés, elle a remplacé actuellement les systèmes basés sur l'étude des caractères biochimiques des bactéries.

1.5 Test en cours de développement

Lors de la croissance des micro-organismes (bactéries, champignons) au sein d'une bouteille d'hémoculture un grand nombre de produits métaboliques, capables d'exister en phase gazeuse à température ambiante sont émis par ces organismes (283,284). Ces composés

organiques volatiles (COV) peuvent être des composés aromatiques, des composés contenant de l'azote ou encore des composés soufrés (283). En raison de la diversité des gènes responsables de la production de ces métabolites entre les différentes espèces, l'hypothèse que différents micro-organismes produisent des « empreintes métaboliques volatiles » distinctes a été émise. L'espace présent entre le volume occupé par le milieu de culture et le haut de la bouteille d'hémoculture et a été analysée et il a été montré que ces signaux pouvaient être uniques et spécifiques des micro-organismes en croissance (285,286).

Le test SpecID™ (Specific Technologies, Etats-Unis) se base sur les propriétés des COV et promet l'identification des agents pathogènes à partir d'une hémoculture positive via un réseau de capteurs colorimétriques. Chaque capteur change de couleur suivant la réaction chimique produite par la présence des COV et le motif de couleur résultant forme une signature spécifique (287).

Le tableau présenté ci-dessous (**tableau 7**) reprend les différentes caractéristiques des tests présentés précédemment. La sensibilité est la proportion de vrais positifs qui sont correctement identifiés par le test tandis que la spécificité est la proportion de vrais négatifs qui sont correctement identifiés par le test (288).

Tableau 7 : Caractéristiques des différents tests de diagnostics après hémoculture présentés dans le chapitre 3

Test	Délai d'obtention des résultats après hémoculture (heure)	Nombre de cibles détectées	Résistance détectée	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Marquage	Référence
Xpert® MRSA/SA BC (Cepheid, Etats-Unis)	1	1	<i>mecA</i>	98 à 100	99 à 100	Approuvé par la FDA, marquage CE-IVD	(272)
BD MAX™ StaphSR Assay (BD Diagnostics, Canada)	2,5	1	<i>mecA</i>	98 à 100	98 à 100	Approuvé par la FDA, marquage CE-IVD	(272)
Biofire® (FilmArray®) (Biomérieux, France)	1	21	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> et <i>blaKPC</i>	>96	98 à 100	Approuvé par la FDA, marquage CE-IVD	(289)
ePlex™ (GenMark, Etats-Unis)	1,5	BCID-GN : 21 BCID-GP : 20 BCID-FP : 16	BCID-GN : 3 BCID-GP : 4	ND	ND	Approuvé par la FDA, marquage CE-IVD	(290)
Unyvero BCU (Curetis GmbH, Allemagne)	4 à 5	35	16	97	99 à 100	Marquage CE-IVD	(244,291)
Sepsis Flow Chip (Master Diagnostica, Espagne)	3	18	20	93-94	100	Marquage CE-IVD	(258)
iC-GPC et iC-GN (iCubate Etats-Unis)	3 à 4	iC-GPC : 5, iC-GN : 8	iC-GPC : 3, iC-GN : 3	iC-GPC : 94 à 100	iC-GPC : 98 à 100	Approuvé par la FDA, marquage CE-IVD	(292)
Hyplex BloodScreen PCR ELISA (Amplex BioSystems, Allemagne)	4,5 à 6	10	<i>mecA</i>	96 à 100	92 à 100	ND	(264)
AdvanDX QuickFISH® (OpGen®, Etats-Unis)	30 minutes	10	Aucune	97 à 100	90 à 100	Approuvé par la FDA, marquage CE-IVD	(289)
XpressFISH® (AdvanDx, Etats-Unis)	1	1	<i>mecA</i>	97 100	98 à 100	Approuvé par la FDA, marquage CE-IVD	(268)
Accelerate PhenoTest™ (Accelerate diagnostics, Etats-Unis)	1 (Pathogène) 5 (Résistance)	28	20	96	99	Approuvé par la FDA, marquage CE-IVD	(289)

Verigene® (Nanosphere, Etats-Unis)	3	BC-GP : 13, BC-GN : 9	BC-GP : 3, BC-GN : 6	BC-GP : 92 à 100, BC-GN : 81 à 100	> 98	Approuvé par la FDA, marquage CE-IVD	(289)
Cognitor® Minus (Momentum Bioscience Ltd., Royaume-Uni)	3	NA	NA	NA	NA	Marquage CE-IVD	(273)
MBT STAR®-Carba IVD (Bruker Daltonics, Etats-Unis)	<1	3	ND	96 à 100	89 à 100	Marquage CE-IVD	(293,294)

NA : Non applicable et ND : Non déterminé. La sensibilité et la spécificité varient selon les études.

2 Méthode de diagnostic directement sur les échantillons de sang

L'analyse directe des échantillons de sang de patient sans le recours à une hémoculture peut réduire considérablement le délai d'identification des agents pathogènes et ainsi réduire les temps et coût d'hospitalisation du patient. L'ensemble des performances des tests présentés ci-dessous sera présenté dans le **tableau 8**.

2.1 Amplification des acides nucléiques et post amplification

2.1.1 PCR multiplexe et analyse des courbes de fusion

Le LightCycler[®] SeptiFast (Roche Molecular, Allemagne) est un système automatisé permettant l'identification de 8 bactéries Gram-négatives (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*/*Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*/*Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Stenotrophomonas maltophilia*), 6 bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus*, *Staphylocoques* à coagulase négative, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*) et 5 champignons (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* et *Aspergillus fumigatus*) ainsi que le gène de résistance *mecA* à partir d'un échantillon de sang de 1,5 ml pour une durée de 5 à 8 heures. Ce test cible l'espaceur interne transcrit (ITS) qui est une région de l'ADN située entre les gènes codant pour l'ARN 16S et l'ARN 23S impliqués dans le grande et petite sous unité du ribosome bactérien (295). L'ADN des agents pathogènes est amplifié à l'aide d'une PCR multiplexe et leur identification est réalisée par l'analyse des courbes de fusion des amplicons. De nombreuses études de performances ont été réalisées sur ces tests. Elles ont montré des sensibilités (de 43% à 95%) et des spécificités (de 60% à 100%) très variables (296).

La détection des gènes de résistance est limitée avec seulement un gène de résistance détecté.

2.1.2 qPCR ou PCR en temps réel

Le test MagicPlex™ Sepsis (SeeGene, Corée du Sud) est un test automatisé qui s’effectue en plusieurs étapes. Après extraction de l’ADN à l’aide du SeePrep12™ (SeeGene, Corée du Sud), une première PCR conventionnelle permet d’amplifier l’ADN des micro-organismes en deux tubes différents, un premier pour les bactéries Gram positives et les gènes de résistance *mecA*, *vanA* et *vanB* et un deuxième pour les bactéries Gram négatives et les champignons. Les agents pathogènes sont ensuite identifiés au cours de deux PCR en temps réel. Ce test permet la détection et l’identification de plus de 90 agents pathogènes au niveau du genre bactérien ou de l’espèce pour 27 d’entre eux, pour un volume de sang initial de 1 ml en environ 5 heures (**figure 20**) (297,298). Les études publiées font état d’une sensibilité allant de 37% à 65% et d’une spécificité allant de 77% à 92% (296).

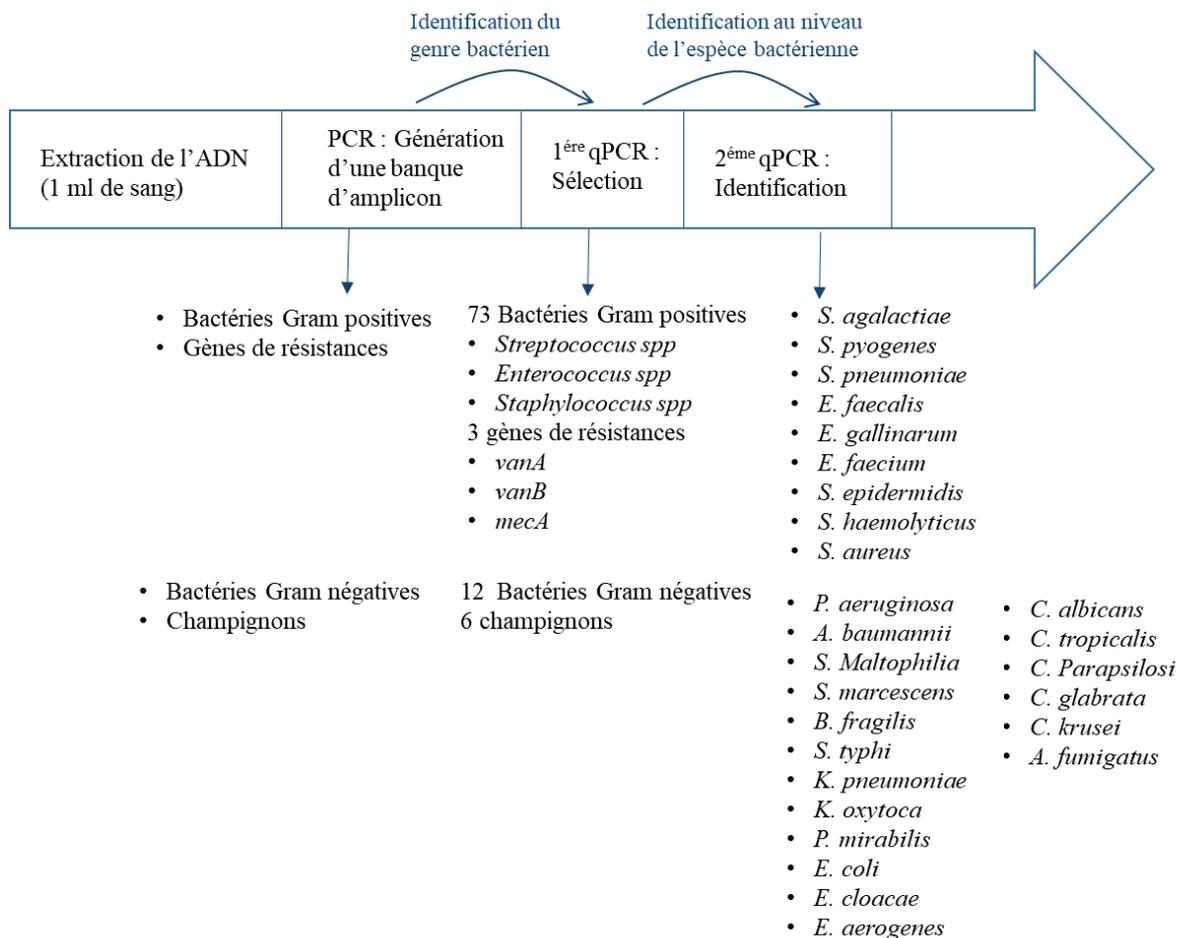


Figure 20 : Déroulé du test MagicPlex™ Sepsis (SeeGene, Corée du sud)

2.1.3 PCR suivie d'un séquençage

SepsiTest™ (Molzylm, Allemagne) est un test qui cible les zones conservées de l'ARN 16S et 18S pour l'amplification de l'ADN bactérien et fongique. Ce test peut détecter 345 bactéries et champignons, pour des échantillons de sang de 1 ml dans un délai d'environ 8 à 12 heures (295). Aucun gène de résistance n'est identifié. Les échantillons de sang sont dans un premier temps enrichis en micro-organismes au travers de la technologie MolYsis™ qui permet la lyse sélective des cellules hôtes tandis que les micro-organismes, en raison de leurs parois cellulaires rigides, restent intacts. L'ADN bactérien est ensuite extrait, amplifié et les amplicons sont séquencés pour l'identification des organismes (299). Les performances de ce test sont variables, avec une sensibilité allant de 21% à 85% et une spécificité allant de 58% à 95% (296).

Deux tests arrivés récemment sur le marché se basent sur la technologie NGS (séquençage nouvelle génération) comme Illumina®, et permettent de séquencer l'ADN et l'ARN beaucoup plus rapidement que les méthodes précédentes comme le séquençage de Sanger. C'est le cas du test iDTECT™ Blood (PathoQuest, France) et du test Karius® test (Karius, Etats-Unis), ce dernier fonctionnant sur des échantillons de plasma sanguin (300,301).

Le séquençage permet d'identifier un grand nombre de pathogènes. Cependant, aucun gène de résistance n'est identifié et un temps important de manipulation est requis.

2.1.4 PCR ESI-MS (Spectroscopie de masse utilisant une ionisation par électronébuliseur)

Le système IRIDICA (Abbott Laboratories, Etats-Unis) auparavant connu sous le nom de PLEX-ID (Abbott Molecular, Etats-Unis) peut détecter et identifier jusqu'à 780 pathogènes (bactéries Gram positives, Gram négatives et des champignons) par l'intermédiaire de plusieurs PCR et d'une analyse des amplicons par ESI MS en 6 à 8 heures. Plusieurs PCR sont réalisées en utilisant 8 paires d'amorces s'hybridant à des régions conservées des gènes codant pour l'ARN 16S et 18S et ciblant une très grande variété de micro-organismes. L'ESI-MS mesure ensuite le rapport m/z des amplicons générés par les PCR. L'identification des agents pathogènes repose sur l'analyse de la composition en base nucléotidique, A, C, G et T des

amplicons (302). La composition de chaque amplicon est alors comparée à une base de données permettant d'identifier les agents pathogènes. Le processus de ce test est présenté en **figure 21**. Ce test permet également l'identification de 4 gènes de résistance *mecA*, *blaKPC*, *vanA* et *vanB*. Une seconde version du PLEX-ID acceptant notamment des échantillons de sang de 5 ml contre 1,25 ml auparavant, afin d'augmenter la sensibilité de détection a été développée.

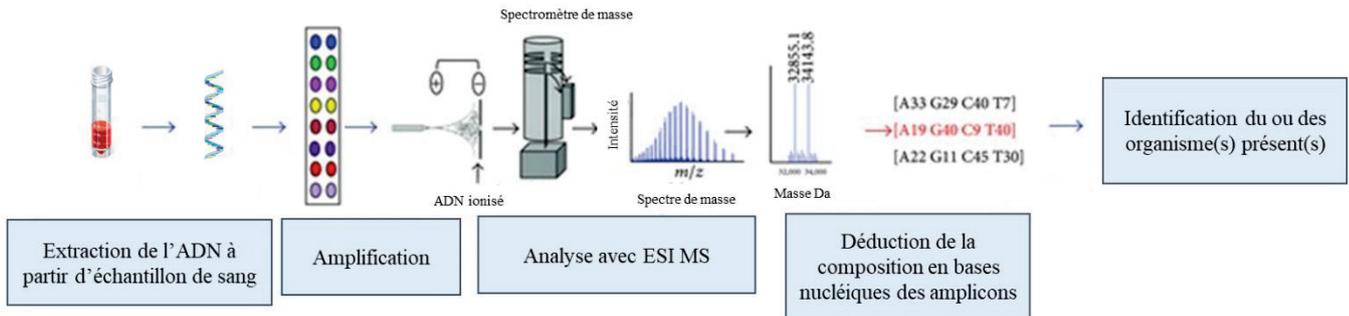


Figure 21 : Principe de fonctionnement du test IRIDICA (Abbott Molecular), adapté de Jordana-Lluch et al. (302)

2.1.5 PCR et résonance magnétique

Le test T2Bacteria[®] (T2Biosystems, USA) permet d'identifier 6 bactéries (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) en 3 à 5 heures. Ce test est effectué sur la plateforme T2Dx. Après une lyse des globules rouges, l'ADN bactérien est extrait suite à une lyse par rupture mécanique des cellules dans un broyeur à bille. L'ADN est amplifié et les amplicons sont identifiés par résonance magnétique impliquant des nanoparticules superparamagnétiques couplées à des sondes spécifiques, qui s'agglomèrent entre elles en présence d'amplicons. Deux types de nanoparticules sont définies pour chaque cible (303). La résonance magnétique mesure la réaction des molécules d'eau en présence de champs magnétiques. Lors de la formation des agglomérats, une modification de l'environnement hydraté dans l'échantillon est observée ce qui modifie le signal obtenu en résonance magnétique et indique la présence de la cible testée (304).

2.2 Tests actuellement en phase de développement

2.2.1 Amplification isotherme cercle à cercle et hybridation sur biopuce

Le test ASTrID[®] (Q-Linea, Suède) permet l'identification de pathogènes et gènes de résistance en se basant sur des sondes PLP (*Padlocks probes*) qui sont des longs oligonucléotides (environ 100pb), dont les extrémités sont complémentaires aux extrémités 5' et 3' de la séquence de la cible (305). Lors de l'étape d'hybridation des amplicons sur les sondes, les deux extrémités de la sonde sont mises en contact, permettant de former un élément circulaire qui sera ensuite amplifié par réplication circulaire de l'ADN (RCA) suivie d'une amplification isotherme cercle à cercle (*Circle to Circle Amplification C2CA*) qui permet d'amplifier en un très grand nombre ces éléments circulaires (306). Les produits présentent un marquage fluorescent et s'hybrident sur des biopuces.

2.2.2 Séquençage Ion Torrent

Le test LiDiae[®] (DNAe, Angleterre) se base sur le séquençage ion torrent pour l'identification des pathogènes et de gènes de résistance en trois heures. Une préparation des échantillons de sang est effectuée au cours de laquelle l'ADN des micro-organismes est extrait. Puis lors de l'amplification des acides nucléiques, les nucléotides sont incorporés pour la synthèse du brin complémentaire et libèrent des ions hydrogène, qui peuvent être détectés sous forme de signaux électriques (307).

2.2.3 PCR et biopuce

Le test FAST-ID[™] BSI (Qvella, Etats-Unis) permet d'identifier des pathogènes en moins d'une heure. C'est un test automatisé où l'extraction, l'amplification des ARN et l'hybridation sur biopuce ont lieu au sein d'une cassette unique. L'extraction s'effectue au travers d'un champ électrique et en deux étapes, avec une lyse des globules rouges avant extraction des acides nucléiques bactériens (308).

Le tableau présenté ci-dessous (**tableau 8**) reprend les différentes caractéristiques des tests présentés précédemment.

Tableau 8 : Caractéristiques des différents tests de diagnostics à partir d'un échantillon de sang présentés dans le chapitre 3
 ND : Non déterminé. La sensibilité et la spécificité varient selon les études

Test	Délai d'obtention des résultats (heure)	Volume de sang (ml)	Cible détectée	Résistance détectée	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Corrélation avec les méthodes traditionnelles (%)	Limite de détection (UFC/ml)	Marquage	Nombre échantillon lors d'un test	Référence
LightCycler® SeptiFast (Roche Molecular, Allemagne)	5 à 6	1,5	19	<i>mecA</i>	43 à 95	60 à 100	43 à 83	3 à 100	Marquage CE-IVD	6	(296)
MagicPlex™ Sepsis (SeeGene, Corée du Sud)	5	1	90	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> et <i>vanB</i>	37 à 65	77 à 92	73	30	Marquage CE-IVD	ND	(296,297)
IRIDICA BAC (Abbott Laboratories, Etats-Unis)	6 à 8	5	780	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> et <i>blaKPC</i>	45 à 83	69 à 94	ND	0.25–128	Marquage CE-IVD	6	(309,310)
SepsiTest™ (Molzzy, Allemagne)	8 à 12	1	345	Aucune	21 à 85	58 à 95	ND	10 à 80	Marquage CE-IVD	12	(310)
T2Bacteria® (T2 Biosystems, USA)	3 à 5	3 à 4	6	Aucune	76 à 96	88 à 91	ND	1	Approuvé par la FDA et marquage CE-IVD	6	(310,311)
Karius® test (Karius, Etats-Unis)	>24	NA	ND	Aucune	ND	ND	ND	ND	-	ND	(300)
iDTECT™ Blood (PathoQuest, France)	48	ND	> 1200	Aucune	ND	ND	ND	ND	Marquage CE-IVD	ND	(301)

3 Bilan sur les techniques d'identification des pathogènes impliqués dans les cas d'infections du sang

Les méthodes standards actuelles de diagnostic sont basées sur la culture microbiologique et ont donc un délai d'exécution long (jusqu'à 5 jours). Les différents tests présentés ci-dessus font intervenir différentes techniques présentant des avantages et des inconvénients, liés aussi bien à des aspects pratiques qu'économiques. La plupart des méthodes d'identification s'effectuent après une hémoculture permettant la croissance des micro-organismes. En effet, le diagnostic directement à partir d'échantillon de sang de patient présente encore une sensibilité souvent limitée, en raison notamment du faible volume de sang analysable (1 à 5 ml) et du faible nombre de pathogènes présent. Certaines méthodes ne permettent pas d'identifier les gènes de résistance comme le SeptiTest ou seulement en faible nombre, généralement *mecA*, *vanA* et *vanB*. Les tests de sensibilité phénotypiques restent donc très largement utilisés. De plus, beaucoup de ces tests sont limités par le nombre d'agents pathogènes qu'ils peuvent détecter, et avec parfois des difficultés à différencier les espèces impliquées dans les infections polymicrobiennes. Un résumé de ces méthodes d'identification est présenté dans la **figure 22**.

L'introduction de toute méthode permettant une identification précoce d'une bactérie et d'éventuels marqueurs de résistance peut permettre de réduire la durée de l'antibiothérapie empirique au profit d'antibiotiques ciblés et efficaces contre le pathogène identifié. Ceci peut avoir un impact bénéfique pour les patients en réduisant les durées de traitement et d'hospitalisation. Cependant, estimer l'impact que ces technologies auront sur la prise en charge du sepsis dans les pratiques courantes reste un défi (244). Les attentes concernant les nouveaux tests de diagnostic pour le sepsis sont importantes et ils doivent répondre à de très nombreux critères. En effet, en plus de permettre l'identification d'un grand nombre de pathogènes et de gènes de résistance, ils devront être sensibles, spécifiques, faciles d'utilisation, rapides et abordables (310).

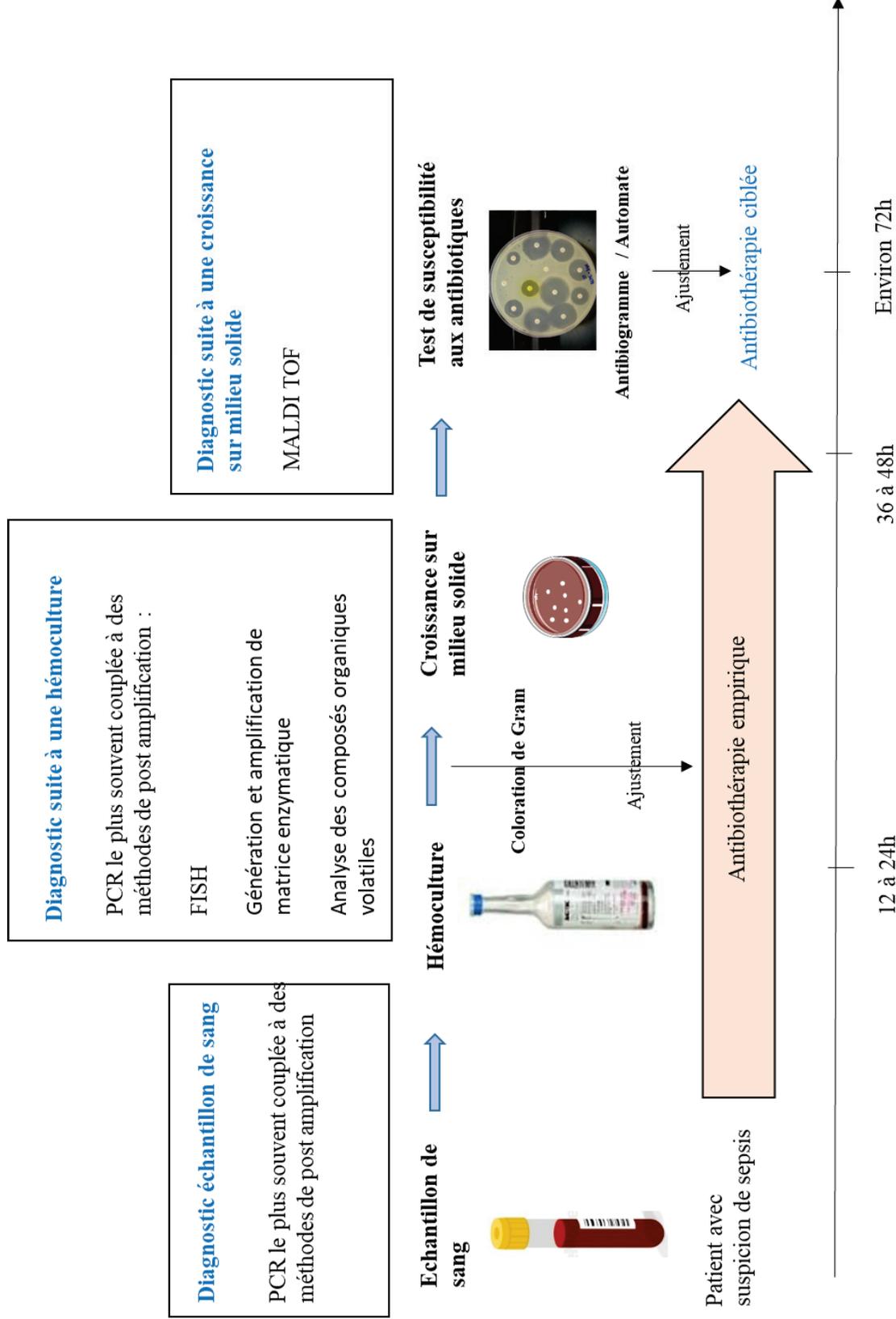


Figure 22 : Schéma récapitulatif des principales méthodes de détection actuelles des infections du sang

Les durées indiquées sont approximatives et correspondent aux organismes facilement cultivables

Principe du projet de thèse

Ce projet de thèse fait partie intégrante du projet FAPIC (*Fast Assay for Pathogen Identification and Characterization*), financé par l'union Européenne (H2020 PHC10 sur 5 ans (2015 -2020)) qui a pour but de développer deux systèmes de diagnostic pour l'identification et la caractérisation des pathogènes détectés directement à partir d'échantillons de sang. Ce test sera capable d'identifier en un seul test, 40 gènes de résistance et 53 pathogènes en 5 à 6 heures selon la méthode présentée dans la **figure 23**.

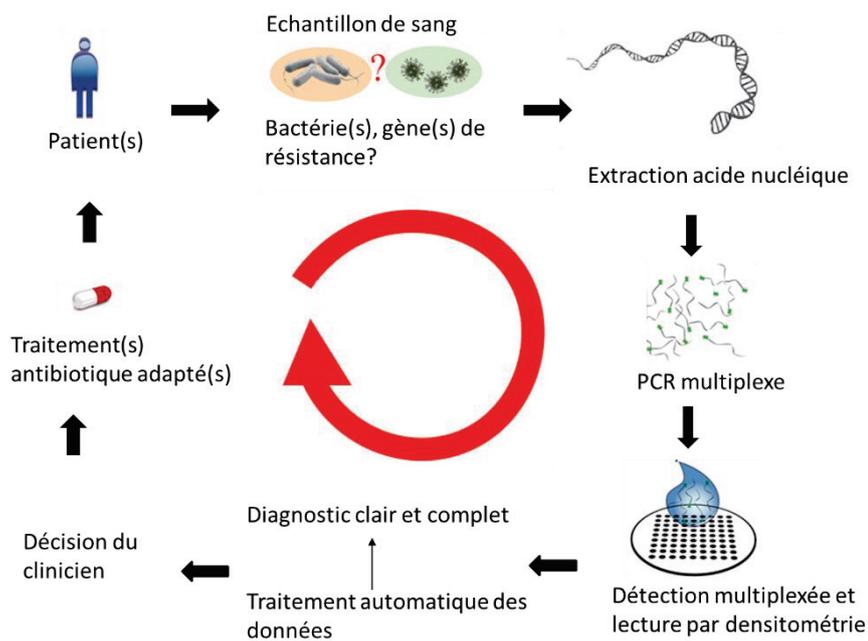


Figure 23 : Principe du test développé au sein du projet FAPIC

L'extraction de l'ADN sera réalisée en utilisant la technologie MolYsis™ développée par la société Molzym et détaillée dans la partie Matériels et Méthodes.

Cette thèse a pour objectifs de concevoir les PCR multiplexes, de développer le système de détection sur les biopuces, de définir une méthode de collecte par imagerie des images ainsi qu'un système d'analyse des résultats. L'ensemble analytique permettra d'identifier les bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques présents au sein d'un échantillon. Ces protocoles seront ensuite intégrés au sein de deux systèmes, développés par la société Bee Robotics au cours du projet FAPIC, afin d'avoir un processus automatisé.

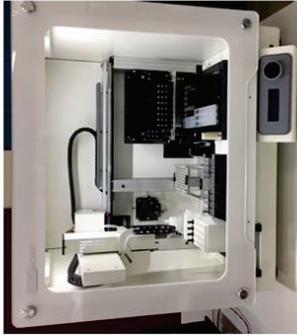
Le premier système a une capacité de 8 à 12 échantillons et est destiné aux grands hôpitaux ou centres de référence. Ce système est composé d'un robot d'extraction permettant l'extraction des échantillons de sang, d'un thermocycleur permettant d'amplifier les acides nucléiques et un dernier robot pour l'hybridation des amplicons sur des biopuces à ADN ainsi que la lecture des puits et le rendu d'un diagnostic. Un second système à plus faible capacité (un seul échantillon) mais entièrement automatisé permettra de réaliser au sein d'un seul automate les différentes étapes présentées ci-dessus (**figure 24**).

Le consortium du projet de recherche FAPIC comprend dix institutions de sept pays européens et est coordonné par l'Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL) (**tableau 9**).

Tableau 9 : Membre du consortium du projet FAPIC

Institutions	Pays	Représentant
UCBL (Université Claude Bernard Lyon 1)	Lyon (France)	Dr. Christophe Marquette
AXO Science	Lyon (France)	Dr. Benjamin Corgier
LIP (Lyon Ingénierie Projets)	Lyon (France)	Patricia Odet
Molzylm	Brême (Allemagne)	Dr. Michael Lorenz
Université de Warwick	Coventry (Angleterre)	Pr. Liz Wellington
AIT (Austrian Institut of Technology)	Seibersdorf (Autriche)	Dr. Ivan Barisic
Hopital de Zagreb	Zagreb (Croatie)	Pr. Branka Bedenić
Université d'Hasselt	Hasselt (Belgique)	Pr. Inge Gyssens
Hopital de Radboud	Nimègue (Pays Bas)	
Bee Robotics	Caernarfon (Pays de Galles)	Steve Jones

Plateforme 1



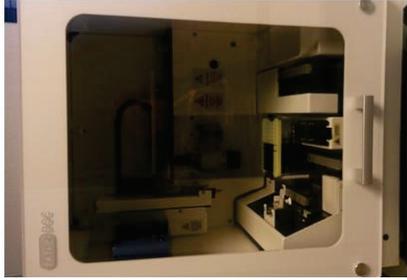
PathoRobot : Développé pour ce projet
12 échantillons de sang de 5 ml

Extraction



SelectNA plus (Molzym, Allemagne) :
Déjà existant
8 échantillons de sang de 1 ml

Plateforme 2



Pathodoc : Développé pour ce projet
1 échantillon de sang de 1 ml



Thermocycleur Eppendorf (Eppendorf, Allemagne) : Déjà existant
32 échantillons au maximum

PCR



AXObot : Développé pour ce projet
32 échantillons au maximum

Hybridation sur biopuces à ADN

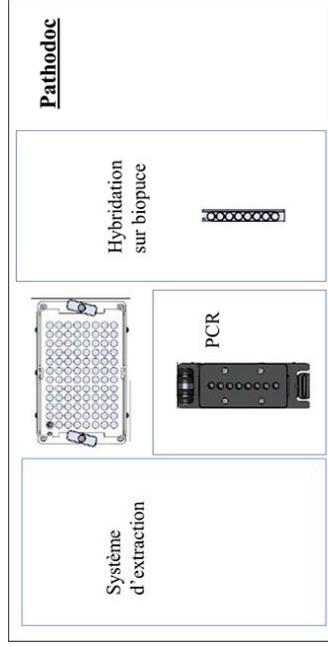


Figure 24 : Présentation des deux plateformes développées au sein du projet FAPIC.

La première plateforme comprend un automate d'extraction (*SelectNa plus* ou *PathoRobot*), un thermocycleur, et un automate pour le traitement des biopuces. Le temps de manipulation pour cette plateforme est plus important que pour la deuxième plateforme (qui comprend qu'un seul automate), car la PCR est préparée de façon manuelle.

Matériels et Méthodes

1 Matériels

1.1 Instruments

Appareil de dépôt non-contact sciFLEXARRAYER S3.....	Scienion
<i>PathoRobot</i>	Bee Robotics
<i>SelectNA plus</i>	Molzym
<i>Pathodoc</i>	Bee Robotics
Thermocycleur.....	Eppendorf
<i>AXObot</i>	Bee Robotics
2100 analyseur Instrument.....	Agilent

1.2 Logiciels

AXOware™	AXO Science
Mega X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis.)	Mega software
OligoAnalyzer Tool.....	IDT DNA
Multiple Primer Analyzer.....	Thermofisher Scientific
MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation)	EMBL-EBI

1.3 Supports

Plaques 96-puits (12 barrettes de 8 puits) sciPLEXPLATE.....	Dutscher
Plaques 384-puits.....	Gentix
Plaque de PCR twin tec sécable (4 segments de 3 barrettes)	Dutscher

1.4 Réactifs

1.4.1 Tampons

Tampon dépôt de sondes SciSPOT oligo B2.....	Scienion
Tampon LowCross.....	Candor Bioscience
Tampon PBS (phosphate buffered saline) en pastille pH 7,4.....	Dutscher

1.4.2 Kits d'extraction

QIAamp DNA Mini kit.....	Qiagen
MolYsis™ Complete kit.....	Molzym

1.4.3 Autres réactifs

Péroxydase de raifort conjuguée à la streptavidine.....	Sigma-Aldrich
Solution de révélation par colorimétrie sciCOLOR T2	Scienion
Eau de qualité biologie moléculaire.....	Corning

1.5 séquences oligonucléotidiques

Tous les oligonucléotides sont purifiés par HPLC et sont reçus lyophilisés

Amorces.....	IDT DNA
--------------	---------

2 Méthodes

2.1 Paramètres utilisés pour les logiciels

2.1.1 Paramètres utilisés lors de la conception des sondes

Lors de la conception des sondes, des paramètres comme le pourcentage en bases G et C (%GC) ou la température de demi-dénaturation (T_m) ont été instaurés. Afin de vérifier le respect de ces critères par les sondes et amorces conçues, ces paramètres ont été vérifiés par le biais de l'outil IDT DNA oligoanalyser (312) avec une concentration en Na^+ de 50 mM, et une concentration en Mg^{2+} de 0 mM. La formation des structures secondaires a également été vérifiée en utilisant l'outil *Multiple Primer Analyzer* de Thermofischer Scientific (313).

2.1.2 Paramètres de la base de données SILVA

La base de données SILVA (314) a été utilisée afin de déterminer le taux de couverture et la spécificité des amorces et sondes conçues pour le panel 1. Les critères de recherche appliqués dans la base de données sont les suivants :

- Recherche dans la base de données : « *Small subunit rRNA (SSU)* ».

- Jeux de données : PARC. Ensemble des séquences d'une base de données (ici SSU) incluant les séquences partielles et les séquences dont la qualité de l'alignement est faible.
- Avec 0 différence autorisée entre les nucléotides des séquences de la base de données et les nucléotides de la séquence testée.

2.1.3 Paramètres du logiciel Méga

Le logiciel Méga a été utilisé pour réaliser l'alignement des séquences oligonucléotidiques. La version du logiciel utilisée est la version 10.0.1. La méthode Muscle pour *MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation* a été choisie lors de la création des alignements avec comme paramètres, les valeurs par défauts proposées, c'est-à-dire une pénalité de -1 pour les insertions de bases et l'algorithme UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*).

2.2 Evaluation des performances du test développé en présence de souches bactériennes

2.2.1 Collecte et extraction de l'ADN pour la validation du test sur les souches

L'Austrian Institute of Technology (AIT) a collecté les souches présentes chez les différents partenaires et nécessaires pour la validation du test. Pour les cibles (pathogènes et gènes de résistance) manquantes, les souches ont ensuite été achetées afin de compléter la collection.

En plus des cibles du test, des souches dites « espèces de validation » ont été collectées ou achetées et l'ADN extrait. Ces bactéries, dont la séquence d'ADN est très proche de celles des bactéries ciblées par le test va permettre d'évaluer la spécificité du test développé et du diagnostic rendu aux cliniciens.

Le **tableau 10** présente les espèces de validation permettant de valider les espèces bactériennes, cibles du test. La liste complète des souches collectées pour ce test ainsi que leurs références sont disponibles en **annexe 1**.

Tableau 10 : Espèces bactériennes (cibles et espèces de validation) utilisées au cours du test

Cible du test	Espèce de validation
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Moraxella spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter nosocomialis</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Pseudomonas otitidis</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Moraxella lacunata</i> <i>Moraxella osloensis</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter koseri</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>proteus mirabilis</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Citrobacter farmeri</i> <i>Enterobacter cloacae complex</i> <i>Enterobacter hormaechei subsp. hormaechei</i> <i>Enterobacter hormaechei subsp. oharae</i> <i>Cronobacter sakazakii</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Salmonella bongori</i> <i>Salmonella enterica sv. typhi</i> <i>Salmonella enterica sv. typhimurium</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Proteus penneri</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i> <i>Haemophilus aegyptius</i> <i>Pasteurella multocida</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter coli</i> <i>Campylobacter lari</i> <i>Campylobacter fetus</i> <i>Arcobacter butzleri</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides spp.</i> <i>Prevotella spp.</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Bacteroides vulgatus</i> <i>Parabacteroides distasonis</i> <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Prevotella bivia</i> <i>Prevotella intermedia</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>

<i>S. dysgalactiae subsp. equisimilis</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus sanguinis</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> <i>Enterococcus hirae</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Granulicatella adiacens</i> <i>Abiotrophia defectiva</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium spp.</i>	<i>Clostridium septicum</i> <i>Clostridium tertium</i> <i>Peptoclostridium difficile</i>
<i>Fusobacterium spp.</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Fusobacterium ulcerans</i>
<i>Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Mycobacterium abscessus</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio vulnificus</i>

Après vérification de leur viabilité lors de leur mise en culture, l'ADN a été extrait.

L'extraction de l'ADN pour la validation du test sur les souches a été réalisée par (AIT) à l'aide du kit QIAamp DNA Mini kit en suivant les recommandations du fabricant pour l'extraction de l'ADN des bactéries mais en effectuant une lyse avec des billes de céramique à l'aide du MagNA Lyser à la place d'une lyse avec le lysozyme pour toutes les souches. L'ADN a ensuite été envoyé à AXO Science et stocké à -20°C.

Les souches ont ensuite été envoyées à l'université de Warwick.

2.2.2 Vérification des cibles

Les souches collectées ont été séquencées et des gels d'agarose ont été réalisés à l'université de Warwick afin de vérifier et compléter si besoin la liste des gènes de résistance présents dans ces souches. Lors de la validation analytique, des souches issues de la banque de

souches, ont parfois dû être séquencées une nouvelle fois, après des résultats surprenants sur les biopuces. Il s'agissait le plus souvent de contaminations ayant eu lieu lors de l'étape de culture bactérienne préalablement à l'extraction.

2.2.3 Réalisation des gammes de dilutions

La sensibilité du test développé a été évaluée en réalisant des gammes de dilutions. Des dilutions en cascades au 10^{ème} ont été réalisées, à partir d'une solution mère dont la concentration est connue.

2.3 Préparation des solutions stocks de souches bactériennes et des échantillons de sang

Toutes les étapes préparatoires présentées ci-dessous ont été réalisées au sein du département Bioscience environnementale de l'école des sciences de la vie de l'université de Warwick afin de réaliser la validation analytique du test. Les cultures s'effectuent au sein d'un laboratoire de sécurité microbiologique P2 ou de classe 2.

2.3.1 Vérification des solutions mères de bactéries fournies par le partenaire AIT et création d'un nouveau stock dans du glycérol

Les boîtes de pétri contenant le milieu approprié ont étéensemencés avec les souches bactériennes stockées dans le glycérol et incubées sur la nuit dans les conditions de cultures appropriées (oxygène et température) présentées dans le **tableau 11**. Le lendemain, après avoir vérifié qu'une seule souche bactérienne s'était développée, les bactéries ont été récoltées à l'aide d'une oese puis re suspendues dans 2ml de milieu de culture. Puis après avoir déposé 200 µl de glycérol à 86% (volume à volume) dans des tubes cryofuge, 900 µl de la suspension bactérienne ont ensuite été ajoutés et mélangés rapidement puis stockés ce tube à -20°C. Finalement, une nouvelle boîte de pétri a étéensemencée puis mise en incubation sur la nuit afin de vérifier la validité de cette nouvelle suspension bactérienne.

2.3.2 Préparation des stocks de bactérie à une concentration donnée pour la phase de validation analytique

La culture des souches anaérobiques s'effectue au sein d'un incubateur spécialisé comme celui présenté dans la **figure 25**. Des boîtes de pétri contenant de la gélose de base pour anaérobies ont étéensemencées à partir des stocks nouvellement créés dans le glycérol, et incubées pendant 3 jours. Les souches bactériennes aérobies et microaérophiles ont été mises en culture à partir des stocks de glycérol, sous une hotte à flux laminaire, dans leur milieu de culture spécifiques et incubées sur la nuit.



Figure 25: Incubateur pour la culture des bactéries anaérobies

Tableau 11 : Conditions de culture des organismes utilisés lors de la phase de validation analytique, la composition détaillée des bouillons de culture est indiquée en annexe 2.

Organismes	Condition de culture			
	Milieu de culture	Recommandation en oxygène	Température	Agitation
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm
<i>Bacteroides fragilis</i>	Bouillon de base pour anaérobies	Aérobic	37°C	-
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Bouillon de base pour anaérobies	Aérobic	37°C	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	Bouillon Müller-Hinton (HB)	Microaerophilie	37°C	100 rpm
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm
<i>Citrobacter freundii</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm
<i>Citrobacter koseri</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm
<i>Clostridium perfringens</i>	Bouillon de base pour anaérobies	Anaérobic	37°C	-
<i>Clostridium septicum</i>	Bouillon de base pour anaérobies	Anaérobic	37°C	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm
<i>Enterobacter cloacae</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Microaerophilie	37°C	100 rpm
<i>Enterococcus faecium</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Microaerophilie	37°C	100 rpm
<i>Escherichia coli</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Bouillon de base pour anaérobies	Anaérobic	37°C	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bouillon de base pour anaérobies	Anaérobic	37°C	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	Bouillon cœur-cervelle (BHI) en présence d'un supplément en coenzyme et Hémine/Hématine	Microaerophilie	37°C	100 rpm
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	30°C	150 rpm
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobic	37°C	150 rpm

<i>Morganella morganii</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Mycobacterium avium</i>	Bouillon Middlebrook 7H9	Aérobie	30°C	150 rpm
<i>Neisseria meningitidis</i>	Bouillon cœur-cervelle (BHI) en présence d'un supplément en coenzyme et Hémine/Hématine	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Prevotella bivia</i>	Bouillon de base pour anaérobies	Anaérobie	37°C	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	Bouillon de base pour anaérobies	Anaérobie	37°C	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	Bouillon de base pour anaérobies	Anaérobie	37°C	-
<i>Proteus mirabilis</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Proteus penneri</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Proteus vulgaris</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. <i>Typhi</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Serratia marcescens</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Shigella flexneri</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bouillon Luria-Bertani (LB)	Aérobie	37°C	150 rpm
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Bouillon cœur-cervelle (BHI)	Microaerophilie	37°C	100 rpm
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> susp <i>equisimilis</i>	Bouillon cœur-cervelle (BHI)	Microaerophilie	37°C	100 rpm
<i>Streptococcus mitis</i>	Bouillon cœur-cervelle (BHI)	Microaerophilie	37°C	100 rpm
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bouillon cœur-cervelle (BHI)	Microaerophilie	37°C	100 rpm
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bouillon cœur-cervelle (BHI)	Microaerophilie	37°C	100 rpm
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Bouillon cœur-cervelle (BHI)	Microaerophilie	37°C	100 rpm

Dès la phase de culture terminée pour toutes les souches, une dizaine de colonies ont été prélevées à l'aide d'un écouvillon et déposées dans un tube Falcon 15 ml rempli de 10 ml de milieu de culture liquide identique au milieu gélosé. Après avoir mélangé vigoureusement au vortex les tubes Falcon, 1 ml du milieu a été transféré dans une cuve de spectrophotométrie et l'absorbance à la longueur d'onde de 600 nm, OD_{600} a été mesurée au spectrophotomètre. Cette longueur d'onde est préférentiellement choisie par rapport aux Ultraviolet (UV) afin de ne pas tuer ou endommager les bactéries.

Un volume précis de la suspension bactérienne contenu dans le tube Falcon a été prélevé, afin d'obtenir une absorbance finale dans l'erenmeyer de 0,010 à 0,015 ua, et a été transféré dans un erlenmeyer surmonté d'un coton stérile et contenant 150 ml de milieu de culture identique au milieu gélosé de la souche. La nouvelle solution a été agitée puis l'absorbance à la longueur d'onde 600 nm a été mesurée afin de vérifier qu'elle est proche de 0,015 ua. L'erenmeyer a ensuite été placé dans un agitateur incubateur et l'absorbance à la longueur d'onde 600 nm a été mesurée toutes les heures jusqu'à atteindre une absorbance comprise entre 0,4 et 0,6 ua, qui correspond à la phase de croissance exponentielle des bactéries, généralement acquise dans ces conditions après 3 à 4 heures de culture.

Une fois la phase exponentielle atteinte, 2 ml de culture ont été transférés dans un tube Eppendorf et dilués au $10^{\text{ème}}$ puis 900 μl de la culture ont été transférés dans un cryotube préalablement rempli avec 200 μl de glycérol à 86% (volume à volume) et stocké à -20°C . Cette opération a été répétées afin d'avoir 2 cryotubes pour chaque souches. Ces stocks de souches ont été préparés afin d'avoir une concentration de 10^6 UFC/ml.

Un aliquot sur les deux réalisés pour les stocks de bactéries à 10^6 UFC/ml a été envoyé à Molzym pour la réalisation de la validation analytique du test.

2.3.3 Vérification de la concentration des stocks de bactérie

La concentration de 10^6 UFC/ml dans les tubes stocks a été vérifiée par comptage des colonies sur boîte de pétri à partir de dilutions en cascade de la solution préparée précédemment. Afin de réaliser le dénombrement, 100 μl des solutions bactériennes ont été prélevé et une dilution au $10^{\text{ème}}$ en cascade jusqu'à la dilution 10^{-5} dans du milieu de culture adapté à la souche ont été réalisées. 100 μl des dilutions 10^{-3} à 10^{-5} ont été mis en culture sur des boîtes de pétri en

triplicat (**figure 26**) et les boîtes ont été incubées 24 heures avec les conditions recommandées pour chaque souches et détaillées dans le **tableau 11**.

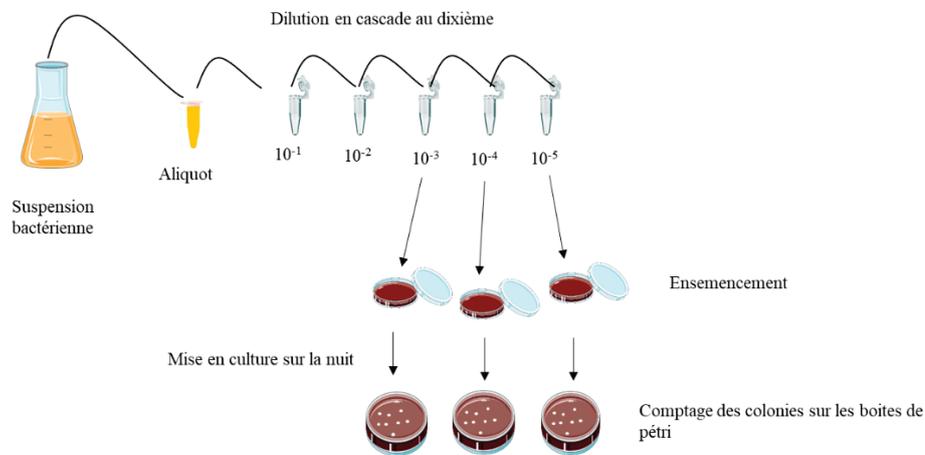


Figure 26 : Protocole de réalisation du comptage des colonies sur boîte de pétri

2.3.4 Préparation des aliquots de sang à l'université de Warwick

Le sang utilisé pour la validation analytique du test provient de l'entreprise Research Donor à Londres qui fournit des échantillons de sang pour la recherche scientifique. Trois poches de sang provenant de trois patients (1 poche pour chaque patients) et contenant chacune 450 ml de sang total humain, mélangés à 63 ml d'anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose (CPD) ont été utilisées. Le sang provient de donneurs sains âgés de 18 à 60 ans et testés négatif pour le VIH, l'hépatite B et C et la syphilis.

Le sang a ensuite été aliquoté en vue de la validation analytique. Des aliquots pour chaque sang de patient ont été réalisés. Pour ce faire, 40 ml de sang de patient ont été mélangés à 9 ml de glycérol dans des tubes Falcons 50 ml à l'aide de pipettes stériles puis 900 µl de ce mélange ont été transférés dans des microtubes à bouchon à vis de 2 ml puis stockés à -20°C.

2.3.5 Contamination artificielle des échantillons de sang négatifs

A partir des solutions stocks de souches bactériennes réalisées précédemment, une dilution en cascade dans le milieu de culture appropriée a été réalisée si besoin pour pouvoir transférer 100 µl de solution bactérienne dans les microtubes de sang aliquoté précédemment

afin d'avoir une concentration finale comprise entre 10^2 et 10^4 UFC/ml de bactéries dans le sang.

Ces échantillons seront utilisés pour réaliser la validation analytique des deux plateformes.

2.4 Test des performances des deux plateformes avec une validation analytique et une validation préclinique

Les performances des deux plateformes développées ont été testées en réalisant une validation analytique et une validation préclinique.

2.4.1 Validation analytique

La validation analytique a consisté à tester sur les deux plateformes un échantillon de sang négatif contaminé artificiellement par une quantité donnée d'une souche connue.

Pour la validation analytique du *Pathodoc*, les différentes étapes ont eu lieu à l'université de Warwick selon les protocoles définis ci-dessous. Les images obtenues suite à l'hybridation sur les biopuces ont été envoyés à AXO Science pour analyse.

La validation analytique de la deuxième plateforme comportant un robot d'extraction (*SelectNA plus* et *PathoRobot*), un thermocycleur et un robot pour l'hybridation des biopuces (*AXObot*), a quant à elle été effectuée en plusieurs étapes. La contamination artificielle des échantillons de sang a été réalisée tout d'abord au sein de Molzym avec les aliquots de solution bactérienne envoyés par l'université de Warwick. Le volume d'échantillon de patient nécessaire pour la réalisation de l'extraction n'est pas le même suivant le *SelectNA plus* (1 ml) ou le *PathoRobot* (5 ml). Des échantillons de même concentration bactérienne finale mais de volumes différents ont donc été réalisés.

Une PCR quantitative a ensuite été effectuée sur un aliquot des éluats obtenus sur les deux robots afin de contrôler de la qualité de l'ADN en sortie d'extraction. Le reste des éluats à été envoyé à AXO Science où la PCR et l'hybridation sur biopuce ont été réalisées. Les images des biopuces ont ensuite été analysées.

2.4.2 Validation préclinique

La validation préclinique a consisté à tester sur la plateforme haut-débit des échantillons de patients dont le diagnostic clinique est connu. Les échantillons de sang ont été collectés au sein des deux hôpitaux et différents types d'échantillon de patients ont été testé (échantillons de patients congelés, échantillons frais). Un aliquot a été séquencé à Molzym. Le reste des éluats a été envoyé à AXO Science afin de réaliser la PCR et l'hybridation sur biopuces. Les résultats ont été analysés puis comparés aux résultats du séquençage et du diagnostic clinique.

2.5 Extraction des acides nucléiques

L'extraction des échantillons pour la validation analytique et la validation préclinique sur les deux plateformes a été effectuée en utilisant les réactifs de la gamme MolYsis™. L'extraction qui est automatisée se déroule à l'intérieur de la cartouche de réactifs en deux grandes étapes avec la lyse des cellules et de l'ADN humain avant extraction de l'ADN bactérien (**Figure 27**).

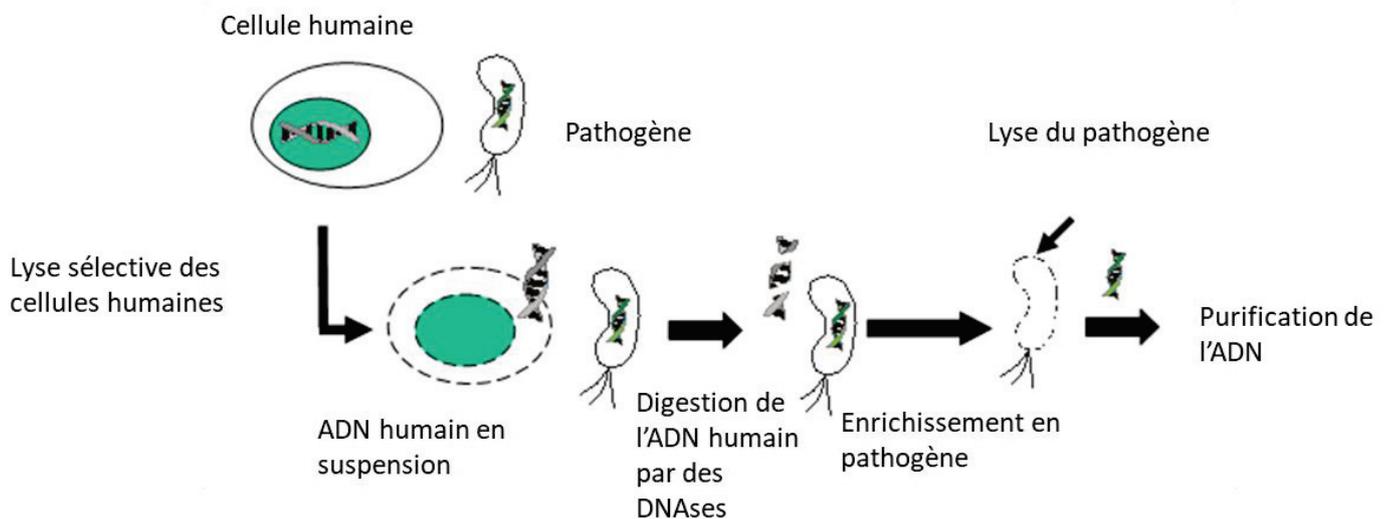


Figure 27: Méthode d'extraction des pathogènes par la technologie MolYsis™

2.6 PCR multiplexes

Les PCR multiplexes de chacun des trois panels sont effectuées de manière simultanée.

2.6.1 Préparation des mix d'amorces

Les amorces ont été achetées chez Integrated DNA Technologies (IDT) et re suspendues dans de l'eau de qualité biologie moléculaire puis stockées à -20°C avant leur utilisation.

Des PCR asymétriques ont ensuite été réalisées afin de favoriser l'apparition et l'intensité des signaux lors de l'hybridation sur les biopuces. En effet, ce sont les fragments d'ADN, portant l'extrémité biotinylée, qui vont s'hybrider sur les sondes.

Les mix de PCR ont été préparés en respectant les volumes suivants (**tableau 12**). Les proportions sont les mêmes pour les deux plateformes et les trois panels.

Tableau 12: Composition du mix de chacune des PCR multiplexes

Réactifs	Volume (µl)
Taq polymérase	25
Mix d'amorces	5
ADN	20
Volume final	50

Le programme de PCR, également commun aux deux plateformes et aux trois panels est présenté dans le **tableau 13**.

Tableau 13: Programme de PCR commun aux trois panels

Etape	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95°C	2 minutes	1
Dénaturation	94°C	30 secondes	45 cycles
Hybridation	52,5°C	30 secondes	
Elongation	72°C	30 secondes	
Elongation finale	72°C	5 minutes	1

2.6.2 Différence entre les PCR réalisées dans le *Pathodoc* et dans un thermocycleur

Pour les PCR réalisées au sein du thermocycleur, le mix de PCR a été distribué dans une plaque PCR qui a ensuite été scellée avec un film adhésif (Film alumaseal PCR). Pour les PCR réalisées dans le *Pathodoc*, dont le processus est entièrement automatisé, les barrettes de PCR ne possèdent pas de capuchons et ne sont donc pas fermées hermétiquement. Afin d'éviter l'évaporation du mix de PCR, de l'huile minérale ont été déposés au-dessus du mix de PCR dans les puits.

2.7 Test d'hybridation haut-débit automatisé

Le protocole d'analyse sur biopuce a été réalisé de manière simultanée pour les trois panels.

2.7.1 Dépôt des sondes en fond de plaques

Les sondes ont été achetées chez Integrated DNA Technologies (IDT), re suspendu dans de l'eau de qualité biologie moléculaire puis ont été stockées à -20°C avant leur utilisation. Chaque sonde a été déposée au fond des puits selon un plan précis présenté dans les **figures 28 à 30**. Les contrôles positifs ou dT permettront de vérifier le bon déroulé du protocole d'hybridation sur les sondes.

dT	aac(6)Ib	aac(6)Ib	CTX-M-1	CTX-M-1	ACC	ACC	IMI	IMI	OXA-1	OXA-1
dT	aad	aad	CTX-M-2	CTX-M-2	ACT	ACT	KPC	KPC	OXA-10	OXA-10
dT	aph2	aph2	CTX-M-9	CTX-M-9	CMY	CMY			OXA-23	OXA-23
dT	CcrA	CcrA	CTX-M-25	CTX-M-25	DHA	DHA	SHV	SHV	OXA-24	OXA-24
T-Tp			qnrA	qnrA			TEM	TEM	OXA-48	OXA-48
T-Tp	ermB	ermB	qnrB	qnrB			IMP	IMP	OXA-58	OXA-58
T-Tp	ermF	ermF	qnrS	qnrS	PER	PER	IMP_2	IMP_2	GIM	GIM
T-Tp			VEB	VEB	tetQ	tetQ	VIM	VIM	SPM1	SPM1
dT	dT	dT	mcr1	mcr1	vanA	vanA	NDM	NDM	mecA	mecA
T-TP	T-TP	T-TP	T-TP				vanB	vanB	mecC	mecC
T-TP	T-TP	T-TP	T-TP				dT	dT	dT	dT

Figure 28 : Plan de dépôt des sondes en fond de puits pour le panel 3

Les dT en rose correspondent aux contrôles positifs, les T-Tp en gris correspondent aux contrôles négatifs. Les sondes sont déposées en duplicats

dT	<i>A.baumannii</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.maltophilia</i>	<i>H.influenza</i>	<i>H.influenza</i>	<i>K.oxytoca</i>	<i>K.oxytoca</i>
dT	<i>Moraxella.spp</i>	<i>Pseudomonas.spp</i>	<i>Pseudomonas.spp</i>	<i>N.meningitidis</i>	<i>C.jejuni</i>	<i>C.jejuni</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K.pneumoniae</i>
dT	<i>S.enterica</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>M.morganii</i>	<i>Proteus.spp</i>	<i>Proteus.spp</i>	<i>E.aerogenes</i>	<i>E.aerogenes</i>
dT	<i>C.amalonicus</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>C.koseri</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>E.cloacae</i>
T-Tp	<i>C.freundii</i>	<i>C.butyrlicum</i>	<i>C.butyrlicum</i>	<i>C.peifringens</i>	<i>Clostridium.spp</i>	<i>Clostridium.spp</i>	<i>Fusobacterium.spp</i>	<i>Fusobacterium.spp</i>
T-Tp	<i>B.fragilis</i>	<i>M.avium</i>	<i>M.avium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.agalactiae</i>	<i>S.agalactiae</i>
T-Tp	<i>Prevotella.spp</i>	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.tuberculosis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>Streptococcus.spp</i>	<i>Streptococcus.spp</i>	<i>S.dysgalactiae_subsp_eaustimilis</i>	<i>S.dysgalactiae_subsp_eaustimilis</i>
T-Tp	<i>Bacteroides.spp</i>	<i>P.acnes</i>	<i>P.acnes</i>	<i>Enterococcus.spp</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.mitis_group</i>	<i>S.mitis_group</i>
dT	T-Tp	<i>Y.enterocolitica l</i>	<i>Y.enterocolitica l</i>	<i>Y.enterocolitica2</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.pneumoniae</i>	<i>S.pneumoniae</i>
T-Tp	T-Tp	<i>P.shigelloides</i>	<i>P.shigelloides</i>	<i>L.pneumophila</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>S.sanguinis</i>	<i>S.sanguinis</i>
T-Tp	T-Tp	<i>A.butzleri</i>	<i>A.butzleri</i>	<i>V.cholerae</i>	dT	dT	dT	dT

Figure 29: Plan de dépôt des sondes en fond de puits pour le panel 1

Les dT en rose correspondent aux contrôles positifs, les T-Tp en gris correspondent aux contrôles négatifs. Les sondes sont déposées en duplicats

dT				<i>C.koseri</i>	<i>E.aerogenes</i>	<i>E.aerogenes</i>		
dT				<i>P.vulgaris</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>E.cloacae</i>		
dT				<i>K.oxytoca</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>		
dT				<i>K.pneumoniae</i>	<i>C.amalonicus</i>	<i>C.amalonicus</i>		
T-Tp				<i>C.freundii</i>	<i>S.typhi</i>	<i>S.typhi</i>	<i>B.cepacia</i>	<i>B.cepacia</i>
T-Tp					<i>Controle d'extraction</i>	<i>Controle d'extraction</i>	<i>S.paucimobilis</i>	<i>S.paucimobilis</i>
T-Tp							<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>
T-Tp								
dT	dT							
T-Tp	T-Tp							
T-Tp	T-Tp				dT	dT	dT	dT

Figure 30: Plan de dépôt des sondes en fond de puits pour le panel 2

Les dT en rose correspondent aux contrôles positifs, les T-Tp en gris correspondent aux contrôles négatifs. Les sondes sont déposées en duplicats

2.7.2 Hybridation sur les biopuces

Les amplicons des PCR multiplexes du panel 1 s'hybrident sur les biopuces du panel 1, les amplicons du panel 2 sur les biopuces du panel 2 et les amplicons du panel 3 sur les biopuces du panel 3.

La **figure 31** présente les différentes étapes de l'hybridation des amplicons des PCR multiplexes sur les biopuces.

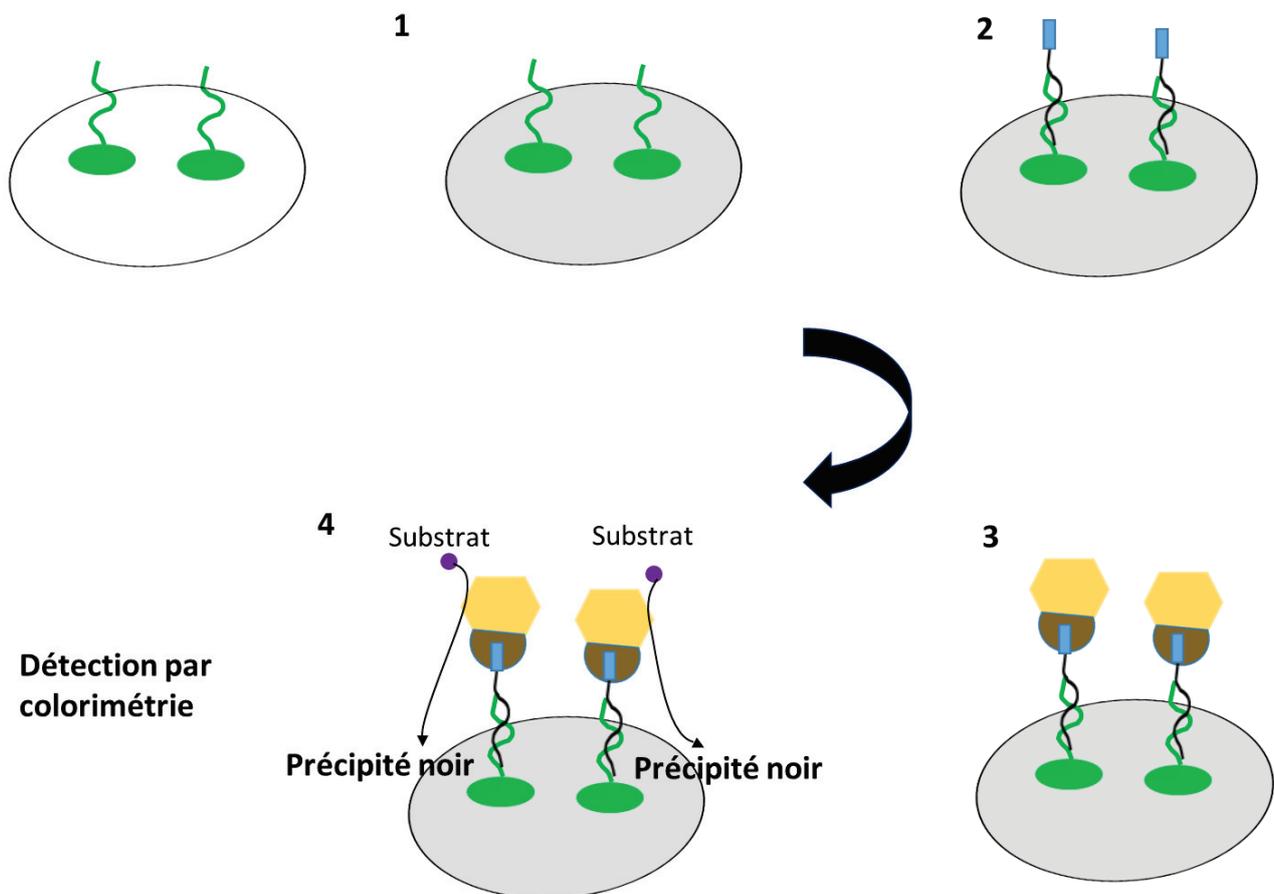


Figure 31 : Déroulé des étapes d'hybridation des amplicons sur la biopuce

1 : Saturation de la surface : Les sondes sont présentes en duplicat en fond de puits.

2 : Hybridation de l'amplicon biotinylé sur les sondes.

3 : Interaction entre la streptavidine couplée à la peroxydase de raifort, et la biotine.

4 : Formation d'un précipité noir en présence d'un substrat de la peroxydase de raifort.

2.8 Imagerie des biopuces et extraction des données

L'hybridation sur la biopuce ayant été réalisée, les puits de la biopuce ont ensuite été photographiés puis analysés par le logiciel AXOware. Ce logiciel permet d'extraire à partir des images, l'intensité des signaux sur l'emplacement de chaque sonde déposée au fond des puits. Après la récupération des images, le logiciel découpe à l'aide d'une grille la matrice de taille 11x11 (**figure 32**) et détermine l'intensité des signaux.

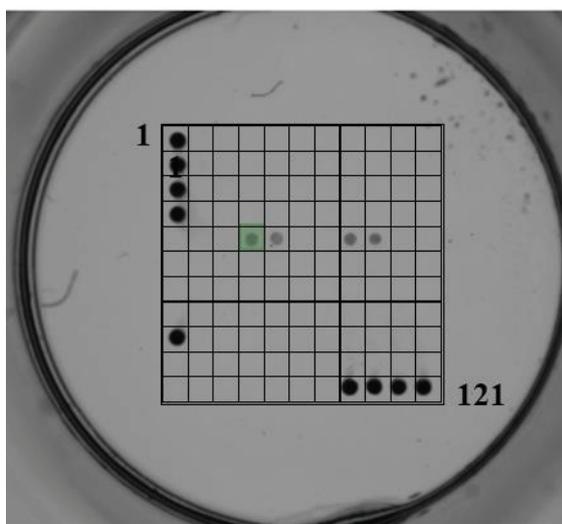


Figure 32: Positionnement de la grille d'AXOware sur les images de la biopuce

La grille se positionne en se basant sur les contrôles positifs situés en position 1,2, 3, 4, 88, 99, 110 et 121.

Les valeurs d'intensité des signaux sur chaque sonde sont déterminées grâce à l'intensité des pixels, et sont réparties sur une échelle de gris inversée, 0 étant le signal le plus fort (noir) et 255 étant le signal le plus faible (blanc). Le logiciel génère ensuite un fichier.xml qui contient des informations caractérisant les signaux observés, notamment l'intensité moyenne des signaux détectés au sein de chacune des cases de la matrice, qui sera utilisé après traitement pour poser le diagnostic clinique.

Chapitre 4 : Choix des cibles et construction des PCR multiplexes

1 Choix des différentes cibles du projet

1.1 Choix des pathogènes et des gènes de résistance

Toutes les cibles qui seront recherchées au sein de ce test ont été sélectionnées par les cliniciens présents au sein du consortium du projet FAPIC. Une recherche bibliographique a d'abord été réalisée afin d'identifier tous les pathogènes impliqués dans les maladies infectieuses : bactéries, virus, champignons, protozoaires et vers. Ensuite, leur pertinence clinique a été évaluée par des cliniciens au sein des sites de Jessa (Belgique) et de Zagreb (Croatie) qui ont vérifié la présence ou non de ces organismes dans les diagnostics positifs posés à partir des hémocultures réalisées au sein de ces hôpitaux. Les critères de prévalence et de dangerosité ont été utilisés pour toutes les cibles génétiques puis un score final a été établi prenant en compte tous ces critères afin de classer les pathogènes selon leurs intérêts cliniques et de sélectionner les cibles qui seront détectées par le test.

Un exemple du score final obtenu pour quelques pathogènes est présenté dans **le tableau 14** ci-dessous. La liste complète des scores finaux établis se trouve en **annexe 3**.

Tableau 14 : Exemple de scores finaux déterminés par les cliniciens pour différents pathogènes

Un score final de 1 indique un pathogène très important à détecter d'un point de vue clinique, un score de 2 indique une importance moyenne et un score de 3, une importance peu significative.

Bactéries	Score		Score
<i>Acinetobacter ssp.</i>	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2
<i>Bacteroides ssp.</i>	1	<i>Burkholderia ssp.</i>	2
<i>Haemophilus ssp.</i>	1	<i>Hafnia ssp.</i>	2
<i>Klebsiella ssp.</i>	1	<i>Helicobacter pylori</i>	2
<i>Legionella ssp.</i>	1	Fungi	
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	<i>Aspergillus ssp.</i>	1
<i>Yersinia ssp.</i>	1	<i>Candida glabrata</i>	1
<i>Chlamydia ssp.</i>	1	<i>Candida ssp.</i>	1
<i>Citrobacter ssp.</i>	1	Virus	
<i>Escherichia coli</i>	1	<i>Epstein-Barr Virus (DNA)</i>	1
<i>Francisella ssp.</i>	1,5	<i>Human herpes virus 1-5 (DNA)</i>	1
<i>Fusobacterium ssp.</i>	1,5	<i>BK virus (DNA)</i>	1

Une étude bibliographique a été également réalisée afin de déterminer les gènes de résistance et facteurs de virulence cliniquement pertinents à inclure dans le projet. La prévalence des isolats cliniques en Belgique et Croatie a été obtenue à l'aide de l'atlas de surveillance des maladies infectieuses du centre Européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) (315).

Ces cibles ont été réparties en différents panels contenant chacun au maximum 50 pathogènes ou gènes de résistance qui seront détectés et identifiés au sein d'une même PCR multiplexe. Ce nombre de 50 cibles a été défini d'après les critères techniques inhérents au dépôt de sondes sur les fonds de puits (surface disponible et espacement entre les dépôts).

1.2 Constitution des panels de cibles pour les PCR multiplexes

Dans un premier temps, trois panels ont été sélectionnés pour être développés lors de ce projet : deux panels pour l'identification des bactéries et un panel pour l'identification des gènes de résistance. Les bactéries ont été privilégiées par rapport aux autres pathogènes notamment à cause de contraintes techniques. En effet, la technologie utilisée dans ce projet pour le système d'extraction, MolYsis™, a été mise au point par Molzym pour l'ADN bactérien et fongique uniquement. De plus, la plupart des souches bactériennes nécessaires au développement du test étant déjà en possession de certains des partenaires, la collecte des souches bactériennes s'est avérée plus efficace que la collecte des autres pathogènes.

1.2.1 Caractéristiques du panel 1

Le panel 1 permet l'identification des séquences d'ADN de 49 bactéries et genre bactériens : *Acinetobacter baumannii*, *Arcobacter butzleri*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella spp.*, *Morganella morganii*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, *Plesiomonas shigelloides*, *Prevotella spp.*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *S.*

dysgalactiae subsp. equisimilis, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio cholerae* et *Yersinia enterocolitica*

Toutes les cibles sont identifiées par l'intermédiaire d'un seul gène, le gène codant pour l'ARN 16S. Ce gène a été choisi pour l'identification des pathogènes du panel 1 car c'est notamment un gène très conservé au sein des bactéries et très bien documentés dans les bases de données.

En plus des pathogènes rencontrés assez régulièrement dans le cas d'infection du sang, ce panel permet également l'identification de pathogènes dit environnementaux : *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Legionella pneumophila* et *Arcobacter butzleri*. L'intérêt de détecter ces pathogènes environnementaux est qu'ils sont des micro-organismes pathogènes opportunistes pouvant infecter des individus immunodéprimés et dans certaines conditions des individus dit « sain ». Ces pathogènes peuvent être trouvés dans différents environnements comme des produits de l'industrie alimentaire pour *Arcobacter butzleri* ou des environnements aqueux pour *Vibrio cholerae* et *Legionella pneumophila* (316–319).

La PCR multiplexe du panel 1 est composée de 4 couples d'amorces et l'identification sur la biopuce des 49 cibles est réalisée par l'intermédiaire de 50 sondes. Pour *Yersinia enterocolitica*, deux sondes ont dû être conçues pour pouvoir détecter tous les variants observés. En effet, pour les bactéries de cette espèce, six biotypes (groupes définis selon des caractères biochimiques) peuvent être établis, les souches appartenant aux biotypes 1B, 2, 3, 4 et 5 sont associées à des maladies chez l'homme et les animaux, tandis que le biotype 1A comprend des souches qui sont considérées comme principalement non pathogènes (320).

1.2.2 Caractéristiques du panel 2

Le panel 2 permet l'identification de 14 cibles : *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter*

aerogenes, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi* et *Sphingomonas paucimobilis*.

Neuf bactéries identifiées dans ce panel sont communes au panel 1 mais le gène ciblé ici pour l'identification de ces bactéries est différent : *dnaJ* ou *gyrB*. Le gène *gyrB* code pour la sous unité B de l'ADN gyrase, enzyme appartenant à la famille des ADN topoïsomérases de classe II qui est essentielle pour la réplication de l'ADN circulaire bactérien. Le gène *dnaJ* code pour une protéine chaperonne, la DnaJ chaperonne ou HSP40 (*Heat shock protein 40KD*) qui est exprimée en cas de stress (exposition au froid ou aux ultraviolets (UV), choc thermique par exemple) pour stabiliser la structure des protéines. L'intérêt d'utiliser deux autres gènes est d'apporter des données de diagnostic plus précises quant à la souche détectée (321,322).

Ce panel permet également d'identifier d'autres pathogènes comme *Salmonella typhi*, par l'intermédiaire du gène *fliC* et d'autres pathogènes dits environnementaux : *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia* et *Sphingomonas paucimobilis*. *Salmonella enterica serovar Typhi* ou *Salmonella typhi*, dont l'infection chez l'humain se produit à travers l'ingestion d'aliments contaminés, et est à l'origine de la fièvre typhoïde. Le gène *fliC* code pour la flagelline, protéine constituant majoritairement le filament flagellaire qui permet à la bactérie de se déplacer.

Un contrôle d'extraction a également été inclus dans ce panel. Il s'agit d'un contrôle qui est co-extrait avec l'échantillon et qui, si l'ADN résultant est amplifié par PCR, permet de confirmer le bon déroulé du protocole d'extraction et la présence d'ADN.

La PCR multiplexe liée à ce panel est composée de 14 couples d'amorces et l'identification sur la biopuce des 14 cibles est réalisée par l'intermédiaire de 14 sondes.

1.2.3 Caractéristique du panel 3

Le panel 3 permet l'identification de 40 gènes de résistance aux antibiotiques détaillés dans le **tableau 15**. Ces résistances ciblent différentes familles d'antibiotique qui ont été détaillées dans le **chapitre 3**.

Tableau 15 : Liste des gènes de résistance et familles d'antibiotique associées, identifiés dans le panel 3.

Famille d'antibiotique	Gène de résistance cible du panel 3	Famille d'antibiotique	Gène de résistance cible du panel 3
Bêta-lactamine	<i>blaACC</i>	Aminoglycoside	<i>aac(6')-Ib</i>
	<i>blaACT</i>		<i>aad</i>
	<i>blaCcrA</i>		<i>aph2</i>
	<i>blaCMY</i>	Glycopeptide	<i>vanA</i>
	<i>blaCTX-M-1</i>		<i>vanB</i>
	<i>blaCTX-M-2</i>	Quinolone	<i>qnrA</i>
	<i>blaCTX-M-25</i>		<i>qnrB</i>
	<i>blaCTX-M-9</i>		<i>qnrS</i>
	<i>blaDHA</i>	Tétracycline	<i>tetQ</i>
	<i>blaGIM</i>	Macrolide	<i>ermB</i>
	<i>blaIMI</i>		<i>ermF</i>
	<i>blaIMP</i>	Colistine	<i>mcr1</i>
	<i>blaKPC</i>	Méthicilline	<i>mecA</i>
	<i>blaNDM</i>		<i>mecC</i>
	<i>blaOXA-1</i>		
	<i>blaOXA-10</i>		
	<i>blaOXA-23</i>		
	<i>blaOXA-24</i>		
	<i>blaOXA-48</i>		
	<i>blaOXA-58</i>		
	<i>blaPER</i>		
<i>blaSHV</i>			
<i>blaSPM</i>			
<i>blaTEM</i>			
<i>blaVEB</i>			
<i>blaVIM</i>			

Lors de la conception des amorces et des sondes de ce panel, les variants du gène *blaIMP* ont été répartis en deux groupes du fait des variations observées au niveau de la séquence de ce gène. Un couple d'amorces et une sonde spécifique pour chacun des deux groupes ont été définis.

Pour le panel 3, la PCR multiplexe est composée de 41 couples d'amorces et l'identification sur la biopuce des 40 cibles est réalisée par l'intermédiaire de 41 sondes.

2 Conception des séquences oligonucléotidiques de chaque panel : amorces et sondes

Les trois PCR multiplexes et les trois biopuces correspondantes à chacun des panels sont traitées simultanément lors de la réalisation d'un test, c'est-à-dire que les mêmes paramètres de température et de durées d'incubation sont appliqués. Il est donc nécessaire de définir exactement les mêmes paramètres de conception pour les sondes des trois panels et pour les amorces des trois panels.

Les amorces et sondes du projet ont dans un premier temps été conçues au sein de *l'Austrian Institute of Technology* (AIT) par l'intermédiaire d'un outil de conception de séquences oligonucléotidiques Oli2go (323). Cet outil, développé au début de ce projet, permet de concevoir des amorces et des sondes et de vérifier la spécificité et la formation de structures secondaires pour les séquences conçues. Puis, en collaboration avec l'université de Warwick, le respect des critères de conception de la PCR décrit ci-dessous a été vérifié ainsi que la spécificité et la couverture des séquences oligonucléotidiques par rapport à des bases de références.

2.1 Critères de conception des sondes et des amorces

2.1.1 Critères de conception des amorces

Les amorces ont été conçues suivant des paramètres précis, se basant sur les critères présents dans la littérature pour des biopuces à ADN, afin de garantir une amplification homogène de chaque cible (324–327). Certains critères comme l'utilisation des bases dégénérées ou le pourcentage en base Cytosine/Guanine (%GC) n'ont pas systématiquement été appliqués à cause de la complexité de conceptions de certaines amorces.

- La T_m des amorces doit être comprise entre 45°C et 55°C.
- Le %GC doit être compris entre 35% et 60%.
- La taille de ces amorces doit être comprise entre 15 et 22 nucléotides.
- La formation des structures secondaires des amorces, entre les amorces du couple ou de tous les couples d'amorces présents dans le panel a été vérifiée et ne doit pas excéder un DeltaG supérieur à un cinquième du DeltaG total, soit environ -5 kcal/mole.

- Eviter dans la mesure du possible les bases dégénérées (K, M, S, W, N, B, D, H, V, R, Y).
- Les fragments générés par les amorces doivent être de taille inférieure à 200pb.

2.1.2 Critères de conception des sondes

Les sondes ont également été conçues suivant des paramètres précis, se basant sur les critères présents dans la littérature (328,329). Certains critères comme la taille ou le %GC n'ont pas systématiquement été appliqués à cause de la complexité de conceptions de certaines sondes.

- La T_m des amorces doit être autour de 65°C.
- Le %GC doit être compris entre 35% et 60%.
- La taille des sondes doit être supérieure à 22 nucléotides.
- La formation des structures secondaires des sondes ne doit pas excéder un ΔG supérieur à environ 1/5 du ΔG total, soit -8 kcal/mole.

2.2 Conception des amorces et sonde pour le panel 1.

L'identification des pathogènes de ce panel s'effectue par l'intermédiaire du gène codant pour l'ARN 16S. Les séquences des différentes cibles ont été récupérées dans la base de données du RDP (*The Ribosomal Database Project*) (330).

2.2.1 Détermination des séquences des sondes

Pour chaque cible du panel 1, une sonde répondant aux critères définis précédemment a été conçue. Les sondes sont réparties au sein des différentes zones variables sur toute la longueur du gène codant pour l'ARN 16S. La spécificité et la couverture de ces sondes ont été vérifiées via la base de données Silva qui fournit des alignements de séquences d'ARN de la petite et grande sous unité du ribosome obtenues chez les bactéries, archées et eucaryotes (314,331).

Le taux de couverture a été calculé comme le rapport entre le nombre de séquences pour une cible donnée qui s'hybride sur la sonde par rapport au nombre total de séquences pour cette même cible disponibles dans la base de données. La spécificité ne s'exprime pas à l'aide

de pourcentage mais notamment sous forme de liste de genres bactériens dont les séquences s'hybrident sur une sonde donnée. En effet, il peut exister d'importantes différences au niveau du nombre de séquences disponibles pour un genre bactérien dans la base de données et cela peut créer des biais dans l'interprétation des résultats. Par exemple, au moment de la détermination de la spécificité des sondes du panel 1, 1800 séquences étaient disponibles pour le pathogène *Klebsiella pneumoniae* contre 12 pour *Plesiomonas shigelloides*.

Le **tableau 16** présente le taux de couverture et la spécificité obtenu pour chacune des sondes du panel 1. Les données peuvent avoir changées depuis l'obtention de ces données en juillet 2017, la base de données SILVA ayant été actualisée depuis.

Parmi les cibles du projet, plusieurs sondes associées à des *Enterobacteriaceae* présentent un taux de couverture ou une spécificité qui sont considérées comme insuffisante, c'est-à-dire un taux de couverture inférieur à 80% et/ou une spécificité incluant en plus de la détection du pathogène ciblé, d'autres pathogènes incluant parfois d'autres cibles du test. Le pathogène sera donc également identifié dans un deuxième panel, le panel 2, mais en utilisant d'autres gènes de référence : *dnaJ* et *gyrB*. Ces gènes, particulièrement pour les *Enterobacteriaceae*, sont plus discriminants et ils présentent une meilleure résolution inter-espèces que le gène codant pour l'ARN 16S (322,332).

Tableau 16 : Spécificité et couverture des sondes du panel 1, déterminée avec la banque de donnée Silva

En rouge, sondes dont la couverture ou la spécificité sont jugées non adéquates pour le projet, c'est-à-dire une couverture inférieure à 80% et/ou une spécificité incluant en plus de la détection du pathogène ciblé d'autres pathogènes dont parfois d'autres cibles du test. Les noms de pathogènes soulignés correspondent aux cibles du projet.

Cible du panel 1	Taux de couverture de la sonde conçue	Spécificité de la sonde conçue	Commentaire
<i>Acinetobacter baumannii</i>	92,5%	<u><i>A. baumannii</i></u> et <i>A. qingfengensis</i>	<i>A. qingfengensis</i> est très rare (333)
<i>Bacteroides fragilis</i>	93,3%	<u><i>B. fragilis</i></u>	-
<i>Bacteroides spp.</i>	88,2%	Seulement <i>Bacteroides spp.</i>	Détection de <i>B. fragilis</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> et <i>B. vulgatus</i> qui sont potentiellement des pathogènes (334)
<i>Campylobacter jejuni</i>	98,3%	<u><i>C. jejuni</i></u> , <i>C. coli</i> et <i>C. lari</i>	Pas de distinction requise entre ces trois pathogènes
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	76,3%	<u><i>C. amalonaticus</i></u> et <i>C. farmeri</i>	Le taux de couverture n'est pas idéal mais une augmentation de celui-ci impacte négativement la spécificité
<i>Citrobacter freundii</i>	96,6%	<u><i>C. freundii</i></u> , <i>C. gillenii</i> , <i>C. braaki</i> , <i>C. murliniae</i> , <i>C. werkmanii</i> , <i>C. muyjensii</i> , <i>R. terrigena</i> , <i>K. cowanii</i> , <i>K. sacchari</i> , <i>T. guamensis</i> et <i>S. bongori</i>	Un gène autre que le 16S est requis.
<i>Citrobacter koseri</i>	91,1%	<i>C. koseri</i>	-
<i>Clostridium butyricum</i>	95,5%	<u><i>C. butyricum</i></u> , <i>C. disporicum</i>	<i>C. disporicum</i> est très rare (335)
<i>Clostridium perfringens</i>	97,9%	<i>C. perfringens</i>	-
<i>Clostridium spp.</i>	65,9%	<u><i>Clostridium spp.</i></u> <i>Proteiniclasticum spp.</i> <i>Sarcina spp.</i>	Le taux de couverture n'est pas idéal mais les principaux pathogènes sont identifiés : <i>C. baratii</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. tertium</i> et <i>C. tetani</i> . (336) <i>C. perfringens</i> n'est pas inclus
<i>Enterobacter aerogenes</i>	66,5%	<u><i>E. aerogenes</i></u> , <i>R. terrigena</i> et <i>R. planticola</i>	Un gène autre que le 16S est requis.
<i>Enterobacter cloacae</i>	15,6%	<u><i>E. cloacae</i></u> , <i>E. ludwigii</i> , <i>C. sakazakii</i> et <i>S. enterica</i>	Le taux de couverture est très faible, un gène autre que le 16S est requis.
<i>Enterococcus faecalis</i>	92,4%	<u><i>E. faecalis</i></u>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	92,9%	<u><i>E. faecium</i></u> , <i>E. hirae</i> <i>E. durans</i> et <i>E. lactis</i>	<i>E. hirae</i> et <i>E. durans</i> sont des pathogènes humains rares (337)

<i>Enterococcus</i> spp.	93,3%	<i>Enterococcus</i> spp. et <i>Granulicatella</i> spp.	Les <i>Granulicatella</i> sont aussi des pathogènes humains importants mais le traitement est identique (338)
<i>Escherichia coli</i>	93,4%	<i>E. coli</i> , <i>E. albertii</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> et <i>S. sonnei</i>	<i>Escherichia</i> spp. et <i>Shigella</i> spp. sont très proches génétiquement (339)
<i>Fusobacterium</i> spp.	88,2%	Seulement <i>Fusobacterium</i> spp.	Détection de <i>F. nucleatum</i> , <i>F. periodonticum</i> , <i>F. mortiferum</i> , <i>F. ulcerans</i> et <i>F. necrophorum</i> (340)
<i>Haemophilus influenzae</i>	93,5%	<i>H. influenzae</i> et <i>H. haemolyticus</i>	Détection faible de <i>H. haemolyticus</i> , qui est proche génétiquement de <i>H. influenzae</i> (341)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	94,1%	<i>K. oxytoca</i> , <i>E. cloacae</i> et <i>K. michiganensis</i>	La spécificité n'est pas adéquate, un gène autre que le 16S est requis
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	91,4%	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. quasipneumoniae</i> , <i>K. varicola</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>L. amnigena</i> et <i>R. planticola</i>	La spécificité n'est pas adéquate, un gène autre que le 16S est requis
<i>Listeria monocytogenes</i>	98,4%	<i>L. monocytogenes</i> et <i>L. marthii</i>	<i>L. marthii</i> est très rare (342)
<i>Moraxella</i> spp.	96,2%	Seulement <i>Moraxella</i> spp.	-
<i>Morganella morganii</i>	84,2%	<i>M. morganii</i> , <i>P. wallisii</i> et <i>S. erythrinae</i>	<i>P. wallisii</i> et <i>S. erythrinae</i> sont très rare (343)
<i>Mycobacterium avium</i>	92,6%	<i>M. avium</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	99,4%	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. pinnipedii</i> et <i>M. shinjukuense</i>	Pas de distinction requise entre ces pathogènes
<i>Neisseria meningitidis</i>	96,2%	<i>N. meningitidis</i> et <i>N. polysaccharea</i>	<i>N. polysaccharea</i> et très proche de <i>N. meningitidis</i> . (344)
<i>Prevotella</i> spp.	95,8%	Seulement <i>Prevotella</i> spp.	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	97,0%	<i>P. acnes</i>	-
<i>Proteus mirabilis</i>	97,8%	<i>P. mirabilis</i> ,	-
<i>Proteus vulgaris</i>	58,9%	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. hauseri</i> , <i>P. penneri</i> , <i>M. morganii</i> , <i>M. psychrotolerans</i> , <i>P. heimbachae</i> , <i>P. rettigeri</i> et <i>P. vermicola</i>	La spécificité et le taux de couverture ne sont pas adéquats, un gène autre que le 16S est requis
<i>Proteus</i> spp.	95%	Seulement <i>Proteus</i> spp.	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96,3%	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. denitrificans</i> et <i>P. tropicalis</i>	<i>P. denitrificans</i> et <i>P. tropicalis</i> ne sont pas pertinents d'un point de vue clinique
<i>Pseudomonas</i> spp.	87,9%	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Azotobacter</i> spp. et <i>Azomonas</i> spp.	-
<i>Salmonella enterica</i>	98,5%	<i>S. enterica</i> et <i>Y. regensburgi</i>	<i>Y. regensburgi</i> est rare (345)

<i>Serratia marcescens</i>	95,1%	<i>S. marcescens, S. entomophila, S. nematodiphila, S. rubidaea et S. ureilytica</i>	<i>S. entomophila, S. nematodiphila et S. ureilytica</i> ne sont pas à l'origine de maladies touchant l'Homme. Pas de distinction requise entre <i>S. marcescens</i> et <i>S. rubidaea</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	99,6%	<i>S. aureus, S. agnetis, S. argenteus, S. hyicus, S. gallinarum, S. schweitzeri et S. simiae</i>	<i>S. agnetis, S. argenteus, S. gallinarum, S. hyicus, S. schweitzeri et S. simiae</i> ne sont pas à l'origine de maladies touchant l'Homme. Pas de distinction requise entre <i>S. aureus</i> et <i>S. argenteus</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	87,5%	<i>S. maltophilia, P. geniculata, P. hibiscicola, S. tumulicola, S. pavanii et X. retroflexus</i>	L'identification de <i>S. maltophilia</i> , n'est pas optimale. Cependant les autres espèces ciblées ne se trouvent pas ou rarement chez l'humain
<i>Streptococcus agalactiae</i>	99,5%	<i>S. agalactiae</i>	-
<i>S. dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	93,5%	<i>S. dysgalactiae subsp. equisimilis</i> et <i>S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>	-
<i>Streptococcus mitis</i>	81%	<i>S. mitis, S. oralis, S. sanguinis, S. parasanguinis, S. pneumoniae, S. pseudopneumoniae et S. salivarius</i>	La spécificité n'est pas adéquate mais une augmentation de celle-ci entraîne une forte diminution du taux de couverture
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	98,2%	<i>S. pneumoniae</i> et <i>S. pseudopneumoniae</i>	Très peu (environ 10%) de <i>S. pseudopneumoniae</i> ciblés
<i>Streptococcus pyogenes</i>	98,9%	<i>S. pyogenes, S. ictaluri et S. canis</i>	<i>S. ictaluri</i> et <i>S. canis ureilytica</i> ne sont pas à l'origine de maladies touchant l'Homme.
<i>Streptococcus sanguinis</i>	67,3%	<i>S. sanguinis</i>	Le taux de couverture n'est pas idéal mais une augmentation de celui-ci impacte négativement la spécificité
<i>Streptococcus spp.</i>	96,2%	Seulement <i>Streptococcus spp.</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 1</i>	22,3%	<i>Y. enterocolitica</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 2</i>	67,7%	<i>Y. enterocolitica</i>	-
<i>Vibrio cholerae</i>	99,0%	<i>V. cholerae et V. mimicus</i>	<i>V. mimicus</i> est très proche de <i>V. cholerae</i> (346)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	97,0%	<i>P. shigelloides</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i>	99,0%	<i>L. pneumophila</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	100,0%	<i>A. butzleri</i>	-

2.2.2 Détermination des séquences des amorces

Il existe des amorces universelles couramment utilisées pour des PCR ciblant le gène codant pour l'ARN 16S, permettant notamment l'amplification partielle ou total du gène. Ces amorces ont été conçues pour amplifier tous les taxons bactériens en ciblant les régions conservées du gène codant pour l'ARN 16S.

Les PCR multiplexes de chacun des trois panels devant être réalisées en même temps, la taille des amplicons doit être similaire (200-500pb) afin d'avoir une phase d'élongation de la PCR de durée identique entre les trois panels, soit ici 30 secondes. Les amorces universelles, initialement prévues dans ce panel (27F-1492R) n'ont donc pas pu être utilisées car l'amplicon amplifié représente toute la longueur du gène soit environ 1,5 kilobases (kb). Il existe également des amorces de référence localisées de part et d'autre des zones variables sur le gène. Cependant, suite à la conception des sondes, ces amorces n'ont pas pu être utilisées car elles se sont parfois retrouvées mal positionnées par rapport aux sondes (amplicons trop grands ou amorces localisées à la même position que les sondes), ou alors elle ne permettait pas d'amplifier l'ADN de la cible pour lequel la sonde avait été définie.

Il a donc fallu déterminer de nouvelles amorces permettant l'amplification d'amplicons de petite taille (< 500 pb) et contenant les sondes préalablement conçues et validées. Les séquences du gène codant pour l'ARN 16S ont été récupérées de la base de données RDP, puis alignées avec le logiciel Méga (347) et finalement, la position des différentes sondes a été identifiée.

La conception de ces nouvelles amorces s'est avérée complexe car les sondes n'étaient pas uniformément réparties sur toute la longueur du gène, certaines zones d'une taille de 100pb pouvant contenir jusqu'à 10 sondes, alors que d'autres zones contenaient uniquement 2 sondes. En parallèle, les zones présentant plusieurs sondes proches appartiennent à différentes classes de pathogènes. Les zones de positionnements des amorces peuvent donc présenter plus de variations au niveau de la séquence nucléotidique et l'emploi des bases dégénérées peut s'avérer essentiel. Quatre couples d'amorces répondant à la nouvelle problématique ont ainsi été définies.

Le taux de couverture de ces amorces dans la base de données SILVA, a été évalué par rapport au taux de couverture obtenu avec les amorces de référence (amorces universelles), pour chacune des cibles du panel 1. Ces données sont exposées dans le **tableau 17**. Le taux de couverture a été déterminé comme le nombre de séquences pour une cible donnée amplifié par les amorces par rapport au nombre total de séquences pour cette même cible disponible dans la base de données.

Le taux de couverture des cibles obtenu avec les couples d'amorces conçus est très proche du taux de couverture des cibles obtenu avec les couples d'amorces universelles, excepté pour le genre *Clostridium* (*Clostridium spp.*) qui est de 79% avec les nouvelles amorces et de 96% avec les amorces universelles. Cette différence s'explique par le fait que l'amorce sens du couple d'amorces 3, qui permet de synthétiser l'amplicon s'hybridant sur la sonde correspondant à *Clostridium spp.*, se trouve à l'extrémité d'une zone de variation de la séquence du genre *Clostridium*.

Tableau 17 : Taux de couverture des couples d'amorces nouvellement définies pour les cibles du panel 1 par rapport aux couples d'amorces de référence

Les couples d'amorces nouvellement définis pour ce projet sont les couples 1, 2, 3 et 4 (en bleu). Les couples d'amorces universelles utilisés en comparaison sont des couples d'amorces universelles parmi les couples généralement utilisés. Le terme NA indique que la couverture n'a pas pu être déterminée avec le couple d'amorce utilisé. Les données ont été obtenues en janvier 2018.

Cible	Couple 1	Couple d'amorces universelles 1	Couple 2	Couple d'amorces universelles 2	519F-907R	Couple d'amorces universelles 3	907F-1100R	Couple d'amorces universelles 4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	87,10% (1567/1800)	86,60% (1559/1800)						
<i>Morganella morganii</i>	26,40% (23/85)	26,40% (23/85)						
<i>Campylobacter jejuni</i>	86,70% (104/120)	86,70% (104/120)						
<i>Mycobacterium avium</i>	47,40% (18/38)	42,10% (16/38)						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34,70% (251/724)	29,70% (215/724)						
<i>Enterococcus faecalis</i>	48,20% (183/380)	46,30% (176/380)						
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	91,50% (75/82)	91,50% (75/82)						
<i>Enterococcus faecium</i>	43,20% (123/285)	41,10% (117/285)						
<i>Bacteroides fragilis</i>	63% (34/54)	63% (34/54)						
<i>Streptococcus sanguinis</i>	53,20% (25/47)	53,20% (25/47)						
<i>Enterococcus spp.</i>	38,20%	36,60%						

	(573/1501)	(549/1501)							
<i>Proteus vulgaris</i>	12,20% (5/41)	12,20% (5/41)							
<i>Yersinia enterocolitica</i>					99,10% (108/109)	99,10% (108/109)			
<i>Propionibacterium acnes</i>					100% (53/53)	98,10% (52/53)			
<i>Serratia marcescens</i>					98,60% (436/442)	98,60% (436/442)			
<i>Enterobacter aerogenes</i>					100% (318/318)	100% (318/318)			
<i>Haemophilus influenzae</i>					100% (154/154)	100% (154/154)			
<i>Streptococcus agalactiae</i>					99,20% (247/249)	99,20% (247/249)			
<i>Proteus mirabilis</i>					89,80% (79/88)	89,80% (79/88)			
<i>Escherichia coli</i>					98,70% (2256/2586)	98,80% (2258/2586)			
<i>Staphylococcus aureus</i>					97,70% (670/680)	97,80% (671/680)			
<i>Streptococcus mitis</i>					100% (59/59)	100% (59/59)			
<i>Enterobacter cloacae</i>					98% (1039/1060)	98,80% (1047/1060)			
<i>Prevotella spp.</i>					95,70% (337/352)		NA		
<i>Plesiomonas shigelloides</i>					100% (12/12)		91,70% (11/12)		
<i>Legionella pneumophila</i>					98,30% (58/59)		100% (59/59)		

Le taux de couverture pour les 4 couples d'amorces est supérieur à 90% pour la très grande majorité des cibles, excepté pour celles amplifiées par le couple d'amorce numéro 1. L'hypothèse permettant d'expliquer ces résultats est que l'amorce sens du couple 1 se situe à l'extrémité du gène codant pour l'ARN 16S. Or les séquences présentes dans la base de données peuvent être légèrement incomplètes et être séquencées à partir du milieu ou en aval de l'amorce (figure 33).

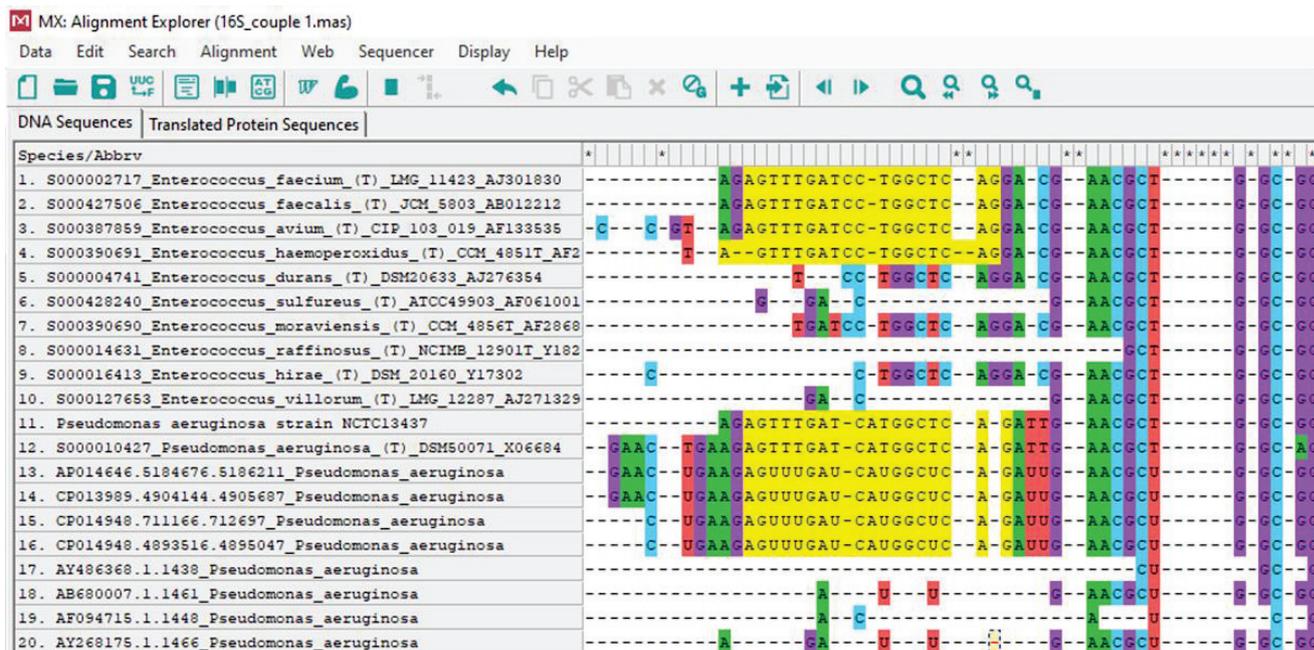


Figure 33 : Séquences incomplètes à l'extrémité du gène codant pour l'ARN 16S : Exemple d'*Enterococcus spp.* et *Pseudomonas aeruginosa*

En jaune, amorce sens du couple d'amorce 1. Les séquences 1 à 10 appartiennent au genre *Enterococcus spp.*, les séquences 11 à 20 appartiennent à diverses souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les paramètres entrés dans la base de données SILVA autorisant aucune différence entre les nucléotides des séquences de la base de données et les nucléotides de la séquence testée, ces séquences sont comptabilisées comme n'étant pas amplifiées par le couple d'amorces numéro 1, faisant ainsi baisser le taux de couverture. L'étude du taux de couverture peut donc se retrouver biaisée. Cette hypothèse semble être validée par le fait que le taux de couverture du couple 1 est très proche voir supérieur à la couverture du couple de référence utilisé pour la comparaison.

Les amorces et sondes du panel 1 ont été conçues et leur sensibilité et taux de couverture ont été vérifiés. Elles doivent être maintenant validées lors de tests à partir d'ADN extrait de souches bactériennes.

2.3 Conception des sondes et des amorces pour le panel 2

L'identification des pathogènes de ce panel s'effectue par l'intermédiaire des gènes *dnaJ* et *gyrB*. La conception a été réalisée par l'Austrian Institute of Technology (AIT) qui s'est par exemple basé sur l'étude menée par Pham Hong Nhung et son équipe pour déterminer quel gène entre *dnaJ* et *gyrB* serait utilisé pour identifier les pathogènes de ce panel (348). La spécificité et le taux de couverture des séquences oligonucléotidiques ont ensuite été vérifiés par l'université de Warwick qui a notamment utilisé la base de données de NCBI (349). Ces résultats sont présentés dans le **tableau 18**. Une séquence est jugée inadéquate lorsque le taux de couverture est inférieur à 80% et/ou la spécificité inclut en plus de la détection du pathogène ciblé d'autres pathogènes et parfois d'autres cibles du test.

Les amorces et sondes du panel 2 ont été conçues et leur sensibilité et taux de couverture ont été vérifiés. Pour *Escherichia coli* et *Aeromonas hydrophila*, d'autres pathogènes pouvant être détectés lors de bactériémies sont également identifiés par les séquences conçues. Lors du rendu des résultats au clinicien, il faudra préciser que la discrimination entre *Escherichia coli* et *Shigella spp.* ou entre *Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas dhakensis* n'a pas pu être réalisée. Les séquences devront maintenant être validées lors de tests à partir d'ADN extrait de souches bactériennes.

Tableau 18 : Taux de couverture et spécificité des séquences oligonucléotidiques (sondes et amorces) du panel 2

En rouge, sondes dont le taux de couverture ou la spécificité est jugé non adéquat pour le projet. Les noms de pathogènes soulignés correspondent aux cibles du projet.

Cible du panel 2	Gène cible	Taux de couverture de la paire d'amorce conçue	Couverture de la sonde conçue	Spécificité de la paire d'amorce conçue	Spécificité de la sonde conçue	Commentaire
<i>Salmonella typhi</i>	<i>fliC</i>	>90%	>90%	<i>S. enterica</i>	<u><i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi</i></u> et <u><i>Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Muenchen</i></u>	La sonde n'est pas entièrement spécifique et d'autres sérovars peuvent être détectés
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>gyrB</i>	>90%	>90%	<i>Burkholderia spp.</i>	<u><i>B. cepacia</i></u> , <u><i>B. cenocepacia</i></u> , <u><i>B. anthina</i></u> , <u><i>B. ambifaria</i></u> , <u><i>B. vietnamiensis</i></u> , <u><i>B. stabilis</i></u> , <u><i>B. metallica</i></u> et <u><i>B. arboris</i></u>	Toutes ces espèces font parties du complexe <i>Burkholderia cepacia</i> et sont très proches génétiquement (350)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>gyrB</i>	>90%	>90%	<u><i>S. paucimobilis</i></u>	<u><i>S. paucimobilis</i></u>	-
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>gyrB</i>	>90%	>90%	<i>Proteus spp.</i>	<u><i>P. vulgaris</i></u>	Les amorces ne sont pas très spécifiques. La spécificité est apportée par la sonde
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>gyrB</i>	>90%	>90%	<u><i>K. oxytoca</i></u>	<u><i>K. oxytoca</i></u>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>gyrB</i>	>90%	>90%	<i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Cronobacter</i> et <i>Klebsiella spp.</i>	<u><i>K. pneumoniae</i></u>	Les amorces ne sont pas très spécifiques. La spécificité est apportée par la sonde
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>gyrB</i>	>90%	>90%	<i>Citrobacter spp. et Enterobacter spp.</i>	<u><i>C. freundii</i></u> et <u><i>C. youngae</i></u> .	Les amorces ne sont pas très spécifiques. <i>C. youngae</i> . est un pathogène peu commun (351)
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>gyrB</i>	>90%	>90%	<u><i>C. koseri</i></u> et <u><i>C. youngae</i></u>	<u><i>C. koseri</i></u>	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>dnaJ</i>	>90%	>90%	<u><i>C. amalonaticus</i></u>	<u><i>C. amalonaticus</i></u>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>dnaJ</i>	>90%	>90%	<u><i>E. aerogenes</i></u>	<u><i>E. aerogenes</i></u>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>dnaJ</i>	>90%	>90%	<u><i>E. cloacae</i></u> et <u><i>E. ludwigii</i></u>	<u><i>E. cloacae</i></u> et <u><i>E. ludwigii</i></u>	<i>E. ludwigii</i> est un pathogène peu commun (352)

<i>Escherichia coli</i>	<i>dnaJ</i>	>90%	>90%	<i>Escherichia/Shigella</i> spp.	<i>E. coli</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> et <i>S. boydii</i>	Le gène <i>dnaJ</i> ne permet pas de discriminer <i>E. coli</i> de <i>Shigella</i> spp.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>dnaJ</i>	>90%	>90%	<i>A. hydrophila</i> et <i>A. dhakensis</i>	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. dhakensis</i> et <i>A. caviae</i>	<i>A. dhakensis</i> et <i>A. caviae</i> sont des pathogènes impliqués dans les infections du sang (353)

2.4 Conception des sondes et amorces pour le panel 3

Le panel 3 permet l'identification des gènes de résistance aux antibiotiques. Au moment de la conception de ces amorces, soit la période de juillet 2017, tous les variants des gènes de résistance publiés à cette période ont été pris en compte pour le panel 3. Les séquences ont été récupérées à partir des bases de données ARG-ANNOT et CARD (354–356). Les différents variants des gènes de résistance amplifiés et détectés par le panel 3 sont présentés dans le **tableau 19**. Les taux de couverture des amorces et sondes des gènes de résistance *qnrB*, *blaIMP* et *blaDHA* ne sont pas idéaux (< 80%), mais une augmentation de ces taux à pour impact une modification des critères de conception des séquences oligonucléotidiques (T_m , formation des structures secondaires).

Les amorces et sondes du panel 3 ont été conçues et évaluées et elles doivent être maintenant validées lors de tests à partir d'ADN extrait de souches bactériennes

Tableau 19 : Variants des gènes de résistance détectés en théorie par le panel 3

Gène de résistance	Variants détectés	Variants non détectés	Taux de couverture
<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(6')-Ib3-4</i> , <i>aac(6')-Ib6-11</i>	-	100% (17/17)
<i>aad</i>	<i>aadA2-3</i> , <i>aadA12-13</i> , <i>aadA15</i> , <i>aadA17</i> , <i>aadA21-25</i>	<i>aadA4-6</i> , <i>aadA11</i> , <i>aadA-16</i>	73% (11/15)
<i>aph2</i>	<i>aph2-Ib</i> , <i>aph2-IIa</i>	-	100% (2/2)
<i>blaACC</i>	<i>ACC-1</i> , <i>ACC-1a</i> , <i>ACC-1b</i> , <i>ACC-1c</i> , <i>ACC-1d</i> , <i>ACC-2</i> , <i>ACC-4</i> , <i>ACC-5</i> , <i>ACC-6</i>	<i>ACC-3</i>	90% (9/10)
<i>blaACT</i>	<i>ACT-2</i> , <i>ACT4-8</i> , <i>ACT-10</i> , <i>ACT-11</i> , <i>ACT13-18</i> , <i>ACT-20</i> , <i>ACT-21</i> , <i>ACT23-27</i> , <i>ACT-29-ACT-36</i>	<i>ACT-1</i> , <i>ACT-3</i> , <i>ACT-9</i> , <i>ACT-12</i> , <i>ACT-19</i> , <i>ACT-22</i> , <i>ACT-28</i> , <i>ACT-37</i>	74% (23/31)
<i>blaccrA</i>	<i>ccrA</i>	-	100% (1/1)
<i>blaCMY</i>	<i>CMY-2</i> , <i>CMY-3-7</i> , <i>CMY-12-18</i> , <i>CMY-21-39</i> , <i>CMY-41-48</i> , <i>CMY-50-51</i> , <i>CMY-53-55</i> , <i>CMY-57-69</i> , <i>CMY-72-73</i> , <i>CMY-75-81</i> , <i>CMY-84-87</i> , <i>CMY-89-97</i> , <i>CMY-99</i> , <i>CMY-102-103</i> , <i>CMY-105-110</i> , <i>CTX-M-113-119</i>	<i>CMY-1</i> , <i>CMY-8</i> , <i>CMY-9</i> , <i>CMY-10</i> , <i>CMY-11</i> , <i>CMY-19</i> , <i>CMY-20</i> , <i>CMY-40</i> , <i>CMY-49</i> , <i>CMY-56</i> , <i>CMY-70</i> , <i>CMY-71</i> , <i>CMY-74</i> , <i>CMY-82</i> , <i>CMY-83</i> , <i>CMY-98</i> , <i>CMY-100</i> , <i>CMY-101</i> , <i>CMY-104</i>	82% (85/104)
<i>blaCTX-M-1</i>	<i>CTX-M-1</i> , <i>CTX-M-3</i> , <i>CTX-M-12</i> , <i>CTX-M-15</i> , <i>CTX-M-22-23</i> , <i>CTX-M-28-30</i> , <i>CTX-M-32-33</i> , <i>CTX-M-36</i> , <i>CTX-</i>	<i>CTX-M-10</i> , <i>CTX-M-11</i> , <i>CTX-M-34</i> , <i>CTX-M-37</i> , <i>CTX-M-66</i> , <i>CTX-M-68</i> , <i>CTX-M-139</i>	87% (46/53)

	M-42, CTX-M-52-55, CTX-M-58, CTX-M-60-62, CTX-M-64, CTX-M-71-72, CTX-M-79-80, CTX-M-82, CTX-M-88, CTX-M-96, CTX-M-101, CTX-M-103, CTX-M-107-109, CTX-M-114, CTX-M-116-117, CTX-M-123, CTX-M-132, CTX-M-136, CTX-M-142, CTX-M-144, CTX-M-155-158,		
<i>bla</i> CTX-M-2	CTX-M-2, CTX-M-5, CTX-M-7, CTX-M-20, CTX-M-31, CTX-M-35, CTX-M-44, CTX-M-56, CTX-M-59, CTX-M-76-77, CTX-M-92, CTX-M-95, CTX-M-115, CTX-M-124, CTX-M-141,	CTX-M-4, CTX-M-6, CTX-M-43	84% (16/19)
<i>bla</i> CTX-M-25	CTX-M-25-26, CTX-M-39, CTX-M-41, CTX-M-89, CTX-M-91, CTX-M-94, CTX-M-100, CTX-M-154,	-	100% (9/9)
<i>bla</i> CTX-M-9	CTX-M-9, CTX-M-13-14, CTX-M-16-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-24, CTX-M-27, CTX-M-38, CTX-M-45-51, CTX-M-65, CTX-M-67, CTX-M-81, CTX-M-83, CTX-M-85-87, CTX-M-90, CTX-M-93, CTX-M-98-99, CTX-M-102, CTX-M-104-106, CTX-M-110-113, CTX-M-121-122, CTX-M-125-126, CTX-M-129, CTX-M-134, CTX-M-147-148, CTX-M-160,	CTX-M-84, CTX-M-130	96% (45/47)

<i>blaDHA</i>	DHA-1-3, DHA-5-7, DHA-10, DHA-14-15, DHA-17-18, DHA-22	DHA-12-13, DHA-16, DHA-19-21	67% (12/18)
<i>blaGIM</i>	GIM-1, GIM-2	-	100% (2/2)
<i>blaIMI</i>	IMI-1-4, IMI-6-7, IMI-9, IMI-13-16	IMI-5, IMI-8	85% (11/13)
<i>blaIMP</i>	IMP-1-10, IMP-14-15, IMP-25-26, IMP-28-30, IMP-32-33, IMP-38-46	IMP-12-13, IMP-16-24, IMP-27, IMP-31, IMP-34, IMP-35-37, IMP-47	62% (28/45)
<i>blaKPC</i>	KPC-1, KPC-3-17, KPC-19, KPC-22	-	100% (18/18)
<i>blaNDM</i>	NDM-1-10, NDM-12-14	-	100% (13/13)
<i>blaOXA-1</i>	OXA-1, OXA-4, OXA-24, OXA-31, OXA-33, OXA-47	-	100% (6/6)
<i>blaOXA-10</i>	OXA-7, OXA-10-11, OXA-13-14, OXA-16-17, OXA-19, OXA-28, OXA-35, OXA-56, OXA-74, OXA-101, OXA-145, OXA-147, OXA-183, OXA-233, OXA-240, OXA-246, OXA-251, OXA-256, OXA-368, OXA-344,	-	100% (23/23)
<i>blaOXA-23</i>	OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-133, OXA-146, OXA-165-172, OXA-225, OXA-239, OXA-366, OXA-398, OXA-422-423, OXA-435	-	100% (21/21)

<i>bla</i> OXA-24	OXA-24-26, OXA-40, OXA-72, OXA-139, OXA-143, OXA-160, OXA-182, OXA-207, OXA-231, OXA-253	OXA-255	91% (10/11)
<i>bla</i> OXA-48	OXA-48, OXA-162-163, OXA-199, OXA-204, OXA-244-245, OXA-247, OXA-370	-	100% (9/9)
<i>bla</i> OXA-58	OXA-58, OXA-96-97, OXA-164, OXA-397, OXA-420	-	100% (6/6)
<i>bla</i> PER	PER-1, PER-3, PER-4, PER -5, PER-7	PER-2, PER-6,	71% (5/7)
<i>bla</i> SHV	SHV-1-3, SHV5-9, SHV11-46, SHV-48-57, SHV-59-74, SHV-76-86, SHV-88, SHV-92-101, SHV-107-111, SHV-120-121, SHV124-129, SHV-133-136, SHV-140-163, SHV-165, SHV-167, SHV-178-189	SHV-2A, SHV-75,SHV-112, SHV122-123, SHV-137,SHV-159, SHV-178,	95% (147/155)
<i>bla</i> SPM	SPM-1	-	100% (1/1)
<i>bla</i> TEM	TEM-1-12, TEM-15-24, TEM-26-34, TEM40-49, TEM-52-60, TEM-67-96, TEM-101-145, TEM-147-165, TEM-166-171, TEM-176-192, TEM-195-201, TEM-205-211	TEM-90, TEM-146, TEM-166, TEM-193-194	97% (181/186)
<i>bla</i> VEB	VEB-1-9	-	100% (9/9)
<i>bla</i> VIM	VIM-1-6, VIM-8-12, VIM-15-38, VIM-42-43	VIM-7, VIM-13, VIM-14, VIM-39	90% (37/41)

<i>ermB</i>	<i>ermB</i>	-	100% (3/3)
<i>ermF</i>	<i>ermF</i>	-	100% (6/6)
<i>mcrI</i>	<i>mcrI</i>	-	100% (1/1)
<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	-	100% (2/2)
<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	-	100% (6/6)
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> 1-7	-	100% (7/7)
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> 1-3, <i>qnrB</i> 6-7, <i>qnrB</i> 9-10, <i>qnrB</i> 13-16, <i>qnrB</i> 18-20, <i>qnrB</i> 23-24, <i>qnrB</i> 26, <i>qnrB</i> 29-30, <i>qnrB</i> -32, <i>qnrB</i> 36, <i>qnrB</i> 39-45, <i>qnrB</i> 47-54, <i>qnrB</i> 57-59, <i>qnrB</i> 61-63, <i>qnrB</i> 66-68, <i>qnrB</i> 70-72, <i>qnrB</i> 74	<i>qnrB</i> 4, <i>qnrB</i> 8, <i>qnrB</i> 11-12, <i>qnrB</i> 17, <i>qnrB</i> 21-22, <i>qnrB</i> 25, <i>qnrB</i> 27-28, <i>qnrB</i> 31, <i>qnrB</i> 33-35, <i>qnrB</i> 37-38, <i>qnrB</i> 46, <i>qnrB</i> 55-56, <i>qnrB</i> -60, <i>qnrB</i> 64-65, <i>qnrB</i> 69, <i>qnrB</i> 73	68% (50/74)
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> 1-9	-	100% (9/9)
<i>tetQ</i>	<i>tetQ</i>	-	100% (6/6)
<i>vanA</i>	<i>vanA</i>		100% (1/1)
<i>vanB</i>	<i>vanB</i>		100% (7/7)

3 Optimisation des conditions expérimentales des protocoles de PCR et d'analyse

Du fait du très grand nombre de cibles du projet (105 cibles), il n'a pas été possible de réaliser une étude approfondie de l'impact de chaque paramètre défini lors des protocoles de PCR et d'analyse sur toutes les cibles au cours des différentes étapes d'optimisation du test. Les trois panels ayant été construits selon les mêmes critères, les paramètres ont été optimisés sur le panel 1, qui a été développé en premier, puis transposés et validés sur les panels 2 et 3.

3.1 Optimisation du protocole d'analyse

3.1.1 Adaptation de la matrice de dépôt et du logiciel AXOware

Les précédents projets développés au sein d'AXO science utilisaient des matrices de dépôt de taille 8X8 spots au maximum, contenant les contrôles positifs, les contrôles négatifs et les sondes en duplicat. Le nombre important de cibles dans chaque panel a nécessité l'augmentation de la taille de la matrice de dépôt à 11x11 et l'adaptation des paramètres de dépôt. Après optimisation, le dépôt en fond de puits de matrices 11x11 s'est révélé réalisable (**figure 34**). Il semble également qu'une matrice de dépôt 11X11 soit la taille maximale de matrice réalisable. En effet, dans les cas de matrices de dépôt plus importantes (supérieures à 12x12), les sondes se trouvant dans les 4 angles de la matrice peuvent se retrouver en bordure ou dans la partie ombragée du puits, ce qui pourrait impacter négativement la lecture des résultats.

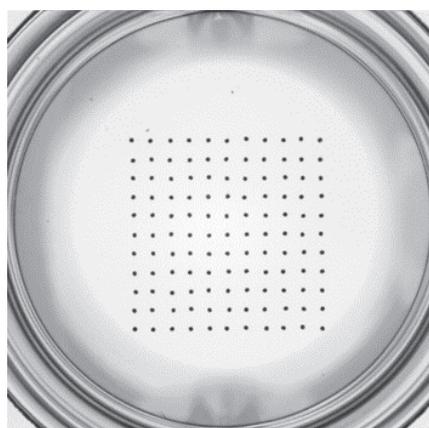


Figure 34: Dépôt en fond de puits des matrices de taille 11x11

La faisabilité du dépôt en fond de puits des matrices de taille 11x11 ayant été démontrée, le logiciel AXOware a été adapté à ce projet, par la société Hirislab à l'origine de ce logiciel, rendant ainsi possible l'extraction de l'intensité des signaux de chacune des sondes pour les nouvelles matrices de dépôt de taille 11x11.

3.1.2 Température de fin de rampe d'hybridation

Au cours du protocole d'analyse, la température de fin de rampe permet d'hybrider les amplicons sur les sondes suivant leur température de demi-dénaturation. Une rampe de température décroissante haute (ex 95°C-70°C) permet aux amplicons de se fixer de manière très spécifique, contrairement à une rampe décroissante de température basse (ex 95°C-30°C). Un équilibre doit être trouvé entre intensité des signaux et spécificité des signaux. La température de demi-dénaturation des sondes étant comprise entre 55°C et 65°C, trois températures différentes ont été testées : 60°C, 65°C et 70°C (**figure 35**).

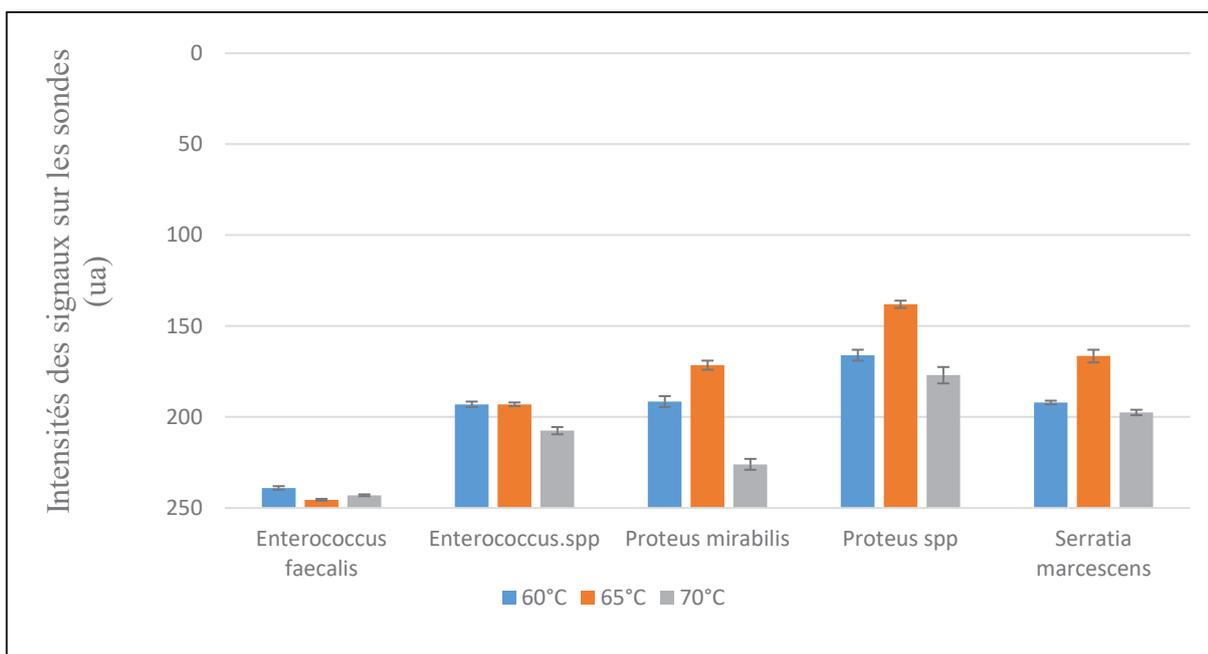


Figure 35 : Intensité des signaux détectés sur les sondes suivant trois températures de fin de rampe pour l'hybridation sur biopuce : 60°C, 65°C et 70°C

Utilisation des pathogènes *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens* et *Proteus mirabilis* à une quantité de 200 ng d'ADN dans la PCR, n=2.

En ordonnée se trouve l'intensité moyenne des signaux détectés au sein de chacune des cases de la matrice, correspondant à l'intensité du signal sur les sondes.

Ces tests ont été effectués sur le panel 1 et ont permis de montrer que la majorité des cibles testées donne une meilleure sensibilité à une température de fin de rampe à 65°C. Cette température a été conservée pour les panels 2 et 3.

3.2 Optimisation du protocole de PCR

3.2.1 Détermination de la concentration finale en amorce dans la PCR

La concentration finale de chaque amorce dans la PCR est généralement comprise entre 0,1 et 1 µM. Pour les PCR multiplexes, cette concentration est généralement plus faible du fait du nombre plus important d'amorces dans le mix PCR.

Pour le panel 1, deux concentrations ont été testées 0,1 µM et 0,3 µM (**figure 36**). Les conditions de PCR ont été testées sur un ADN cible par couple d'amorces (en prenant en compte la position de la sonde) :

- *Enterococcus faecalis* (amplifié par le couple d'amorce 1)
- *Serratia marcescens* (amplifié par le couple d'amorce 2)
- *Staphylococcus aureus* (amplifié par le couple d'amorce 2)
- *Citrobacter amalonaticus* (amplifié par le couple d'amorce 3)
- *Listeria monocytogenes* (amplifié par le couple d'amorce 4)

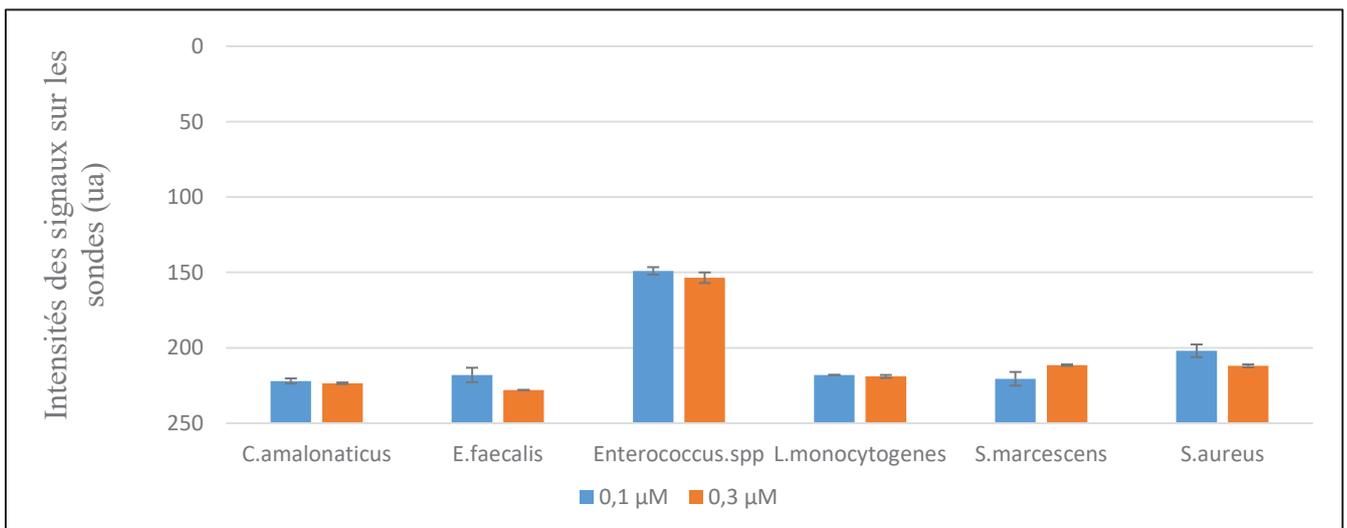


Figure 36 : Test de deux valeurs de concentrations finales d'amorces dans la PCR du panel 1 : 0,1 µM et 0,3 µM

Une différence significative est observée sur les sondes *S. marcescens*, *S. aureus* et *E. faecalis* (n=2)

Les intensités des signaux sur les sondes sont très proches quelque soit la concentration finale en amorces dans le mix. Pour les sondes *E. faecalis* et *S. aureus*, les signaux sont plus importants avec une concentration finale de chaque amorce à 0,1 µM contre 0,3 µM pour *S. marcescens*. Ces deux concentrations seront utilisées lors de la détermination de la température d'hybridation de la PCR.

3.2.2 Evaluation des températures d'hybridation lors des PCR

La température de demi-dénaturation (T_m) des amorces indique la température à laquelle 50% de l'ADN double brin est dénaturé. La température d'hybridation pour la PCR (T_a) se calcule en fonction de la T_m dont la valeur varie suivant la formule utilisée pour la calculer, la concentration en sels, la concentration des amorces ainsi que les modifications possibles apportées aux amorces.

La température de demi-dénaturation des amorces de ce test a été calculée suivant la formule ci-dessous avec les concentrations en sels suivantes $[Na^+]=50$ mM et $[Mg^{2+}]=0$ mM

$$T_m(^{\circ}C) = \frac{\Delta H^{\circ}}{\Delta S^{\circ} + R \ln[oligo]} - 273,15$$

H° représente l'enthalpie et S° l'entropie de l'amorce déterminées avec les paramètres thermodynamiques des plus proches voisins (357), R est la constant des gaz parfaits (1,987 calK⁻¹mole⁻¹), [oligo] désigne la concentration molaire d'un oligonucléotide et le nombre - 273,15 permet de convertir les degrés Kelvin en degrés Celsius.

Généralement, pour déterminer la T_a , une température de 3°C à 5°C inférieur à la T_m est acceptée. Les 59 couples d'amorces de ce projet ont été conçues selon les mêmes critères, mais malgré cela, une différence de 11,4°C est observée entre la T_m la plus faible (45,4°C) et la T_m la plus haute (56,8°C). Prendre une T_a inférieure à la T_m la plus faible entrainerait un écart important par rapport à la T_m la plus haute, or une T_a trop basse peut entrainer des hybridations entre l'amorce concernée et des séquences non spécifiques.

La Ta peut être calculée en soustrayant 5°C au Tm ou en utilisant la formule suivante.

$$- \quad Ta^{OPT} = 0,3Tm^{Primer} + 0,7Tm^{Product} - 14,9 \quad (358)$$

Avec $Tm^{product} = 64,9 + 41 \times ((G+C) - 16,4)/N$ (N = nombre de nucléotide du produit)

En appliquant ces formules sur l'amorce présentant la plus faible Tm pour chaque panel c'est-à-dire 49,8°C pour l'amorce sens du couple 1 (panel 1), 45,6°C pour l'amorce sens de *S.typhi* (panel 2) et 45,4°C pour l'amorce antisens de *vanA*, on obtient les Ta optimaux présentées dans le **tableau 20**.

Tableau 20 : Calcul de la Ta selon les deux formules pour les 3 panels

	Panel 1	Panel 2	Panel 3
$Ta^{OPT} = 0,3Tm^{Primer} + 0,7Tm^{Product} - 14,9$	58,8°C	52,7°C	54,2°C
$Ta = Tm - 5^{\circ}C$	44,8°C	40,6°C	40,4°C

Les Ta optimales calculées avec ces deux formules sont très éloignées l'une de l'autre. La moyenne des Tm des amorces de chaque panel étant respectivement de 51,2°C pour le panel 1, 52,4°C pour le panel 2 et 50,1°C pour le panel 3. Il a été décidé de tester trois températures d'hybridation autour de ces valeurs. Trois Ta ont donc été testées : 49,5°C, 51°C et 52,5°C. Ces températures d'hybridation ont ensuite été testées sur 4 pathogènes : *Citrobacter amalonaticus*, *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis* (**figure 37**).

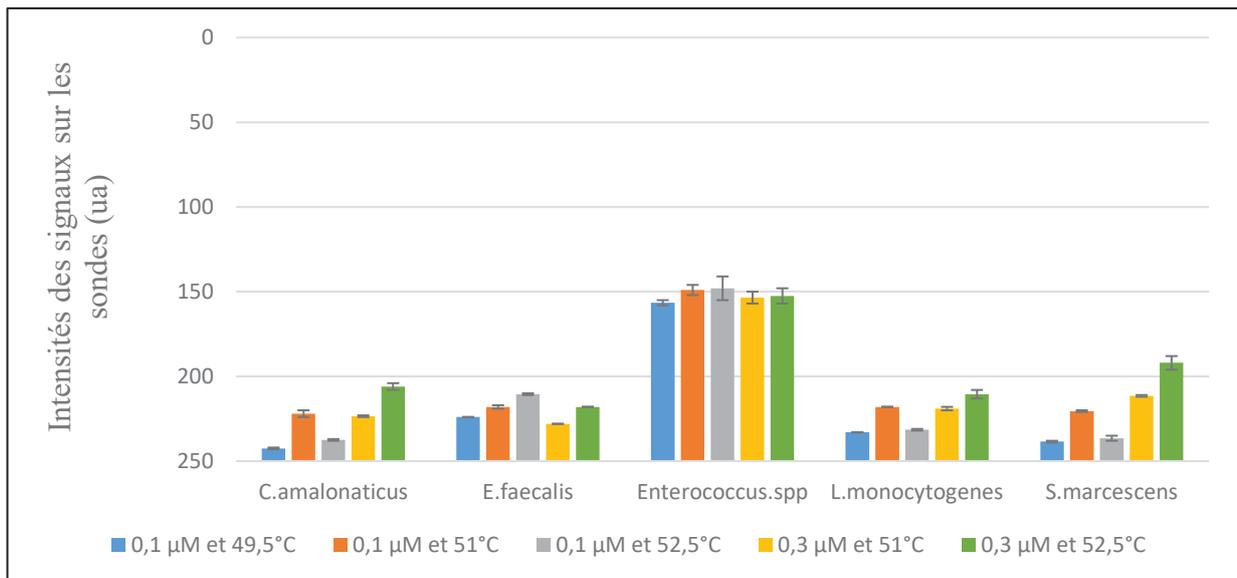


Figure 37 : Test de différentes températures d'hybridations pour la PCR: 49,5°C, 51°C et 52,5°C avec des concentrations finales d'amorces dans la PCR de 0,1 µM et 0,3 µM. La condition 0,3 µM et 49,5°C n'a pas été réalisée, (n=2).

Le signal d'intensité la plus forte est observé pour la condition 0,3 µM et 52,5°C sur les sondes *C. amalonaticus*, *S. marcescens* et *L. monocytogenes*. Pour la sonde *Enterococcus spp.*, le signal est d'intensité similaire pour les conditions testées alors que pour la sonde *Enterococcus faecalis*, le signal le plus intense est rencontré pour la condition 0,1 µM et 52,5°C. Cependant seule une différence de seulement 6 ua est observée avec la condition 0,3 µM et 52,5°C.

Une température d'hybridation de 52,5°C et une concentration finale de chaque amorce de 0,3 µM ont donc été validées pour la suite des tests. Cette température a ensuite été appliquée aux deux autres panels.

3.2.3 PCR symétrique vs PCR asymétrique

La PCR asymétrique consiste à utiliser un excès d'une amorce du couple d'amorce par rapport à l'autre afin de favoriser préférentiellement la synthèse d'un brin particulier. Dans le cadre de ce test, c'est l'amorce biotinylée qui est favorisée afin de synthétiser majoritairement le brin qui va s'hybrider sur les sondes. Au terme des cycles de PCR, le brin biotinylé est

retrouvé de manière plus abondante, ce qui va favoriser le signal observé sur les sondes. Plus le ratio entre les deux amorces du couple est important, plus le déséquilibre interviendra tôt dans le nombre de cycles et plus le nombre de copies diminuera avec comme conséquence une diminution de l'intensité du signal sur les sondes.

L'asymétrie entre les deux amorces du couple ne doit donc pas être trop importante. Un rapport a été sélectionné et a été testé sur 4 pathogènes : *Citrobacter amalonaticus*, *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis* (**figure 38**).

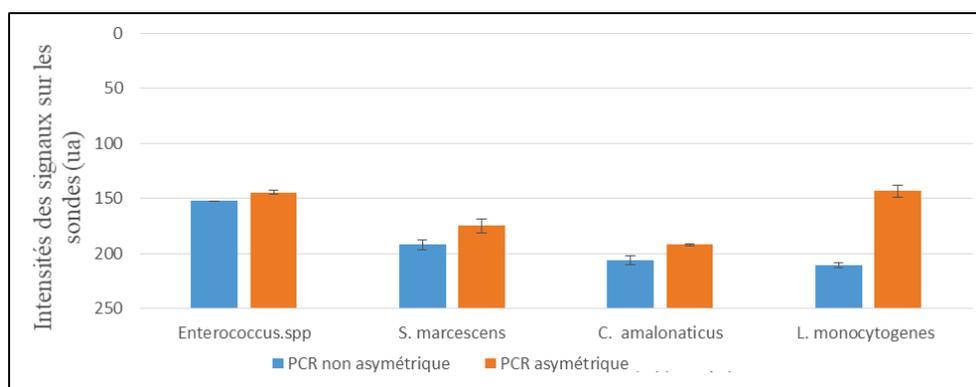


Figure 38 : Test d'un rapport d'asymétrie des amorces sur l'intensité des signaux observés sur les sondes du panel 1 (n=2)

Une augmentation de l'intensité sur toutes les sondes étudiées est observée en présence de ce rapport d'asymétrie Cette augmentation est comprise entre 5 et 10% excepté pour la sonde *L. monocytogenes* où l'intensité du signal augmente de 31%.

Ce rapport d'asymétrie a donc été fixé pour l'ensemble des couples d'amorces du projet.

3.2.4 Ajustement des concentrations en amorces dans les mix d'amorces des panels 2 et 3

3.2.4.1 Ajustement de la concentration en amorces pour le panel 2

Afin d'améliorer la détection de certaines cibles, la concentration finale des couples d'amorces correspondants dans la PCR a été ajusté. En effet, lors de la transposition des

caractéristiques de la PCR déterminées sur le panel 1 au panel 2, aucun signal sur les sondes n'a été observé pour certaines cibles. La concentration finale en amorce dans la PCR a donc été ajustée afin de favoriser l'apparition des signaux pour les cibles manquantes comme *B. cepacia* et *P. vulgaris*. Deux nouveaux mix d'amorces, 1 et 2 ont été testé (**figure 39**).

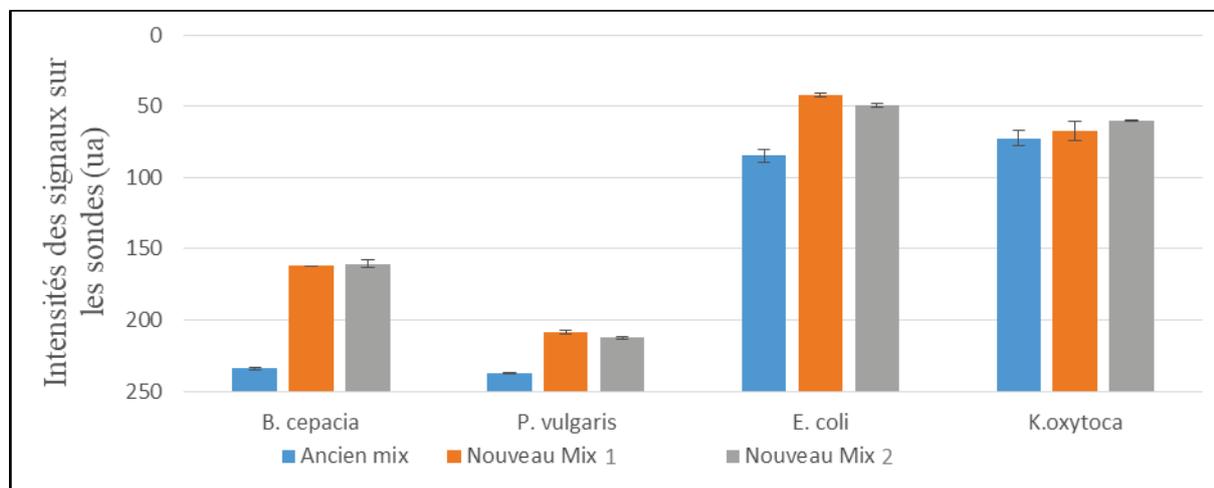


Figure 39 : Evaluation de l'augmentation de la concentration finale en amorces dans la PCR sur l'intensité des signaux du panel 2 (n=2)

Une augmentation significative de l'intensité des signaux est observée avec le changement de la concentration des amorces sur les sondes *B. cepacia* et *P. vulgaris*. La modification de la concentration de ces amorces n'a également pas impacté de manière négative les signaux observés sur les sondes d'autres pathogènes. Afin de limiter la quantité d'amorces globale dans le mix de PCR, le nouveau mix d'amorces 1 a été conservé pour toutes les expérimentations suivantes.

3.2.4.2 Ajustement de la concentration en amorce pour le panel 3

Afin d'améliorer la détection de certaines cibles, la concentration finale des couples d'amorces dans la PCR a été ajusté. En effet, lors de la transposition des caractéristiques de la PCR déterminées sur le panel 1 au panel 3, trois gènes de résistance n'ont pas été détectés : *blaCMY*, *blaOXA-24* et *blaIMP* tandis que d'autres gènes de résistance comme *blaIMI*, *qnrB* et *mcr1* présentaient un signal sur les sondes plutôt faible (inférieur à 200 ua). Plusieurs concentrations en amorces ont été testées jusqu'à tester la composition du nouveau mix d'amorces dont l'effet sur les intensités des signaux sur les cibles et présenté dans la **figure 40**.

Une augmentation de l'intensité des signaux sur les sondes suite à l'utilisation de ce nouveau mix d'amorces est observée sur quatre des six cibles présentées ici. D'autres cibles (*blaVIM* et *blaOXA-23*) qui présentaient un signal déjà élevé en intensité avec l'ancien mix d'amorces n'ont pas été impacté négativement par l'utilisation du nouveau mix d'amorces du panel 3.

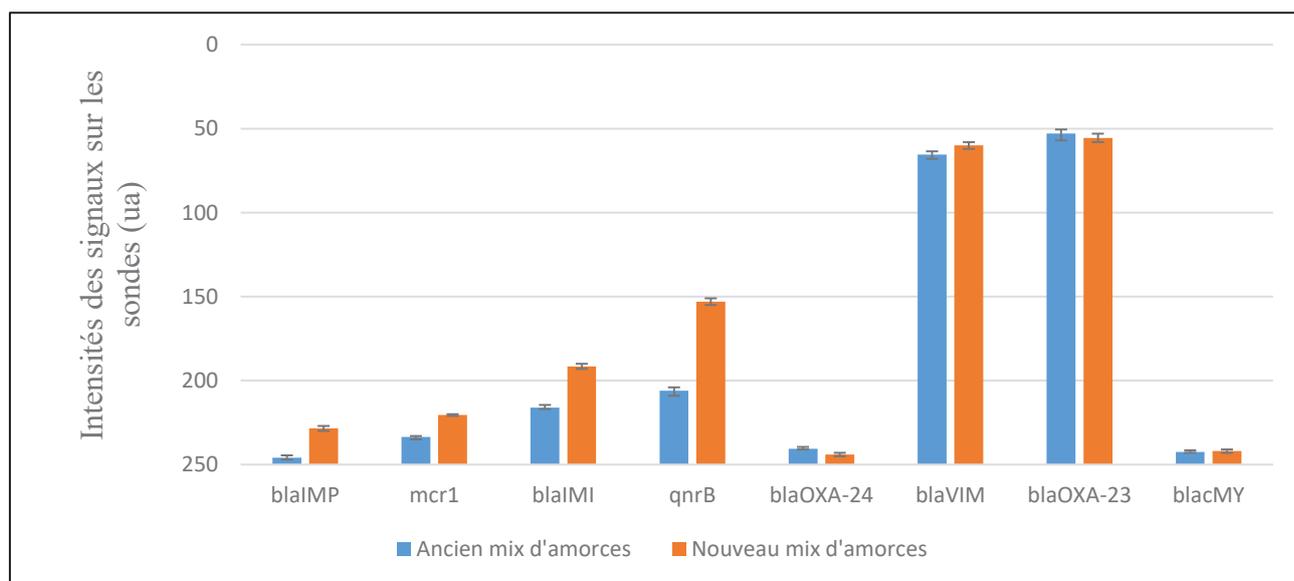


Figure 40 : Evaluation de l'augmentation de la concentration finale en amorce dans la PCR sur l'intensité des signaux du panel 3

n=2

La composition de ce nouveau mix d'amorces a été conservée pour toutes les expérimentations suivantes.

Malgré des modifications parfois significative de la concentration finale dans la PCR de certaines amorces, l'intensité des signaux sur la biopuce du panel 3 reste plutôt limitée. Afin de déterminer si la faible augmentation de l'intensité de ces signaux provient de la faible augmentation de la quantité d'amplicons produite au cours de la PCR ou d'une faible hybridation de ceux-ci sur les sondes, une mesure de la taille et quantité produits de la PCR a été réalisée par séparation sur gel d'électrophorèse (réalisée avec le Bioanalyzer 2100 d'Agilent).

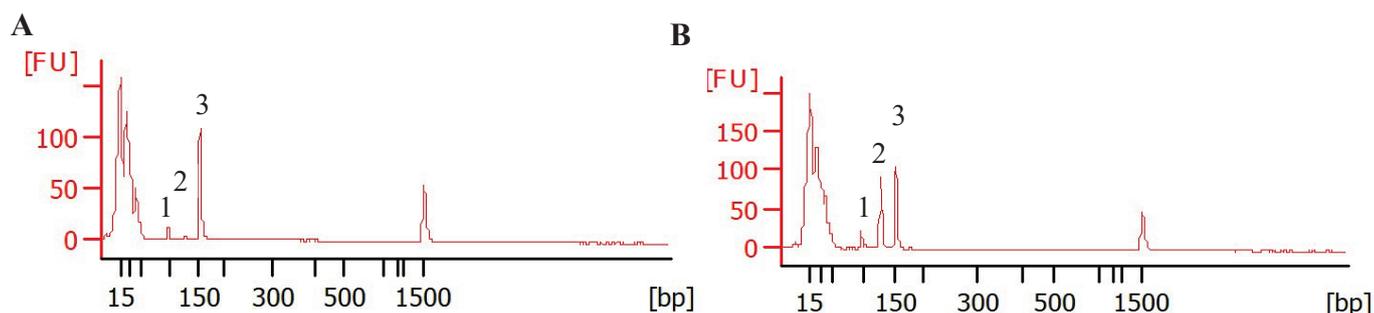


Figure 41 : Electrophérogramme obtenu sur le Bioanalyzer 2100 d'Agilent permettant de vérifier l'impact de l'augmentation de la concentration finale en amorce sur les cibles *aad*, *mcr1* et *TEM*

L'ADN de la souche DSM105182 a été utilisé. Cette souche contient trois gènes de résistance : *aad* (1) (84bp), *mcr-1* (2) (117bp) et *blaTEM* (3) (143bp)

A : Ancien mix d'amorces pour le panel 3

B : Nouveau mix d'amorces pour le panel 3

La **figure 41** présente l'intensité des pics observables selon la taille des fragments d'ADN. Un pic très important autour de 15 pb correspondant à la taille des amorces de la PCR multiplexe est observé, et est cohérent avec le nombre d'amorces (82) utilisé pour la PCR multiplexe du panel 3. Aucune variation des pics n'est observée pour les gènes *aad* et *blaTEM* ce qui corrobore le fait que l'utilisation du nouveau mix d'amorce n'a pas eu d'impact négatif sur l'intensité observé avec l'ancien couple d'amorce sur les autres cibles du panel 3. Pour *mcr1*, une très forte augmentation de la taille du pic est observée ce qui indique une synthèse plus importante de l'amplicon au cours de la PCR avec le nouveau mix d'amorces.

Le fait que l'intensité des signaux *mcr1* sur la biopuce n'a pas augmentée de manière comparable suggère que la température de fin de rampe lors du protocole d'analyse ou la conception de la sonde ne soient pas optimales. Ces observations sont confirmées par les deux autres cibles présentes sur ce gel d'électrophorèse. En effet, *aad* qui présente le pic le plus faible sur ce gel possède un des signaux les plus intenses sur la biopuce (entre 30 et 40 ua).

3.2.5 Augmentation du nombre de cycle de la PCR de 35 cycles à 45 cycles

Une augmentation du nombre de cycle de la PCR de 35 cycles à 45 cycles a été privilégiée afin d'augmenter la synthèse du brin s'hybridant sur la sonde. En effet, la modification de la température de fin de rampe lors du protocole a été écartée car cela impacte les deux autres panels et donc les optimisations réalisées jusqu'à présent. De même, la synthèse d'une nouvelle sonde a été écartée car cela entrainerait la conception de nouveau couple d'amorces et de sondes.

L'étude a été menée sur les trois panels, des PCR (triplicat) à 35, 40 et 45 cycles ont été réalisées.

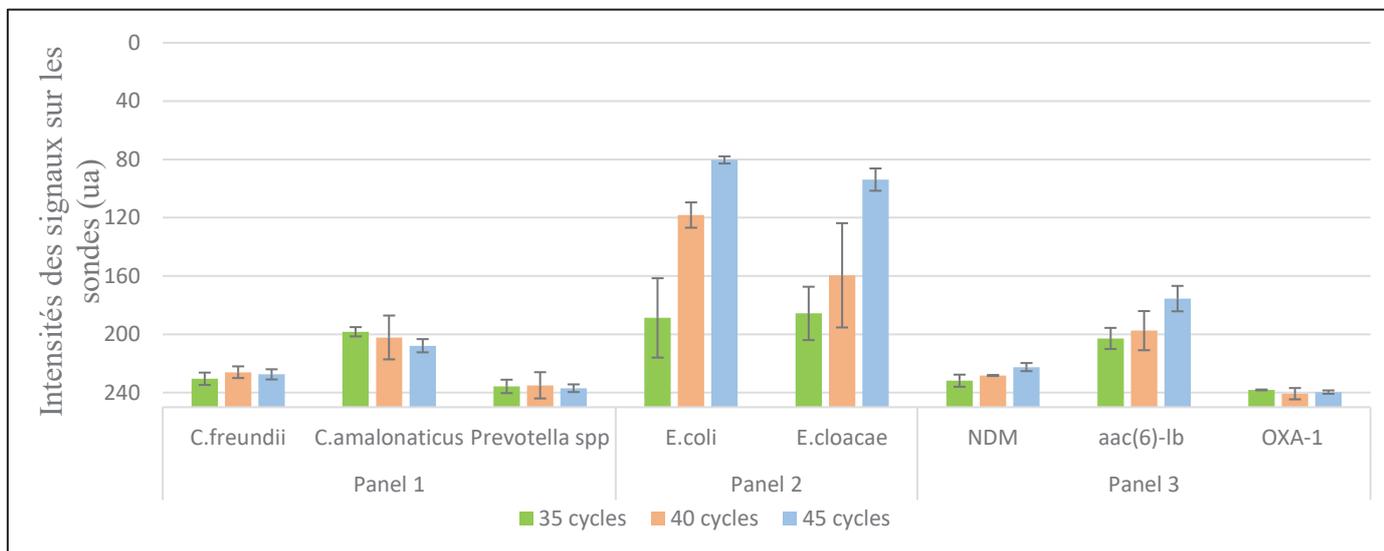


Figure 42 : Intensité des signaux sur les sondes selon le nombre de cycle de la PCR (n=3)

La **figure 42** présente un exemple de résultats obtenus sur quelques cibles des trois panels. Globalement, aucun impact positif ou négatif sur l'intensité des signaux du panel 1 n'est observé. Pour le panel 2, une amélioration significative de l'intensité des signaux est observée avec l'augmentation du nombre de cycles. Finalement pour le panel 3, aucun impact négatif sur l'intensité des signaux n'a été observé. Certaines cibles présentent une amélioration de l'intensité des signaux à 45 cycles comme NDM par exemple, aucun impact n'est observé sur d'autres comme par exemple OXA-1.

Le nombre de cycles du programme PCR a donc été fixé à 45 cycles.

3.2.6 Optimisation du protocole d'analyse sur le *Pathodoc*

Un appareillage spécifique intégré, le *Pathodoc* a été développé pour le projet. Une première étape a consisté à adapter les trois protocoles (extraction, PCR et analyse) sur ce robot. Pour la partie du protocole d'analyse, il a fallu adapter les températures de la rampe d'analyse, le système de chauffage et de refroidissement de la biopuce étant différent de celui présent sur le robot d'analyse présent à AXO Science. Les températures de la rampe d'hybridation ont en effet été abaissées.

Il a donc fallu vérifier l'impact de l'utilisation de l'huile sur l'obtention des résultats. Le *Pathodoc* étant entièrement automatisé, les protocoles de l'extraction au protocole d'hybridation doivent s'effectuer sans intervention humaine. Les tubes où s'effectue la PCR ainsi que le thermocycleur utilisé au sein du *Pathodoc* sont donc ouvert (sans couvercle) afin de pouvoir effectuer les différentes distributions de réactifs nécessaires. Afin d'éviter l'évaporation du mélange de PCR lors des différents cycles, de l'huile minérale a été déposée au-dessus du mélange de PCR dans les tubes.

Il a donc fallu dans un premier temps démontrer l'absence d'impact de l'huile sur le déroulé de la PCR puis l'absence d'impact sur l'hybridation des amplicons sur les sondes au sein de la biopuce. En effet, une fois la PCR effectuée, et lors de la distribution de ce mélange dans les biopuces, de l'huile peut être aspirée dans les cônes et distribuée sur la biopuce. Une étude, dont les résultats sont présentés dans la **figure 43** a donc été réalisée en triplicat sur des cibles des trois panels. Trois conditions différentes ont été testées :

- Une PCR réalisée sans huile dans un tube fermé puis déposée sur la biopuce
- Une PCR réalisée avec de l'huile puis déposée avec cette huile sur la biopuce
- Une PCR réalisée avec de l'huile mais déposée sans huile sur la biopuce

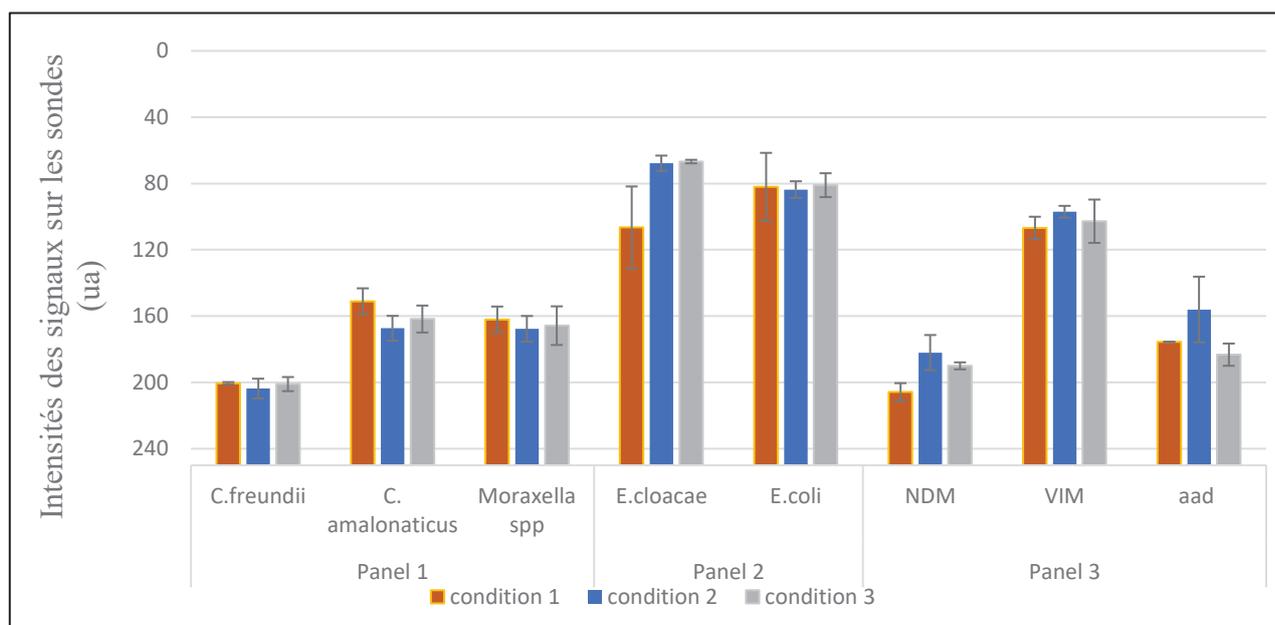


Figure 43 : Impact de l'huile sur l'intensité des signaux détectés sur la biopuce pour les trois panels

Condition 1 : Une PCR réalisée sans huile dans un tube fermé puis déposée sur la biopuce

Condition 2 : Une PCR réalisée avec de l'huile puis déposée avec cette huile sur la biopuce

Condition 3 : Une PCR réalisée avec de l'huile mais déposée sans huile sur la biopuce

Excepté pour les signaux sur les sondes *E. cloacae* et *aad* pour la condition 1, l'intensité des signaux est similaire dans les trois conditions testées. L'absence d'impact de l'huile sur la PCR et l'hybridation sur les sondes des amplicons est vérifiée.

Pour des raisons de faisabilité technique le volume final de PCR a été fixé à 50 μ l avec 20 μ l d'ADN extrait déposé dans la PCR. En effet, la place dans le *Pathodoc* étant limitée, une seule catégorie de cône peut être utilisée pour l'ensemble des protocoles (1000 μ l). Des petits volumes tels que 5 μ l ne pouvait pas être aspiré de manière reproductible avec les cônes de 1000 μ l. Ce volume d'ADN dans la PCR a également été adopté pour la plateforme 1.

Les protocoles ayant été optimisés (concentration finale en amorces, T_m , nombre de cycle de PCR) une méthode d'analyse des résultats peut maintenant être mise en place.

Chapitre 5 : Interprétation analytique des résultats obtenus

1 Résultats obtenus sur les différents panels

Les séquences des sondes et des amorces ont été validées expérimentalement en utilisant des souches de pathogènes ciblés par le test et comportant les gènes de résistance. L'ADN des cibles ayant été collecté et l'optimisation des protocoles étant effectuée, la validation du test et l'analyse des images obtenues après PCR multiplexe et hybridation sur biopuce peuvent être réalisées. Ces étapes sont dans un premier temps effectuées avec l'ADN extrait à partir de souches bactériennes connues, et mises en culture.

Les résultats du panel 2 et du panel 3 seront présentés dans un premier temps, suivis par ceux du panel 1, dont l'interprétation est plus complexe, du fait de la similarité des séquences ciblées.

1.1 Images obtenues sur le panel 2

La **figure 44** présente un exemple de résultats obtenus pour des cibles du panel 2. En plus des signaux attendus sur les sondes en présence des pathogènes ciblés, des signaux sur des sondes non attendues sont parfois observés comme pour *Klebsiella oxytoca*, mais le signal le plus intense reste celui détecté sur la sonde d'intérêt.

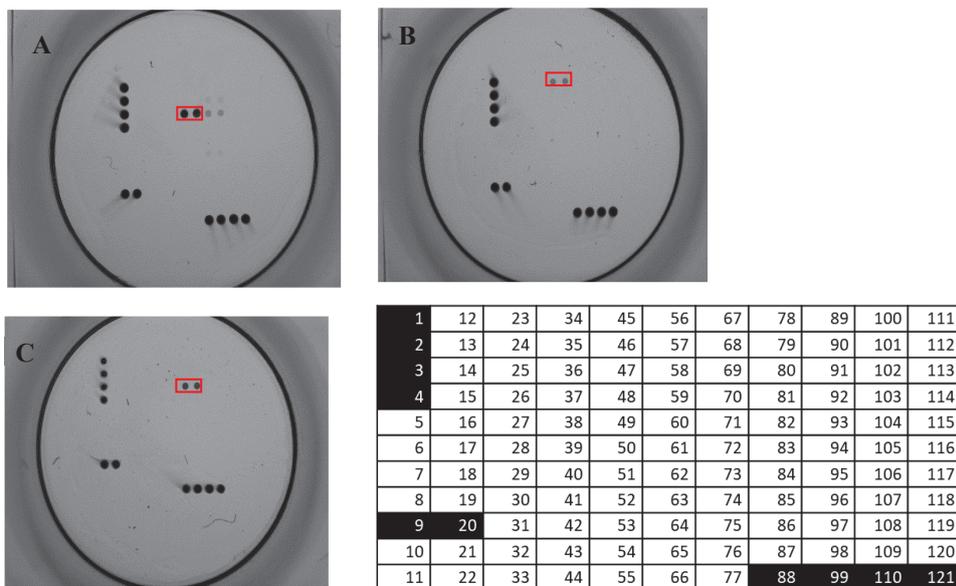


Figure 44 : Exemple de pathogènes présentant des signaux spécifiques sur la biopuce du panel 2

A : *Klebsiella oxytoca* (emplacement 58 et 69), B : *Citrobacter koseri* (emplacement 56 et 67) et C : *Escherichia coli* (emplacement 80 et 91)

Des signaux apparaissent sur des sondes non prévues initialement pour l'identification de ces pathogènes. Ces signaux, appelés par la suite, signaux « non attendus » sont également observés en présence « d'espèces de validation ». La **figure 45** présente un exemple des signaux observés sur la sonde *E.coli*. *Citrobacter farmeri*, *Shigella dysenteriae* et *Cronobacter sakazakii* présentent tous les trois des signaux sur la sonde *E. coli* alors que ce sont des pathogènes non ciblés par le test.

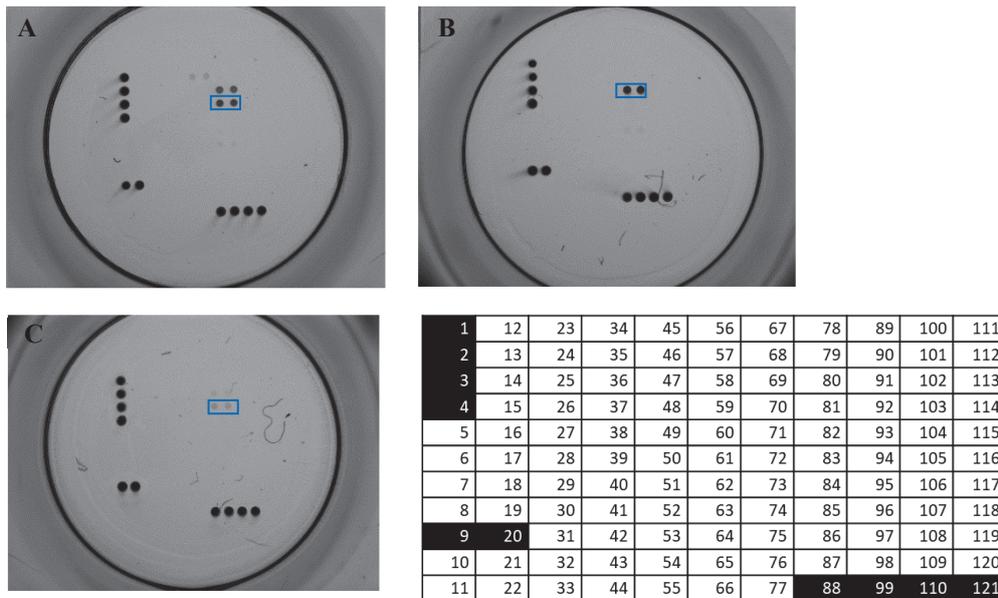


Figure 45 : Observation de signaux non attendus sur la sonde *E. coli* en présence d'espèce de validation : Exemple de *Citrobacter farmeri*, *Shigella dysenteriae* et *Cronobacter sakazakii*
 A : *Citrobacter farmeri* B : *Shigella dysenteriae* et C : *Cronobacter sakazakii*
 En bleu sonde *E. coli* (emplacement 80 et 91).

Lors de la détermination de la spécificité des séquences oligonucléotidiques du panel 2, dans le **chapitre 4**, il a été démontré que les amorces, contrairement aux sondes, ne présentaient pas une spécificité très importante (**tableau 18**). En effet, l'ADN de ces trois espèces de validation peut être amplifié au cours de la PCR multiplexe par certain des couples d'amorces du panel 2. Cependant, en se référant à la spécificité des sondes déterminée pour ce même panel, seul un signal sur la sonde *E. coli* devrait en théorie être observé en présence de *Shigella dysenteriae*.

Afin d'expliquer les signaux non attendus, une hypothèse est émise sur le fait que ces signaux, qui sont détectés sur les sondes, sont dus à une très grande proximité des séquences des amplicons. En effet, le gène codant pour l'ARN 16S présente des zones très conservées et il est possible que la séquence des amplicons de la cible et d'une autre espèce ne diffère que de

quelques nucléotides ce qui permettrait alors aux amplicons des deux pathogènes de s'hybrider sur la sonde. Afin de vérifier cette hypothèse, les différences observables au niveau des séquences nucléotidiques pour les trois espèces citées ci-dessus sont présentées dans le **tableau 21**. Les séquences utilisées pour cette comparaison ne correspondent pas exactement aux séquences des souches utilisées pour ce test mais à des séquences connues de ces pathogènes et obtenues sur la base de donnée NCBI (349).

Une grande proximité des séquences, entre 90% et 100%, est observée avec parfois un seul nucléotide de différences entre la séquence de l'amplicon et la séquence de la sonde. Cependant, le nombre de différence au niveau des séquences ne permet pas à lui seul d'expliquer l'observation des signaux. En effet, un signal est observé sur la sonde *E. cloacae* en présence d'ADN de *Cronobacter sakazakii* présentant quatre différences au niveau des séquences oligonucléotidiques alors qu'aucun signal n'est détecté sur la même sonde en présence d'ADN de *Shigella dysenteriae* bien que seulement deux différences entre les séquences soient observées. D'autres paramètres influençant l'apparition de signaux sur les sondes seront explicités plus loin dans ce chapitre.

Tableau 21: Différences au niveau des séquences oligonucléotidiques entre l'amplicon théorique et la séquence des sondes : Exemple pour *Citrobacter farmeri*, *Shigella dysenteriae* et *Cronobacter sakazakii*

En bleu, signaux détectés sur les sondes *E. coli*, *C.koseri* et *E. cloacae* pour chacun des trois pathogènes de validation. La séquence de la sonde est indiquée en premier puis celle de l'amplicon. Seules les différences sont mises en évidence.

Pathogène / Sonde	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Citrobacter farmeri</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>
<i>E. coli</i>	----- -----	-----T-----C--- -----G-----T---	T-C--G-----A--- C--T--T-----C---
<i>C. koseri</i>	-----T----- -----C-----	-----A----- -----G-----	-----T-A----- -----C-G-----
<i>E. cloacae</i>	G----T----- C----A-----	G--A----- C--T-----	----T---A-----C--- ----G---C-----A---

1.2 Images obtenues sur le panel 3

1.2.1 Signaux spécifiques observés sur les sondes du panel 3

Les sondes du panel 3 présentent des signaux spécifiques observables sur la biopuce. Jusqu'à huit cibles peuvent être identifiées de façon simultanée, comme présenté dans l'isolat clinique C de la **figure 46**.

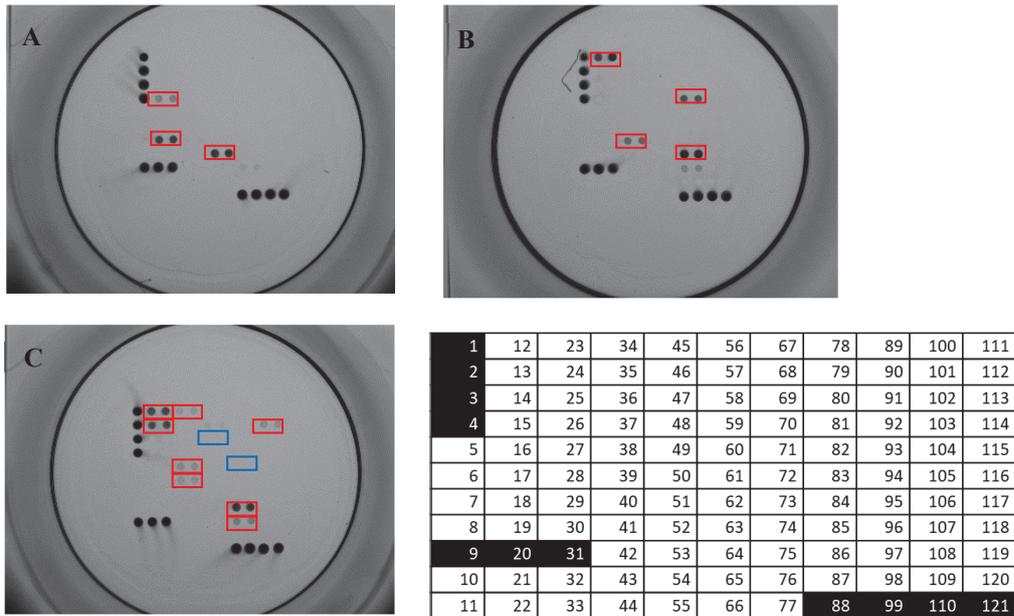


Figure 46: Exemple de détection des cibles du panel 3 avec des pathogènes contenant un nombre variable de gènes de résistance

A : Pathogène contenant les gènes de résistance aux antibiotiques *blaccrA* (emplacement 15 et 26), *ermF* (emplacement 18 et 29) et *TetQ* (emplacement 52 et 63), B : Pathogène contenant les gènes de résistance aux antibiotiques *aac(6')-Ib* (emplacement 12 et 23), *qnrS* (emplacement 40 et 51), *blaSHV* (emplacement 81 et 92) et *blaVim* (emplacement 85 et 96) (et C : Pathogène contenant les gènes de résistance aux antibiotiques *aac(6')-Ib* (emplacement 12 et 23), *aad* (emplacement 13 et 24), *CTX-M-1* (emplacement 34 et 45), *qnrA* (emplacement 38 et 49), *qnrB* (emplacement 39 et 50), *blaVIM* (emplacement 85 et 96), *blaNDM* (emplacement 86 et 97) et *OXA-10* (emplacement 101 et 112) et cible non détectées : *blaCMY* (emplacement 58 et 69) et *blaTEM* (emplacement 82 et 93).

1.2.2 Apparition de signaux non attendus avec l'augmentation de la concentration finale de certains couples d'amorces de PCR

Des signaux non attendus sur des sondes ont été détectés lors de l'ajustement de la concentration de certaines amorces dans le mix et également lors de l'augmentation du nombre de cycles, au cours de l'étape d'optimisation de la PCR multiplexe du panel 3 comme mentionné dans le **chapitre 4**. D'autre part, en utilisant l'*AXObot*, un signal est observé sur la sonde NDM uniquement, alors qu'avec le *Pathodoc*, les signaux sont plus nombreux et sont visibles quelquefois sur les sondes OXA-1, NDM mais majoritairement sur la sonde TEM. Ces signaux ne sont pas observés de manière reproductible pour un même pathogène ou pour une même souche.

Concernant les signaux observés sur la sonde TEM, la présence du gène de résistance *blaTEM* au sein des souches a été vérifiée sur gel d'agarose et des bandes d'intensités très

faibles ont été observées pour quelques souches. Un doute est émis sur la présence de cette résistance d'autant plus qu'un signal sur la sonde TEM a été observé uniquement avec la plateforme *Pathodoc* (pour quelques expérimentations réalisées avec l'ADN de ces mêmes souches) et après ajustement de la concentration finale de différentes amorces. Il est possible que la quantité d'ADN soit trop faible pour être amplifiée et détectée par le test.

La différence d'intensité de ces signaux entre les deux plateformes (*AXObot* et *Pathodoc*) peut s'expliquer par la différence dans le système de chauffage de la biopuce, lors du protocole d'hybridation. En effet, les plateformes peuvent contenir un système de chauffage, chauffant la biopuce par le dessous (comme une plaque de cuisson) ou chauffant la biopuce dans un environnement confiné (comme dans un four). La mesure des températures et le refroidissement des biopuces et donc légèrement différent et pourrait expliquer les différences observées au niveau des signaux non attendus sur les sondes

Il est également possible que les signaux observés proviennent de la composition du mix de la Taq polymérase. En effet, lors de sa production, l'ADN polymérase est souvent exprimée comme une protéine recombinante chez *Escherichia coli* et le gène *blaTEM-1* est le marqueur sélectif le plus couramment utilisé pour les vecteurs d'expression (359). La purification de l'enzyme peut parfois être incomplète et des traces de ce gène de résistance peuvent être trouvées. Par exemple, Tenover et al. ont utilisés une enzyme Taq polymérase dont le vecteur d'expression utilisé pour la synthèse comportait le gène de résistance *blaTEM* et ils ont remarqué qu'en changeant d'enzyme, ils éliminaient les faux positifs obtenus en cherchant à détecter cette cible dans des échantillons de patients (360).

Ainsi, suite à l'optimisation du test et aux modifications apportées à l'étape de PCR, il est possible que des traces du gène de résistance *blaTEM* soient présentes dans le mix de la polymérase et que l'augmentation de la quantité d'amorces et du nombre de cycle ait permis la synthèse d'un nombre suffisamment grand de copies pour qu'elles soient détectables sur gel d'agarose et sur biopuce. La non répliquabilité de l'observation des signaux sur la sonde TEM sur la biopuce est peut-être due à la variabilité de la quantité du gène *blaTEM* au sein du mix de PCR couplé à la sensibilité de détection du test.

Pour le gène *blaNDM*, des signaux ont parfois été observés sur cette sonde en présence d'échantillons mais également lors de contrôles négatif (sur de l'eau grade biologie

moléculaire). Ces signaux sont apparus au moment de l'augmentation du nombre de cycles de la PCR à 45 cycles et de l'optimisation de la concentration en amorces du mix d'amorces du panel 3. Afin de vérifier si ces signaux proviennent de l'amplification de fragment non attendus, un gel d'électrophorèse a donc été réalisé sur des contrôles négatifs. La **figure 47** présente une comparaison des gels d'électrophorèse (réalisé avec le Bioanalyzer 2100 d'Agilent) sur l'ancien et le nouveau mix d'amorces pour le panel 3.

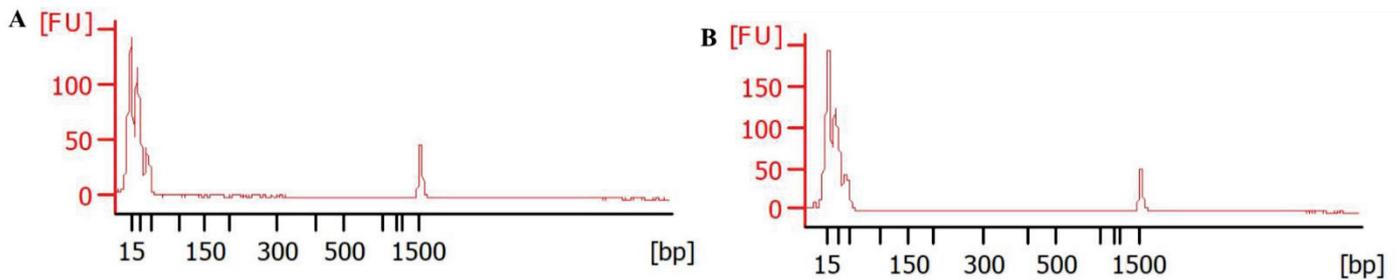


Figure 47 : Electrophérogramme obtenu sur le Bioanalyzer 2100 d'Agilent et permettant de comparer un échantillon négatif amplifié avec l'ancien (A) et le nouveau mix d'amorces (B) dont la concentration finale en amorces est supérieure

Le pic observé autour de 15pb correspond aux amorces présentes dans le mix de PCR

Une augmentation du pic de 150 à 200 FU localisée autour de 15 pb, et qui traduit l'augmentation du nombre d'amorces dans la PCR, est bien observée dans le nouveau mix d'amorces. Cependant aucune amplification d'un fragment non attendu n'est observée qui permettrait d'expliquer les signaux observés sur la biopuce. Plusieurs phénomènes expliqués un peu plus loin dans ce chapitre peuvent permettre d'expliquer l'observation de signaux sur les sondes.

1.3 Images obtenues sur le panel 1

Les images obtenues sur le panel 1 peuvent être classées en trois catégories.

1.3.1 Classement des images obtenues en trois catégories

Certains pathogènes comme ceux présentés dans la **figure 48** présentent des signaux spécifiques observables sur la biopuce.

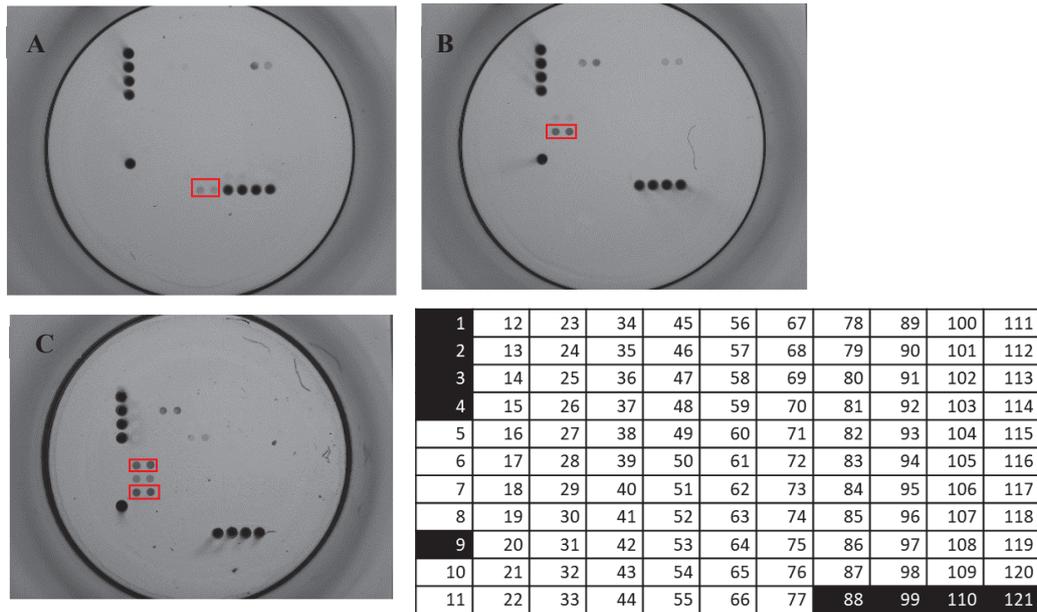


Figure 48 : Exemple de pathogènes présentant des signaux spécifiques sur la biopuce
 A : *Vibrio cholerae* (emplacement 66 et 77), B : *Prevotella melanogenica* (emplacement 18 et 29) et C : *Bacteroides fragilis* (sonde *Bacteroides spp.* : (emplacement 19 et 30) et sonde *Bacteroides fragilis* (emplacement 17 et 28)

D'autres pathogènes comme ceux présentés dans la **figure 49** présentent un nombre de signaux observables sur la biopuce plus important, que ce soient des signaux attendus ou des signaux non-attendus.

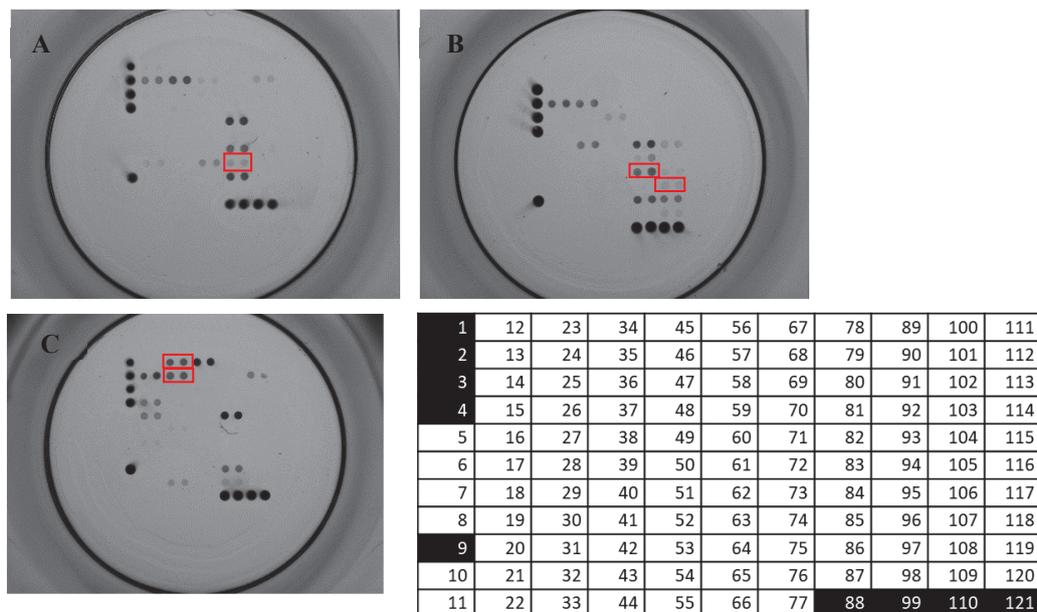


Figure 49: Exemple de pathogènes présentant un nombre de signaux plus important que prévu sur la biopuce
 A : *Saphylococcus aureus* (emplacement 85 et 96), B : *Streptococcus mitis* (sonde *Streptococcus spp.* : (emplacement 84 et 95) et sonde *Streptococcus mitis* (emplacement 107 et 118)) et C : *Pseudomonas*

aeruginosa (sonde *Pseudomonas aeruginosa* (emplacement 34 et 45) et sonde *Pseudomonas spp.* (emplacement 35 et 46).

Et finalement, pour la dernière catégorie de pathogènes comme ceux présentés dans la **figure 50**, le nombre de signaux observables (spécifiques et non-attendus) sur la biopuce est très important.

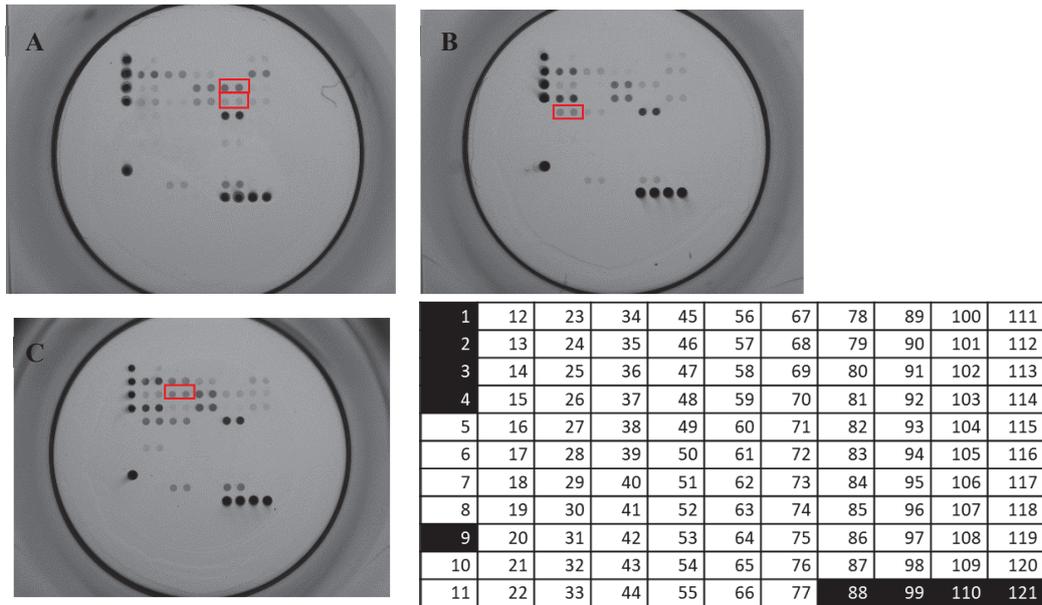


Figure 50 : Exemple de pathogènes présentant un très grand nombre de signaux sur la biopuce

A : *Proteus mirabilis* (sonde *Proteus spp.* (emplacement 80 et 91) et sonde *Proteus mirabilis* (emplacement 81 et 92), B : *Citrobacter freundii* (emplacement 16 et 27) et C : *Escherichia coli* (emplacement 36 et 47)

Dans ce dernier cas, les pathogènes testés présentent, en plus des signaux attendus sur la sonde permettant l'identification spécifique du pathogène, un nombre variés de signaux sur plusieurs sondes. Les signaux observés sur les différentes sondes ne semblent pas dépendre du couple d'amorce permettant d'amplifier l'amplicon se fixant sur la sonde mais plutôt de l'ordre auquel appartiennent les pathogènes. En effet, les pathogènes pour lesquels un très grand nombre de signaux sont observés sur la biopuce appartiennent à l'ordre des *Enterobacteriales* alors que les pathogènes pour lesquels les signaux observés sont quasi spécifique appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales* (*Mycobacterium spp.* et *Propionibacterium acnes*) ou des *Bacteroidales* (*Prevotella spp.* et *Bacteroides spp.*).

1.3.2 Comparaison des signaux sur la biopuce entre espèces cibles et espèces de validation : Exemple de *Pseudomonas aeruginosa*

La **figure 51** présente les signaux observés sur la biopuce pour deux espèces de validation *Pseudomonas stutzeri* et *Pseudomonas fluorescens* qui sont très proches génétiquement de *Pseudomonas aeruginosa*.

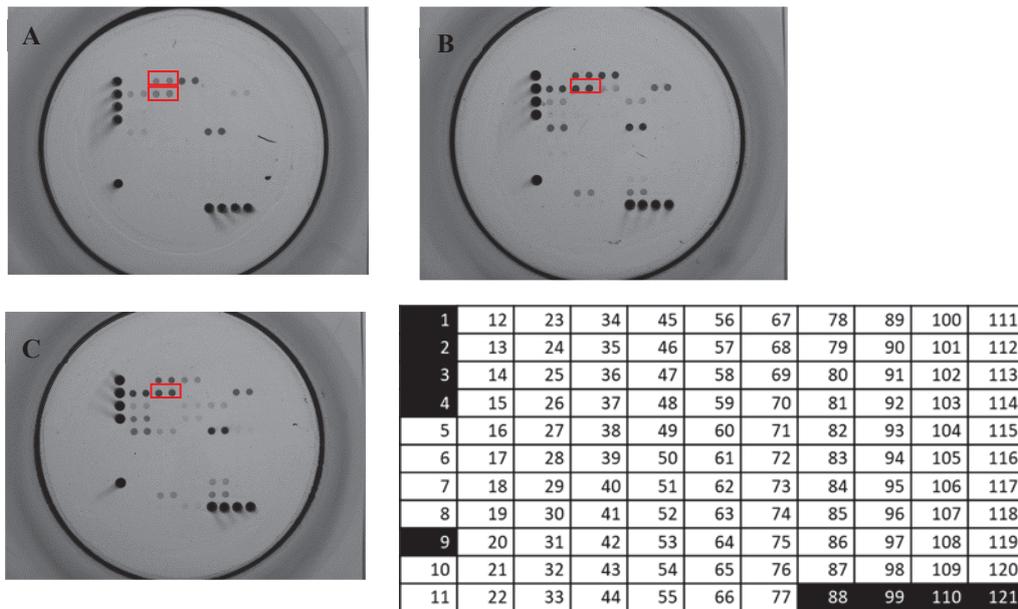


Figure 51 : Comparaison des signaux sur les sondes entre bactéries cibles et espèces de validation : Exemple de *Pseudomonas aeruginosa*

A : *Pseudomonas aeruginosa*, B : *Pseudomonas stutzeri* et C : *Pseudomonas fluorescens*. Sonde *Pseudomonas aeruginosa* (emplacement 34 et 45) et sonde *Pseudomonas* spp. (emplacement 35 et 46).

Pseudomonas stutzeri et *Pseudomonas fluorescens* présentent tous les deux des signaux sur les sondes *Pseudomonas* spp., ce qui est un résultat attendu mais aussi sur la sonde *P. aeruginosa*, ce qui est un signal « non attendu ». De plus, l'intensité et la répartition sur les sondes sont très proches entre les trois pathogènes. Il semble donc, au vu de ces observations, que la distinction entre espèces cibles et espèces de validation soit difficile sans une méthode d'analyse performante des résultats.

1.3.3 Proximité des séquences oligonucléotidiques entre les sondes et l'amplicon

Comme pour le panel 2, les nombreux signaux non-attendus qui sont parfois observés sur les sondes semblent être dus à une très grande proximité des séquences oligonucléotidiques entre les amplicons issus de la PCR et l'amplicon spécifique devant s'hybrider sur la sonde.

Les signaux observables sur des biopuces analysées avec l'*AXO*bot ainsi que les différences entre la séquence de l'amplicon de *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 13437 et la séquence des sondes sont présentés dans le **tableau 22**. Les signaux observables indiqués dans ce tableau représentent une moyenne des résultats obtenus pour ce pathogène au cours des différentes expérimentations réalisées. Par exemple, l'observation d'un signal sur la sonde *L. monocytogenes* (en vert) n'est pas constante et varie selon les différentes expérimentations. L'observation de ce signal dépend généralement de la quantité d'ADN utilisée lors de la PCR.

Après analyse des séquences présentes dans le **tableau 22**, différentes observations peuvent être effectuées pour *Pseudomonas aeruginosa*. Dans un premier temps, l'hybridation d'un amplicon sur les sondes *S. maltophilia*, *Moraxella spp.* et *Clostridium spp.* est surprenante car le segment s'hybridant sur les sondes ne devraient pas être amplifié.

Un amplicon présentant des nucléotides différents par rapport à la séquence de la sonde peut donc s'hybrider sur celle-ci et entraîner l'apparition d'un signal détectable sur la biopuce. L'impact d'un mésappariement au niveau des amorces varie fortement selon sa position, et les bases impliquées. En effet, un mésappariement se trouvant près de l'extrémité 5' présente des effets qui sont beaucoup moins préjudiciables qu'un mésappariement à l'extrémité 3' qui impacte le lieu de fixation de la polymérase. Un mésappariement de type pyrimidine-pyrimidine et impliquant les bases cytosine et thymine (C-T) présente un impact selon Stadhouders et al. qui est intermédiaire par rapport à un mésappariement de type purine-purine et purine pyrimidine, mais dépendant de l'enzyme utilisée (361).

Tableau 22 : Proximité des séquences oligonucléotides et signaux sur les sondes. Exemple pour *Pseudomonas aeruginosa* souche NCTC 13437

En bleu, signaux constamment observables sur la biopuce et en vert signaux dont l'observation sur la biopuce varie selon les conditions expérimentales. Seules les séquences présentant jusqu'à 5 différences maximum sont indiquées. Pour les cases restées blanches, aucun signal sur les sondes n'est observé. La séquence de la sonde est indiquée en premier puis celle de l'amplicon.

Pathogène Sondes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Localisation (5'-3')
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-
<i>Bacteroides spp.</i>	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	2 différences	-----G-----G -----A-----A
<i>Citrobacter koseri</i>	-	-
<i>Clostridium butyricum</i>	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-
<i>Clostridium spp.</i>	2 différences	-----A-A----- -----G-C-----
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-
<i>Enterococcus spp.</i>	-	-

<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Fusobacterium spp.</i>	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 différences	-----T-C-CA---A -----A-A-GG---C
<i>Legionella pneumophila</i>	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	4 différences	-----ATA-----C-- -----TCG-----T--
<i>Moraxella spp.</i>	2 différences	-----G--T -----T—C
<i>Morganella morganii</i>	-	-
<i>Mycobacterium avium</i>	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	5 différences	---A-----T-----TTG--- ---G-----C-----CCA---
<i>Prevotella spp.</i>	3 différences	-----G-----T-C----- -----C-----C-T-----
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-
<i>Proteus spp.</i>	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 différences	
<i>Pseudomonas spp.</i>	0 différences	
<i>S.dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2 différences	-----TC----- -----CT-----
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-
<i>Streptococcus mitis</i>	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-
<i>Streptococcus sanguinis</i>	-	-
<i>Streptococcus spp.</i>	-	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-
<i>Yersinia enterocolitica 1</i>	-	-
<i>Yersinia enterocolitica 2</i>	-	-

Un signal est observable sur les sondes jusqu'à cinq différences entre la séquence de la sonde et celle de l'amplicon. Cependant, le nombre de différences ne garantit pas l'observation d'un signal sur la biopuce. En effet, les signaux sur les sondes *K. pneumoniae* et *P. shigelloides* qui comportent cinq différences au niveau des séquences avec l'amplicon sont observés de façon constante dans les différentes conditions, contrairement aux signaux observables sur la sonde *L. monocytogenes*, sonde qui présente moins de différences au niveau des séquences par rapport à celle de l'amplicon. De même, aucun signal n'est détecté sur la sonde *Prevotella spp.* alors que seulement trois différences sont observées entre les séquences.

L'hypothèse que le nombre de différences ne garantit pas l'observation d'un signal est renforcée par le fait que des signaux sont observés sur plusieurs sondes qui présentent deux différences au niveau de leurs séquences par rapport à celle de l'amplicon mais l'intensité de ces signaux est différente. Un exemple d'image d'une biopuce obtenue après l'hybridation d'amplicons issus de la souche NCTC 13437 de *Pseudomonas aeruginosa* est présenté **figure 51**. Un signal faible (entre 135 et 150 ua) est visible sur la sonde *C. freundii* (emplacement 16 et 27). Le signal visible sur la sonde *S. maltophilia* (emplacement 56 et 67) qui possède, comme la sonde *C. freundii*, deux différences au niveau des séquences oligonucléotidiques, est quant à lui le signal le plus intense parmi ceux observés sur les 50 sondes.

Cependant, les observations réalisées pour le pathogène *Pseudomonas aeruginosa* ci-dessus s'appliquent uniquement à la souche NCTC 13437. La souche M7298, autre souche de *Pseudomonas aeruginosa*, (souche clinique dont le séquençage indique une correspondance avec la souche DSM 50071), possède en plus des signaux observés précédemment, un signal constant sur les sondes *C. amalonaticus* et *Prevotella spp.*, or aucune différence au niveau de la séquence du fragment s'hybridant sur ces deux sondes n'a été observée entre la séquence ADN de la souche NCTC 13437 et la souche DSM 50071.

Les signaux observés sur les sondes ainsi que leurs intensités ne dépendent donc pas uniquement du nombre de différences observées entre les séquences mais également de la nature de la sonde et de son environnement.

1.4 Caractéristiques des sondes conditionnant l'observation des signaux

Il est difficile de prévoir totalement les conditions de fixation d'un amplicon sur les sondes fixées sur une surface solide comme dans le cas des biopuces à ADN (362). Des séquences non ciblées peuvent s'hybrider avec la sonde si ces dernières contiennent une région très similaire à une portion de la sonde.

Wu et al. ont montré que pour une sonde de 25-mers, les hybridations croisées peuvent être causées par des fragments complémentaires à la sonde d'une longueur minimum de 10 à 16-mers soit au minimum 40% de la longueur de la sonde (363). D'autres paramètres tels que le pourcentage en nucléotide G et C de la sonde, la formation de structures secondaires, la

localisation des mésappariements et la présence de séquences ou d'un même nucléotide répétés peuvent aussi affecter la spécificité des sondes.

Matveeva et al. proposent d'exclure les sondes présentant un nombre de guanine trop important (>8 pour des sondes 25mers) ou une série successive de trois guanines ainsi que les sondes présentant une enthalpie libre (ΔG) supérieure ou égale à -26 kcal/mol et un ΔG inférieur ou égal à -2 kcal/mol pour la formation des structures secondaires (364). En effet, la formation de structures secondaires au sein de l'amplicon peut également impacter négativement l'hybridation de l'amplicon sur la sonde est donc l'intensité des signaux.

Cependant, malgré de nombreux moyens de calcul, il est difficile de prévoir exactement la formation des structures secondaires dans le contexte d'une hybridation sur biopuces car d'autres facteurs comme la densité des sondes en fond de puits et la composition de la surface des biopuces peuvent également avoir un impact (365).

Les amplicons qui s'hybrident sur les sondes sont ici d'une taille plus importante que les sondes, c'est-à-dire autour de 300 nucléotides pour les amplicons par rapport à 25 nucléotides de moyenne pour les sondes. L'hybridation de ces fragments d'ADN sur les sondes peut entraîner un encombrement stérique où les « queues » des amplicons hybridés peuvent pénaliser la fixation d'autres amplicons sur les sondes avoisinantes au sein du même dépôt et donc impacter l'intensité des signaux (**figure 52**). Cet effet est d'autant plus fort que la densité des sondes est élevée (366). Cet effet peut également être accentué avec l'utilisation du gène codant pour l'ARN 16S où les régions conservées de ce gène sont généralement utilisées et dues à la très grande proximité des séquences, plus d'interactions avec l'environnement sont possibles (367).

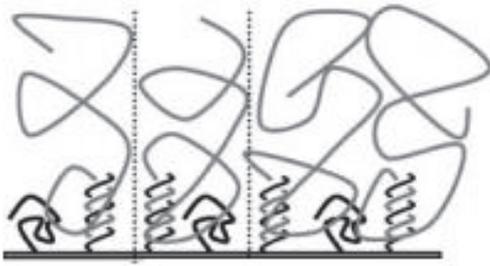


Figure 52 : Emcombrement stérique tel que présenté par Halperin et al (366).

Les amplicons en gris se fixent sur les sondes en noir et la queue des amplicons crée un encombrement stérique sur les sondes situées à proximité. Sur ce schéma, la séquence de l'amplicon s'hybridant sur les sondes se situe à une extrémité de celui-ci.

La vérification des conditions proposées par Matveeva et al. ainsi que Wu et al. sur les sondes présentant des signaux pour la souche NCTC13437 de *Pseudomonas aeruginosa* (tableau 23) a permis d'identifier au moins un critère d'exclusion pour chacune des sondes pouvant expliquer la détection de ces signaux non attendus.

Tableau 23 : Vérification des critères d'exclusions émis par Matveeva et al. ainsi que Wu et al. sur les sondes sur lesquelles des signaux sont observés pour *Pseudomonas aeruginosa*

Sondes \ Critères	Plus de 8 Guanine	Motif GGG	DeltaG supérieur ou égale à - 26 kcal/mol	DeltaG inférieur ou égale à - 2 kcal/mol	Longueur du fragment s'hybridant sur la sonde >40%
<i>C. freundii</i>	Non	Oui	Non	Non	Oui
<i>Clostridium spp.</i>	Non	Non	Non	Non	Oui
<i>K. pneumoniae</i>	Oui	Non	Non	Non	Oui
<i>L. monocytogenes</i>	Oui	Oui	Non	Non	Non
<i>Moraxella spp.</i>	Non	Non	Non	Non	Oui
<i>P. shigelloides</i>	Non	Non	Non	Non	Oui
<i>P. aeruginosa</i>	Oui	Oui	Non	Non	Oui
<i>Pseudomonas spp.</i>	Oui	Non	Non	Non	Oui
<i>S. maltophilia</i>	Non	Non	Non	Non	Oui

Aucune des sondes présentées dans ce tableau ne vérifie les critères concernant d'enthalpie libre proposés par Mateeva et al.. Cependant ces résultats pourraient aussi être corrélés au fait que le logiciel utilisé pour la détermination de l'enthalpie libre, c'est-à-dire celui développé par IDT (312), n'utilise peut être pas la même méthode de calcul que Matveeva et

al.. Cependant, les sondes vérifient au moins un des deux autres critères évoqués (plus de 8 Guanines ou une longueur de fragments supérieur à 40%), ce qui pourrait expliquer les signaux non attendus observés.

1.5 Contrôles négatifs pour les panels 1 et 2

Les enzymes ADN polymérases utilisées dans les kits de PCR contiennent souvent des contaminants, comme par exemple, de l'ADN issu de l'organisme hôte ayant servi à sa production comme des plasmides (368) ou des phages (369,370). La polymérase Taq, contiendrait autour de 10^2 équivalents génomiques d'ADN bactérien par unité d'enzyme (371).

Cela pourrait avoir un impact négatif sur le rendu des résultats, avec l'apparition de faux positifs, en cas d'étude de sensibilité et de détection de très faibles quantités d'ADN, mais également, dans le cas de PCR avec des amorces dites 'universelles' comme dans le cas du gène codant pour l'ARN 16S utilisé pour ce test (372).

Contrairement au panel 3, où des signaux peuvent être observés sur des sondes pour les contrôles négatifs, aucun signal n'est visible pour les contrôles négatifs réalisés sur les panels 1 et 2 et dont les images des biopuces obtenues pour le *Pathodoc* sont présentées **figure 53**. Aucun signal pour les contrôles négatifs n'a été détecté sur les biopuces que cela soit lors des étapes d'optimisation du test et en présence d'ADN issu des souches ou d'échantillons artificiellement contaminés.

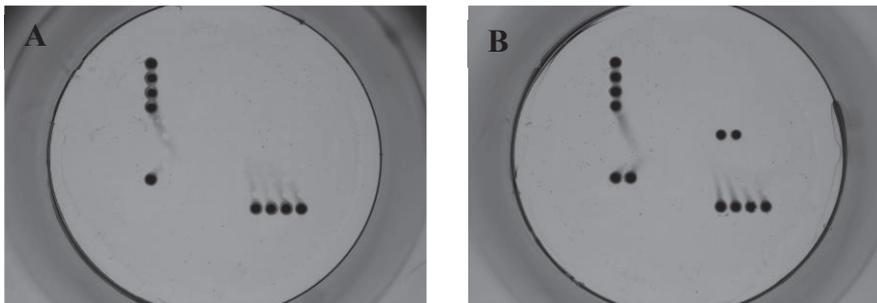


Figure 53 : Images correspondant à l'analyse d'un échantillon de sang dont le diagnostic est négatif (contrôles négatifs) sur les panels 1 (A) et 2 (B) pour le *Pathodoc*. Le signal observé sur le panel 2 correspond au contrôle d'extraction

2 Mise en place d'une méthode d'analyse des résultats obtenus avec les trois panels

Afin de pouvoir proposer un résultat qui pourra être utilisé par les cliniciens, les outils de diagnostic automatisés doivent être associés à un système d'analyse de résultats performant et fiable. Au vu des résultats présentés précédemment, où la présence de signaux inattendus a été observée pour les trois panels, un système d'analyse complexe a dû être mis en place pour le test développé ici.

La méthode d'analyse mise en place sera différente selon les panels.

2.1 Mise en place d'un système de seuils pour les panels 2 et 3

Une méthode impliquant le développement de seuils d'intensités sur les sondes a été développée pour l'analyse des panels 2 et 3.

2.1.1 Détermination des seuils pour le panel 2

Les seuils sur le panel 2 ont été définis afin de distinguer un signal significatif sur la sonde de l'espèce correspondante, d'un signal issu d'une autre cible ou d'une espèce de validation.

En effet, comme observé sur des images de biopuces du panel 2 présentées dans les **figures 44 et 45**, des signaux sur la sonde *d'E. coli* sont également observés en présence d'ADN provenant d'espèces de validation comme *Citrobacter farmeri*, *Shigella dysenteriae* et *Cronobacter sakazakii* mais aussi d'autres cibles du projet comme *Klebsiella oxytoca*.

La **figure 54** présente la répartition des valeurs des intensités détectées sur la sonde *E. coli* dans le cas de contrôles négatifs (en bleu), en présence d'autres organismes qu'*Escherichia coli* (en rouge ou en présence d'*Escherichia coli* (en vert). Pour rappel les intensités sont exprimées en unité arbitraire (ua) sur une échelle de valeur inversée. Le signal le plus intense a une valeur de 0 ua tandis que le signal le plus faible a une valeur de 255 ua.

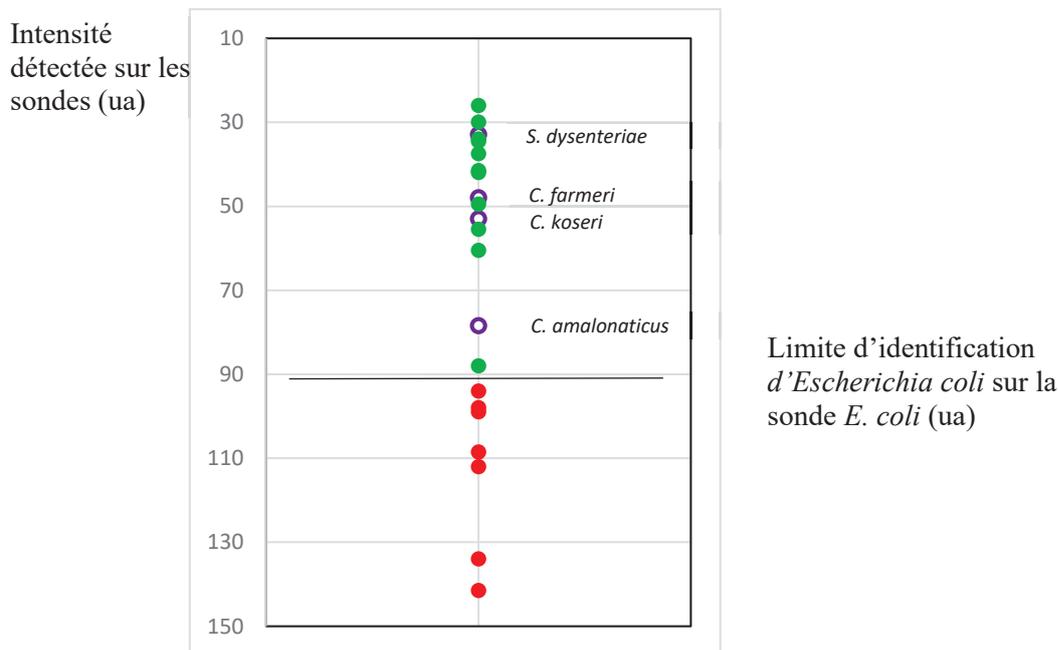


Figure 54 : Détermination des seuils du panel 2 : Exemple d'*Escherichia coli*

En rouge : Intensités obtenues sur la sonde *E. coli* pour d'autres bactéries qu'*Escherichia coli* et en vert : Intensités obtenues sur la sonde *E. coli* pour des souches d'*Escherichia coli*. En contour violet : Intensités détectées sur la sonde *E. coli* pour des pathogènes autres qu'*Escherichia coli* qui sont inférieurs au seuil instauré pour l'identification d'*Escherichia coli*.

Comme présenté dans la **figure 54**, des signaux sur la sonde *E. coli* dont l'intensité est supérieure à 90 ua sont observés pour *Escherichia coli* tandis que pour les autres pathogènes, des signaux majoritairement inférieurs à 92 ua (80% des cas présentés ici) sont observés. Un potentiel seuil d'identification d'une valeur de 91 ua pourrait alors être établi pour l'identification d'*Escherichia coli*, pour le panel 2. Cependant, l'instauration de ce seuil n'est pas suffisante pour distinguer totalement *Escherichia coli* des autres espèces. En effet, dans quatre conditions, les intensités détectées sur la sonde *E. coli* se trouvent au-dessus de ce potentiel seuil, entraînant alors des faux positifs. Ces quatre cas correspondent sur la **figure 54**, à deux intensités détectées sur d'autres cibles *Citrobacter amalonaticus* et *Citrobacter koseri* ainsi que deux espèces de validation *Citrobacter farmeri* et *Shigella dysenteriae*.

Les trois pathogènes du genre de *Citrobacter spp.* possèdent en plus du signal observé sur la sonde *E. coli*, un signal sur la sonde *E. cloacae*. Un système de double seuil est alors mis en place pour l'identification du pathogène *Escherichia coli* : Un signal inférieur à 91 ua sur la

sonde *E. coli* et un signal supérieur à 140 ua sur la sonde *E. cloacae* sont les conditions requises pour pouvoir identifier un pathogène détecté sur le panel 2 comme étant *Escherichia coli* (**figure 55**).

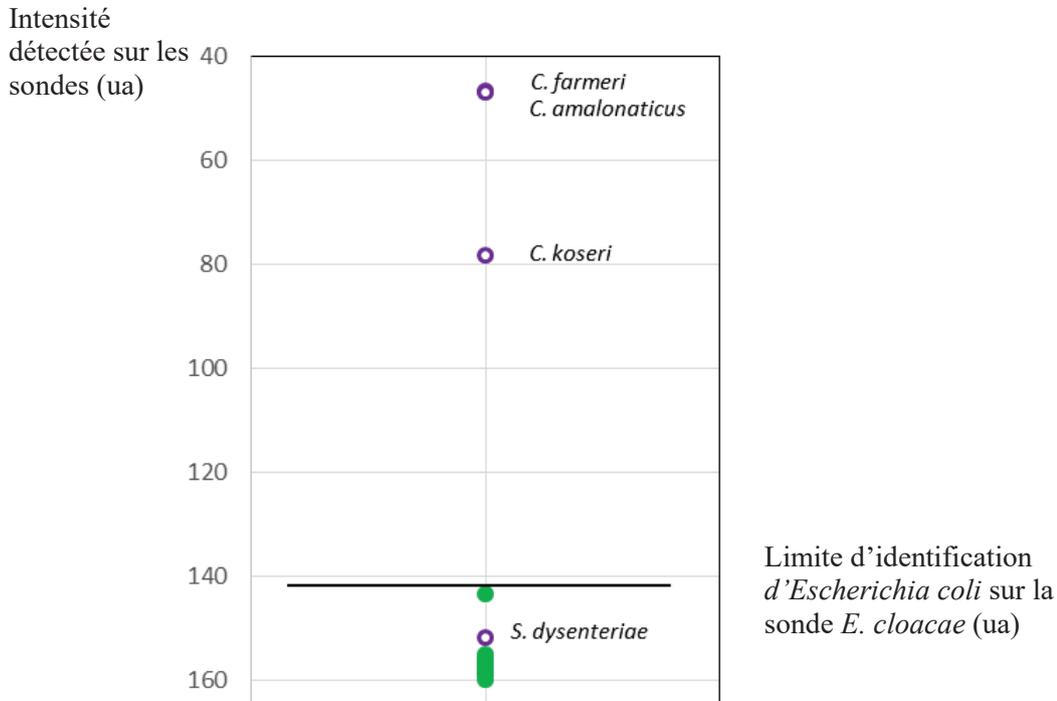


Figure 55 : Détermination d'un seuil d'intensité sur la sonde *E. cloacae* pour l'identification d'*Escherichia coli*

En vert intensités sur la sonde *E. cloacae* des échantillons d'*Escherichia coli*. En contour violet, les quatre cas où l'intensité sur la sonde *E. coli* est inférieure à 91 ua alors que ce n'est pas une *Escherichia coli*. L'échantillon appartenant au genre *Shigella spp.* présente une intensité supérieure à 140 ua

Pour *Shigella dysenteriae* et plus généralement pour les espèces appartenant au genre *Shigella spp.*, un signal sur la sonde *E. coli* supérieur au seuil fixé est observé. Il n'est donc pas possible de distinguer *Escherichia coli* de *Shigella spp.* grâce à ce panel 2 seulement. Les seuils pour les autres cibles du panel 2 ont été fixés de façon similaire (**figure 56**). L'intensité des seuils varient fortement selon les cibles (entre 46 et 153 ua). Pour 5 pathogènes, *Salmonella enterica subsp enterica sv typhi*, *Citrobacter amalonaticus*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophila* et *Sphingomonas paucimobilis*, les seuils ont été fixés afin de ne pas détecter de faux positifs, mais aucun signal positif sur les sondes n'a été observé. Comme pour *Shigella spp.*, il n'est pas possible de distinguer des espèces de la famille *Enterobacter cloacae complexe*

d'*Enterobacter cloacae* dans 100% des cas, même avec un système de double seuil qui a aussi été instauré pour *Enterobacter cloacae*.

La distinction devra donc s'effectuer par le biais du premier panel focalisé sur le gène codant pour l'ARN 16S. Les observations précédentes ont été réalisées grâce à l'*AXObot* (plateforme 1). Pour le *Pathodoc*, les observations quant à *Shigella spp.* et *Enterobacter cloacae* sont similaires. Cependant les seuils établis pour le panel 2 diffèrent selon les deux plateformes (*Pathodoc* et *AXObot*), (**tableau 24**).

Tableau 24 : Seuils de détection déterminés pour le panel 2 pour les deux plateformes (*AXObot* et *Pathodoc*)

	<i>AXObot</i>	<i>Pathodoc</i>
<i>A. hydrophila</i>	152	147
<i>B. cepacia</i>	153	145
<i>C. amalonaticus</i>	152	146
<i>C. freundii</i>	49	113
<i>C. koseri</i>	140	145
<i>E. aerogenes</i>	153	144
<i>E. cloacae</i>	49 et <i>E. coli</i> > 144	75 et <i>E. coli</i> > 144
<i>E. coli</i>	91 et <i>E. cloacae</i> > 140	90 et <i>E. cloacae</i> > 147
<i>K. oxytoca</i>	77	120
<i>K. pneumoniae</i>	153	110
<i>P. vulgaris</i>	153	145
<i>S. paucimobilis</i>	151	146
<i>S. typhi</i>	153	147

L'intensité des seuils est ajustée si nécessaire au fur et à mesure de l'acquisition de nouvelles données. La différence majeure entre les deux plateformes se situe au niveau du seuil de la sonde *K. pneumoniae*. En effet, les signaux positifs de la cible sont souvent compris autour de 140 à 150 ua pour l'*AXObot* alors qu'ils sont compris entre 50 et 100 ua pour le *Pathodoc*. Les performances de détection des cibles du panel 2, suite à l'instauration des seuils de détection seront présentées dans le **chapitre 6**.

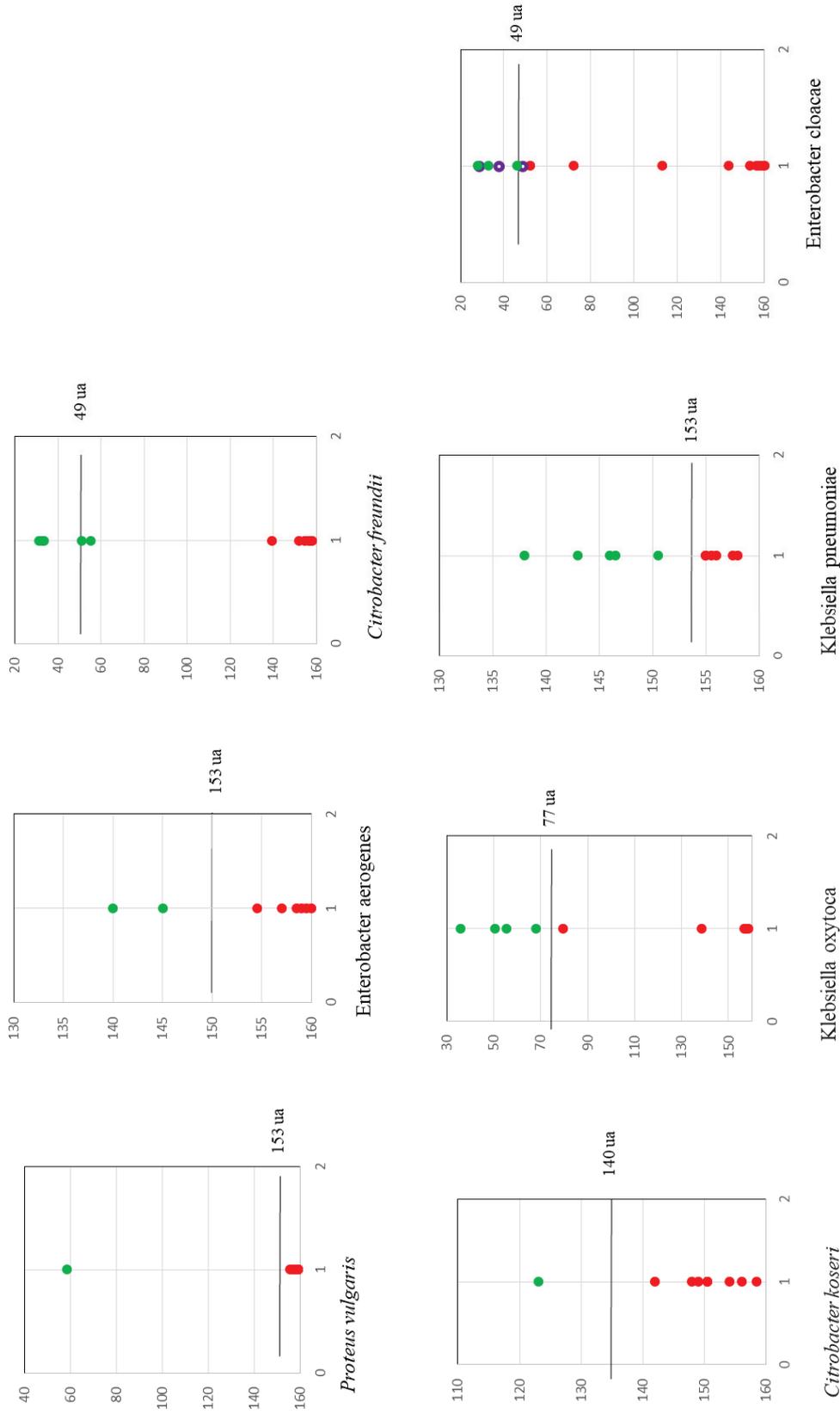


Figure 56: Détermination des seuils pour les cibles identifiées par le panel 2

En rouge : Intensités obtenues sur les sondes pour d'autres bactéries et en vert: Intensités obtenues en présence du pathogène à identifier.
 En contour violet : Intensités détectées sur la sonde *E. cloacae* pour des pathogènes autres qu'*Enterobacter cloacae* qui sont inférieurs au seuil instauré pour l'identification d'*Enterobacter cloacae*.

En ordonnée, intensité détectée sur les sondes (ua)

2.1.2 Détermination des seuils pour le panel 3

Les seuils sur le panel 3 ont été définis afin de distinguer un signal sur une sonde qui correspond à la présence d'un gène de résistance aux antibiotiques au sein d'un pathogène, par rapport à un signal non attendu obtenu notamment sur les sondes des gènes de résistance *bla**NDM* et *bla**TEM*. La **figure 57** présente les valeurs des intensités détectées sur la sonde NDM pour des pathogènes ne possédant pas le gène de résistance *bla**NDM* (rouge) ou au contraire possédant ce gène de résistance (vert).

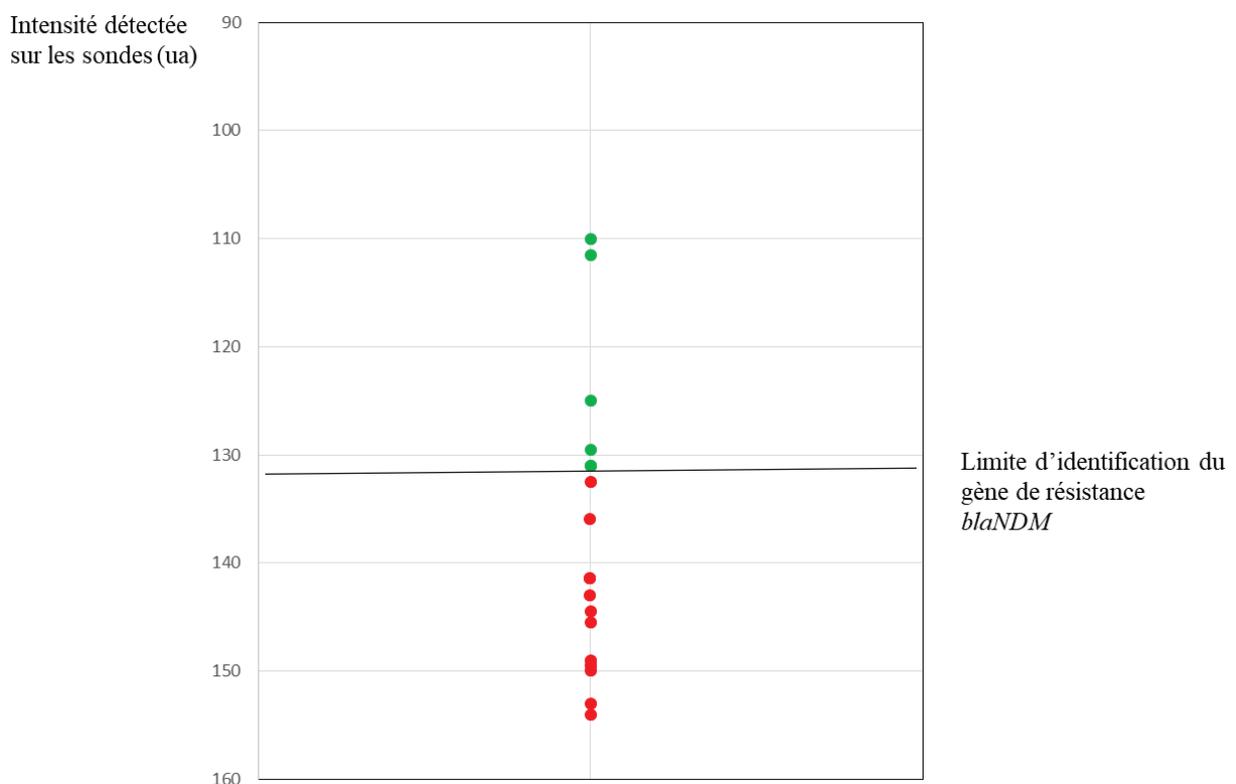
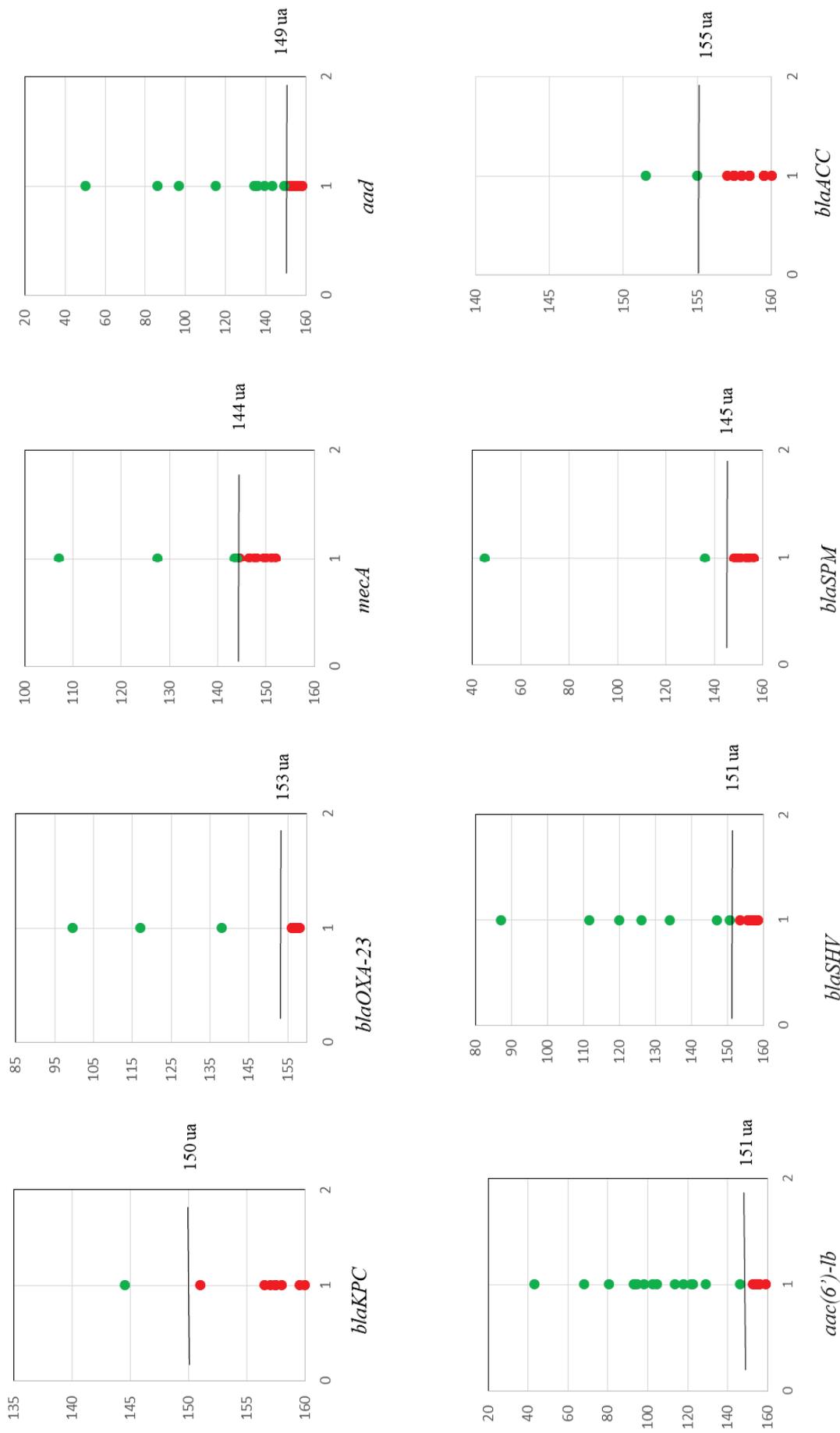
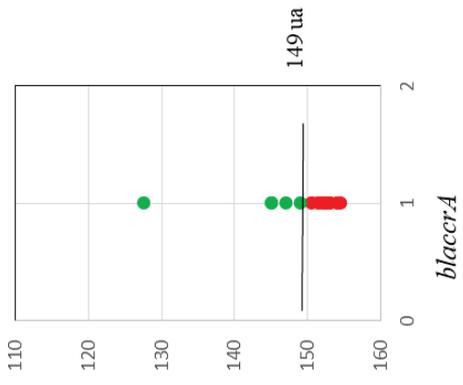


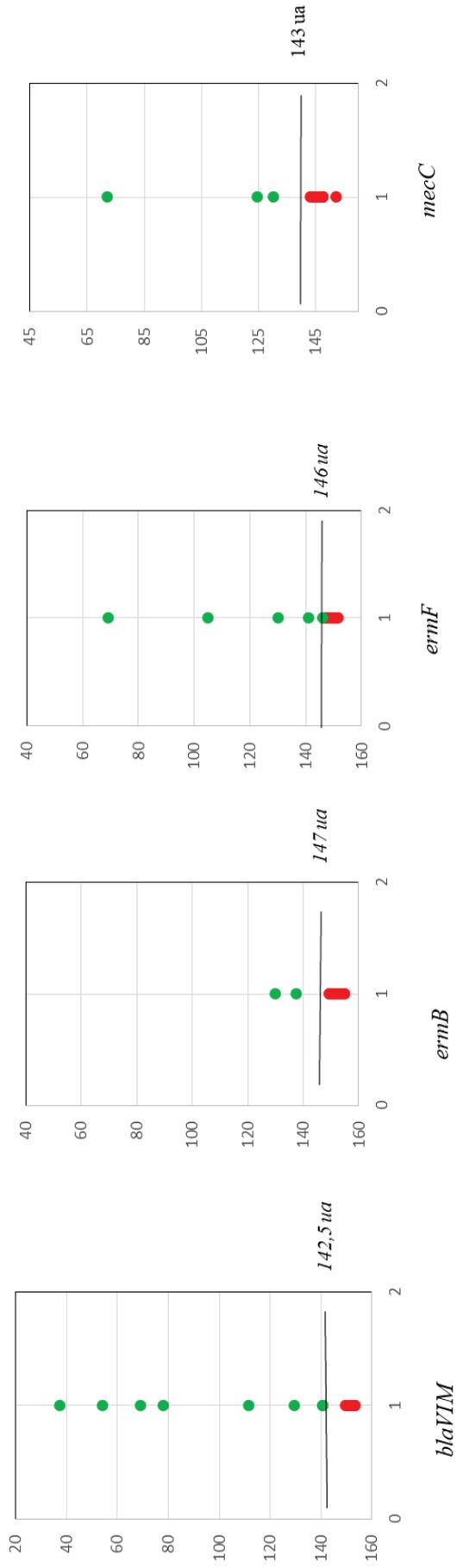
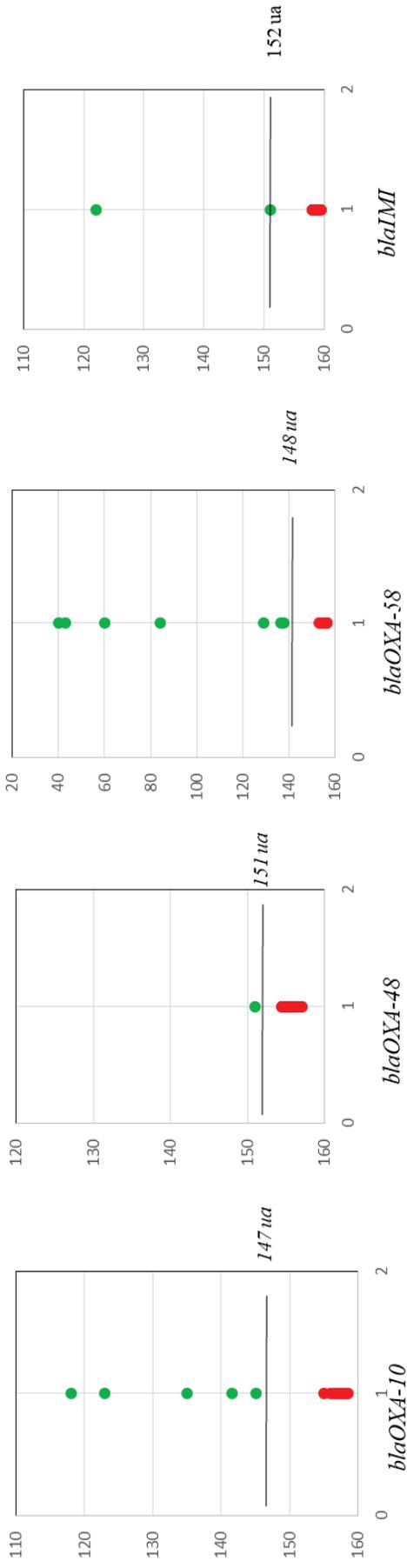
Figure 57 : Détermination des seuils du panel 3 : Exemple du gène de résistance *bla**NDM*

En rouge : Intensités obtenues sur la sonde NDM pour des pathogènes ne possédant pas le gène de résistance *bla**NDM*. En vert : Intensités obtenues sur la sonde NDM pour des pathogènes possédant le gène de résistance *bla**NDM*.

Un seuil d'identification, d'une valeur de 131 ua peut donc être établi pour identifier la présence du gène de résistance *bla**NDM* au sein d'un pathogène. En appliquant le même principe, des seuils d'intensités ont été fixés pour l'identification des autres gènes de résistance. Un exemple des seuils fixés est présenté en **figure 58**.







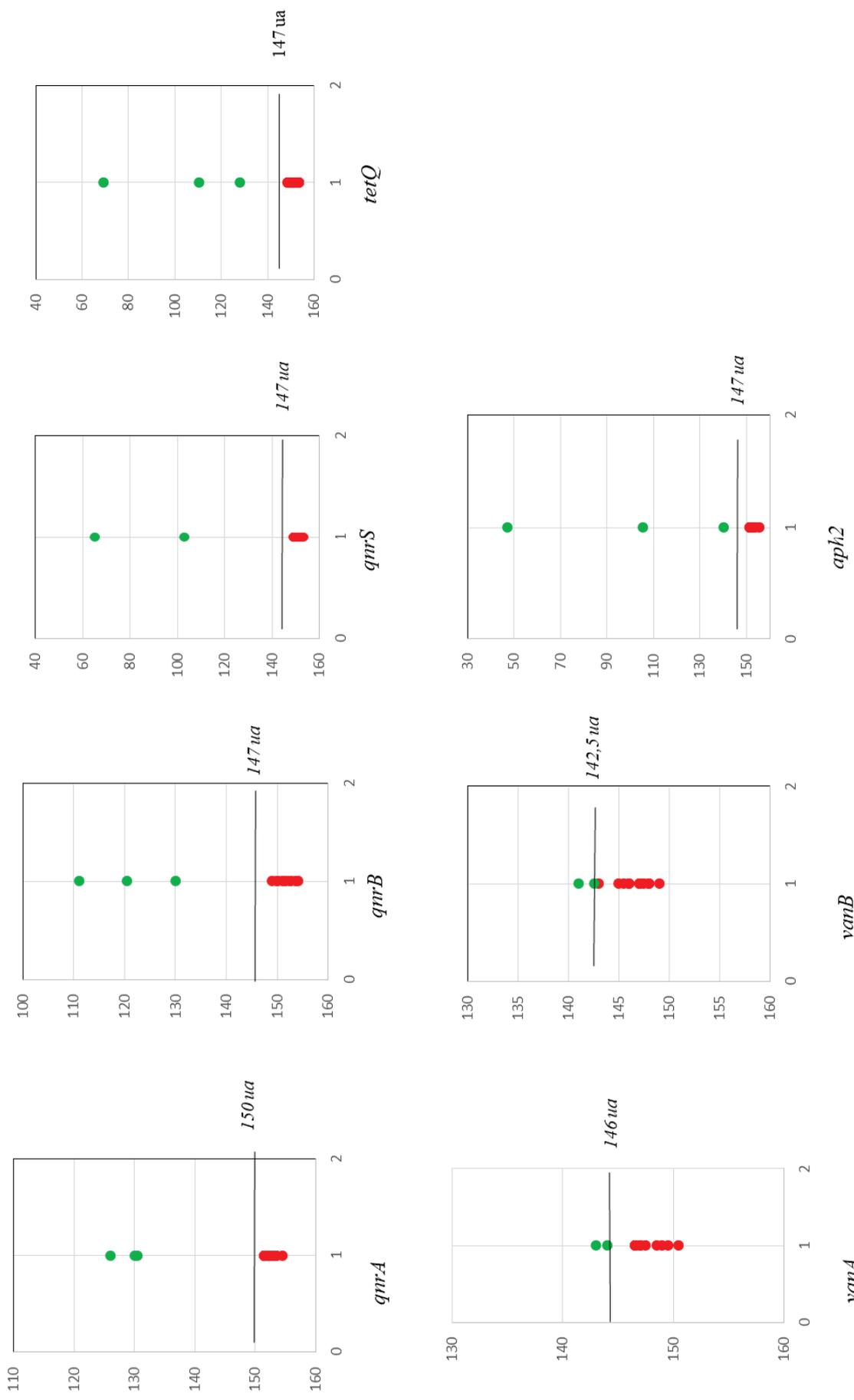


Figure 58 : Exemple de seuils déterminés pour les cibles identifiées par le panel 3
 En rouge : Intensités obtenues sur les sondes d'échantillon ne comportant pas la cible et en vert : Intensités obtenues sur les sondes en présence du gène de résistance à identifier. En ordonnée, intensité détectée sur les sondes (ua)

Les observations précédentes ont été effectuées à partir des résultats obtenus sur l'*AXObot* (plateforme 1). Les seuils établis pour le panel 3 diffèrent comme pour le panel 2 selon les deux plateformes (*Pathodoc* et *AXObot*), (**tableau 25**).

Tableau 25 : Seuils de détection déterminés pour le panel 3 pour les deux plateformes (*AXObot* et *Pathodoc*)

Cible	<i>AXObot</i>	<i>Pathodoc</i>
<i>aac(6')-Ib</i>	151	124
<i>aad</i>	149	115
<i>aph2</i>	147	147
<i>blaACC</i>	155	146
<i>blaACT</i>	147	146,5
<i>blaccrA</i>	149	144
<i>blaCMY</i>	147	147
<i>blaCTX-M-1</i>	152,5	146
<i>blaCTX-M-2</i>	147	136
<i>blaCTX-M-25</i>	147	147
<i>blaCTX-M-9</i>	152,5	147
<i>blaDHA</i>	154	148
<i>blaGIM</i>	150	144
<i>blaIMI</i>	152	145,5
<i>blaIMP</i>	150,5	147
<i>blaIMP2</i>	150	147
<i>blaKPC</i>	150	143
<i>blaNDM</i>	131	95
<i>blaOXA-1</i>	154,5	143,5
<i>blaOXA-10</i>	147	131
<i>blaOXA-23</i>	153	145
<i>blaOXA-24</i>	147	145
<i>blaOXA-48</i>	151	147
<i>blaOXA-58</i>	148	146
<i>blaPER</i>	147	147
<i>blaSHV</i>	151	147
<i>blaSPM</i>	145	146
<i>blaTEM</i>	152,5	135,5
<i>blaVEB</i>	145	147
<i>blaVIM</i>	142,5	112
<i>ermB</i>	147	146
<i>ermF</i>	146	147
<i>mcrI</i>	142	147
<i>mecA</i>	144	144
<i>mecC</i>	143	138
<i>qnrA</i>	150	147

<i>qnrB</i>	147	147
<i>qnrS</i>	147	147
<i>tetQ</i>	147	147
<i>vanA</i>	146	146,5
<i>vanB</i>	142,5	137

Les seuils des cibles, *blaCMY*, *blaDHA*, *blaACT* et *blaOXA-24* pour les deux plateformes et *blaCTX-25*, *mcr1*, *blaPER*, *blaVEB* et *blaTEM* pour l'*AXO*bot, ont été fixés afin de ne pas détecter de faux positifs sur tous les échantillons testés, mais aucun signal positif sur les sondes n'a été observé. Les seuils sont similaires entre les robots pour 33 sondes (moins de 10 ua d'écart). Cependant pour le reste des sondes, les seuils sont beaucoup plus élevés sur le *Pathodoc*, dû notamment au fait que les signaux non attendus sont plus nombreux et plus intenses sur le *Pathodoc*.

Les performances de détection des cibles du panel 3, suite à l'instauration des seuils de détections seront présentées, dans le **chapitre 6**.

2.2 Développement d'un système d'analyse pour le panel 1

Le panel 1, qui se base sur le gène codant pour l'ARN 16S, présente de nombreux signaux sur des sondes qui sont non attendus. Ce nombre et l'intensité des signaux varient selon les pathogènes et selon la quantité d'ADN introduite lors de la PCR.

2.2.1 Les signaux observables sur la biopuce forment une signature spécifique pour chaque pathogène.

Les différents signaux, observables sur la biopuce, ne semblent pas être répartis aléatoirement mais semblent au contraire suivre un schéma, une signature spécifique de chaque pathogène au niveau de leur répartition sur les sondes et de leurs intensités.

La **figure 59** présente les signatures obtenues pour des pathogènes appartenant à différents genres bactériens. Ces signatures ont été obtenues en effectuant dans un premier temps la moyenne des intensités des signaux observés sur les deux sondes correspondant à une

cible sur la biopuce. Puis, afin de représenter visuellement les signaux, une attribution de couleur est appliquée sur les cinquante valeurs obtenues, correspondant aux cinquante cibles, avec le signal le plus fort (valeur d'intensité la plus faible) parmi les 50 valeurs, en rouge et le signal le plus faible (intensité la plus forte), en blanc.

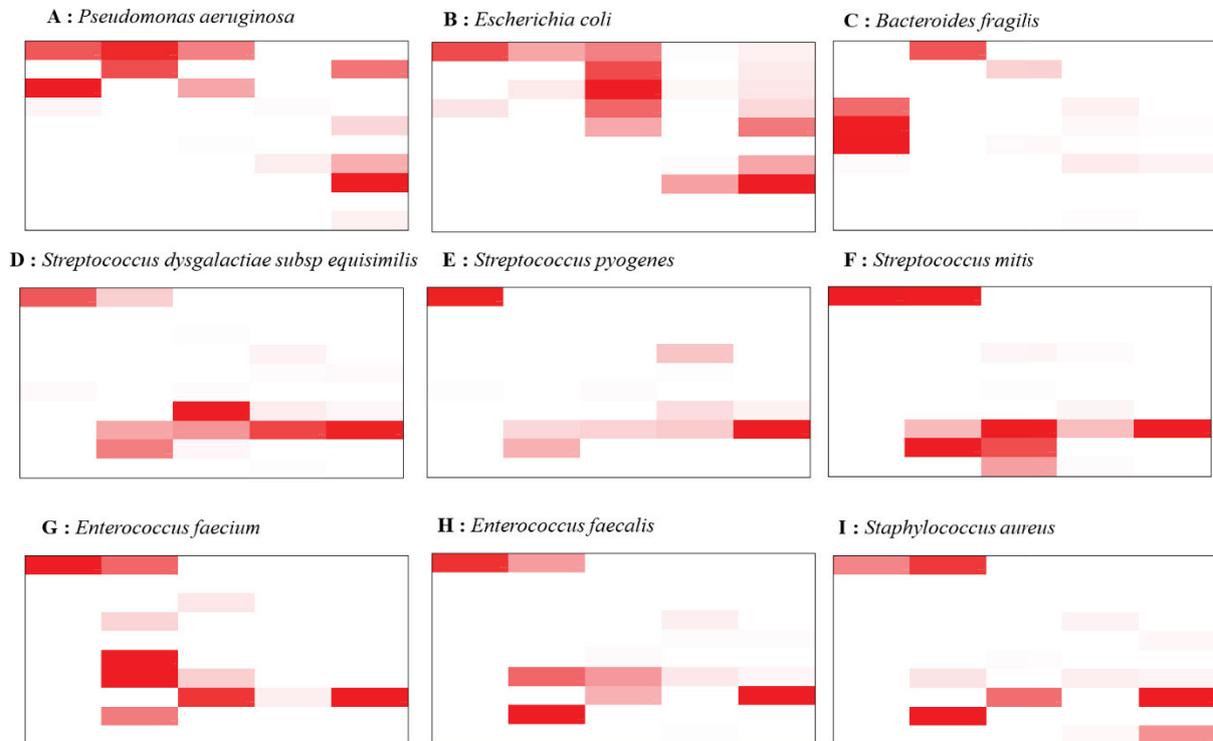


Figure 59 : Exemple de signatures obtenues pour différents pathogènes cibles du panel 1

Chacun des pathogènes semble posséder sa propre signature et qui semble être très similaires entre pathogènes appartenant au même genre bactérien comme par exemple le genre *Streptococcus spp.*, mais elles présentent tout de même de légères différences qui permettraient de distinguer deux pathogènes cibles entre eux.

Un test de diagnostic doit pouvoir permettre d'identifier les cibles même lorsqu'elles se trouvent à très faibles concentrations. Malgré la variation dans la localisation et l'intensité des signaux observés précédemment, la signature doit pouvoir être conservée dans les différentes conditions expérimentales afin d'être utilisée pour pouvoir analyser les résultats obtenus suite à l'hybridation sur les biopuces. La **figure 60** présente un exemple de signatures obtenues en présence de différentes concentrations d'ADN et pour deux souches différentes du pathogène *Staphylococcus aureus*.

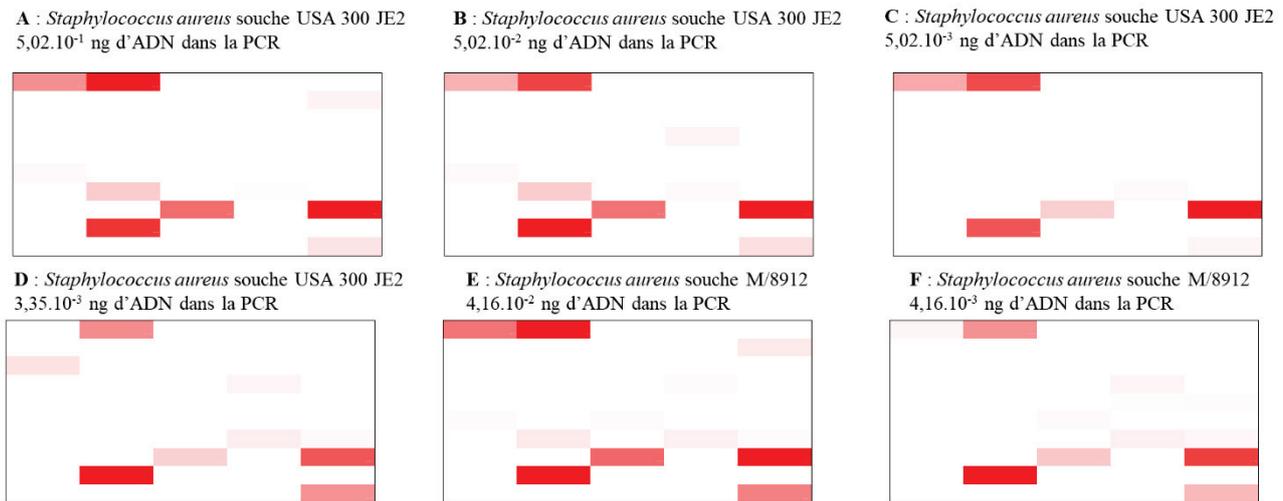


Figure 60 : Conservation des signatures des pathogènes selon la quantité d'ADN dans la PCR et les souches utilisées

Les deux souches de *Staphylococcus aureus* testées présentent une signature visuelle très proche, à quantité d'ADN similaire (signature B et E ou D et F de la **figure 60**). Malgré la diminution de la quantité d'ADN dans la PCR et l'utilisation d'une souche différente pour un pathogène donné, les signatures semblent être bien conservées. Pour la reconnaissance des pathogènes, il ne sera pas possible de se baser sur tous les signaux visibles. En effet, pour les signaux les plus faibles (couleur rose pâle), la présence de ces signaux varie selon les conditions. Les pathogènes seront donc identifiés en se basant sur la présence des signaux les plus forts dans chacune des conditions (ici cinq sondes pour *Staphylococcus aureus*), qui constituent le cœur des signatures.

2.2.2 Utilisation des signatures dans le cadre des infections polymicrobiennes

Entre 4% et 25% des infections dans le sang sont polymicrobiennes (19,40,41,48,53). Lors d'une bactériémie, plusieurs pathogènes peuvent alors se retrouver simultanément dans le sang du patient. L'utilisation des signatures doit donc pouvoir permettre d'identifier toutes les cibles dans le cas d'une infection incluant au moins deux pathogènes.

La **figure 61** présente deux exemples de combinaisons de deux pathogènes, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ainsi qu'*Escherichia coli* et *Enterococcus faecium*.

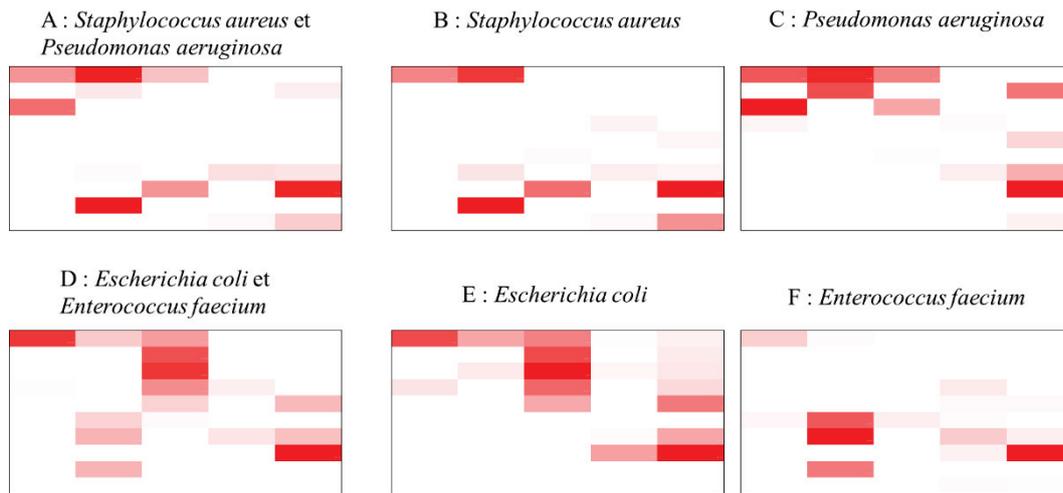


Figure 61 : Utilisation de la méthode des signatures dans le cas d'infections polymicrobiennes

Une partie des signatures obtenues individuellement pour les pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est reconnaissable en présence d'une double infection comportant ces deux pathogènes. Il en est de même en cas d'infection avec *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*.

La disparition de quelques signaux lors des cas de double infection n'empêche pas l'identification des pathogènes en utilisant la méthode des signatures. Cette disparition peut s'expliquer par exemple, par une compétition lors de l'amplification de l'ADN au cours des étapes de PCR ou tout simplement par la technique utilisée lors de la réalisation des signatures visuelles. En effet, le dégradé de couleur se base sur l'intensité la plus élevée détectée sur les sondes. Or, si l'intensité la plus élevée détectée sur les sondes est plus importante pour le pathogène en combinaison avec un autre pathogène que pour le pathogène seul, le dégradé de couleur sera ajusté et à intensité égale, un signal qui apparaissait très faiblement dans le cas du pathogène seul n'apparaîtra plus dans le cas d'infection polymicrobienne.

Cette reconnaissance n'est cependant possible qu'en présence de pathogènes dont les signatures respectives n'incluent pas les mêmes sondes. Par exemple, avec cette méthode il semble difficile dans le cas d'une présence simultanée de deux pathogènes appartenant au genre *Streptococcus spp.* de pouvoir les distinguer, de même pour deux Entérobactéries. Mais, grâce à l'identification complémentaire de 9 Entérobactéries, sur les panels 1 et 2, il est alors possible en utilisant les deux panels de les identifier. Lors de l'évaluation de l'identification des pathogènes dans le cadre d'infections polymicrobiennes les plus fréquemment rencontrées au

sein des hôpitaux d’Hasselt et de Zagreb, (**chapitre 6**), *Escherichia coli* a pu être identifiée sur les deux panels (souvent l’un ou l’autre) ce qui augmente le nombre de pathogènes détectés dans ces combinaisons.

Il semble donc que la méthode d’analyse des signatures permette l’identification de deux pathogènes présents simultanément dans le sang des patients.

2.2.3 Comparaison des signatures obtenues avec le *Pathodoc* et l’*AXO*bot

Les exemples présentés ci-dessus sont des exemples de signatures obtenues lors d’une hybridation sur les biopuces réalisées avec l’*AXO*bot. Afin que cette méthode d’analyse soit validée, elle doit pouvoir être appliquée aux résultats obtenus avec le *Pathodoc*.

La **figure 62** présente une comparaison des signatures obtenues pour une même souche de pathogène entre les deux plateformes.

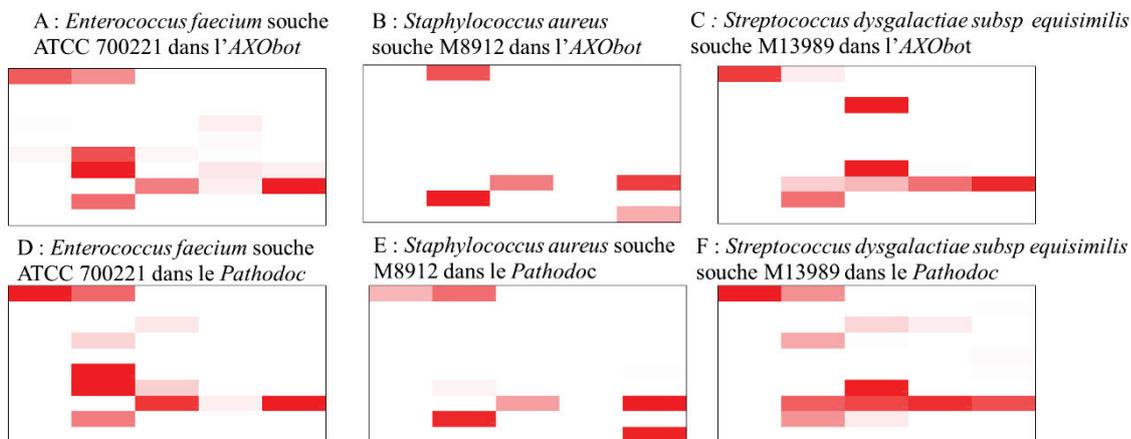


Figure 62 : Comparaison des signatures obtenues pour une même souche entre le *Pathodoc* et l’*AXO*bot

Les signatures obtenues sur les deux robots pour une même souche et à quantité d’ADN proche (autour de 1.10^3 UFC/ml) présentent plusieurs différences. En effet, le corps de la signature est conservé pour une même souche, mais les signaux obtenus sont plus nombreux avec le *Pathodoc* (signaux clairs). De même, sur une même sonde, les signaux sont plus intenses après une hybridation sur les biopuces réalisées au sein du *Pathodoc*. En présence de *Staphylococcus aureus*, un signal compris entre 30 et 70 ua est observé sur la sonde *S. aureus* avec le *Pathodoc* contre un signal compris entre 110 et 140 ua avec l’*AXO*bot. De même, en

présence de *Streptococcus dysgalactiae subsp equisimilis*, un signal compris entre 50 et 70 ua est observé sur la sonde *Staphylococcus aureus* avec le *Pathodoc* contre un signal compris entre 110 et 130 ua avec l'*AXObot*.

Cette différence au niveau des signaux observés et de leurs intensités peut avoir différentes origines :

- Utilisation de deux plateformes différentes (*Pathodoc* contre *SelectNA plus*, thermocycleur et *AXObot*)
- Transport de réactifs et d'échantillons entre les différents partenaires (AXO Science, Molzym et l'université de Warwick).

Concernant l'utilisation des deux plateformes, les différences observables peuvent être liées à la façon de mesurer les paramètres physiques ou mécaniques comme la température dans les puits d'extraction, de PCR ou les biopuces, les temps de pipetages, l'homogénéisation des réactifs, ou la manière de chauffer utilisée. Les quelques différences qui pourraient être rencontrées peuvent donc avoir un impact sur les signaux observés sur les biopuces en fin de protocole. De plus, le fait que des réactifs ou de l'ADN congelé aient voyagé entre les différents sites (AXO Science, Molzym et l'université de Warwick) peut avoir également un impact sur les résultats obtenus (Performance de la Taq polymérase, dégradation de l'ADN)

En conclusion, l'utilisation des signatures pour la reconnaissance des pathogènes dans le panel 1 semble donc être une méthode prometteuse pour l'analyse des résultats sur le panel 1. Néanmoins, il est probable que pour le panel 1 comme pour les panels 2 et 3, un ajustement de la méthode d'analyse des signatures ou des signaux soit nécessaire selon la plateforme utilisée.

3 Conception du programme de reconnaissance des pathogènes du panel 1

Un processus d'analyse automatique a été développé en se basant sur la méthode des signatures observées précédemment pour les pathogènes du panel 1. Ce processus d'analyse se déroule en plusieurs étapes.

3.1 Transcription des intensités extraites avec AXOware en intensités relatives, utilisées dans l'analyse automatique

L'intensité maximale sur les sondes composant les signatures varie selon la quantité d'ADN présente dans la PCR, la plateforme d'analyse utilisée (*Pathodoc* ou *AXObot*) et parfois selon la souche du pathogène. Les données brutes d'intensités ne peuvent donc pas être directement utilisées afin d'effectuer des comparaisons entre les différentes conditions et une harmonisation des échelles de valeurs d'intensités est nécessaire pour compenser la variabilité entre les différentes analyses.

3.1.1 Utilisation d'intensités relatives pour chaque résultat obtenu

Les intensités sur les sondes de la biopuce sont déterminées à partir de la moyenne des intensités des deux sondes d'une cible extraites avec le logiciel AXOware. Comme les signatures visuelles obtenues précédemment, à chaque image (essai) sont associées cinquante valeurs d'intensités qui correspondent aux cinquante sondes du panel 1.

Dans un premier temps, les intensités ont été retranscrites dans une autre échelle de valeurs allant de 0 à 255. Ces valeurs correspondent aux valeurs prises par un pixel sur l'échelle (en bit) de gris, 0 correspondant au noir et 255 au blanc. La valeur la plus faible (signal le plus fort) parmi les cinquante valeurs d'intensités associées à une image se voit attribuer la valeur 0 en intensité relative, la plus forte valeur (signal le plus faible) la valeur 255. Une équation de droite de type fonction affine est alors obtenue et permet de transcrire les 48 autres intensités en intensités relatives.

Une illustration visuelle de cette méthode est présentée **figure 63**.

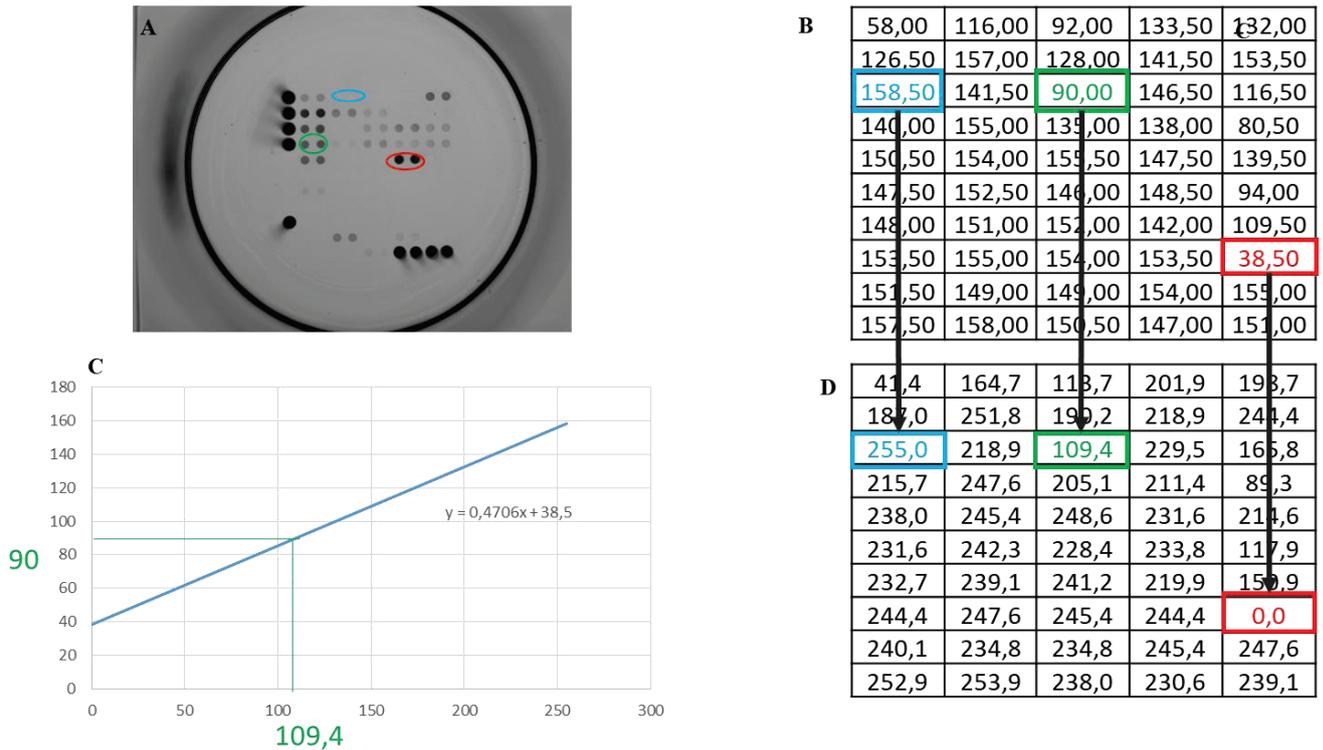


Figure 63 : Exemple d'obtention des intensités relatives dans le cas d'*Escherichia coli*

A : Image obtenue sur l'AXObot, en rouge signal le plus fort (sonde *Clostridium spp.*), en bleu signal le plus faible (sonde *Pseudomonas spp.* et en vert signal utilisé dans l'exemple.

B : Obtention des 50 intensités avec le logiciel AXOware puis calcul de la moyenne de l'intensité détectée sur les deux sondes correspondant à une et même cible puis attribution de la valeur 255 à la plus forte valeur (signal faible) et 0 à la plus faible (signal fort)

C : Détermination de l'équation de droite de la fonction affine

D : Utilisation de cette équation pour transcrire les 48 autres intensités

Les valeurs d'intensités (avant l'utilisation des intensités relatives) étaient déjà dans une échelle de valeur allant de 0 à 255 ua. Cependant, les valeurs maximums d'intensité varient suivant les conditions des essais et la plateforme utilisée et il était alors impossible d'effectuer des comparaisons des résultats. L'utilisation d'intensités relatives va permettre de transcrire toutes les intensités obtenues pour les différents pathogènes sur une même échelle et donc de comparer les résultats.

3.1.2 Comparaison des résultats obtenus pour les différentes expérimentations

Suite à l'instauration des intensités relatives, il est possible de comparer les résultats et les intensités obtenus pour un même pathogène dans différentes conditions.

Les différentes conditions mentionnées pour un pathogène correspondent à des :

- Résultats obtenus entre les deux plateformes *AXObot* et *Pathodoc*.
- Résultats obtenus en présence de quantités très variables d'ADN.
- Résultats obtenus en présence de différentes souches pour un même pathogène.
- Résultats obtenus dans le cas d'infections polymicrobiennes avec la présence de plusieurs pathogènes.
- Résultats obtenus en présence d'une matrice complexe, ici le sang, dans le cas de contaminations artificielles d'un échantillon de sang négatif avec une concentration connue de bactéries.
- Résultats obtenus sur un échantillon de patient.

La **figure 64** présente les intensités relatives sur les cinquante sondes dans les différentes conditions mentionnées ci-dessus pour *Staphylococcus aureus*. La méthode de détermination du nombre de copies de génome sera détaillée dans le chapitre suivant.

Suivant les différentes conditions testées, les signaux les plus forts sont observés sur les mêmes sondes. Cependant, des variations de l'intensité des signaux sont observées suivant les conditions, mentionnées ci-dessus. En effet, l'intensité des signaux sur la sonde *S.aureus*, est beaucoup plus importante lorsque l'hybridation sur les sondes a lieu avec le *Pathodoc* par rapport à l'*AXObot*, ce qui corrobore les observations précédentes. De plus, dans le cas de co-infections par deux pathogènes comme par exemple *Staphylococcus aureus* en présence de *Pseudomonas aeruginosa*, les signaux correspondants à la signature de *Pseudomonas aeruginosa* comme ceux observés sur les sondes *Stenotrophomonas maltophilia* ou *Citrobacter freundii*, sont clairement visibles.

Les signatures, préalablement observées, sont également identifiables en utilisant la méthode des intensités relatives. Cinq sondes, *Clostridium spp.*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas spp.*, *S. aureus* et *Streptococcus spp.* comportent les signaux les plus forts et ceci, quelque soient les conditions. Ces sondes vont donc constituer la base de la signature pour l'identification de la cible *Staphylococcus aureus*.

3.2 Détermination des sondes utilisées et de leurs intervalles d'intensité relative pour l'établissement des signatures servant à la reconnaissance des pathogènes

Les intensités relatives ayant été déterminées, il est maintenant possible de comparer les résultats obtenus dans les différentes conditions évoquées précédemment et ainsi de déterminer les sondes qui serviront à identifier toutes les cibles du panel 1, puis les intervalles d'intensités sur les sondes, c'est à dire un intervalle dans lequel doivent se trouver les intensités relatives sur chaque sonde. L'instauration de ces intervalles, en plus des sondes, va permettre par exemple de distinguer des bactéries présentant des signaux sur les mêmes sondes comme dans le cas par exemple de pathogènes cibles et de validation.

Le nombre de sondes qui seront utilisées pour l'identification d'une cible varie fortement. En effet, celles-ci sont déterminées empiriquement, par observations des différents résultats obtenus dans les différentes conditions. Ces sondes peuvent présenter un signal constant suivant les différentes conditions d'expériences, comme montré dans la **figure 65** ou au contraire, peuvent ne présenter aucun signal mais être essentiel pour distinguer deux pathogènes présentant des signatures très similaires.

Clostridium septicum qui est une espèce de validation et les deux cibles *Clostridium perfringens* et *Clostridium butyricum* présentent une signature très proche avec des signaux détectés sur les mêmes sondes (**figure 65**). Cependant, des variations au niveau des intensités relatives sont détectées et un intervalle d'intensité, en plus d'une combinaison de deux sondes, est utilisé afin de distinguer ces trois pathogènes.

Clostridium butyricum présente un fort signal sur la sonde *Clostridium butyricum* (0 à 50 ua) et un signal très faible sur la sonde *Pseudomonas spp.* (190 à 250 ua). *Clostridium septicum* présente un signal important sur la sonde *Clostridium butyricum* (40 à 60 ua) et un signal sur la sonde *Pseudomonas spp.* (100 à 150 ua) et finalement *Clostridium perfringens* présente un signal assez faible sur la sonde *Clostridium butyricum* (155 à 195 ua) et un signal sur la sonde *Pseudomonas spp.* (95 à 155 ua).

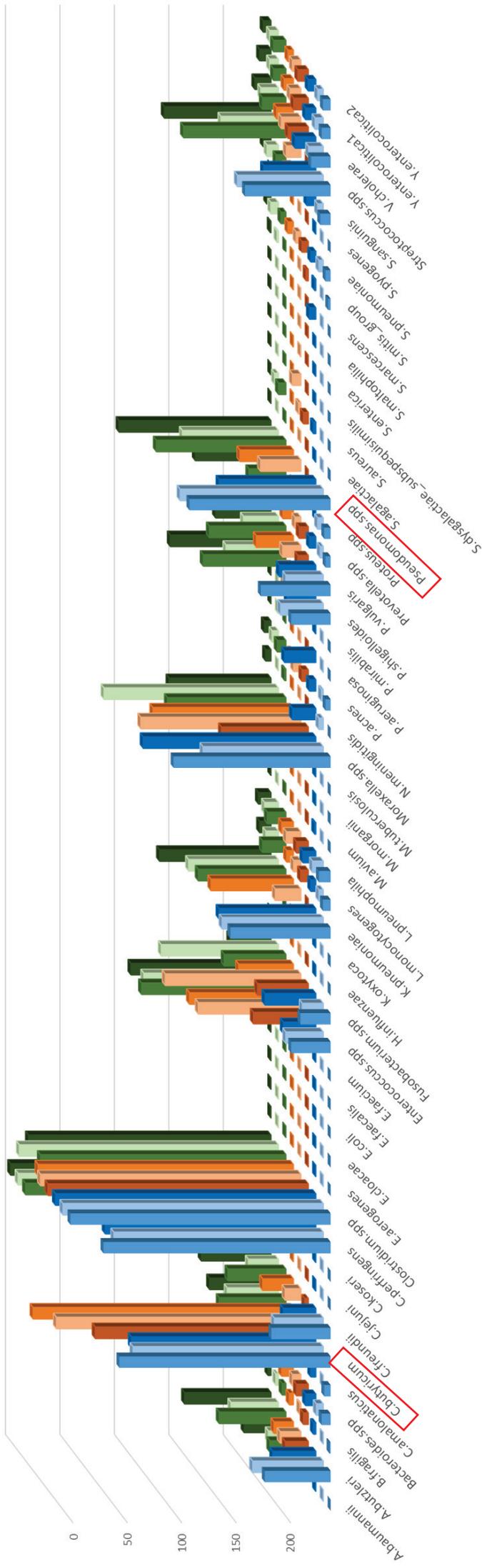


Figure 65 : Distinction entre espèces cibles et espèces de validation avec les intervalles d'intensité : Exemple de *Clostridium spp.*

En abscisse, les 50 sondes du panel 1, en ordonnée, les intensités relatives déterminées sur ces sondes et en profondeur, les pathogènes utilisés avec trois exemples de résultats pour chaque : *Clostridium septicum* (en bleu, espèce de validation), *Clostridium butyricum* (en rouge, cible) et *Clostridium perfringens* (en vert, cible). L'ADN utilisé est de l'ADN extrait à partir de souche. En encadré rouge, sondes utilisées pour différencier ces trois pathogènes

Il est donc possible, en utilisant des intervalles d'intensités relatives sur les sondes servant de signature pour l'identification d'un pathogène donné, de distinguer deux pathogènes cibles présentant des signatures proches mais également de différencier les espèces cibles des espèces de validation.

Cette association entre sonde et intervalle des intensités relatives sur ces sondes pour l'identification des pathogènes est appelée combinaison. Un exemple de combinaison est présenté dans le **tableau 26**.

Tableau 26 : Combinaison pour l'identification de *Clostridium butyricum*

Sondes	Intervalle d'intensités (ua)
<i>Moraxella spp.</i>	90-216
<i>C. butyricum</i>	0-50
<i>Clostridium spp.</i>	0-15
<i>C. perfringens</i>	220-251
<i>Pseudomonas spp.</i>	180-250

Après hybridation sur les biopuces des PCR multiplexes réalisées à partir de l'ADN extrait de l'échantillon de patient, le diagnostic rendu au clinicien indiquera la présence de *Clostridium butyricum* si les intensités relatives, déterminées à partir des signaux détectés sur les images et après traitement informatique, répondent à tous les critères présentés dans le **tableau 26**.

Au sein des combinaisons, des sondes peuvent être communes pour l'identification de plusieurs pathogènes. La différenciation entre ces pathogènes se fait alors grâce aux seuils d'intensités relatives (**tableau 27**). Toutes les cibles du genre *Streptococcus spp.* sont identifiées sur la base des 7 sondes développées pour identifier ces pathogènes ainsi que la sonde *Moraxella spp.* En effet, ces pathogènes présentent des signaux plus ou moins importants sur toutes ces sondes.

Les seuils d'intensités pour les sondes sont parfois très restreints, par exemple le seuil sur la sonde *S. agalactiae* pour *Streptococcus dysgalactiae susp equisimilis* (235 à 252), ou alors très vastes et incluent la quasi-totalité des valeurs, comme par exemple la sonde *S.*

agalactiae pour *Streptococcus agalactiae* (0 à 240). Une gamme de valeur étendue sur un seuil indique une grande variation des valeurs d'intensités relatives parmi les différentes conditions de chaque échantillon. La distinction entre *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus dysgalactiae subsp equisimilis* s'effectue avec la sonde *Streptococcus spp.* où les intervalles d'intensités relatives ne se chevauchent pas. Les intervalles d'intensités sur les sondes de la combinaison sont très proches pour *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus dysgalactiae equisimilis* excepté pour deux sondes : *S. agalactiae* et dans une moindre mesure *S. sanguinis*. La distinction de ces deux pathogènes s'effectue donc par le biais de la sonde *S.agalactiae*, où les intervalles d'intensités se chevauchent sur 5 ua.

Tableau 27 : Combinaisons présentant des sondes communes : Exemple pour *Streptococcus spp.*

Pathogène Sonde	Intervalle d'intensités (ua)		
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae subsp equisimilis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	130-225	35-220	215-235
<i>Streptococcus spp.</i>	0-130	0-110	150-240
<i>S. dysgalactiae</i>	50-200	15-218	0-120
<i>S. pneumoniae</i>	100-245	175-228	55-135
<i>S. mitis</i>	130-250	220-250	0-205
<i>S. agalactiae</i>	0-240	235-252	160-250
<i>S. sanguinis</i>	110-252	220-250	115-235
<i>Moraxella spp.</i>	10-210	0-130	100-221

3.3 Développement d'une analyse automatique pour l'identification des pathogènes

3.3.1 Mise en place de l'analyse automatique

Une fois toutes les combinaisons de sondes et d'intervalles d'intensité relative déterminées pour l'identification de chacune des cibles du panel 1, un programme informatique a été écrit (langage Java) afin de pouvoir tester de manière automatique toutes les combinaisons possibles pour chaque échantillon.

Dans un premier temps, les données d'intensités brutes sont extraites des images obtenues par le logiciel AXOware suite à l'hybridation des amplicons sur les biopuces, puis, la moyenne des intensités pour chaque sonde est déterminée.

Le programme effectue ensuite les étapes suivantes pour chaque échantillon :

- Récupération des moyennes des intensités sur les 50 sondes.
- Détermination de la plus faible et de la plus forte intensité.
- Détermination de la pente.
- Détermination des intensités relatives associées aux 48 autres sondes.
- Vérification de la correspondance des intensités relatives à au moins une combinaison permettant la reconnaissance d'un pathogène du panel 1.
- Affichage du nom de la cible correspondant à une combinaison validée par les intensités relatives.

3.3.2 Optimisation des combinaisons utilisées par le programme informatique

Ce programme a été développé au début de la phase de validation analytique du projet afin d'interpréter les résultats obtenus pour chacun des échantillons de sang artificiellement contaminés avec une quantité donnée d'un pathogène connu. Depuis, les combinaisons utilisées par le programme pour la reconnaissance des pathogènes ont été plusieurs fois optimisées au fur et à mesure de l'accumulation des données. Ces modifications ont essentiellement impacté les intervalles pour les valeurs d'intensité à vérifier sur les sondes, mais parfois aussi les sondes présentes au sein des combinaisons.

En effet, des différences existent au niveau de l'intensité des signaux obtenus pour certains pathogènes entre le *Pathodoc* et l'*AXObot*, et ces différences persistent même après l'utilisation des intensités relatives. Ces différences peuvent venir comme mentionné précédemment dans ce chapitre du système d'incubation lors du protocole d'hybridation sur biopuce mais également de la différence au niveau des thermocycleurs utilisés. Par exemple pour *Staphylococcus aureus*, deux combinaisons indépendantes ont dû être créées, afin de pouvoir différencier ce pathogène cible des espèces de validation comme *Staphylococcus epidermidis*.

Comme observé précédemment sur la **figure 64**, une grande amplitude de valeur d'intensité peut être trouvée sur la sonde *S. aureus* ou *Pseudomonas spp.* par exemple, suivant la condition appliquée aux échantillons testés. Or la différenciation entre pathogènes cibles et espèces de validation se fait souvent par l'intermédiaire d'un intervalle d'intensité sur une sonde précise. Deux combinaisons qui sont complémentaires ont donc été créées et *Staphylococcus aureus* sera identifié si les intensités relatives vérifient l'une ou l'autre des combinaisons présentées dans le **tableau 28**.

Tableau 28 : Identification de *Staphylococcus aureus* par l'intermédiaire de deux combinaisons

Sonde	Intervalle d'intensités (ua)	
	Combinaison 1	Combinaison 2
<i>Pseudomonas spp.</i>	0-78	85-210
<i>C.freundii</i>	150-251	166-251
<i>Clostridium spp.</i>	0-180	0-180
<i>S.aureus</i>	0-200	0-140
<i>L.monocytogenes</i>	0-170	0-170
<i>Moraxella spp.</i>	50-250	50-240

La distinction entre *Staphylococcus aureus* et toutes autres cibles ou espèce de validation est réalisée au niveau des intensités détectées sur les sondes *Pseudomonas spp.* et *S. aureus*. Les intensités relatives déterminées pour *Staphylococcus epidermidis* vérifient généralement la combinaison 2 excepté pour la sonde *S. aureus* où l'intensité est supérieure à 140 ua. *Staphylococcus epidermidis* peut donc être différencié de *Staphylococcus aureus*. Les intensités relatives pour le pathogène *Staphylococcus aureus* peuvent également prendre des valeurs supérieures à 140 (signaux faibles). Ce pathogène est alors reconnu avec la combinaison 1 où les intensités relatives sur la sonde *Pseudomonas spp.* sont également plus faibles (entre 0 et 78), car dans ces quelques cas particuliers, le signal détecté sur cette sonde est le plus fort de la biopuce. L'instauration de deux combinaisons pour l'identification de *Staphylococcus aureus* a permis d'augmenter la capacité de reconnaissance de ce pathogène dans les différentes conditions tout en évitant les faux positifs, via un agrandissement de la taille de certains intervalles d'intensité.

Deux combinaisons ont parfois dû être créées dans le cas d'infections polymicrobiennes. En effet, l'intensité du signal le plus fort parmi les cinquante sondes détermine la pente de conversion entre les intensités issues d'AXOware et les intensités relatives et donc la validation

ou non des combinaisons pour la reconnaissance des pathogènes. Dans certains cas, comme par exemple dans le cas d'une infection avec *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, la reconnaissance individuelle des pathogènes n'est pas ou peu impactée car certaines sondes présentant les signaux les plus forts sont communes aux deux pathogènes, c'est-à-dire les sondes *Clostridium spp.* et *Pseudomonas spp.*

Cependant pour d'autres cas d'infections polymicrobiennes dans lesquels aucune sonde des combinaisons pour l'identification des deux pathogènes ne sont communes, par exemple pour *Escherichia coli* et *Bacteroides fragilis*, la reconnaissance individuelle des pathogènes peut être perturbée. En effet, comme observé sur la **figure 48**, très peu de signaux en dehors de ceux observés sur les sondes attendues sont détectés pour *Bacteroides fragilis*. De plus, la combinaison utilisée pour l'identification de *Bacteroides fragilis* ne comporte aucune sonde commune avec *Escherichia coli*.

Or en présence d'*Escherichia coli*, surtout en quantité assez importante (autour de 10^3 copies de génome), les signaux sur les sondes de la combinaison correspondant à *Bacteroides fragilis*, après transformation en intensité relative sont très faibles (200 à 220 ua). En effet, *Escherichia coli*, comme il est visible sur la **figure 50**, possède de nombreux signaux d'intensité importante comme sur la sonde *Clostridium spp.* Dans le cas d'une infection par *Escherichia coli* et *Bacteroides fragilis*, les intensités relatives sont donc déterminées à partir des signaux les plus forts présents sur les sondes appartenant à la combinaison d'*Escherichia coli*. Les intensités relatives sur les sondes pour la reconnaissance de *Bacteroides fragilis* ne correspondent donc plus aux intervalles définis. Cependant, l'augmentation de taille de ces intervalles est impossible car les intensités relatives obtenues dans le cas de cette infection polymicrobiennes, sont équivalentes aux intensités relatives observées par exemple dans le cas d'échantillons négatifs.

En effet, dans le cas d'échantillons négatifs, les intensités relatives sont aussi calculées, et même si les intensités brutes sont très proches pour toutes les sondes (autour de 250 ua), les intensités relatives sont comprises entre 0 ua et 255 ua. Il a donc fallu déterminer une autre combinaison possible, la combinaison 2 dans le **tableau 29**, valable uniquement dans les cas d'infections polymicrobiennes.

La sonde *C. koseri* a été sélectionnée car un signal sur cette sonde est observé pour *Escherichia coli* dans toutes les conditions testées et les intensités sur cette sonde lors des contrôles négatifs ne sont pas parmi les plus intenses et donc ne seront pas utilisées pour calculer la pente pour la détermination des intensités relatives. Ceci permet donc de ne pas avoir de faux positifs identifiés *Bacteroides fragilis* avec la combinaison 2, en présence d'un échantillon ne comportant aucun pathogène.

Tableau 29: Création d'une deuxième combinaison pour l'identification de *Bacteroides fragilis* dans le cas d'infection polymicrobienne.

Sondes	Intervalle d'intensités (ua)	
	Combinaison 1	Combinaison 2
<i>Prevotella spp.</i>	95-185	150-215
<i>B.fragilis</i>	0-180	150-215
<i>Bacteroides spp.</i>	0-70	150-215
<i>Pseudomonas spp.</i>	20-190	150-190
<i>C.koseri</i>	X	30-60

Le **tableau 30** présente les sondes comprises dans les combinaisons pour la reconnaissance de chaque pathogène du panel 1. Deux cibles ne présentent pas de combinaison : *Mycobacterium tuberculosis*, pour lequel aucune souche n'a été cultivée et *Citrobacter amalonaticus*, qui doit être séquencé car un doute subsiste quant à la souche dont l'ADN a été extrait. Les performances de détection des cibles du panel 1, suite à l'instauration des seuils de détection seront présentées, dans le **chapitre 6**.

Toutes les intensités obtenues à partir des images issues des biopuces et testées avec ce programme constituent une base de données accessible pour celui-ci. Cette base de données grossit au fur et à mesure des expériences réalisées. Lors des modifications apportées aux combinaisons pour améliorer la reconnaissance des pathogènes, les modifications sont aussi testées sur les résultats conservés en mémoire par le logiciel. Ainsi, chaque nouvelle modification peut être validée sur d'anciens résultats et son impact évalué. Une modification des combinaisons peut par exemple permettre d'identifier un pathogène dans d'anciens résultats qui n'avait pas été reconnu au préalable ou peut aussi entraîner au contraire, l'apparition de faux positifs. Ainsi, l'impact de chaque modification apportée au programme, au fur et à mesure de l'avancée des expériences et donc de l'obtention de nouveaux résultats, a pu être validé sur l'ensemble des résultats acquis préalablement.

Tableau 30 : Sondes présentées dans les combinaisons de chaque cible du panel 1

Cibles panel 1	Nombre de sondes dans la combinaison	Nom des sondes	Utilisation d'une deuxième combinaison
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	<i>Moraxella spp., A. baumannii, P. aeruginosa, Pseudomonas spp., C. freundii</i> et <i>S. maltophilia</i>	Oui
<i>Arcobacter butzleri</i>	4	<i>Clostridium spp., S. aureus, C. jejuni</i> et <i>A. butzleri</i>	Non
<i>Bacteroides fragilis</i>	4	<i>Prevotella spp., B. fragilis, Bacteroides spp.</i> et <i>Pseudomonas spp.</i>	Oui
<i>Bacteroides spp.</i>	4	<i>Prevotella spp., B. fragilis, Bacteroides spp.</i> et <i>Pseudomonas spp.</i>	Non
<i>Campylobacter jejuni</i>	3	<i>Clostridium spp., C. jejuni</i> et <i>A. butzleri</i>	Non
<i>Citrobacter freundii</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M.morganni, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P.mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes</i> et <i>Y. enterocolitoca</i>	Non
<i>Citrobacter koseri</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M.morganni, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P.mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes</i> et <i>Y. enterocolitoca</i>	Non
<i>Clostridium butyricum</i>	5	<i>Moraxella spp., C. perfringens, C. butyricum, Pseudomonas spp.</i> et <i>Clostridium spp.</i>	Non
<i>Clostridium perfringens</i>	5	<i>Moraxella spp., C. perfringens, C. butyricum, L. monocytogenes</i> et <i>Clostridium spp.</i>	Non
<i>Clostridium spp.</i>	4	<i>Moraxella spp., C. perfringens, C. butyricum</i> et <i>Clostridium spp.</i>	Non
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M.morganni, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P.mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes</i> et <i>Y. enterocolitoca</i>	Non
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M.morganni, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P.mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes</i> et <i>Y. enterocolitoca</i>	Non
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	<i>Enterococcus spp., E. faecium, E. faecalis, L.monocytogenes, Streptococcus spp.</i> et <i>Clostridium spp.</i>	Non
<i>Enterococcus faecium</i>	7	<i>Enterococcus spp., E. faecium, E. faecalis, L.monocytogenes, Streptococcus spp.</i> et <i>Clostridium spp.</i>	Oui
<i>Enterococcus spp.</i>	6	<i>Enterococcus spp., E. faecium, E. faecalis, L.monocytogenes, Streptococcus spp.</i> et <i>Clostridium spp.</i>	Non
<i>Escherichia coli</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M.morganni, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P.mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes</i> et <i>Y. enterocolitoca</i>	Non
<i>Fusobacterium spp.</i>	5	<i>Moraxella spp., Clostridium spp., Pseudomonas spp., Fusobacterium spp.</i> et <i>C. perfringens</i>	Non
<i>Haemophilus influenzae</i>	7	<i>Moraxella spp., Clostridium spp. S. aureus, Pseudomonas spp., Enterococcus spp., L. monocytogenes</i> et <i>H. influenzae</i>	Non
<i>Klebsiella oxytoca</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M.morganni, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P.mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes</i> et <i>Y. enterocolitoca</i>	Non
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M.morganni, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P.mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes</i> et <i>Y. enterocolitoca</i>	Non
<i>Legionella pneumophila</i>	3	<i>Pseudomonas spp., Prevotella spp.</i> et <i>L. pneumophila</i>	Non

<i>Listeria monocytogenes</i>	4	<i>Moraxella spp., S. aureus, Clostridium spp. et L. monocytogenes</i>	Non
<i>Moraxella spp.</i>	6	<i>Moraxella spp., A. baumannii, P. aeruginosa, Pseudomonas spp., C. freundii et S. maltophilia</i>	Non
<i>Morganella morganii</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M. morgani, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P. mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes et Y. enterocolitica</i>	Non
<i>Mycobacterium avium</i>	5	<i>Pseudomonas spp., Clostridium spp., P. acnes, M. avium et M. tuberculosis</i>	Non
<i>Neisseria meningitidis</i>	4	<i>Pseudomonas spp., Moraxella spp., P. aeruginosa et N. meningitidis</i>	Non
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	4	<i>Moraxella spp., Pseudomonas spp., A. baumannii et P. shigelloides</i>	Non
<i>Prevotella spp.</i>	4	<i>Prevotella spp., B. fragilis, Bacteroides spp. et Pseudomonas spp.</i>	Non
<i>Propionibacterium acnes</i>	5	<i>Pseudomonas spp., Clostridium spp., P. acnes, M. avium et M. tuberculosis</i>	Non
<i>Proteus mirabilis</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M. morgani, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P. mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes et Y. enterocolitica</i>	Non
<i>Proteus spp.</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M. morgani, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P. mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes et Y. enterocolitica</i>	Non
<i>Proteus vulgaris</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M. morgani, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P. mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes et Y. enterocolitica</i>	Non
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	<i>Moraxella spp., A. baumannii, P. aeruginosa, Pseudomonas spp., C. freundii et S. maltophilia</i>	Oui
<i>Pseudomonas spp.</i>	6	<i>Moraxella spp., A. baumannii, P. aeruginosa, Pseudomonas spp., C. freundii et S. maltophilia</i>	Non
<i>Salmonella enterica</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M. morgani, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P. mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes et Y. enterocolitica</i>	Non
<i>Serratia marcescens</i>	15	<i>E. coli, C. amalonaticus, K. oxytoca, K. pneumoniae, S. marcescens, M. morgani, C. koseri, C. freundii, Proteus spp., P. mirabilis, P. vulgaris, S. enterica, E. clacae, E. aerogenes et Y. enterocolitica</i>	Non
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	<i>Pseudomonas spp., Moraxella spp., S. aureus, Clostridium spp., L. monocytogenes et C. freundii</i>	Oui
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	<i>Moraxella spp., A. baumannii, P. aeruginosa, Pseudomonas spp., C. freundii et S. maltophilia</i>	Non
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8	<i>Streptococcus spp., S. agalactiae, S. dysgalactiae subsp. equisimilis, S. mitis, S. sanguinis, S. pyogenes, S. pneumoniae et Moraxella spp.</i>	Non
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	8	<i>Streptococcus spp., S. agalactiae, S. dysgalactiae subsp. equisimilis, S. mitis, S. sanguinis, S. pyogenes, S. pneumoniae et Moraxella spp.</i>	Non
<i>Streptococcus mitis</i>	8	<i>Streptococcus spp., S. agalactiae, S. dysgalactiae subsp. equisimilis, S. mitis, S. sanguinis, S. pyogenes, S. pneumoniae et Moraxella spp.</i>	Oui
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8	<i>Streptococcus spp., S. agalactiae, S. dysgalactiae subsp. equisimilis, S. mitis, S. sanguinis, S. pyogenes, S. pneumoniae et Moraxella spp.</i>	Non
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8	<i>Streptococcus spp., S. agalactiae, S. dysgalactiae subsp. equisimilis, S. mitis, S. sanguinis, S. pyogenes, S. pneumoniae et Moraxella spp.</i>	Non

<i>Streptococcus sanguinis</i>	8	<i>Streptococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae subsp equisimilis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> et <i>Moraxella</i> spp.	Non
<i>Streptococcus</i> spp.	8	<i>Streptococcus</i> spp., <i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae subsp equisimilis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> et <i>Moraxella</i> spp.	Non
<i>Vibrio cholerae</i>	5	<i>Moraxella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>A. baumannii</i> , <i>V. cholerae</i> et <i>K. pneumoniae</i>	Non
<i>Yersinia enterocolitica</i>	15	<i>E. coli</i> , <i>C. amalonaticus</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>M. morgani</i> , <i>C. koseri</i> , <i>C. freundii</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. enterica</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> et <i>Y. enterocolitica</i>	Oui

Le programme est, au moment de la rédaction de ce manuscrit, toujours en cours de développement, et des modifications sur les combinaisons sont toujours effectuées notamment concernant certaines cibles du panel 1 pour lesquelles le nombre de données acquises est trop faible pour que leur identification par ce programme soit robuste. En effet pour *Staphylococcus aureus* par exemple, au moment de l'écriture de ce manuscrit, les intensités correspondant à 65 analyses de ce pathogène ont été réalisées et pour les derniers résultats intégrés, aucune modification des combinaisons n'a été nécessaire pour la reconnaissance de ce pathogène. Cependant, pour *Mycobacterium avium* par exemple, seules les intensités correspondant à 4 analyses de ce pathogènes ont été réalisées et les combinaisons doivent être ajustées à chaque fois pour que le logiciel puisse reconnaître ce pathogène.

Maintenant qu'un système d'analyse a été mis en place, il est possible de déterminer les performances du test au cours d'une validation analytique où la sensibilité de détection des cibles sera évaluée grâce à des échantillons de sang artificiellement contaminés avec une quantité donnée d'un pathogène connu. Puis, les performances du test développé seront évaluées sur des échantillons de patient testés à l'aveugle, c'est-à-dire sans connaître le diagnostic clinique. Ces résultats sont présentés dans le **chapitre 6**.

3.4 Résumé du processus d'analyse des résultats

Le résumé du processus d'analyse des résultats avant rendu du diagnostic au clinicien est présenté dans la **figure 66**. Des méthodes d'analyse des résultats différentes ont dû être développées selon les panels. En effet, des signaux non attendus sont parfois observés sur les sondes, principalement sur le panel 1 complexifiant ainsi l'interprétation des résultats.

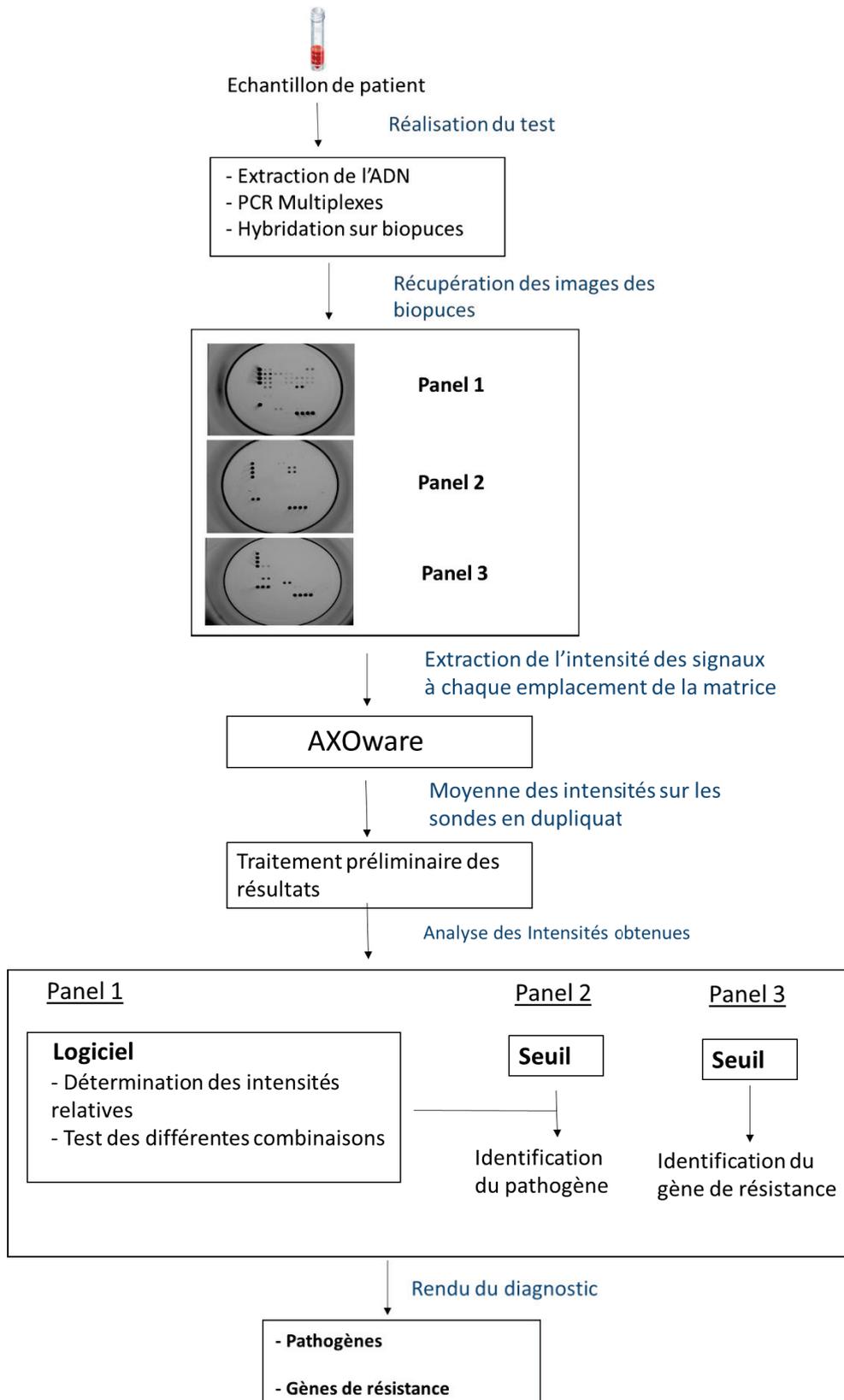


Figure 66: Résumé du processus d'analyse des résultats avant rendu d'un diagnostic

Chapitre 6 : Etudes des performances du test développé

1 Etude des performances du test développé avec de l'ADN extrait de souches bactériennes et sur l'*AXObot*

Les performances du test développé ont dans un premier temps été évaluées sur de l'ADN extrait de souches cultivés et avec l'*AXObot* (plateforme 1). La détection des cibles notamment à un faible nombre de copies de génome (sensibilité de détection), en présence d'autres pathogènes (infections polymicrobiennes) et la capacité de distinction de celle-ci par rapport aux espèces de validation (spécificité de détection) ont été évaluées.

1.1 Estimation du nombre de copies de génome

L'ADN extrait de chacune des souches ayant été envoyé à AXO Science, la sensibilité de détection a été évaluée en nombre de copies de génome et non en UFC/ml. Le nombre de copies de génome équivalent à la quantité d'ADN incorporée dans la PCR a été déterminé par le biais de la formule suivante :

$$\text{Nombre de copies} = \frac{X \text{ (ng)} * 6,0221 \times 10^{23} \text{ (molécules/mole)}}{N * 660 \text{ (g/mole)} \times 1 \times 10^9 \text{ (ng/g)}}$$

Avec X : La quantité d'ADN incorporé dans la PCR

N : La taille du génome

$6,0221 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$: La constante d'Avogadro

660 g/mole : Masse molaire moyenne d'une paire de base

Les performances évoquées par la suite sont perfectibles mais elles permettent d'avoir une première idée de la capacité de détection du test. En effet, pour le panel 1, elles ne tiennent pas compte du nombre de copie du gène codant pour l'ARN 16S qui peut influencer positivement et négativement ces limites. De plus, la taille du génome utilisée pour déterminer le nombre de copie du génome est une moyenne de la taille de génome de différentes souches pour une même espèce et non la taille du génome de la souche utilisée.

1.2 Evaluation de la sensibilité et de la spécificité du test développé

Les seuils ainsi que les combinaisons utilisées par le logiciel ont été définis afin de limiter les faux positifs. Dans certains cas, comme par exemple pour le gène de résistance *blaNDM*, les signaux non attendus observés sur la sonde entraînent la détermination d'un seuil élevé (131 ua) qui ne permet pas d'identifier dans 100% des cas ce gène de résistance (**tableau 34**). Cependant, si ce seuil était diminué, de nombreux faux positifs seraient détectés.

1.2.1 Identification des cibles du panel 1

Le **tableau 31** répertorie pour le panel 1, tous les échantillons testés à partir d'ADN de souches, les pourcentages de cas d'identification (vrais positifs) et les faux positifs observés, une fois les protocoles optimisés

Trois cibles du panel 1 n'ont pas été testées : *Citrobacter amalonaticus* (dont l'ADN extrait à partir de la souche bactérienne doit être séquencé car aucun signaux sur les sondes du panel 2 ne sont détectés), *Plesiomonas shigelloides* (ADN reçu après ces essais) et *Mycobacterium tuberculosis* (aucun ADN extrait disponible). Certaines cibles comme *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* ont été testées plus de 20 fois, avec des quantités variables de pathogènes (copies de génomes) alors que d'autres cibles comme *Serratia marcescens* ou *Fusobacterium spp.* ont été testées 1 fois seulement et avec un faible nombre (environ 5.10^2) de copies de génomes.

Des poussières peuvent se trouver présentes dans le fond des puits et être ainsi considérées comme un signal sur une sonde par le logiciel AXOware. Les intensités alors obtenues suite à la présence de cette poussière peuvent fausser la reconnaissance des pathogènes par le programme d'analyse. Par exemple, pour le panel 1, le pathogène *Salmonella bongori* a été identifié comme *Bacteroides fragilis* pour un échantillon. De même, *Pseudomonas stutzeri* a été identifié comme *Streptococcus mitis*. Les résultats obtenus avec ces échantillons ne sont pas pris en compte. Quelques faux positifs sont détectés sur des espèces de validation qui sont proches des cibles d'un point de vue génétique.

Tableau 31 : Identification des cibles du panel 1 à partir d'ADN extrait de souches

Cibles panel 1	Souches utilisées	Caractéristique des échantillons	Identification	Erreur d'identification
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Isolats clinique (GIM, 1), NCTC 13305, M10639	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	60% (9/15)	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	DSM 8739	1.10^3 copies de génome	100% (1/1)	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	M/7021	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	100% (6/6)	-
<i>Bacteroides spp.</i>	DSM 2079, DSM 1447	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	29% (2/7)	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	M8495	5.10^2 copies de génome	100% (1/1)	-
<i>Citrobacter freundii</i>	Isolat clinique 73489	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	75% (3/4)	-
<i>Citrobacter koseri</i>	DSM4595	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	75% (3/4)	-
<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 10702	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	100% (4/4)	-
<i>Clostridium perfringens</i>	M/8480	Entre 1.10^5 et 1.10^3 copies de génome	100% (3/3)	-
<i>Clostridium spp.</i>	DSM 7534	Entre 1.10^5 et 1.10^3 copies de génome	100% (3/3)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM30053	Entre 1.10^5 et 1.10^3 copies de génome	100% (3/3)	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	M/12961	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	33% (2/6)	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 12201, NCTC 13379	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	91% (10/11)	-
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 700221	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	73% (8/11)	1 <i>Enterococcus durans</i> identifié comme <i>Enterococcus faecium</i> dans le cas d'une infection polymicrobienne
<i>Enterococcus spp</i>	DSM 20633, DSM 20160	Entre 1.10^5 et 1.10^3 copies de génome	71% (10/14)	-
<i>Escherichia coli</i>	DSM 105182, NCTC 13462, NCTC 13476, isolat clinique (26E, 23E CMY)	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	60% (25/42)	2 <i>Shigella spp.</i> identifiés comme <i>Escherichia coli</i>
<i>Fusobacterium spp.</i>	DSM21784	5.10^2 copies de génome	0% (0/1)	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	DSM4690	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	75% (3/4)	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Isolat clinique 26384	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	75% (3/4)	-

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M/12958, NCTC 13465, M/11720, NCTC 13439, Isolats clinique (KPC1, 10/134)	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	20% (4/20)	-
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152	5.10 ² copies de génome	0% (0/1)	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	M12196	5.10 ² copies de génome	100% (1/1)	-
<i>Moraxella spp.</i>	DSM 6998	Entre 1.10 ³ et 5.10 ² copies de génome	0% (0/2)	-
<i>Morganella morganii</i>	DSM6675	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	80% (4/5)	-
<i>Mycobacterium avium</i>	DSM 44256	5.10 ² copies de génome	0% (0/1)	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	M/14654	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	88% (7/8)	-
<i>Prevotella spp.</i>	DSM 20514	5.10 ² copies de génome	100% (1/1)	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	M11726	5.10 ² copies de génome	0% (0/1)	-
<i>Proteus mirabilis</i>	Isolat clinique P1	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	40% (2/5)	-
<i>Proteus spp.</i>	DSM 4542	5.10 ² copies de génome	0% (0/1)	-
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 13387	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	100% (4/4)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Isolat clinique SPM, NCTC 13437	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	64% (7/11)	2 <i>Pseudomonas otitidis</i> identifiés comme <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas spp.</i>	Isolat clinique SBW25, DSM 24166, DSM 17224	Entre 1.10 ⁵ et 1.10 ³ copies de génome	65% (11/17)	-
<i>Salmonella enterica</i>	DSM17058	Entre 1.10 ³ et 5.10 ² copies de génome	33% (1/3)	-
<i>Serratia marcescens</i>	DSM30121	5.10 ² copies de génome	0% (0/1)	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	M8912, USA 300 JE2	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	74% (20/27)	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Isolat clinique SMAL	5.10 ² copies de génome	100% (1/1)	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	M/4674	Entre 1.10 ⁵ et 1.10 ³ copies de génome	89% (8/9)	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>subsp equisimilis</i>	M/13989	Entre 1.10 ⁵ et 1.10 ³ copies de génome	88% (7/8)	-
<i>Streptococcus mitis</i>	DSM 12643	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	78% (7/9)	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	Entre 1.10 ⁵ et 1.10 ³ copies de génome	67% (4/6)	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSM 20565	Entre 1.10 ⁵ et 1.10 ³ copies de génome	67% (6/9)	-

<i>Streptococcus sanguinis</i>	DSM 20567	Entre 1.10^5 et 1.10^3 copies de génome	100% (8/8)	1 <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> et 2 <i>Streptococcus mitis</i> identifiés comme <i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Streptococcus spp.</i>	DSM 20662, M/6687, DSM 18670	Entre 1.10^5 et 1.10^3 copies de génome	50% (8/16)	-
<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC 14035	5.10^2 copies de génome	100% (1/1)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM4780	5.10^2 copies de génome	100% (1/1)	-

Pour les sondes ciblant des genres bactériens, c'est la reconnaissance des espèces de validation appartenant aux mêmes genres bactériens qui a été évaluées. L'absence de reconnaissance de certains pathogènes peut s'expliquer par les tests qui ont été réalisés avec de faibles quantités de bactéries (autour de 10^2 copies de génomes). Cela indique que les capacités de détection, en termes de sensibilité, peuvent être atteintes. Sur les biopuces, cela se traduit par une absence de signal détecté ou un nombre trop faible de signaux qui ne permettent pas au logiciel de reconnaître les combinaisons des pathogènes. C'est le cas notamment des *Enterobactéries* dont la combinaison est composée de 15 sondes.

1.2.2 Identification des cibles du panel 2

Le **tableau 32** répertorie pour le panel 2 tous les échantillons testés à partir d'ADN de souches, les pourcentages de cas d'identification (vrais positifs) et les faux positifs observés, une fois les protocoles optimisés.

Trois cibles présentent dans le panel 2 n'ont pas été testées : *Citrobacter amalonaticus* (dont l'ADN extrait à partir de la souche bactérienne doit être séquencé car aucun signaux sur les sondes du panel 2 ne sont détectés), *Burkholderia cepacia* et *Aeromonas hydrophila* (dont l'ADN de ces deux pathogènes a été reçus après ces essais). A l'exception de *Salmonella enterica subsp enterica sv typhi*, *Sphingomonas paucimobilis* et *Enterobacter aerogenes* qui n'ont été testé qu'une seule fois, les cibles restantes présentent une très bonne spécificité de détection (98 à 100%). La spécificité de détection est inférieure pour *Klebsiella pneumoniae* (55%) et dans une moindre mesure *Enterobacter cloacae* (75%).

Comme mentionné dans le **chapitre 5**, des faux positifs sont parfois détectés avec les espèces appartenant à *Enterobacter cloacae complexe* et *Shigella spp.*. Et finalement, le pourcentage d'identification des *Entèrobactéries* est plus important avec le panel 2 qu'avec le panel 1.

Tableau 32 : Identification des cibles du panel 2 à partir d'ADN extrait de souches

Cibles panel 2	Souches utilisées	Caractéristique des échantillons	Identification	Erreur d'identification
<i>Citrobacter freundii</i>	Isolat clinique 73489	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	100% (7/7)	-
<i>Citrobacter koseri</i>	DSM4595	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	100% (7/7)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM30053	5.10^2 copies de génome	100% (1/1)	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	M/12961	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	75% (3/4)	2 <i>Enterobacter cloacae</i> complexe identifiés comme <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichia coli</i>	DSM 105182, NCTC 13462, NCTC 13476, isolat clinique (26E, 23E CMY)	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	98% (40/41)	3 <i>Shigella</i> spp. identifiés comme <i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Isolat clinique 26384	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	100% (4/4)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M/12958, NCTC 13465, M/11720, NCTC 13439, Isolats clinique (KPC1, 10/134)	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	55% (6/11)	-
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 13387	Entre 1.10^5 et 5.10^2 copies de génome	100% (4/4)	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> sv <i>typhi</i>	ATCC 8385	5.10^2 copies de génome	0% (0/1)	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	DSM 1098	5.10^2 copies de génome	0% (0/1)	-

1.2.3 Identification des cibles du panel 3

Le **tableau 33** répertorie pour le panel 3 tous les échantillons testés à partir d'ADN de souches, les pourcentages de cas d'identification (vrais positifs) et les faux positifs observés, une fois les protocoles optimisés.

Les capacités de détection des cibles du panel 3 varient fortement suivant les cibles. Des cibles comme les gènes de résistance *blaTEM* et *blaCMY* ne sont pas détectées une seule fois malgré plus de 10 essais. Les sondes et amorces conçues pour ces cibles ne sont peut-être pas optimales. Pour le gène *blaNDM*, le choix du seuil est assez élevé (131 ua) ce qui permet d'éviter les faux positifs mais ce qui entraîne en contrepartie une diminution de la détection de cette cible (des signaux étant d'intensité supérieure à 131 ua). Concernant le panel 3, les gènes de résistance *blaVEB*, *blaCMY*, *mcr1*, *blaTEM*, *blaPER*, *blaOXA-24*, *blaACT*, *blaCTX-M-25* et *blaDHA* n'ont pas été détecté malgré leurs présences confirmées au sein de certaines souches. Cependant, ces observations ne concernent souvent qu'un essai avec une quantité de bactérie faible (5.10^2 copies de génome) et il faudrait la répéter afin de confirmer l'absence de détection de ces cibles.

Pour deux échantillons USA 300 JE2 et l'isolat clinique 5CF, des signaux, supérieurs en intensité aux seuils fixés apparaissent sur des sondes laissant supposer la présence de gènes de résistance supplémentaires. La présence ou non de ces gènes doit être à nouveaux vérifiée par PCR et migration sur gel d'agarose.

Tableau 33 : Identification des cibles du panel 3 à partir d'ADN extrait de souches

Gène de résistance panel 3	Souches utilisées	Caractéristique des échantillons	Identification	Erreur d'identification
<i>aac(6'-Ib)</i>	Isolats clinique (KPC1, 10/134, 5CF, 26E, 8EC, GIM), M/12958, NCTC 13439	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	89% (34/38)	2 signaux avec la souche USA 300 JE2
<i>aad</i>	Isolats clinique (1, 10/134, 5CF, 8EC, GIM), NCTC 13437, DSM 105182, NCTC 13462	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	65% (15/23)	-
<i>aph2</i>	Isolat clinique aph2	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	88% (7/8)	-
<i>blaACC</i>	Isolat clinique 26E	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	100% (2/2)	-
<i>blaACT</i>	DSM 12409	5.10 ² copies de génome	0% (0/1)	-
<i>blaccrA</i>	M/7021	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	80%(4/5)	-
<i>blaCMY</i>	Isolats clinique (5CF, CMY, PI)	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	0% (0/13)	-
<i>blaCTX-M-1</i>	M/12958, isolats clinique (10/134, 5CF, 26E, 8EC)	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	50% (7/14)	-
<i>blaCTX-M-2</i>	NCTC 13462	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	100% (4/4)	-
<i>blaCTX-M-25</i>	NCTC 13465	Entre 1.10 ³ et 5.10 ² copies de génome	0% (0/2)	-
<i>blaCTX-M-9</i>	Isolat clinique 23E	Entre 1.10 ³ et 5.10 ² copies de génome	100% (2/2)	-
<i>blaDHA</i>	Isolat clinique 10/134	5.10 ² copies de génome	0% (0/1)	-
<i>blaGIM</i>	Isolat clinique (GIM)	5.10 ² copies de génome	100% (1/1)	-
<i>blaIMI</i>	NCTC 13925	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	50% (2/4)	-
<i>blaIMP</i>	NCTC 13476, IMP	Entre 1.10 ³ et 5.10 ² copies de génome	67% (2/3)	-
<i>blaKPC</i>	Isolat clinique KPC1	5.10 ² copies de génome	100% (1/1)	-
<i>blaNDM</i>	Isolat clinique 5CF	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	40% (2/5)	-
<i>blaOXA-1</i>	M/1295, isolats clinique (10/134, 5CF, 26E)	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	100% (5/5)	5 signaux avec l'isolat clinique 5CF

<i>blaOXA-10</i>	NCTC 13437	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	90% (9/10)	-
<i>blaOXA-23</i>	M/10639	Entre 1.10 ³ et 5.10 ² copies de génome	100% (2/2)	-
<i>blaOXA-24</i>	Isolats clinique (1, OXA-24)	Entre 1.10 ³ et 5.10 ² copies de génome	0% (0/2)	-
<i>blaOXA-48</i>	M/12958	Entre 1.10 ³ et 5.10 ² copies de génome	50% (1/2)	-
<i>blaOXA-58</i>	NCTC 13305	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	100% (7/7)	-
<i>blaPER</i>	M/10639	Entre 1.10 ³ et 5.10 ² copies de génome	0% (0/2)	-
<i>blaSHV</i>	Isolats clinique (KPC1,10/134), NCTC 1346, M/129585, NCTC 13439	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	43% (6/14)	-
<i>blaSPM</i>	Isolat clinique (8EC)	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	100% (4/4)	-
<i>blaTEM</i>	NCTC 13465, M/12958, DSM 105182, isolats clinique (5CF, 26E, 8EC), NCTC 13462	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	0% (0/25)	-
<i>blaVEB</i>	NCTC 13437	5.10 ² copies de génome	0% (0/1)	-
<i>blaVIM</i>	NCTC 13437, NCTC 13439, isolats clinique (5CF, 8EC), M/12961	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	52% (12/23)	-
<i>ermB</i>	NCTC 12201, NCTC 13379	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	25% (2/8)	-
<i>ermF</i>	M/7021	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	75% (6/8)	-
<i>mcr1</i>	DSM 105182	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	0% (0/5)	-
<i>mecA</i>	USA 300 JE2	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	86% (6/7)	-
<i>mecC</i>	M8912	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	71% (5/7)	-
<i>qnrA</i>	Isolats clinique (5CF, 26E)	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	86% (6/7)	-
<i>qnrB</i>	Isolats clinique (5CF, 8EC)	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	36% (4/11)	-
<i>qnrS</i>	NCTC 13439	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	50% (4/8)	-
<i>tetQ</i>	M/7021, DSM 20514	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	78% (7/9)	-
<i>vanA</i>	NCTC 12201, ATCC 700221	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	100% (2/2)	-
<i>vanB</i>	NCTC 13379	Entre 1.10 ⁵ et 5.10 ² copies de génome	43% (3/7)	-

1.2.4 Performances globales du test à partir de l'ADN extrait de souches bactériennes

En regroupant les résultats précédents, les performances du test à partir de l'ADN extrait de souches bactériennes sont les suivantes :

- 71% (243/340) des pathogènes testés ont été identifiés par le biais des panels 1 et 2
- 57% (173/302) des gènes de résistance ont été identifiés par le biais du panel 3

1.3 Espèces utilisées pour valider la spécificité

Les espèces dites « de validations » sont des espèces proches (phylogénétiquement) des espèces cibles du test, mais que le logiciel de reconnaissance doit pouvoir différencier pour ne pas fournir des résultats erronés aux cliniciens (faux positifs). Parmi ces espèces de validation, certaines d'entre elles doivent pouvoir être identifiées par les sondes ciblant des genres bactériens (*Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* et *Streptococcus spp.*).

La détection des espèces de validation a été évaluée et les résultats sont fournis dans le **tableau 34**. Parmi celles-ci, 7 sont parfois confondues avec une espèce cible par le logiciel et donnent un faux positif : *Enterobacter cloacae complexe*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus durans*, *Pseudomonas otitidis* et *Streptococcus pseudopneumoniae*. Ces résultats sont attendus car ce sont des espèces proches génétiquement de certaines cibles. Il est également à noter que parmi les cibles, dans 2 cas sur les 8 évalués, *Streptococcus mitis* a été identifié comme *Streptococcus sanguinis*.

Afin de confirmer ces résultats, il faudrait répéter l'analyse un plus grand nombre de fois. Certaines cibles comme celles appartenant aux genres *Campylobacter spp.* ou *Acinetobacter spp.* n'ont pu être testées qu'une seule fois.

Tableau 34 : Détection des « espèces de validation » par le logiciel de reconnaissance

Espèce « de validation »	Détection par le logiciel
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Non détectée
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	Non détectée
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Non détectée
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides spp.</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Bacteroides spp.</i>
<i>Campylobacter coli</i>	Non détectée
<i>Campylobacter fetus</i>	Non détectée
<i>Campylobacter lari</i>	Non détectée
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Non détectée
<i>Citrobacter farmeri</i>	Non détectée
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Clostridium spp.</i>
<i>Clostridium tertium</i>	<i>Clostridium spp.</i>
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Non détectée
<i>Enterobacter cloacae</i> complexe	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp <i>oharae</i>	Non détectée
<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	Non détectée
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
<i>Granulicatella adiacens</i>	Non détectée
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	Non détectée
<i>Mycobacterium abscessus</i>	Non détectée
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Non détectée
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Non détectée
<i>Pantoea agglomerans</i>	Non détectée
<i>Parabacteroides distasonis</i>	Non détectée
<i>Pasteurella multocida</i>	Non détectée
<i>Proteus penneri</i>	<i>Proteus spp</i>
<i>Providencia rettgeri</i>	Non détectée
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
<i>Pseudomonas otitidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
<i>Salmonella bongori</i>	Non détectée
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Non détectée
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>

Dans les cas où une distinction entre une espèce cible et une espèce de validation est requise, d'autres moyens de diagnostic devront être employés. Par exemple, dans le cas d'*Escherichia coli* et de *Shigella spp.*, les caractéristiques biochimiques et le sérogroupage sont généralement utilisés pour différencier ces bactéries mais ces deux méthodes ne fonctionnent pas avec tous les isolats (373). Paauw et al. ont montré des résultats favorables en essayant de distinguer ces bactéries en utilisant le MALDI TOF et en passant par une bibliothèque de référence dédiée et un protocole normalisé de préparation des échantillons (374).

1.4 Détermination des capacités de détection du test

1.4.1 Variation de l'intensité des signaux sur les sondes suivant la quantité d'ADN incorporée dans la PCR

Afin de déterminer les capacités de détection des cibles, des quantités de plus en plus faibles d'ADN ont été incorporées dans la PCR. La **figure 67** représente l'intensité moyenne des signaux détectés en présence du pathogène *Escherichia coli* (sur la sonde *E. coli* pour le panel 1 et pour le panel 2) puis en présence du gène de résistance *aac(6')-Ib* (sur la sonde *aac(6')-Ib* pour le panel 3).

Pour les panels 1 et 2 et en cas de signaux positifs, aucune variation significative de l'intensité n'est détectée entre 1.10^5 copies de génome et 5.10^2 copies de génome. Pour le panel 3, une diminution significative de l'intensité des signaux est observée sur la sonde *aac(6')-Ib* entre 1.10^5 copies de génome et 1.10^3 copies de génome. Pour le dernier point à 5.10^2 copie de génome, une très grande variabilité est observée (écart-type de +/- 20 ua)

L'absence de variation significative des signaux observés pour ces sondes des panels 1 et 2 peut s'expliquer par une saturation des sondes lors de l'hybridation des amplicons. Pour le panel 1, les gènes codant pour l'ARN 16S sont présents en plusieurs copies et de nombreux amplicons sont synthétisés. Pour le panel 2, une meilleure identification des Entérobactéries que pour le panel 1 est observée laissant supposer des conditions plus optimales d'amplification et/ou d'hybridation sur les biopuces. Et finalement pour le panel 3, la diminution significative de l'intensité des signaux observés avec la diminution de la quantité d'ADN peut sûrement

s'expliquer par la compétition pour l'amplification des différentes cibles dans la PCR et une synthèse des amplicons ne permettant pas de saturer les sondes. La plus grande variabilité observée pour l'intensité des signaux pour le panel 3 (environ 2 fois plus que pour le panel 1 et 2) peut s'expliquer par la variation des conditions dans lesquelles se trouvent cette cible (présence d'un nombre plus ou moins important d'autres gènes de résistance, présence chez des espèces bactériennes différentes, existence de variants).

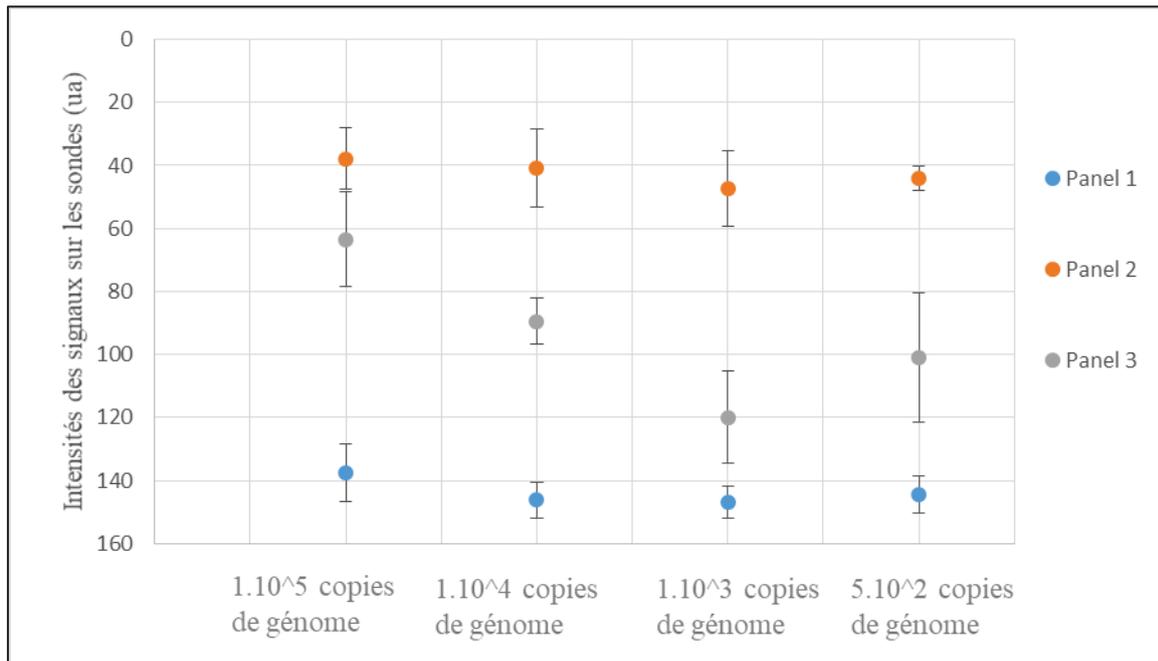


Figure 67 : Variation de l'intensité des signaux sur les sondes suivant la quantité d'ADN incorporée dans la PCR

Seules les intensités au-dessus du seuil de détection pour les panels 2 et 3 ont été comptabilisées et le nombre de données par point est compris entre 4 et 18. Pour les panels 1 et 2, les intensités obtenues en cas d'infections polymicrobiennes ont également été incluses.

1.4.2 Définition

La LoD (*Limit of Detection*) est la plus faible concentration d'analyte (élément mesuré) susceptible d'être distinguée de manière fiable de la LoB (*Limit of Blank*) et à laquelle la détection est possible. La LoB est définie comme la concentration apparente d'analyte la plus élevée qui devrait être trouvée lorsque des réplicats d'un échantillon ne contenant pas d'analyte sont testés. La LoD est déterminée en utilisant à la fois la LoB mesurée et des réplicats d'échantillon connu et contenant une faible concentration d'analyte (375).

La détermination de la LoD n'est pour l'instant pas applicable avec les données obtenus pour ce projet car :

- Un grand nombre de réplicats est demandé (autour de 20 généralement) et seul un duplicat à pour l'instant été réalisé et uniquement pour quelques cibles et pour les contrôles négatifs (blanc)
- Des quantités jusqu'à 5.10^2 copies de génome ont été utilisées, or, certaines cibles sont encore détectées à cette quantité laissant supposer que ces cibles peuvent peut-être être détecté avec des quantités inférieures d'analytes

Il sera donc mentionner dans ce manuscrit non pas la limite de détection des cibles mais la capacité de détection de ces cibles.

1.4.3 Capacité de détection des pathogènes

Les capacités de détection pour les pathogènes détectés par ce test sont présentées dans la **figure 68**. Elles ont été déterminées avec des points de gammes en duplicat pour 24 cibles et également pour 6 pathogènes testés seulement une fois : *Staphylococcus aureus* (M/8912), *Clostridium perfringens*, *Prevotella bivia*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa* (isolat clinique SPM). Pour chaque pathogène testé, des gammes avec des quantités d'ADN comprises entre 5.10^2 et 1.10^5 copies de génomes ont été analysés. Des variations au niveau de la détection de ces pathogènes sont observées suivant les souches. Par exemple pour *Pseudomonas aeruginosa*, l'isolat clinique SPM est détecté à une quantité d'environ 5.10^2 copies de génomes contre, entre 1.10^3 et 1.10^4 copies de génomes pour la souche M/7298.

1.10 ⁴ copies de génome	5.10 ³ copies de génome	1.10 ³ copies de génome	5.10 ² copies de génome
<i>Proteus mirabilis</i> (isolat clinique P1)	<i>Bacteroides fragilis</i> (M/7021)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (NCTC 13305)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (M10639)
<i>Staphylococcus aureus</i> (M8912)	<i>Clostridium perfringens</i> (M/8480)	<i>Citrobacter freundii</i> (isolat clinique 73489)	<i>Escherichia coli</i> (isolat clinique 23E)
<i>Streptococcus pyogenes</i> (DSM 20565)	<i>Enterococcus faecalis</i> (NCTC 13379)	<i>Citrobacter koseri</i> (DSM 4595)	<i>Escherichia coli</i> (DSM 105182)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> * (M/7298)	<i>Enterococcus faecalis</i> (NCTC 12201)	<i>Clostridium butyricum</i> (DSM 10702)	<i>Escherichia coli</i> (NCTC 13462)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (isolat clinique 1)	<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 700221)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (DSM 30053)	<i>Haemophilus influenzae</i> (DSM 4690)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> * (M/7298)	<i>Enterobacter cloacae</i> (M/12961)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (isolat clinique SPM)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC 13437)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (isolat clinique 26384)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (USA 300 JE2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolat clinique KPC-1)	
	<i>Streptococcus agalactiae</i> (M/4674)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolat clinique M/1120)	
	<i>Streptococcus mitis</i> (DSM 12643)	<i>Morganella morganii</i> (DSM 6675)	
	<i>Streptococcus sanguinis</i> (DSM 20567)	<i>Neisseria meningitidis</i> (M/146S4)	
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>subsp equisimilis</i> (M/13989)	<i>Proteus vulgaris</i> (DSM 13387)	
	<i>Prevotella bivia</i> (DSM20514)		
	<i>Campylobacter jejuni</i> (M/8485)		

Figure 68 : Capacité de détection des pathogènes (panel 1 et 2)

Le symbole « * » indique une différence entre les deux réplicats. En bleu, un seul essai a été réalisé.

1.4.4 Capacité de détection des résistances

Les capacités de détection pour les gènes de résistance aux antibiotiques détectés par ce test sont présentées dans la **figure 69**. Elles ont été déterminées avec des points de gammes en duplicat pour 25 cibles et également pour 5 résistances qui ont été testées seulement une fois : *ermB* (NCTC 12201), *blaNDM* (isolat clinique 5CF), *blaSPM* (isolat clinique SPM), *blaCTX-M-9* (isolat clinique 23E) et *blaKPC* (isolat clinique KPC1).

Pour chaque pathogène testés, des gammes avec des quantités d'ADN comprises entre 5.10² et 1.10⁴ copies de génomes ont été analysées. Les copies de génomes indiquées dans la **figure 69** correspondent aux copies de génomes du pathogènes abritant la ou les résistance(s) aux antibiotiques ciblé(s). Des variations au niveau de la détection de ces cibles sont observées suivant les souches. Par exemple, pour le gène de résistance *ermB*, il est identifié une fois sur

deux à plus de 1.10^4 copies de génomes avec la souche NCTC 13379 et à 1.10^3 copies de génomes avec la souche NCTC 12201.

	1.10 ⁴ copies de génome	5.10 ³ copies de génome	1.10 ³ copies de génome	5.10 ² copies de génomes
<i>ermB</i> * (NCTC 13379)	<i>mecC</i> (M8912)	<i>ermB</i> (NCTC 12201)	<i>blaOXA-58</i> (NCTC 13305)	<i>blaOXA-23</i> (M10639)
		<i>vanA</i> (ATCC 700221)	<i>blaSHV</i> (isolat clinique KPC-1 et 10/134 , NCTC 13465)	<i>aad</i> (DSM 105182, NCTC 13462)
		<i>mecA</i> (USA 300 JE2)	<i>aac(6')Ib</i> (isolat clinique KPC-1 et 10/134)	<i>blaCTX-M-2</i> (NCTC 13462)
		<i>blaIMI</i> (NCTC 13925)	<i>blaOXA-1</i> (isolat clinique 10/134 et 26E)	<i>blaSPM</i> (isolat clinique SPM)
		<i>aph2</i> (isolat clinique 8EC)	<i>blaVIM</i> (NCTC 13437, isolat clinique 5CF)	<i>blaCTX-M-1</i> (M12958)
		<i>ermF</i> (M/7021)	<i>blaOXA-10</i> (NCTC 13437)	<i>blaCTX-M-9</i> (isolat clinique 23E)
		<i>blaTetQ</i> (M/7021)	<i>aad</i> (NCTC 13437, isolat clinique 10/134)	<i>blaKPC</i> (isolat clinique KPC-1)
		<i>blaccrA</i> (M/7021)	<i>blaIMP</i> (isolat clinique IMP)	
		<i>qnrS</i> (NCTC 13439)	<i>blaACC</i> (isolat clinique 26E)	
		<i>qnrA</i> (isolat clinique 26E et 5CF)		
		<i>vanB</i> (NCTC 13379)		
		<i>blaNDM</i> (isolat clinique 5CF)		

Figure 69 : Capacité de détection des gènes de résistance (panel 3)

Le symbole « * » indique une différence entre les deux réplicats. En bleu, un seul essai a été réalisé.

1.5 Infections polymicrobiennes

1.5.1 Liste des combinaisons de pathogènes les plus significatives

Les infections du sang peuvent être aussi occasionnées par plusieurs pathogènes. Une liste des combinaisons de pathogènes les plus significatives au sein de l'hôpital d'Hasselt a été réalisée (**tableau 35**).

Tableau 35 : Combinaisons de pathogènes les plus significatives dans les cas d'infections polymicrobiennes

Source de la bactériémie	Pathogène le plus fréquemment isolé	Pathogène(s) associé(s)
Intra-abdominal (Intestin)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus spp. / Enterococcus faecalis</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacteroides spp. / Bacteroides fragilis</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus spp. / Streptococcus agalactiae / Streptococcus mitis (Sauf Streptococcus pyogenes ou Streptococcus dysgalactiae)</i>
Appareil urinaire	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus spp. / Enterococcus faecalis</i>
Dispositif intravasculaire	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa / Pseudomonas spp.</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Peau et tissus mous	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes / Streptococcus dysgalactiae</i>

1.5.2 Détection de ces combinaisons par le test développé

Des combinaisons répondant aux critères précédents ont donc été testées avec des espèces cibles mais également des espèces de validation (**tableau 36**). Dans le cas où les deux pathogènes de la combinaison sont à quantité égale (environ 10^4 copies de génome), 72% (13/18) des combinaisons sont détectées. En cas de déséquilibre entre les pathogènes (*Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus* à 10^5 copies de génome et les autres 100 fois moins présent), 53% (9/17) des combinaisons sont détectées. Pour cette dernière condition, trois résultats n'ont pas pu être obtenus car les images des puits de la biopuce étaient inexploitables, des traces de réactifs résiduels se trouvant sur la matrice, au milieu des puits.

En cas de déséquilibre entre les pathogènes de la combinaison, les pathogènes du genre *Pseudomonas spp.* ne sont pas identifiés par le logiciel. En effet, les signaux pour la reconnaissance du genre *Pseudomonas spp.* se situent sur des sondes communes à *Escherichia coli* et en présence d'une forte quantité d'*Escherichia coli*, la reconnaissance des espèces du genre *Pseudomonas spp.* est perturbée. Le logiciel est également capable de distinguer les espèces cibles des espèces de validation testées, même dans le cas d'infections polymicrobiennes.

Tableau 36 : Evaluation de la détection des pathogènes dans le cadre d'infections polymicrobiennes par le test développé

En vert : Reconnaissance des deux pathogènes présents dans la combinaison et orange : Reconnaissance d'un seul pathogène présent dans la combinaison. Dans le cas de quantités similaires, environ 10^4 copies de génome de chaque pathogène ont été introduites dans le mélange de PCR, tandis que dans le cas de quantités déséquilibrées *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ont été introduit en excès soit à environ 10^5 copies de génome et les autres pathogènes à environ 10^3 copies de génome (soit 100 fois moins). Les espèces cibles sont indiquées, les espèces « de validation » sont quant à elles identifiées avec le genre bactérien.

Combinaison testée	Cible identifiée (quantité similaire)	Cible identifiée (quantité déséquilibrée)
<i>Escherichia coli</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus durans</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus spp.</i>	Problème durant le protocole d'hybridation
<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus hirae</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus spp.</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus spp.</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Bacteroides spp.</i>	Problème durant le protocole d'hybridation
<i>Escherichia coli</i> + <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Parabacteroides distasonis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus mitis</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus mitis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Pseudomonas otitidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Problème durant le protocole d'hybridation	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp <i>dysgalactiae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus spp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp <i>equimilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp <i>equimilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp <i>equimilis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus spp.</i>

2 Validation analytique

La validation analytique a consisté à tester sur les deux plateformes, (1) *SelectNA plus* / *PathoRobot*, thermocycleur, *AXObot* et (2) *Pathodoc*, des échantillons de sang artificiellement contaminés avec une quantité donnée d'un pathogène connu. Un total de 57 souches bactériennes a été sélectionné pour la validation analytique (**tableau 37**). Ces souches ne permettent pas de couvrir la totalité des cibles du test mais 70% (38/54) des pathogènes, 5 espèces « de validation » et 100% des résistances ont été analysés.

Tableau 37 : Pathogènes utilisés au cours de la validation analytique des deux plateformes

Référence	Pathogène	Résistance
Isolat clinique(GIM)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>blaGIM, aac(6')-lb, aad, blaOXA-24</i>
M/10639	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>blaOXA-23, blaPER</i>
NCTC 13305	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>blaOXA-58</i>
M/7021	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>blaccrA, tetQ, ermF</i>
DSM 2079	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	-
M/8495	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
DSM 4593	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-
DSM 4595	<i>Citrobacter koseri</i>	-
M/8480	<i>Clostridium perfringens</i>	-
DSM 7534	<i>Clostridium septicum</i>	-
DSM 30053	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-
NCTC 13925	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaIMI</i>
Isolat clinique (5CF)	<i>Enterobacter cloacae complexe</i>	<i>blaNDM-1, qnrA6, blaCMY, aac(6')-lb, aad, blaCTX-M-1, blaOXA-10, blaTEM, blaVIM, qnrB</i>
Isolat clinique (8EC)	<i>Enterobacter cloacae complexe</i>	<i>qnrB6, aph2, blaTEM, blaCTX-M-1, blaVIM, aad, aac(6')-lb</i>
isolat clinique (ACT-9)	<i>Enterobacter cloacae complexe</i>	<i>blaACT</i>
NCTC 12201	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB, vanA</i>
NCTC 13379	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB, vanB</i>
DSM 20477	<i>Enterococcus faecium</i>	-
Isolat clinique (23E)	<i>Escherichia coli</i>	<i>blaCTX-M-9</i>
DSM 105182	<i>Escherichia coli</i>	<i>aad, blaTEM, mcr1</i>
NCTC 13462	<i>Escherichia coli</i>	<i>aad, blaCTX-M-2, blaTEM</i>
NCTC 13476	<i>Escherichia coli</i>	<i>blaIMP, aac(6')-lb</i>
DSM 21784	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-
DSM 15643	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-
DSM 4690	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
Isolat clinique (26384)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-

Isolat clinique (KPC-1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaKPC-1, aac(6')-Ib, SHV</i>
M/12958	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>aac(6')-Ib, blaSHV, blaTEM, blaOXA-48, blaOXA-1, blaCTX-M-1</i>
NCTC 13439	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV-36, aac(6')-Ib, qnrS, blaVIM</i>
NCTC 13465	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV-11, blaTEM, blaCTX-M-26</i>
Isolat clinique (10/134)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaDHA-1, aac(6')-Ib, aad, blaCTX-M-1, blaOXA-1, blaSHV</i>
DSM 20600	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
DSM 9143	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
DSM 6675	<i>Morganella morganii</i>	-
DSM 44256	<i>Mycobacterium avium</i>	-
M/14654	<i>Neisseria meningitidis</i>	-
DSM 20514	<i>Prevotella bivia</i>	<i>tetQ</i>
DSM 7089	<i>Prevotella melaninogenica</i>	-
M/11726	<i>Propionibacterium acnes</i>	-
ATCC 14153	<i>Proteus mirabilis</i>	-
DSM 4544	<i>Proteus penneri</i>	-
DSM 123387	<i>Proteus vulgaris</i>	-
M/7298	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>blaSPM-1</i>
NCTC 13437	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>aad, blaOXA-12, blaVEB, blaVIM</i>
DSM 4166	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
ATCC 19430	<i>Salmonella enterica subsp. enterica sv. typhi</i>	-
DSM 30121	<i>Serratia marcescens</i>	-
DSM 4782	<i>Shigella flexneri</i>	-
M/8912	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecC</i>
USA300 JE2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecA</i>
DSM 17058	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
M/4647	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
M/13989	<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	-
DSM 12643	<i>Streptococcus mitis</i>	-
ATCC 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
DSM 20565	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
DSM 20567	<i>Streptococcus sanguinis</i>	-

Un résumé de la validation analytique pour les deux plateformes est présenté dans la **figure 70**.

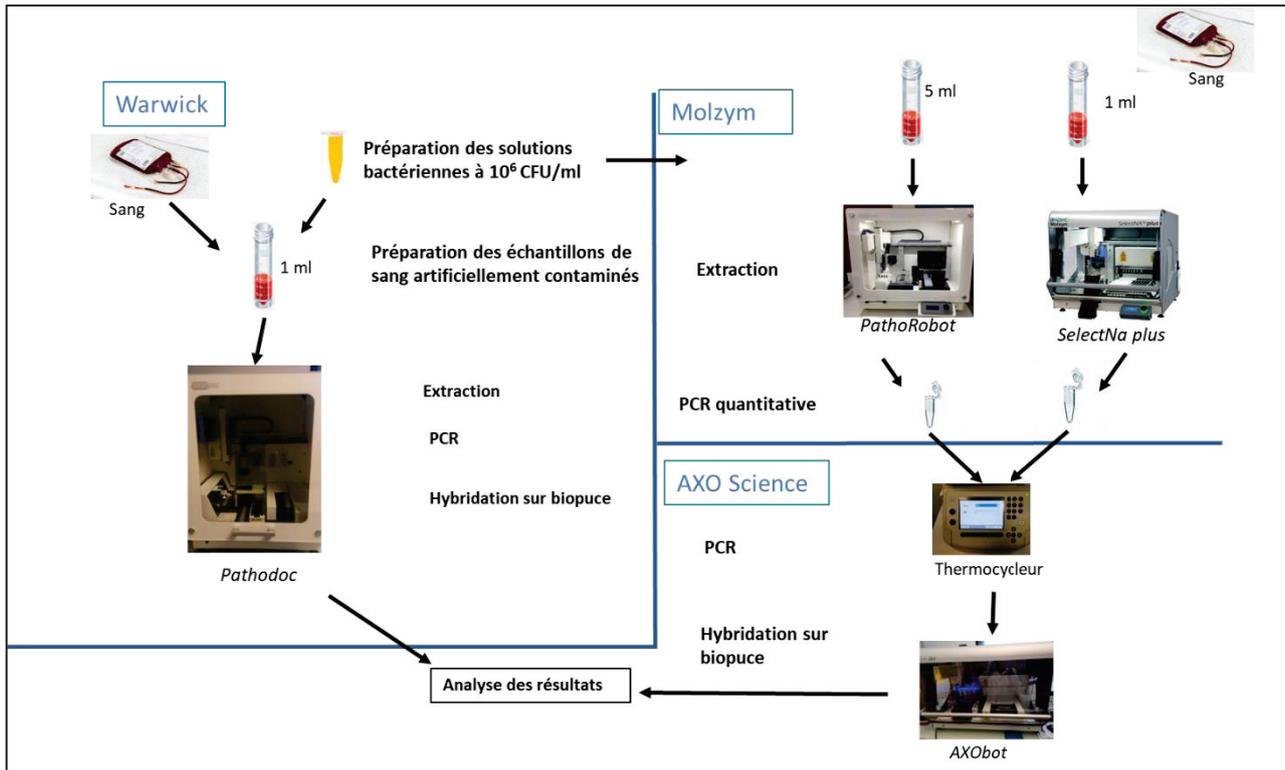


Figure 70 : Validation analytique des deux plateformes : *Pathodoc* et *SelectNA plus/Pathorobot*, thermocycleur, *AXObot*

2.1 Validation analytique du *Pathodoc* (Plateforme 2)

2.1.1 Déroulé de la validation analytique du *Pathodoc*

La validation analytique du *Pathodoc* s'est déroulée au sein de l'université de Warwick. Au moment de la rédaction de ce manuscrit, la validation analytique est toujours en cours et 14 souches restent à tester.

Trois *Pathodoc* ont été initialement développés pour ce projet. La reproductibilité des résultats d'un test sur les différentes machines a été évaluée et un *Pathodoc* a été retiré immédiatement car ses performances étaient en deçà des deux autres. Des paramètres tels le prélèvement et la distribution des réactifs ou la température lors des différentes étapes de chauffage ont été évalués mais aucune raison pouvant expliquer ces différences n'a été trouvée. La validation analytique a donc été effectuée sur deux *Pathodoc* nommés *Pathodoc 2* et *Pathodoc 3*. Le *Pathodoc 3* ayant rencontré des problèmes techniques au cours de la validation clinique, les échantillons ont fini par être testés uniquement sur le *Pathodoc 2*. Pour chacun des deux *Pathodoc*, les échantillons de sang ont été contaminés avec une quantité de 10^3 UFC/ml.

Suivant les résultats obtenus, une deuxième contamination des échantillons de sang a été réalisée, avec le même pathogène, soit à 10^4 UFC/ml ou 10^2 UFC/ml. Pour chaque pathogène présent dans **tableau 37**, quatre résultats sont donc attendus.

Un exemple des résultats obtenus est présenté dans le **tableau 38**. Le panel 2 comporte une sonde pour l'identification d'un contrôle d'extraction permettant d'attester du bon déroulé du protocole d'extraction. Au cours de la validation analytique, l'intensité moyenne des signaux relevée pour le contrôle d'extraction est de 14,3 ua (écart type 4,4 ua). Seuls deux échantillons testés parmi tous ceux de la validation analytique du *Pathodoc*, présentent une intensité pour le contrôle d'extraction qui est faible (75 et 108 ua). Pour l'isolat clinique 8EC aucun gène de résistance n'a pu être identifié. Pour NCTC 13439, deux gènes de résistance *aad* et *blaTEM* sur les quatre présents ont pu être identifié mais pas le pathogène. Un contrôle d'extraction faible n'est pas donc pas synonyme d'une absence de résultat. L'extraction doit cependant être moins optimale.

Pour l'échantillon NCTC 13925 (A) à une concentration de 10^4 UFC/ml, deux gènes de résistance en plus de *blaIMI* sont identifiés par le logiciel. Ces résultats sont surprenants car ces deux gènes de résistance ne sont pas présents dans la souche et un seul échantillon parmi les 4 réalisés avec le même tube de solution bactérienne présente ces résistances. Une contamination lors de la préparation de l'échantillon a donc été envisagée.

Des différences pour l'identification des cibles sont observées entre les *Pathodoc 2* et *3* alors que les échantillons sont dans les mêmes conditions. Par exemple, aucune résistance n'a pu être identifiée pour l'échantillon de sang contenant *Enterococcus faecalis* NCTC 13379 pour le *Pathodoc 3* alors qu'elles ont été totalement ou partiellement identifiées pour le *Pathodoc 2*. Ces variations existent également au sein d'un même *Pathodoc*. Par exemple, pour des échantillons contenant la souche de *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13439, le pathogène est identifié à 10^2 UFC/ml seulement dans un cas sur les deux. Il est possible que cette variation dans la détection soit due au fait que la limite de détection de cette cible soit proche de la concentration testée (10^2 UFC/ml). Et finalement, dans de rares cas comme par exemple pour *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13439, des gènes de résistance peuvent être identifiés alors qu'aucun pathogène n'a pu être identifié. Les limites de détections peuvent donc être différentes entre gènes de résistance et pathogènes.

Tableau 38 : Exemple de résultats obtenus lors de la validation analytique du *Pathodoc*

Une identification correcte de la cible est indiquée en vert alors qu'une identification « partielle » est indiquée en orange, c'est-à-dire une identification uniquement au niveau du genre bactérien pour les pathogènes ou une identification d'une partie seulement des gènes de résistance. Une absence d'identification ou une identification erronée est indiquée en rouge. Un trait horizontal indique qu'aucune cible n'a été identifiée.

	Souche	Quantité (UFC/ml)	Pathogène	Résistance	Pathogène identifié	Résistance identifiée
Pathodoc 2	NCTC 13439	10 ²	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV-36, aac(6)-Ib, qnrS, blaVIM</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV, aac(6)Ib</i>
	NCTC 13439	10 ³	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV-36, aac(6)-Ib, qnrS, blaVIM</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV, aac(6)Ib, qnrS, blaVIM</i>
	NCTC 13439	10 ²	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV-36, aac(6)-Ib, qnrS, blaVIM</i>		<i>blaSHV, aac(6)Ib</i>
	NCTC 13439	10 ³	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV-36, aac(6)-Ib, qnrS, blaVIM</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV, aac(6)Ib, qnrS, blaVIM</i>
	Isolat clinique	10 ²	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaKPC, blaSHV, aac(6)Ib</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaKPC, blaSHV, aac(6)Ib</i>
	Isolat clinique	10 ³	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaKPC, blaSHV, aac(6)Ib</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaKPC, blaSHV, aac(6)Ib</i>
	Isolat clinique	10 ⁴	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaKPC, blaSHV, aac(6)Ib</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaKPC, blaSHV, aac(6)Ib</i>
	NCTC 13379	10 ³	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB, vanB</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanB</i>
	NCTC 13379	10 ⁴	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB, vanB</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB, vanB</i>
	DSM 4166	10 ²	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	<i>Pseudomonas spp.</i>	-
	DSM 4166	10 ³	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	<i>Pseudomonas spp.</i>	-
	NCTC 13925 (A)	10 ³	<i>Enterobacter cloacae complexe</i>	<i>blaIMI</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
	NCTC 13925 (A)	10 ⁴	<i>Enterobacter cloacae complexe</i>	<i>blaIMI</i>	-	<i>blaIMI, aad, blaTEM</i>
	NCTC 13925 (B)	10 ³	<i>Enterobacter cloacae complexe</i>	<i>blaIMI</i>	-	<i>blaIMI</i>
	NCTC 13925 (B)	10 ⁴	<i>Enterobacter cloacae complexe</i>	<i>blaIMI</i>	-	-
	NCTC 13439	10 ²	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV-36, aac(6)-Ib, qnrS, blaVIM</i>	<i>blaSHV-36, aac(6)-Ib, qnrS, blaVIM</i>	<i>blaSHV, aac(6)Ib</i>
Isolat clinique 8EC	10 ³	<i>Enterobacter cloacae complexe</i>	<i>qnrB6, aph2, blaTEM, blaCTX-M-1,</i>	-	-	
DSM 4166	10 ²	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	<i>Pseudomonas spp.</i>	-	
DSM 4166	10 ³	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	<i>Pseudomonas spp.</i>	-	
NCTC 13379	10 ³	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB, vanB</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	
NCTC 13379	10 ⁴	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB, vanB</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	
Isolat clinique blaKPC1	10 ²	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaKPC, blaSHV, aac(6)Ib</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>blaSHV</i>	
NCTC 13462	10 ²	<i>Escherichia coli</i>	<i>aad, blaCTX-M-2, blaTEM</i>	-	-	
NCTC 13462	10 ³	<i>Escherichia coli</i>	<i>aad, blaCTX-M-2, blaTEM</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>blaCTX-M-2</i>	
DSM 12643	10 ²	<i>Streptococcus mitis</i>	-	<i>Streptococcus mitis</i>	-	
DSM 12643	10 ³	<i>Streptococcus mitis</i>	-	<i>Streptococcus spp.</i>	-	
Pathodoc 3						

2.1.2 Performances du *Pathodoc*

Sur les 43 souches testées, 76% (42/56) des échantillons testés avec le *Pathodoc* 3 ont été identifiés par le logiciel contre 80% (93/117) pour le *Pathodoc* 2. Concernant les gènes de résistance, 62% (37/60) des échantillons testés par le *Pathodoc* 3 ont été identifiés par le logiciel contre 50% (105/211) pour le *Pathodoc* 2. Les résultats sont comparables entre les deux *Pathodoc* mais l'identification des résistances est moins performante avec le *Pathodoc* 2.

En accord avec les observations réalisées dans le **chapitre 5**, les échantillons contaminés avec le pathogène *Shigella spp.* sont identifiés par le logiciel en tant que *Escherichia coli*. De même, dans 17% (3/18) des cas, des pathogènes appartenant à la famille *Enterobacter cloacae complexe* ont été identifiés en tant qu'*Enterobacter cloacae*. Cela confirme les observations faites avec de l'ADN extrait à partir de souches bactériennes.

La **figure 71** présente les capacités de détection des pathogènes, obtenue au cours de la validation analytique du *Pathodoc*. Des résultats différents sont observés pour différentes souches d'un même pathogène (Exemple pour *Acinetobacter baumannii* ou *Klebsiella pneumoniae*). Deux explications peuvent être avancées :

- Ces différences peuvent peut-être s'expliquer par un nombre de copies du gène codant pour l'ARN 16S différent suivant les souches de ce pathogène et entraînant des variations dans l'intensité des signaux.
- La séquence de l'amplicon issu de la PCR est différente suivant les souches entraînant un signal variant au niveau de son intensité sur les sondes.

Les souches *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 13437), *Enterococcus faecalis* (NCTC 13379 et NCTC 12201) et *Acinetobacter baumannii* (isolat clinique GIM) n'ont pas été testées à des concentrations de 10^2 UFC/ml, tandis que les autres souches n'ont pas été testées à des concentrations inférieures à 10^2 UFC/ml.

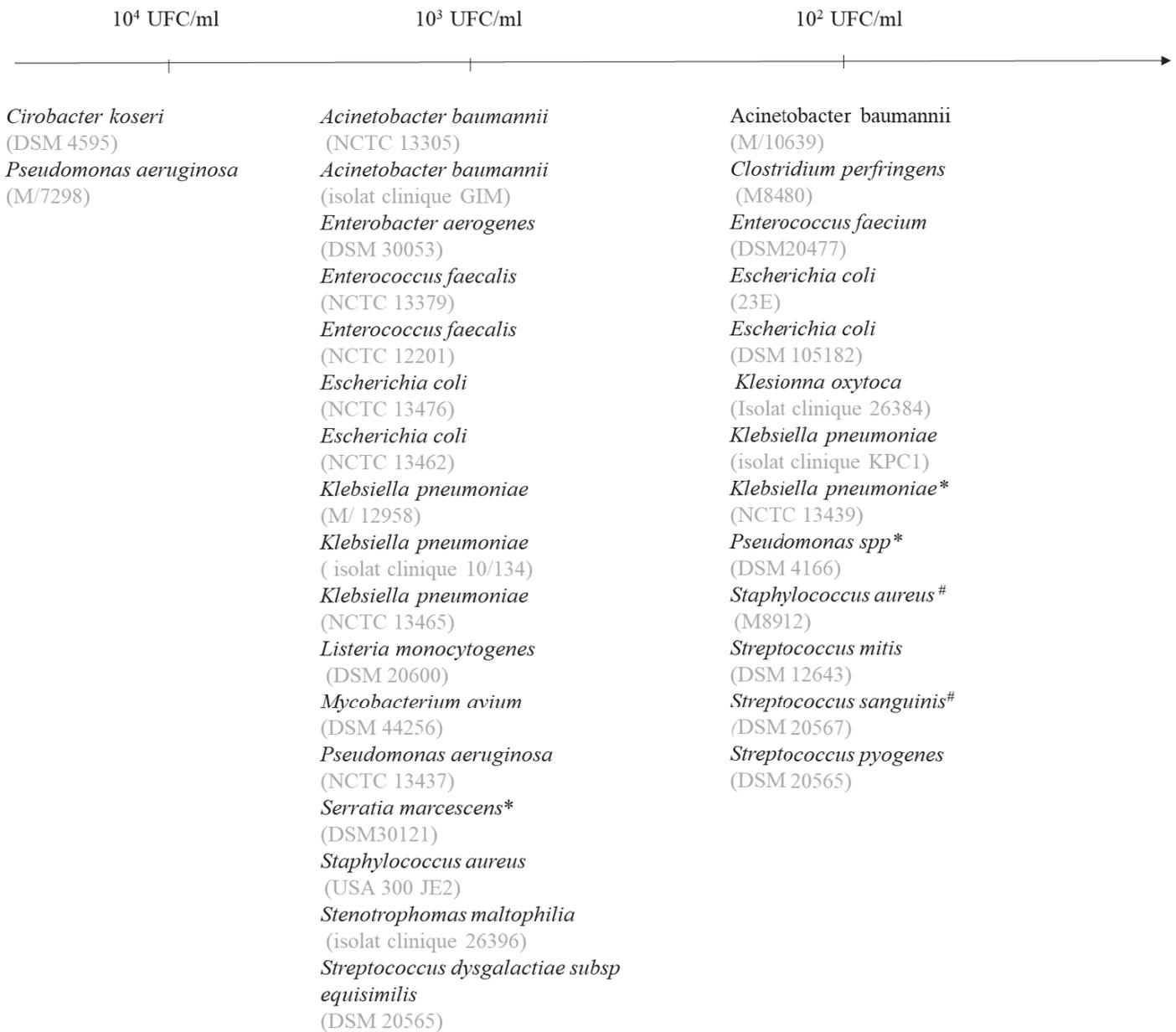


Figure 71 : Capacité de détection observée pour les pathogènes testés lors de la validation analytique du *Pathodoc*

* : Résultats obtenus une fois sur deux, sur le même *Pathodoc* (*Pathodoc 2*)

: Résultats obtenus une fois sur deux, sur deux *Pathodoc* différents

La **figure 72** présente la capacité de détection observée pour les gènes de résistance.



Figure 72 : Capacité de détection observée pour les gènes de résistance testés lors de la validation analytique du *Pathodoc*

*: Résultats obtenus une fois sur deux, sur le même *Pathodoc* (*Pathodoc 2*)

: Résultats obtenus une fois sur deux, sur deux *Pathodoc* différents

Les gènes de résistance *blaCMY*, *qnrA*, *qnrB*, *blaDHA*, *blaACT*, *blaGIM* et *blaOXA-24* et *tetQ* n'ont pas été détectés aux concentrations testées. Le gène de résistance *blaTEM* a seulement été détecté dans 2 cas sur 24. Comme pour les pathogènes, des différences au niveau de la sensibilité de détection sont observées pour des gènes de résistance présents dans différentes souches, comme par exemple *aac(6')-lb* et *aad*. De plus, des différences sont également observées suivant le *Pathodoc* utilisé, pour plusieurs gènes de résistance comme *aph2*, *blaKPC* et *blaIMP*, qui sont détectés à une concentration inférieure pour le *Pathodoc 2*,

par rapport au *Pathodoc 3*. Et finalement, pour deux pathogènes *Klebsiella pneumoniae* (M/12958) et *Enterobacter cloacae complexe* (Isolat clinique 8EC), le gène de résistance *aac(6')-Ib* notamment n'a pas été détecté alors que la détection de cette cible au cours des différents essais réalisés précédemment est importante (89%). Il est probable que la concentration utilisée pour la contamination des échantillons de sang avec ce pathogène soit inférieure à ce qui était prévu. En effet, les contaminations artificielles des échantillons de sang ont été réalisées à partir de tube mère à 10^6 UFC/ml, cependant il est possible que la concentration du tube mère de ces deux souches soient inférieur d'un facteur 10 à 100.

2.1.3 Comparaison avec les résultats obtenus sur les souches

Les échantillons de sang étant d'un volume de 1 ml, il est possible de comparer les résultats obtenus en UFC/ml lors de la validation analytique des résultats obtenus en copies de génome sur les souches. Globalement, il existe une bonne corrélation entre les limites de détections obtenues lors de la validation analytique et lors des essais avec l'ADN extrait à partir des souches bactériennes. C'est le cas notamment les deux souches d'*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (souche USA 300 JE2), *Streptococcus dysgalctiae subsp equisimilis*, *Acinetobacter baumannii* (souche M/10639) ou encore *Escherichia coli* (souche DSM 105182 et 123E).

Cependant, il existe également des différences comme *Streptococcus pyogenes* par exemple, qui est identifié à une concentration de 10^2 CFU/ml lors de la validation analytique au sein du *Pathodoc*, contre près de 1.10^4 copies de génome avec de l'ADN extrait à partir de souches. Inversement, *Citrobacter koseri* est n'identifié qu'à partir d'une quantité dix fois plus importante (1.10^4 UFC/ml) lors de la validation analytique.

Concernant les gènes de résistance aux antibiotiques, des différences existent entre les capacités de détection observées pour les souches et lors de la validation analytique. En effet, les gènes de résistance *blaPER*, *blaVEB*, *blaTEM* sont par exemple identifiés à 10^4 UFC/ml pour la validation analytique alors que ces gènes de résistance ne l'étaient pas sur les souches. De même, les gènes de résistance de type CTX-M ont été détectés jusqu'à 10^2 copies de génome sur les souches contre 10^3 UFC/ml pour la validation analytique. Il existe finalement des gènes de résistance détectés à des quantités similaires comme *blaSHV*, *mecA*, *blaKPC* ou *qnrS*.

Ces différences dans les capacités de détection ne sont pas surprenantes. En effet, en plus de l'incertitude sur la détermination des copies de génome et l'utilisation de plateformes différentes, la présence d'une matrice comme le sang peut avoir un effet sur la détection des cibles.

2.2 Validation analytique pour la Plateforme 1 : *SelectNA plus* / *PathoRobot*, thermocycleur, *AXObot*

2.2.1 Etude préliminaire

Avant le début de la validation analytique avec les 57 souches sélectionnées, une étude préliminaire effectuée avec des souches n'appartenant pas à la liste des souches collectées pour le développement du test a été réalisée. Des échantillons de sang ont été artificiellement contaminés avec une quantité connue de souches données et les résultats sont présentés dans le **tableau 39**. Des combinaisons de différents pathogènes ont été testées dont *Candida albicans* qui n'est pas une cible.

Tableau 39 : Résultats de l'étude préliminaire réalisée avant la validation analytique sur la plateforme 1

Une identification correcte de la cible est indiquée en vert alors qu'une identification « partielle » est indiquée en orange, c'est-à-dire une identification uniquement au niveau du genre bactérien pour les pathogènes ou une identification d'une partie seulement des gènes de résistance. Une absence d'identification ou une identification erronée est indiquée en rouge. Un trait horizontal indique qu'aucune cible n'a été identifiée.

Pathogène et concentration utilisée	Identification par le test développé
<i>Escherichia coli</i> : 2,10 ⁵ UFC/ml	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> 2,10 ⁴ UFC/ml + <i>Staphylococcus aureus</i> 2,10 ⁴ UFC/ml + (<i>C. albicans</i> 2,10 ³ UFC/ml)	<i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i> 2,10 ³ UFC/ml + <i>Staphylococcus aureus</i> 2,10 ³ UFC/ml + (<i>C. albicans</i> 2,10 ² UFC/ml)	<i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i> 2,10 ² UFC/ml + <i>Staphylococcus aureus</i> 2,10 ² UFC/ml + (<i>C. albicans</i> 2,10 ¹ UFC/ml)	<i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i> 1,10 ³ UFC/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i> 2,10 ² UFC/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Moraxella catharrallis</i> 1,10 ³ UFC/ml	-
<i>Moraxella catharrallis</i> 1,10 ² UFC/ml	-
<i>Enterococcus faecalis</i> 1,10 ³ UFC/ml	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> 2,10 ² UFC/ml	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Escherichia coli</i> 1,10 ³ UFC/ml + <i>Enterococcus faecalis</i> 5,10 ³ UFC/ml	<i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1,10 ³ UFC/ml + <i>Staphylococcus aureus</i> 2,10 ² UFC/ml	<i>Pseudomonas spp.</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5,10 ³ UFC/ml	-

Les résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de la validation analytique du *Pathodoc* et tous les pathogènes ont été détectés, jusqu'à des concentrations de 10^2 UFC/ml, excepté *Moraxella catharrallis* et *Pseudomonas aeruginosa* qui n'ont pas pu être identifiés (ou partiellement) par le logiciel. Les pathogènes ont également pu être distingués dans le cas d'infections polymicrobiennes. Ces résultats concordent avec les essais précédemment réalisés et l'étude préliminaire sur la plateforme 1 est donc validée.

2.2.2 Déroulé de la validation analytique de la plateforme 1

La contamination artificielle des échantillons de sang ainsi que l'extraction des échantillons ont été effectuées au sein de Molzym puis les éluats ont été envoyés à AXO Science pour la suite des tests (**figure 70**). Les échantillons ont été extraits à la fois sur le *SelectNA plus* et sur le *PathoRobot*, le *SelectNA plus* servant de référence pour l'étape d'extraction, cette plateforme étant déjà validée et commercialisée. Les échantillons de sang ont été contaminés avec des concentrations variant entre 10^3 et 10^5 UFC/ml de souches, ces concentrations étant testées en duplicat. Les échantillons de sang destinés à être extraits sur le *PathoRobot* et le *SelectNA plus* ont étéensemencés avec des quantités équivalentes d'un pathogène donné (mais à des concentrations différentes), le volume de sang extrait étant différent entre les deux robots (1 ml pour le *SelectNa plus*, 5ml pour le *PathoRobot*). Un total de 34 pathogènes parmi ceux présents dans le **tableau 37** a été testé et pour chaque pathogène présent, quatre résultats sont attendus.

Au cours de la validation analytique de la plateforme 1, l'intensité moyenne des signaux relevée pour le contrôle d'extraction est de 41,6 ua (écart type : 14,1 ua). Seuls deux échantillons testés parmi tous ceux de la validation analytique, présentent une intensité pour le contrôle d'extraction qui est faible (106 et 146 ua). Le pathogène présent dans l'échantillon présentant un contrôle d'extraction à 106 ua a pu être identifié par le logiciel (*Streptococcus dygalactiae subsp equisimilis*) tandis que celui dont le contrôle d'extraction est à 146 ua n'a pas été identifié. Un exemple de résultats obtenus au cours de la validation analytique de la plateforme 1 est présenté dans le **tableau 40**. De manière générale, un nombre inférieur de pathogènes et de gènes de résistance sont identifiés par la plateforme 1 comparé au *Pathodoc*, alors que les concentrations de pathogènes utilisées pour la contamination des échantillons de sang est similaire voir légèrement supérieure.

Tableau 40 : Exemple de résultats obtenus lors de la validation analytique de la plateforme 1 (*SelectNa plus/PathoRobot*, thermocycleur, *AXObot*)

Une identification correcte de la cible est indiquée en vert alors qu'une identification « partielle » est indiquée en orange, c'est-à-dire une identification uniquement au niveau du genre bactérien pour les pathogènes ou une identification d'une partie seulement des gènes de résistance. Une absence d'identification ou une identification erronée est indiquée en rouge. Un trait horizontal indique qu'aucune cible n'a été identifiée. Les Ct sont obtenus après la réalisation des qPCR. Plus le Ct est élevé et plus la quantité d'ADN est faible.

	Souche	Quantité (UFC/ml)	Pathogène	Résistance	Ct	Pathogène identifié	Résistance identifiée
SelectNA plus	NCTC 13305	1,0.10 ⁵	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> OXA-58	30,6	-	-
	NCTC 13305	1,0.10 ⁵	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> OXA-58	31,62	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
	NCTC 12201	6,4.103	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB</i> , <i>vanA</i>	28,91	-	-
	NCTC 12201	6,4.103	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB</i> , <i>vanA</i>	26,31	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
	DSM 30121	1,2.10 ⁵	<i>Serratia marcescens</i>	-	Negatif	-	-
	DSM 30121	1,2.10 ⁵	<i>Serratia marcescens</i>	-	34,82	-	-
	DSM 20600	1,4.10 ⁵	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	27,48	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
	DSM 20600	1,4.10 ⁵	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	28,09	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
	M/8912	2,4.10 ⁴	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecC</i>	27,72	-	-
	M/8912	2,4.10 ⁴	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecC</i>	28,87	-	-
PathoRobot	NCTC 13305	2,0.10 ⁴	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> OXA-58	32,36	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
	NCTC 13305	2,0.10 ⁴	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> OXA-58	28,93	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
	NCTC 12201	1,3.10 ³	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB</i> , <i>vanA</i>	29,71	-	-
	NCTC 12201	1,3.10 ³	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermB</i> , <i>vanA</i>	29,41	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanA</i>
	DSM 30121	2,4.10 ⁴	<i>Serratia marcescens</i>	-	34,78	-	-
	DSM 30121	2,4.10 ⁴	<i>Serratia marcescens</i>	-	34,2	-	-
	DSM 20600	2,8.10 ⁴	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	33,64	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
	DSM 20600	2,8.10 ⁴	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	32,18	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
	M/8912	4,8.10 ³	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecC</i>	26,72	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
	M/8912	4,8.10 ³	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecC</i>	27,59	<i>Staphylococcus aureus</i>	-

2.2.3 Performances de la plateforme 1

La qualité de l'extraction a aussi été contrôlée par l'intermédiaire d'analyses qPCR réalisées à Molzym, sur des aliquots des éluats. De façon surprenante, pour 15% (21/136) des éluats, les qPCR sont négatives ou présentent un Ct très élevé (>35), indiquant ainsi une absence ou une quantité minimale d'ADN dans les éluats. Cette absence d'ADN dans les éluats pourrait permettre en partie d'expliquer l'absence de détection de quelques cibles,

Le **tableau 41** résume les performances obtenues pour la plateforme 1, selon les outils d'extraction utilisés en incorporant ou en excluant les échantillons dont les qPCR sont négatives.

Tableau 41 : Performances de la plateforme 1 au cours de la validation analytique et en incluant ou excluant les qPCR négatives
Les performances de la plateforme 2 sont indiquées dans ce tableau pour comparaison

	Plateforme 1				Plateforme 2	
	En incluant les qPCR négatives		En excluant les qPCR négatives		Pathodoc 2	Pathodoc 3
	PathoRobot	SelectNA plus	PathoRobot	SelectNA plus		
Pathogène	49% (39/79)	55% (43/78)	58% (37/63)	58% (42/73)	80% (93/117)	76% (42/56)
Gène de résistance	27% (30/113)	32% (36/113)	43% (30/69)	36% (36/99)	50% (105/211)	62% (37/60)

Les performances de la plateforme 1 sont inférieures à celles de la plateforme 2 (*Pathodoc*), cependant, elles sont très proches entre une extraction par le *PathoRobot* et une extraction par le *SelectNa plus*. Même en excluant les échantillons dont les qPCR sont négatives, l'identification des pathogènes s'est révélée correcte dans 58% des cas avec la plateforme 1 contre près de 80% pour la plateforme 2. De même, entre 36% et 43% des gènes de résistance sont identifiés avec la plateforme 1 contre 50% à 62% avec la plateforme 2.

Un nombre supérieur de qPCR négatives (5 contre 16) a été observé avec les éluats issus du *PathoRobot*. Ceci peut peut-être être expliqué par le fait que le *PathoRobot* est toujours en cours de développement et le protocole d'extraction n'est pas encore totalement optimisé sur ce robot.

La **figure 73** présente les capacités de détection des pathogènes obtenus au cours de la validation analytique de la plateforme 1. Un nombre inférieur de pathogènes est détecté comparé aux *Pathodoc*. Deux concentrations différentes n'ont pas été testées mais pour la

concentration testée, un seul échantillon sur les deux est souvent détecté. C'est le cas par exemple pour *Streptococcus mitis*, *Enterococcus faecalis* (souche NCTC 12201) ou *Staphylococcus aureus* (USA 300 JE2), ce qui peut indiquer que la limite de détection de ces cibles a été atteintes. Des différences existent au niveau de la détection entre les deux robots (par exemple *Escherichia coli* souche DSM 105182 non identifié avec le *PathoRobot*).

10 ⁵ UFC/ml	10 ⁴ UFC/ml	10 ³ UFC/ml	
<i>Morganella morganii</i> (DSM 6675)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (M/10639)	<i>Haemophilus influenzae</i> (DSM 4690)	<i>Staphylococcus aureus</i> * (USA 300 JE2)
<i>Streptococcus mitis</i> * (DSM 12643)	<i>Acinetobacter baumannii</i> * (M/10639)	<i>Klesionna oxytoca</i> (Isolat clinique 26384)	<i>Haemophilus influenzae</i> (DSM 4690)
<i>Acinetobacter baumannii</i> * (NCTC 13305)	<i>Enterococcus faecalis</i> * (NCTC 12201)	<i>Klesionna oxytoca</i> (Isolat clinique 26384)	<i>Staphylococcus aureus</i> (M8912)
<i>Escherichia coli</i> * (23E)	<i>Enterococcus faecalis</i> * (NCTC 12201)	<i>Streptococcus mitis</i> * (DSM 12643)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>subsp equisimilis</i> (DSM 20565)
<i>Streptococcus pyogenes</i> (DSM 20565)	<i>Escherichia coli</i> (DSM 105182)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> * (NCTC 13465)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>subsp equisimilis</i> * (DSM 20565)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC 13437)	<i>Acinetobacter baumannii</i> * (NCTC 13305)	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)	<i>Escherichia coli</i> * (23E)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> * (USA 300 JE2)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (DSM 20565)	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolat clinique 10/134)		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolat clinique 10/134)		

Figure 73 : Capacité de détection observée pour les pathogènes testés lors de la validation analytique de la plateforme 1

En noir résultats obtenus avec le *SelectNa plus*, en bleu résultats obtenus avec le *PathoRobot*

*: Résultats obtenus une fois sur deux.

Le *PathoRobot* extrait des échantillons de 5 ml

La **figure 74** présente la capacité de détection observée pour les gènes de résistance.

10 ⁵ UFC/ml	10 ⁴ UFC/ml	10 ³ UFC/ml
<i>blaOXA-10</i> (NCTC 13437)	<i>blaOXA-23*</i> (M/10639)	<i>vanA*</i> (NCTC 12201)
<i>aad</i> (NCTC 13437)	<i>blaOXA-23*</i> (M/10639)	<i>vanA</i> (NCTC 12201)
<i>blaVIM*</i> (NCTC 13437)	<i>PER*</i> (M/10639)	<i>blaKPC</i> (isolat clinique KPC1)
<i>blaCTX-M-9</i> (23E)	<i>aad</i> (DSM 105182, isolat clinique 10/134)	<i>SHV</i> (isolat clinique KPC1)
<i>mecA*</i> (USA 300 JE2)	<i>aac(6')Ib</i> (isolat clinique KPC1, 10/134)	<i>aac(6')Ib*</i> (isolat clinique KPC1)
	<i>SHV*</i> (isolat clinique KPC1, 10/134)	
	<i>blaOXA-10</i> (NCTC 13437)	
	<i>aad</i> (NCTC 13437)	
	<i>blaVIM</i> (NCTC 13437)	
	<i>blaOXA-1</i> (isolat clinique 10/134)	
	<i>blaCTX-M-9</i> (23E)	

Figure 74 : Capacité de détection observée pour les pathogènes testés lors de la validation analytique de la plateforme 1

En noir résultats obtenus avec le *SelectNa plus*, en bleu résultats obtenus avec le *PathoRobot*

*: Résultats obtenus une fois sur deux.

Le *PathoRobot* extrait des échantillons de 5 ml

Comme pour la détection des pathogènes, un nombre inférieur de gènes de résistance est détecté, comparé aux *Pathodoc*.

2.2.4 Raisons possibles pouvant expliquer les résultats obtenus sur la plateforme 1

Les résultats obtenus pour la validation analytique de la plateforme 1 sont inférieurs à ceux obtenus pour la validation analytique de la plateforme 2 et avec ceux obtenus avec de l'ADN extrait à partir de souches bactériennes. Ces résultats inférieurs concernent également le *SelectNA plus* qui est un robot d'extraction déjà commercialisé et ne correspondent pas à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

Une hypothèse par rapport à ces résultats a donc été émise concernant la concentration bactérienne des solutions mères des souches utilisées pour contaminer artificiellement les échantillons de sang. Ces souches ont en effet été préparées et envoyées par l'Université de Warwick à une concentration de 10^6 UFC/ml or, après contrôle au sein de Molzym, les concentrations des souches bactériennes se sont avérées être entre 100 et 10 000 fois inférieures à celles attendues. La contamination des échantillons de sang par certaines souches bactériennes a donc très certainement été effectuée à des concentrations trop faibles pour que les cibles soient identifiées par le test. Un doute existe donc quant aux limites de détection des cibles déterminées avec la plateforme 1.

3 Validation préclinique

La validation préclinique a consisté à tester à l'aveugle des échantillons de sang de patients collectés au sein de l'Hôpital de Hasselt (Belgique) et à établir un diagnostic. Au total, quatre catégories d'échantillons de patients ont été testés et le déroulé de la validation préclinique est présenté dans la **figure 75**.

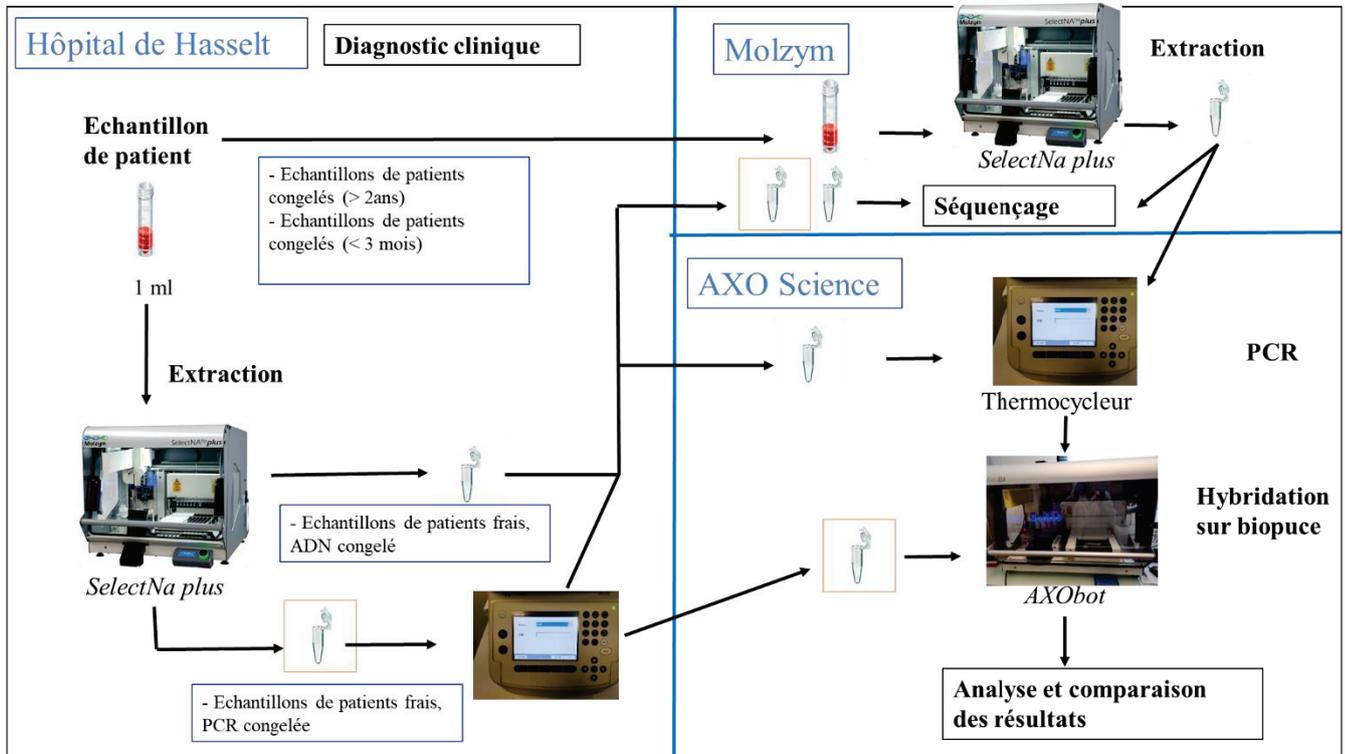


Figure 75 : Validation préclinique de la plateforme haut-débit *SelectNA plus*, thermocycleur et *AXObot*

3.1 Définition de la qualification des échantillons

Le but de la validation préclinique et de comparer les diagnostics obtenus avec les résultats obtenus par les méthodes cliniques utilisées au sein des hôpitaux partenaires (Hôpital de Hasselt et de Zagreb). Les résultats de séquençage obtenus sur les éluats après extraction permettent d'effectuer un contrôle en cours de processus et de donner une indication sur la validité de l'échantillon.

Un échantillon est considéré comme positif quand le pathogène identifié est une cible du test. En cas de présence d'un pathogène non identifié par le test, cet échantillon sera considéré comme négatif, car ne pouvant pas être identifié avec le logiciel d'analyse.

Un échantillon est considéré comme un vrai négatif quand le résultat est négatif pour le diagnostic clinique, pour le séquençage et pour le test développé. Un échantillon est considéré comme un vrai positif quand le résultat est positif (cible) pour le diagnostic clinique, pour le séquençage et pour le test développé. Un échantillon est considéré comme un faux positif quand le résultat est négatif pour le diagnostic clinique et pour le séquençage mais positif pour le test et finalement, un échantillon est considéré comme un faux négatif quand le résultat pour le diagnostic clinique et le séquençage sont positifs mais négatif pour le test.

Les échantillons pour lesquels le diagnostic clinique est positif mais le séquençage est négatif ont été retirés de l'étude, soit environ 40% des échantillons. En effet, il est impossible de conclure quant à la validité du diagnostic proposé par le test, si, après extraction, il n'est pas possible de confirmer la présence de l'ADN de la cible.

Lors de la validation préclinique, la valeur moyenne de l'intensité du contrôle d'extraction est de 26 ua (écart-type : 8,4 ua). Seul un échantillon testé parmi tous ceux de la validation analytique présente une intensité pour le contrôle d'extraction qui est faible (130 ua). Celui-ci a été retiré de l'analyse.

3.2 Tests avec des échantillons de patients congelés

3.2.1 Déroulé de la validation préclinique sur les échantillons de patients congelés

Les premiers tests réalisés pour la validation préclinique ont été effectués sur des échantillons de sang de patients congelés au début du projet (au moins deux ans d'ancienneté). Les échantillons de patients ont été envoyés à Molzym qui les a extraits (majoritairement sur le *PathoRobot*). Un aliquot de l'éluat a été utilisé pour réaliser une PCR suivie d'un séquençage et le reste de l'éluat a été envoyé à AXO Science. Un total 53 échantillons ont été analysés (35 échantillons négatifs et 18 échantillons positifs) dont 8 qui ont été extraits en parallèle sur le *SelectNA plus* et le *PathoRobot*.

3.2.2 Performances du test

Un aperçu des résultats obtenus sur ces échantillons est présenté dans le **tableau 42**.

Peu d'échantillons positifs en clinique le sont également lors du séquençage des éluats obtenus (3/18). Le plus souvent, le diagnostic de ces échantillons obtenu avec le test développé est également négatif mais parfois un pathogène identifié par le logiciel correspond à la cible identifiée lors du diagnostic clinique. Un seul échantillon a vu son diagnostic confirmé par les trois méthodes.

Tableau 42 : Résultats obtenus pour la validation préclinique de la plateforme 1, avec des échantillons de sang congelés et anciens. En bleu, résultats négatifs pour les cibles détectées par le test développé et en rouge résultats positifs. Un trait horizontal signifie qu'il n'y a pas de donnée disponible. Les Ct obtenus après la réalisation des qPCR au sein de Molzym ainsi que le pourcentage d'identité trouvé lors du séquençage sont également indiqués.

Echantillons	Diagnostic clinique		Diagnostic à Molzym <i>SelectNA plus</i>				Diagnostic à AXO Science (Test)		Diagnostic à Molzym <i>PathoRobot</i>				Diagnostic à AXO Science (Test)	
	Pos/neg	Résultat	Pos/neg	Ct	Séquençage	Identité (%)	Pos/neg	Résultat	Pos/neg	Ct	Séquençage	Identité (%)	Pos/neg	Résultat
FAPIC044	Négatif	-	Négatif	-	-	-	Positif (Pas une cible)	-	-	36, 24	<i>Austropallene cornigera / Malassezia restricta</i>	100	Négatif	-
FAPIC069	Négatif	-	Négatif	-	-	-	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-
FAPIC093	Négatif	-	Positif (Pas une cible)	34	<i>Staphylococcus hominis</i>	100	Négatif	-	Négatif	33	<i>Malassezia restricta</i>	99,19	Négatif	-
FAPIC140	Négatif	-	Positif (Pas une cible)	34, 41	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	98,7	Négatif	-	Négatif	-	-	-	Négatif	-
FAPIC152	Négatif	-	Négatif	-	-	-	Négatif	-	-	-	<i>Propionibacterium acnes</i>	97,9	Négatif	-
FAPIC153	Négatif	-	Négatif	-	-	-	Négatif	-	-	-	<i>Propionibacterium acnes + Arcanobacterium haemolyticum</i>	100 / 99,4	Négatif	-
FAPIC154	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	-	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-
FAPIC168	Négatif	-	Positif (Pas une cible)	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	100	Positif	Klebsiella pneumoniae	Positif (Pas une cible)	-	<i>Staphylococcus lugdunensis / Staphylococcus hominis</i>	100	Négatif	-
FAPIC178	Négatif	-	Positif (Pas une cible)	-	<i>Peptoniphilus harei strain + Peptoniphilus</i>	94,8 + 100	Négatif	-	Négatif	35, 16	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,8	Négatif	-

FAPIC198	Positif	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Positif (Pas une cible)	34, 3	<i>gorbachii / Peptoniphilus grossensis</i>	99,8	Négatif	-	Négatif	-	Négatif	-	-
FAPIC212	Positif (Pas une cible)	<i>Candida tropicalis</i>	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	-
FAPIC214	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	-
FAPIC216	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	-
FAPIC221	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	-
FAPIC225	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	-	Positif	26, 45	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	Négatif
FAPIC226	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	Positif	32, 27	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	Négatif
FAPIC246	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus hominis</i>	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-	-	-	Négatif
FAPIC260	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-	-	-	Négatif
FAPIC263	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-	-	-	Négatif
FAPIC269	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-	-	-	Négatif
FAPIC280	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	-	Négatif	-	-	-	Négatif
FAPIC283	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	35, 69	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	-	-	Négatif	-	-	-	Négatif
FAPIC290	Négatif	-	Positif (Pas une cible)	29, 48	<i>Polyporales</i>	-	-	-	Négatif	-	-	-	Négatif
FAPIC291	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	Négatif	-	Positif (Pas une cible)	-	<i>Bacillus subtilis</i>	100	Négatif
FAPIC292	Positif	<i>Streptococcus</i>	Négatif	-	-	-	-	-	Positif	-	<i>Fusobacterium nucleatum +</i>	100 / 100	Négatif

FAPIC434	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	Négatif	-
FAPIC440	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	100	Négatif	-
FAPIC454	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	Négatif	-
FAPIC461	Positif	<i>Morganella morganii</i>	Négatif	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	Négatif	-
FAPIC464	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	Négatif	-	Positif (Pas une cible)	99	Négatif	-
FAPIC478	Positif	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	Positif	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
FAPIC487	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	Négatif	-
FAPIC494	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Négatif	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	Négatif	-
FAPIC499	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	29, 03	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	Positif	Staphylococcus aureus	26, 45	Positif	100	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>
FAPIC500	Négatif	-	Négatif	-	-	-	-	Négatif	-	Négatif	-	Négatif	-

Les résultats de la validation préclinique sont les suivants :

Pour une extraction avec le *SelectNA plus*

- Vrai négatif: 43% (3/7)
- Vrai positif : 14% (1/7)
- Faux positif : 29% (2/7)
- Faux négatif : 14% (1/7)

Pour une extraction avec le *PathoRobot*

- Vrai négatif :87,5% (35/40)
- Vrai positif : 2,5% (1/40)
- Faux positif : 5% (2/40)
- Faux négatif : 5% (2/40)

Environ 15% des échantillons testés en clinique sont habituellement positifs. Les résultats obtenus avec le *PathoRobot* sont bien en deçà. Ceci peut s'expliquer par le nombre d'échantillons positifs en clinique qui ont été retirés de l'analyse, à cause des résultats de séquençage qui étaient négatifs. Afin d'expliquer le nombre d'échantillons positifs en clinique qui n'ont pas été détectés avec le test, une hypothèse est émise sur l'ancienneté des échantillons. En effet, ces échantillons de sang ont été collectés plus de deux ans auparavant (courant 2017) et même en présence de glycérol, les bactéries ont pu être dégradées, ce qui a pu entraîner un faible rendement au niveau de l'extraction

3.3 Tests avec des échantillons de patient congelés de moins de trois mois

Afin de vérifier si l'ancienneté des échantillons de sang de patients pouvait expliquer les résultats précédents, 8 échantillons de patients congelés et datant de moins de trois mois ont été analysés. Ces échantillons ont été collectés au sein de l'hôpital de Hasselt et sont positifs pour une cible détectée par le test. Les échantillons ont été envoyés à Molzym pour extraction puis un aliquot des éluats obtenus a été séquencé, le reste des aliquots a ensuite été envoyé à AXO Science. Les résultats sont présentés dans le **tableau 43**.

Tableau 43 : Résultats obtenus pour les 8 échantillons de patients congelés dont l'ancienneté est inférieure à 3 mois

En bleu, résultats négatifs pour les cibles détectées par le test développé et en rouge résultats positifs. Un trait horizontal signifie qu'il n'y a pas de donnée disponible. Le pourcentage d'identité trouvé lors du séquençage est également indiqué.

Echantillons	Diagnostic clinique		Diagnostic à Molzym			Diagnostic à AXO Science (Test)		Diagnostic à Molzym			Diagnostic à AXO Science (Test)	
	Pos/neg	Résultat	Pos/neg	Séquençage	Identité (%)	Pos/neg	Résultat	Pos/neg	Séquençage	Identité (%)	Pos/neg	Résultat
FAPIC0446	Positif	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Négatif	-	-	Negative	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC0461	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Positif	<i>Escherichia coli</i>	100	Negative	-	Positif	<i>Escherichia coli</i>	100	Négatif	-
FAPIC0529	Positif	<i>Escherichia coli</i> / <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Positif (Pas une cible)	<i>Lactobacillus zeae/paracasei/casei</i>	99,8	Positif	<i>Enterococcus faecalis</i>	Erreur lors de l'extraction			-	-
FAPIC0532	Positif	<i>Enterococcus faecalis</i>	Négatif	-	-	Positif	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC0134	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif	-	-	Negative	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC0332	Positif	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	-	-	Negative	-	Erreur lors de l'extraction			-	-
FAPIC0705	Positif	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Négatif	-	-	Negative	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC0042	Positif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Positif (Pas une cible)	<i>Citrobacter werkmanii</i>	99,2	Negative	-	Négatif	-	-	Négatif	-

Un seul échantillon positif est identifié après séquençage. Deux pathogènes ont été identifiés avec la plateforme 1 mais pas pour les bons échantillons. Une erreur de manipulation des échantillons peut probablement être à l'origine de ces résultats. En retirant également les échantillons positifs en clinique et dont les résultats du séquençage divergent, deux échantillons (FAPIC0461 et FAPIC0529) sont conservés et un faux positif et un faux négatif sont obtenus par la plateforme 1.

Aucun changement n'est donc observé par rapport aux échantillons congelés qui étaient plus anciens. Lors de la validation analytique, les échantillons de sang négatifs ont été contaminés par les souches puis directement extraits. Afin de reproduire ces conditions, l'automate d'extraction *SelectNA plus* a donc été installé au sein de l'hôpital d'Hasselt afin d'extraire directement des échantillons frais (non congelé) de patients.

3.4 Tests avec des échantillons frais de patient

3.4.1 Déroulé de la validation préclinique sur ces échantillons

Afin de vérifier si des échantillons de sang de patients frais permettent une meilleure identification des pathogènes, 60 échantillons de patients (31 positifs pour des cibles du projet,

10 positifs mais non des cibles et 19 négatifs) ont été analysés. Les échantillons ont été extraits au sein de l'université d'Hasselt puis un aliquot des éluats a été envoyé à Molzym pour séquençage tandis qu'un autre aliquot a été envoyé à AXO Science.

3.4.2 Performances du test

Les résultats obtenus sur ces échantillons sont présentés dans le **tableau 44**. Des difficultés sont rencontrées pour identifier *Escherichia coli*. En effet sur les 16 échantillons contenant *Escherichia coli* et diagnostiqués en clinique, aucun ne l'a été avec le séquençage ou avec le test développé. Pour un échantillon (FAPIC2B-0132), le contrôle d'extraction est très faible (130 ua) ce qui laisse supposer un problème lors de l'extraction et l'absence de diagnostic positif obtenu. Pour deux échantillons (FAPIC2-0696 et FAPIC2B-0019), le séquençage donne un résultat négatif mais un pathogène est reconnu par le logiciel, le premier (*Fusobacterium spp.*) correspondant à la cible diagnostiquée en clinique, le deuxième (*Staphylococcus aureus*) ne correspond pas, mais ce pathogène est très proche génétiquement de *Staphylococcus epidermidis* (détecté en clinique) ce qui pourrait expliquer la confusion.

Tableau 44 : Exemple de résultats obtenus avec des échantillons de sang frais pour la validation préclinique

En bleu, résultats négatifs pour les cibles détectées par le test développé et en rouge résultats positifs. Un trait horizontal signifie qu'il n'y a pas de donnée disponible. Le pourcentage d'identité trouvé lors du séquençage est également indiqué.

Echantillons	Diagnostic clinique		Diagnostic à Molzym <i>SelectNA plus</i>			Diagnostic à AXO science (Test)	
	Pos/neg	Résultat	Pos/neg	Séquençage	Identité (%)	Pos/neg	Résultat
FAPIC0134	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif	-	-	Positif	<i>Mycobacterium avium</i>
FAPIC2-0585	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0595	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0613	Négatif	-	Négatif	-	-	Positif	<i>Enterococcus faecalis</i>
FAPIC2-0632	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0634	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0664	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0673	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0674	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0689	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0692	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0696	Positif	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Négatif	-	-	Positif	<i>Fusobacterium spp</i>
FAPIC2-0703	Positif (Pas une cible)	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0704	Positif (Pas une cible)	<i>Pasteurella multocida</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2-0705	Positif	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0006	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0008	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Positif (Pas une cible)	<i>Malassezia restricta / Gregarinasina gen. sp.</i>	98,85	Négatif	-
FAPIC2B-0012	Positif (Pas une cible)	<i>Brevibacterium casei / Micrococcus lylae</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0013	Positif	<i>Granulicatella adiacens / Fusobacterium spp. / Parvimonas micra</i>	Positif (Pas une cible)	<i>Malassezia restricta / Gregarinasina gen. sp.</i>	-	Négatif	-

FAPIC2B-0019	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Négatif	-	-	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>
FAPIC2B-0022	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0026	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif (Pas une cible)	100	100	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>
FAPIC2B-0031	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0042	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0045	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0047	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0055	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0061	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0066	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0074	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0081	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0083	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0086	Positif	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0088	Positif (Pas une cible)	<i>Slackia spp. / Eikenella corrodens</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0093	Positif	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0094	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0097	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0102	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Positif	<i>Klebsiella oxytoca</i>
FAPIC2B-0115	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positif (Pas une cible)	99,24	99,24	Positif (Pas une cible)	<i>Russulales sp. / Peniophora sp.</i>	99,24	Positif	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
FAPIC2B-0116	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0123	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0125	Positif	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positif (Pas une cible)	99,24	99,24	Positif (Pas une cible)	<i>Russulales sp. / Peniophora sp.</i>	99,24	Négatif	-
FAPIC2B-0127	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-
FAPIC2B-0129	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus hominis</i>	Négatif	-	-	Négatif		-	Négatif	-

FAPIC2B-0130	Positif	<i>Citrobacter koserii</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0132	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Contrôle d'extraction très faible	
FAPIC2B-0133	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0141	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0142	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0144	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0152	Positif	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0158	Positif	<i>Bacteroides fragilis</i> / <i>Staphylococcus hominis</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0160	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0164	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0166	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0178	Positif	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0182	Positif	<i>Streptococcus salivarius</i> groupe	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0185	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0186	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0188	Négatif	-	Négatif	-	-	Négatif	-
FAPIC2B-0190	Positif	<i>Escherichia coli</i> / <i>Staphylococcus epidermidis</i> / <i>Staphylococcus capitis</i>	Négatif	-	-	Négatif	-

Les résultats de la validation préclinique pour les échantillons extraits sur du sang frais sont les suivants :

Pour une extraction avec le *SelectNA plus*

- Vrai négatif: 88% (28/32)
- Vrai positif : 3% (1/32)
- Faux positif : 9% (3/32)
- Faux négatif : 0% (0/32)

Les pourcentages obtenus sont similaires à ceux obtenus dans le cas des échantillons congelés présentant une ancienneté supérieure à 2 ans. Un seul échantillon positif en clinique a été confirmé par le séquençage. Le fait que l'extraction soit directement réalisée sur les échantillons de patients frais ne semble donc pas améliorer l'identification des pathogènes ciblés. Contrairement au *Pathodoc* où toutes les étapes (Extraction, PCR et hybridation sur les biopuces) sont réalisées sans interruption, les tests réalisés sur la plateforme 1 incluent le transport d'un site à un autre des éluats qui doivent alors être congelés. Ces étapes intermédiaires pourraient impacter la qualité de l'ADN et donc le diagnostic posé suite au séquençage ou à la réalisation du test.

3.5 Tests avec l'extraction et la PCR réalisées au sein de l'hôpital d'Hasselt

3.5.1 Déroulé de la validation préclinique sur ces échantillons

Afin de limiter l'impact des étapes supplémentaires induites au cours de cette validation préclinique, des réactifs de PCR pour le séquençage et pour le test développé ont été envoyés à Hasselt. Un total de 33 échantillons (17 positifs, 6 positifs non ciblés et 10 négatifs) ont été analysés. L'extraction a été réalisée sur des échantillons de patients frais, suivi des PCR pour Molzym et AXO Science. Après envoi des produits de PCR, le séquençage a été effectué à Molzym et le protocole d'hybridation sur biopuces à AXO Science.

3.5.2 Performances du test

Les résultats obtenus sur ces échantillons sont présentés dans le **tableau 45**.

Tableau 45 : Résultats obtenus pour la validation préclinique avec des échantillons dont l'extraction et les PCR ont été réalisées au sein de l'hôpital de Hasselt

En bleu, résultats négatifs pour les cibles détectées par le test développé et en rouge résultats positifs. Un trait horizontal signifie qu'il n'y a pas de donnée disponible. Le pourcentage d'identité trouvé lors du séquençage est également indiqué.

Echantillons	Diagnostic clinique		Diagnostic à Molzym <i>SelectNA plus</i>				Diagnostic à AXO science (Test)	
	Pos/neg	Résultat	Pos/neg	Séquençage	Identité (%)	Pos/neg	Résultat	
FAPIC2b-0685	Positive	<i>Escherichia coli</i>	negative	-	-	Negative	-	
FAPIC2b-0686	Negative	-	Positif (Pas une cible)	<i>Bacillus firmus</i> / <i>Bacillus licheniformis</i> / <i>Brochothrix campestris</i>	99,5 / 99,5 / 99,5	Negative	-	
FAPIC2b-0689	Positive	<i>Escherichia coli</i>	Positive	<i>Escherichia albertii</i> / <i>Escherichia coli</i> / <i>Yersinia enterocolitica</i>	100/100	Negative	-	
FAPIC2b-0691	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> / <i>Staphylococcus hominis</i>	Positive	<i>Negative</i>	-	Negative	-	
FAPIC2b-0695	Positive	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative	-	-	Negative	-	
FAPIC2b-0697	Positive	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	negative	-	-	Negative	-	
FAPIC2b-0699	Positif (Pas une cible)	<i>Corynebacterium striatum</i>	negative	-	-	Negative	-	

FAPIC2b-0702	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus capitis</i> / <i>Staphylococcus epidermidis</i>	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0705	Positive	<i>Proteus mirabilis</i>	negative	-	-	Positive	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
FAPIC2b-0707	Positive	<i>Escherichia coli</i> / <i>Staphylococcus epidermidis</i> / <i>Cutibacterium acnes</i>	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0708	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus hominis</i>	Positif (Pas une cible)	-	98,79	Negative	-
FAPIC2b-0711	Positive	<i>Escherichia coli</i>	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0715	Negative	-	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0716	Positive	<i>Escherichia coli</i>	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0717	Negative	-	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0719	Positif (Pas une cible)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positive	<i>negative</i>	-	Positive	<i>Staphylococcus aureus</i>
FAPIC2b-0723	Negative	-	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0726	Negative	-	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0730	Positive	<i>Escherichia coli</i>	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0838	Positive	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	negative	-	-	Negative	-
FAPIC2b-0841	Negative	-	negative	-	-	Negative	-

Les résultats de la validation préclinique pour une extraction et une PCR sur sang frais sont les suivants :

- Vrai négatif: 88% (15/17)
- Vrai positif : 0% (0/17)
- Faux positif : 6% (1/17)
- Faux négatif : 6% (1/17)

Les résultats sont très similaires à ceux obtenus sur les échantillons de sang frais traités précédemment. Des difficultés sont toujours rencontrées pour identifier *Escherichia coli*. En effet, sur les 8 échantillons contenant *Escherichia coli* et diagnostiqués en clinique, un seul l'a été avec le séquençage et un autre avec le test développé. Ce qui est toujours surprenant au vu de la bonne identification d'*Escherichia coli* lors de la validation sur les souches et de la validation analytique.

Pour trois échantillons (FAPIC2-0664, FAPIC2-0705 et FAPIC2B-0719), le séquençage a donné un résultat négatif mais un pathogène est reconnu par le logiciel, *Staphylococcus epidermidis* qui a une nouvelle fois été identifié par le logiciel en tant que *Staphylococcus aureus*.

3.5.3 Hypothèse quant aux résultats obtenus

Les résultats sont similaires à ceux obtenus pour les échantillons congelés de plus de deux ans ou pour les échantillons de patients frais. La réalisation de la PCR directement sur les échantillons extraits ne semble donc pas avoir eu d'impact sur les performances.

Il est également possible que la quantité de bactéries présente dans les échantillons de patients soit trop faible pour être détectée et identifiée par ce test. La quantification des bactéries au sein des échantillons cliniques n'est pas connue.

3.6 Tests complémentaires

Des tests complémentaires ont été effectués sur de nouveaux échantillons de patients afin de vérifier si les résultats obtenus précédemment étaient confirmés. Un diagnostic clinique

a été posé sur ces échantillons, mais les résultats du séquençage et du test développé n'ont malheureusement pas pu être obtenus avant la finalisation de ce manuscrit.

3.6.1 Extraction à Hasselt des échantillons de patients avec les *SelectNA plus* et le *PathoRobot*

Afin de vérifier si un volume de sang plus important (5 ml) pouvait améliorer l'identification des cibles, des échantillons de sang frais ont été extraits en parallèle avec le *SelectNA plus* (1 ml) et le *PathoRobot* (5 ml). Un aliquot de ces éluats a été envoyé à Molzym pour le séquençage tandis que le reste des aliquots doit être envoyé à AXO Science pour la réalisation des PCR et de l'hybridation sur les biopuces.

3.6.2 Extraction d'échantillons de patients au sein de l'Hôpital de Zagreb

Des échantillons de patients ont été également extraits au sein de l'hôpital de Zagreb, afin de vérifier si des observations similaires pouvaient être réalisées. Des échantillons de patients frais ont donc été extraits avec le *SelectNA plus* puis un aliquot des éluats obtenus a été envoyé à Molzym pour séquençage tandis que le reste des aliquots a été envoyé à AXO Science.

3.6.3 Test d'échantillons de patients sur le *Pathodoc*

La reconnaissance des pathogènes ayant été plus performante au cours de la validation analytique sur le *Pathodoc*, il a été envisagé de tester des échantillons de patient sur ce dernier. Au moment de la rédaction de ce manuscrit aucun échantillon de patient n'a pu être encore analysé avec le *Pathodoc*.

3.7 Essais afin d'améliorer l'identification des pathogènes à AXO Science

3.7.1 Amélioration du logiciel de reconnaissance des pathogènes

Au cours de la validation préclinique, des signaux ont été observés sur les biopuces sans parvenir à une identification des pathogènes. Ces signaux ont été observés dans le cas d'échantillons négatifs (pas de pathogène identifié en clinique ou un pathogène qui n'est pas une cible) ou dans le cas d'échantillons positifs. Une fois le diagnostic des échantillons de patients connu, une modification des intervalles d'intensité des signaux sur les sondes a été réalisée afin d'essayer d'améliorer la capacité de reconnaissance des pathogènes présents. Les résultats présentés dans ce manuscrit sont les résultats après ces modifications.

3.7.2 Test avec un volume inférieur d'ADN extrait dans la PCR

Afin de vérifier si l'ADN incorporée dans la PCR n'est pas trop importante et l'amplification limitée par des inhibiteurs, ce qui pourrait expliquer l'absence de reconnaissance de certains pathogènes, un volume inférieur de la solution d'ADN extraite a été incorporé dans la PCR. Un volume inférieur aux 20 µl a été testé sur 3 échantillons :

- L'échantillon Snv 54 qui est positif pour *Clostridium perfringens* et testé avec un volume de 13 µl d'ADN dans la PCR
- L'échantillon Snv 136, positif pour *Streptococcus pyogenes* et testé avec un volume de 8 µl d'ADN dans la PCR
- L'échantillon Snv 134 positif pour *Staphylococcus aureus* et testé avec un volume de 8 µl d'ADN dans la PCR

La **figure 76** représente l'intensité obtenue sur les sondes *C. perfringens* et *Clostridium spp.* (pour Snv 54), *S. pyogenes* et *Streptococcus spp.* (pour Snv136) et *S. aureus* (pour Snv134) aux deux volumes testés : 20 µl et 13µl ou 8µl.

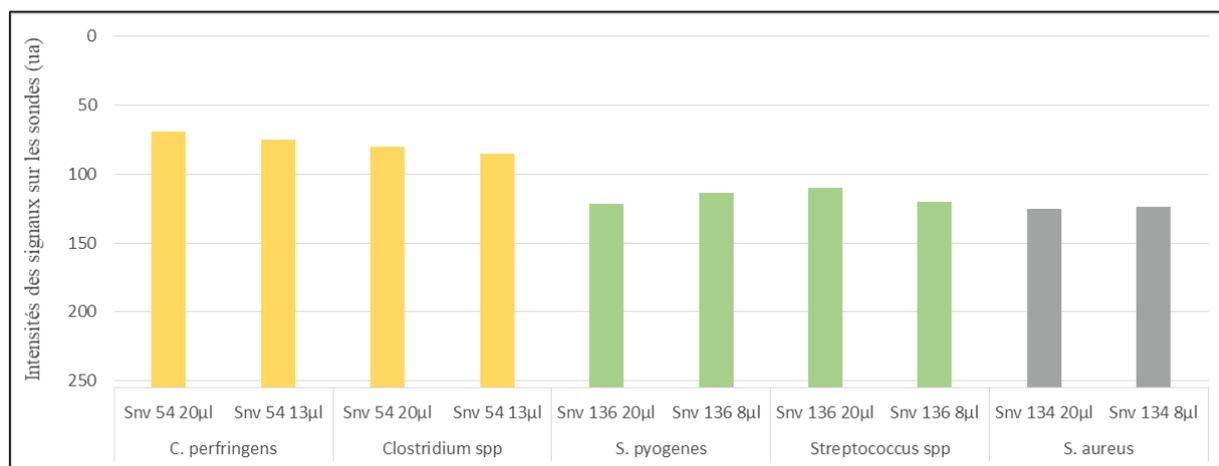


Figure 76 : Intensités détectées sur les sondes pour des pathogènes dont un volume inférieur de solution d'ADN a été introduit dans la PCR

Une légère variation (± 10 ua) est observée entre les valeurs d'intensités pour 20µl de la solution d'ADN et un volume inférieur. Une diminution de l'intensité des signaux est observée sur les sondes *C. perfringens* (13µl), *Clostridium spp.* (13µl) et *Streptococcus spp.* (8µl) tandis qu'une augmentation de l'intensité des signaux est observée sur les sondes *S. aureus* (8µl) et *S. pyogenes* (8µl). Pour les 3 échantillons testés, une reconnaissance par le logiciel a eu lieu pour les deux volumes testés (20µl et 8 ou 13µl).

L'impact de l'utilisation d'un volume inférieur d'ADN élué sur l'intensité des signaux observé est difficile à évaluer. Il faudrait répéter cet essai sur un plus grand nombre d'échantillons et notamment évaluer l'impact sur la détection des gènes de résistance.

3.8 Identification des résistances

Les phénotypes de résistances ont également été observés au sein de l'hôpital d'Hasselt et les résultats comparés à ceux obtenus à AXO Science. Une table de conversion a été établie afin de pouvoir convertir ces résistances phénotypiques en résistances génotypiques et comparer les résultats obtenus. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 46**.

Sur les 73 pathogènes pour lesquels un antibiogramme a été réalisés, aucune correspondance n'a été trouvée lors du rendu du diagnostic, sur ces mêmes échantillons, au sein

d'AXO Science. Pour un échantillon (FAPIC-00134), aucun résultat n'est disponible à cause de la présence de liquide résiduel dans le fond des puits.

Pour 6 pathogènes, le gène de résistance *blaNDM* a été identifié par le test développé. Cependant, ce résultat ne correspond pas au résultat des antibiogrammes et un nouveau seuil pour cette cible doit donc être déterminé. Et finalement, dans le cas d'un échantillon ou aucun antibiogramme n'a été déterminé car le diagnostic clinique était négatif (FAPIC2B-0841), un gène de résistance *blaSHV* a été identifié.

Cette absence de reconnaissance des résistances aux antibiotiques lors de la validation clinique peut avoir notamment deux origines. Une concentration en bactérie dans le sang inférieure aux limites de détections des cibles, ou alors des problèmes au niveau de l'extraction des échantillons. En effet, la majorité des échantillons positifs en cliniques ne sont pas confirmés lors du séquençage, ce qui laisse penser à des problèmes d'extraction. Cependant, l'intensité du signal obtenu pour le contrôle d'extraction est élevé (en moyenne 26 ua) et plus intense que l'intensité des signaux obtenus lors de la validation analytique de la plateforme 1.

Tableau 46 : Exemple de résultats obtenus concernant les gènes de résistance lors de la validation préclinique de la plateforme 1

Echantillon	Pathogène et antibiogramme	Résistances supposées	Diagnostic à AXO Science
FAPIC0446	MIC Pénicilline S (< 0.016µg/mL) érythromycine R MIC cefotaxime S (0.012µg/mL) clindamycine R	ermB	-
FAPIC0461	Amoxicilline R amoxicilline-clavulanic acid R pipéracilline-tazobactam I cefuroxime I.V. R ceftriaxone S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine R méropénem S	qnr (A/B/S), TEM/SHV et OXA-1/ACT/CMY/PER/CTX-M-1(1/2/9/25)	-
FAPIC0529	Amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S 1. Lactobacillus rhamnosus mic amoxicilline S (2µg/mL) MIC clindamycine S (0.38µg/mL)	-	-
FAPIC0532	amoxicilline S	-	-
FAPIC0134	flucloxacillin S	-	-
FAPIC0332	Amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanicS cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV	-
FAPIC0705	Amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanicS cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine R	TEM/SHV et qnr (A/B/S)	-
FAPIC0042	Amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanicS cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV	-
FAPIC0632	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	CTX-M-9
FAPIC0674	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC0134	1. Staphylococcus aureus flucloxacilline S	-	ND
FAPIC0689	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC0696	1. Fusobacterium nucleatum MIC Pénicilline S (< 0.016µg/mL) MIC amoxicilline-acide clavulanic S (< 0.016µg/mL) MIC clindamycine S (< 0.016µg/mL) MIC metronidazol S (< 0.016µg/mL)	-	-
FAPIC0703	1. Acinetobacter radioresistens ceftazidime S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC0704	1. Pasteurella multocida MIC Pénicilline S (0.125µg/mL) MIC amoxicilline-acide clavulanic S (0.25µg/mL) MIC ciprofloxacine S (0.016µg/mL) MIC triméthoprim-sulfaméthoxazole S (0.032µg/mL)	-	-
FAPIC0705	1. Klebsiella oxytoca amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine R	TEM/SHV et qnr (A/B/S)	-
FAPIC0706	1. Staphylococcus aureus flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0008	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine R	qnr (A/B/S)	-
FAPIC2b-0012	1. Brevibacterium casei MIC Pénicilline S (0.047µg/mL) vancomycine mic S (0.125µg/mL) MIC ciprofloxacine S (0.50µg/mL) 1. Micrococcus lysae MIC Pénicilline S (0.023µg/mL) vancomycine mic S (0.25µg/mL)	-	-

FAPIC2b-0013	1. Granulicatella adiacens MIC Pénicilline S MIC amoxicilline-acide clavulanic I MIC clindamycine S MIC méropénem R MIC metronidazol S Antibioqram aeroben (2) 1. Fusobacterium species MIC Pénicilline I (0.38µg/mL) MIC amoxicilline-acide clavulanic S (0.19µg/mL) MIC clindamycine S (0.25µg/mL) MIC metronidazol R (> 256µg/mL) 2. Parvimonas micra MIC Pénicilline S (< 0.016µg/mL) MIC amoxicilline-acide clavulanic S (0.032µg/mL) MIC clindamycine S (0.047µg/mL) MIC metronidazol S (0.023µg/mL)	VIM/IMP/NDM/KPC/OXA	-
FAPIC2b-0019	1. Staphylococcus epidermidis flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0022	1. Staphylococcus epidermidis~flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0026	1. Staphylococcus aureus~flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0042	1. Staphylococcus haemolyticus~flucloxacilline S	-	NDM
FAPIC2b-0045	1. Escherichia coli amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic R pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S Antibioqram aeroben (2)	TEM/SHV et OXA-1/ACT/CMY/PER/CTX-M-1(1/2/9/25)	-
FAPIC2b-0066	1. Escherichia coli amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV	-
FAPIC2b-0074	1. Escherichia coli amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic R pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV et OXA-1/ACT/CMY/PER/CTX-M-1(1/2/9/25)	-
FAPIC2b-0081	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC2b-0086	1. Streptococcus pneumoniae MIC Pénicilline I (0.25µg/mL) MIC cefotaxime S (0.125µg/mL)	-	-
FAPIC2b-0088	1. Slackia species MIC Pénicilline S (0.047µg/mL) MIC amoxicilline-acide clavulanic S (0.064µg/mL) MIC clindamycine S (0.016µg/mL) MIC metronidazol S (0.047µg/mL) 1. Eikenella corrodens MIC Pénicilline S (0.19µg/mL) MIC amoxicilline-acide clavulanic S (0.38µg/mL) MIC ceftriaxone S (0.012µg/mL) MIC ciprofloxacine S (0.004µg/mL)	-	-
FAPIC2b-0093	1. Klebsiella pneumoniae amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV	-
FAPIC2b-0094	1. Staphylococcus aureus flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0097	1. Staphylococcus aureus flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0102	1. Escherichia coli amoxicilline R pipéracilline-tazobactam S temocilline S cefuroxime I.V. R aztréonam R amikacine S ciprofloxacine R méropénem S	TEM/SHV	-
FAPIC2b-0115	1. Staphylococcus epidermidis flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0116	1. Staphylococcus aureus flucloxacilline S clindamycine S ciprofloxacine R triméthoprim-sulfaméthoxazol S rifampicine S	qnr (A/B/S)	-

FAPIC2b-0125	1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV	-
FAPIC2b-0129	1. <i>Staphylococcus hominis</i> flucloxacilline R vancomycine S érythromycine R clindamycine S	ermB	-
FAPIC2b-0130	1. <i>Citrobacter koserii</i> amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV	-
FAPIC2b-0141	1. <i>Escherichia coli</i> amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic R pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV et OXA-1/ACT/CMY/PER/CTX-M-1(1/2/9/25)	-
FAPIC2b-0144	1. <i>Escherichia coli</i> amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic R pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV et OXA-1/ACT/CMY/PER/CTX-M-1(1/2/9/25)	-
FAPIC2b-0152	1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV	-
FAPIC2b-0158	1. <i>Bacteroides fragilis</i> MIC Pénicilline R (6µg/mL) MIC amoxicilline-acide clavulanic S (0.38µg/mL) MIC clindamycine R (> 256µg/mL) MIC metronidazol S (0.38µg/mL)	ermF	-
FAPIC2b-0166	1. <i>Escherichia coli</i> amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC2b-0171	1. <i>Escherichia coli</i> amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic R pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. R cefepime R aztréonam R amikacine S ciprofloxacine R méropénem S	qnr (A/B/S), TEM/SHV et OXA-1/ACT/CMY/PER/CTX-M-1(1/2/9/25)	-
FAPIC2b-0178	1. <i>Escherichia coli</i> amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	NDM
FAPIC2b-0182	1. <i>Streptococcus salivarius</i> groep MIC Pénicilline S (0.023µg/mL) MIC ceftriaxone S (0.047µg/mL)	-	-
FAPIC2b-0185	1. <i>Staphylococcus aureus</i> flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0190	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> flucloxacilline R vancomycine S érythromycine S clindamycine S 2. <i>Staphylococcus capitis</i> flucloxacilline S 1. <i>Escherichia coli</i> amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic R pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. S ceftriaxone S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine I	TEM/SHV et OXA-1/ACT/CMY/PER/CTX-M-1(1/2/9/25)	-
FAPIC2b-0640	1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> MIC Pénicilline S (< 0.016µg/mL) MIC cefotaxime S (0.008µg/mL)	-	NDM
FAPIC2b-0646	1. <i>Streptococcus agalactiae</i> Pénicilline S amoxicilline S érythromycine R clindamycine R	qnr (A/B/S) et ermB	-
FAPIC2b-0650	1. <i>Escherichia coli</i> amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC2b-0654	1. <i>Escherichia coli</i> amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC2b-0659	1. <i>Escherichia coli</i> amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV	-

FAPIC2b-0664	1. Escherichia coli amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic R pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine I 2. Klebsiella oxytoca amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic S pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S 2. Streptococcus bovis Groep Pénicilline S clindamycine R	TEM/SHV	-
FAPIC2b-0672	1. Streptococcus pneumoniae MIC Pénicilline S (0.016µg/mL) amoxicilline S MIC cefotaxime S (0.016µg/mL)	-	-
FAPIC2b-0676	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC2b-0685	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC2b-0689	1. Escherichia coli amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV	-
FAPIC2b-0691	1. Staphylococcus epidermidis flucloxacilline R vancomycine S érythromycine R clindamycine R 2. Staphylococcus hominis flucloxacilline R vancomycine S érythromycine R clindamycine R	ermB/F	-
FAPIC2b-0695	1. Pseudomonas aeruginosa pipéracilline-tazobactam S ceftazidime S amikacine S ciprofloxacine S 1. Pseudomonas aeruginosa pipéracilline-tazobactam S ceftazidime S amikacine S ciprofloxacine S	-	NDM, aac(6')-Ib
FAPIC2b-0697	1. Streptococcus pneumoniae MIC Pénicilline S (0.016µg/mL) amoxicilline S MIC cefotaxime S (0.023µg/mL)	-	-
FAPIC2b-0699	1. Corynebacterium striatum MIC Pénicilline R (0.38µg/mL) vancomycine mic S (0.38µg/mL) MIC ciprofloxacine S (0.125µg/mL) 1. Corynebacterium striatum MIC Pénicilline R (0.50µg/mL) vancomycine mic S (0.50µg/mL) MIC ciprofloxacine S (0.125µg/mL)	TEM/SHV	-
FAPIC2b-0702	1. Staphylococcus capitis flucloxacilline R vancomycine S érythromycine R clindamycine S	ermB	-
FAPIC2b-0705	1. Proteus mirabilis amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic R pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine R	qnr (A/B/S), TEM/SHV et OXA-1/ACT/CMY/PER/CTX-M-(1/2/9/25)	NDM
FAPIC2b-0707	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S / 1. Staphylococcus epidermidis flucloxacilline R vancomycine S érythromycine S clindamycine R / 1. Cutibacterium acnes MIC Pénicilline S (0.094µg/mL) MIC amoxicilline-acide clavulanic S (0.75µg/mL) MIC pipéracilline-tazobactam S (2µg/mL) MIC clindamycine S (0.094µg/mL) MIC metronidazole R (> 256µg/mL)	ermB	-
FAPIC2b-0708	1. Staphylococcus hominis~flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0711	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	NDM
FAPIC2b-0716	1. Escherichia coli amoxicilline R amoxicilline-acide clavulanic R pipéracilline-tazobactam S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	TEM/SHV et OXA-1/ACT/CMY/PER/CTX-M-(1/2/9/25)	-

FAPIC2b-0719	1. Staphylococcus epidermidis~flucloxacilline S	-	-
FAPIC2b-0730	1. Escherichia coli amoxicilline S cefuroxime I.V. S aztréonam S amikacine S ciprofloxacine S	-	-
FAPIC2b-0838	1. Streptococcus pneumoniae MIC Pénicilline S (0.016µg/mL) MIC cefotaxime S (0.016µg/mL)	-	-
FAPIC2b-0841	-	-	SHV

3.9 Conclusions concernant les performances du test développé

Lors de la réalisation de la validation analytique et de l'étude des performances sur les souches, une bonne identification globale des pathogènes a été obtenue avec une complémentarité pour l'identification des Entérobactéries entre les panels 1 et 2. L'identification des gènes de résistance est cependant un peu plus faible. Pour trois cibles, *blaDHA*, *blaTEM* et *blaOXA-24*, les gènes de résistance ont été testés uniquement dans le cas où au moins trois autres gènes de résistance sont présents et une compétition entre les différentes cibles au moment de l'amplification pourrait avoir lieu. Ce phénomène pourrait être accentué par le fait que les T_m des amorces de ces trois cibles sont très proches des T_m minimales et maximales observées pour les amorces du panel 3 (autour de 46°C ou supérieur à 55,5°C) et la température hybridation lors de la PCR (52,5°C) pourrait ne pas permettre une amplification optimale de ces cibles. Toutes les cibles n'ayant pas été évaluées ou seulement dans un faible nombre de cas, il faudrait poursuivre et multiplier les analyses.

Une capacité de détection entre 10^2 et 10^3 UFC/ml a été identifiée pour la grande majorité de cibles testées. Des concentrations inférieures à 10^2 UFC/ml, n'ayant pas été testées, il faudrait également poursuivre ces analyses.

Finalement, un nombre très faible de cibles a été identifié lors de la validation préclinique. Il est possible que les pathogènes présents dans ces échantillons de sang de patients soient à des concentrations plus basses que les limites de détections du test développé. Il pourrait être intéressant de tester des échantillons de patients avec le *Pathodoc*, celui-ci semblant présenter une meilleure sensibilité de détection et de tester en parallèle avec le *Pathodoc* et la plateforme 1 un même échantillon de patient. Finalement, il pourrait être également intéressant d'évaluer ce test avec un tout autre système d'extraction.

Conclusion générale et perspectives

Dans les cas de bactériémies et de sepsis et dans un contexte d'augmentation des résistances aux antibiotiques, la demande est forte pour le développement de test de diagnostic sensibles, spécifiques, faciles d'utilisation, rapides et abordables.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont porté sur le développement de deux systèmes de diagnostic, automatisé et semi-automatisé, pour l'identification et la caractérisation de 53 bactéries et genres bactériens, ainsi que de 40 gènes de résistance dans un seul test. L'identification de ces cibles s'effectue directement à partir d'échantillons de sang de patients.

Dans un premier temps, les cibles qui sont identifiées par ce test ont été sélectionnées selon leur criticité et leur prévalence. Ces cibles ont été réparties en trois panels, panel 1 et 2 pour l'identification des pathogènes et le panel 3 pour l'identification des gènes de résistance. Les amorces et sondes pour la reconnaissance des cibles des 3 panels ont été conçues, puis les protocoles d'analyse (PCR et hybridation sur biopuces) ont été optimisés. Ensuite, une méthode d'analyse spécifique pour chaque panel des images obtenues suite à l'hybridation sur les biopuces a été développée. Ces méthodes se basent sur un système de seuil d'intensité pour les panels 2 et 3 et un système de reconnaissance de signature spécifique pour le panel 1. Ces signatures se basent sur l'intensité et la localisation des signaux observés sur la biopuce.

Ensuite, les performances de ce test ont été évaluées dans un premier temps sur de l'ADN extrait de souches bactériennes, puis sur l'ADN extrait d'échantillons artificiellement contaminés avec une quantité connue d'une souche donnée. Les résultats sont encourageants avec une détection des cibles jusqu'à 10^2 UFC/ml. Cependant, il faudrait poursuivre ces analyses sur un plus grand nombre d'échantillons et de cible, afin de notamment déterminer précisément les limites de détections de chaque cible.

Finalement, des échantillons de patients ont été testés à l'aveugle lors d'une validation préclinique. Des résultats complets ne sont pas encore connus au moment de la rédaction de ce manuscrit, mais très peu de cibles ont été identifiées que ce soit pour les pathogènes ou les gènes de résistance. Afin de déterminer si les pathogènes sont présents à des concentrations trop faibles pour être identifiés par ce test, il faudrait pouvoir quantifier en clinique les pathogènes présents dans les échantillons de patient. De même, il serait intéressant d'évaluer ce test avec un système d'extraction plus efficace.

Ce test, ainsi que les plateformes utilisées peuvent être adaptés à différents types de pathologies ou d'échantillons. Au sein du projet FAPIC, un quatrième panel est en cours de développement et permettra l'identification de facteur de virulence ou de gène codant pour certaines toxines à partir d'échantillons dits environnementaux tels que les eaux de surface. Ces quatre panels pourront être utilisés de manière simultanée, permettant de réaliser une caractérisation complète des échantillons. Un total de huit panels différent peut être analysé de manière simultanée avec ce test, laissant ainsi de nombreuses possibilités pour une caractérisation complète d'un échantillon.

Et finalement, il pourrait être envisagé d'effectuer ce test après la réalisation d'hémocultures de durée réduites. Ceci permettrait d'augmenter la sensibilité de détection des cibles, qui reste limité ici par rapport à la spécificité, mais entraînerait une augmentation significative du délai nécessaire avant le rendu d'un diagnostic. Plusieurs études ont montré un temps de positivité des hémocultures moyen compris entre 12h et 15h (376–378), ce temps pouvant certainement être réduit, la PCR étant une méthode de diagnostic sensible.

Annexes

Annexe 1: Listes des souches utilisées dans ce projet

Référence de la souche	Souche	Résistance
Isolat clinique (OS.2)	-	OXA-48
DSM9849	<i>Abiotrophia defectiva</i>	-
DSM9849	<i>Abiotrophia defectiva</i>	-
DSM30007	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
M/10639	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23, PER
Isolat clinique (1)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-24, aadA1
Isolat clinique (ACB-19-OXA23)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23
Isolat clinique (GIM)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM, aac(6')-Ib, aad, oxa-24
Isolat clinique (SHV-5)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SHV-5
NCTC 13305	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-58
DSM2403	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-
DSM 102856	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	-
DSM 30187	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>subp hydrophila</i>	-
DSM8739	<i>Arcobacter butzleri</i>	-
M/7021	<i>Bacteroides fragilis</i>	ccrA, Tetq, ermF
DSM2079	<i>Bacteroides</i> <i>thetaiotaomicron</i>	-
DSM1447	<i>Bacteroides vulgatus</i>	-
DSM 7288	<i>Burkholderia cepacia</i>	-
NCTC11366	<i>Campylobacter coli</i>	-
DSM5361	<i>Campylobacter fetus</i>	-
M/8495	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
NCTC11352	<i>Campylobacter lari</i>	-
DSM30191	<i>Chromobacterium</i> <i>violaceum</i>	-
DSM4593	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-
DSM 17655	<i>Citrobacter farmeri</i>	-
Isolat clinique (73489)	<i>Citrobacter freundii</i>	-
DSM4595	<i>Citrobacter koseri</i>	-
DSM10702	<i>Clostridium butyricum</i>	-
M/8480	<i>Clostridium perfringens</i>	-
DSM7534	<i>Clostridium septicum</i>	-
DSM2485	<i>Clostridium tertium</i>	-
DSM4485	<i>Cronobacter sakazakii</i>	-
DSM30053	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-
DSM30054	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
M/12961	<i>Enterobacter cloacae</i>	VIM, aac(6')-Ib
Isolat clinique (26385)	<i>Enterobacter cloacae</i>	-

Isolat clinique (ACT-9)	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	ACT
NCTC 13925	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	IMI
Isolat clinique (IMP)	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	IMP
Isolat clinique (5CF)	<i>Enterobacter cloacae</i> complexe	NDM-1, qnrA6, CMY, aac(6')-Ib, aad, CTX-M-1, OXA-10, TEM, VIM, qnrB, OXA-1
Isolat clinique (8EC)	<i>Enterobacter cloacae</i> complexe	qnrB6, aph2, TEM, CTX-M-1, VIM, aad, aac(6')-Ib
DSM 12409	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	ACT
DSM 16687	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	ACT
DSM20633	<i>Enterococcus</i> <i>durans</i> / <i>Streptococcus</i> <i>durans</i>	-
ATCC29212	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
NCTC 12201	<i>Enterococcus faecalis</i>	ermB, vanA
NCTC 13379	<i>Enterococcus faecalis</i>	ermB, vanB
Isolat clinique (EF4)	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
ATCC 700221	<i>Enterococcus faecium</i>	vanA
DSM20477	<i>Enterococcus faecium</i>	-
DSM 20160	<i>Enterococcus hirae</i>	-
DSM105182	<i>Escherichia coli</i>	aad, TEM, mcr1
DSM30083	<i>Escherichia coli</i>	-
M/11407	<i>Escherichia coli</i>	-
M/12884	<i>Escherichia coli</i>	-
M/3579	<i>Escherichia coli</i>	aac(6')-Ib, TEM
NCTC 13476	<i>Escherichia coli</i>	IMP, aac(6')-Ib
Isolat clinique ((JMI09)	<i>Escherichia coli</i>	-
Isolat clinique (CMY-1)	<i>Escherichia coli</i>	CMY-1
Isolat clinique (B16138841-1)	<i>Escherichia coli</i>	-
Isolat clinique (B161347508-1)	<i>Escherichia coli</i>	-
Isolat clinique (B16098095-1)	<i>Escherichia coli</i>	-
Isolat clinique (B14021281-3)	<i>Escherichia coli</i>	-
Isolat clinique (B14096342-2)	<i>Escherichia coli</i>	-
Isolat clinique (23E)	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-9
NCTC 13462	<i>Escherichia coli</i>	aad, CTX-M-2, TEM
Isolat clinique (26E)	<i>Escherichia coli</i>	acc-1, OXA-1, TEM-1, aac(6')Ib-cr, qnrA6, CTX-M-1

Isolat clinique (6E)	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-55, CTX-M-27, TEM-1, CTX-M-1, CTX-M-9
DSM21784	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-
DSM15643	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-
DSM19847	<i>Fusobacterium ulcerans</i>	-
DSM9848	<i>Granulicatella adiacens</i>	-
DSM 22187	<i>Haemophilus aegyptius</i>	-
NCTC 10659	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	-
DSM4690	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
Isolat clinique (26384)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
DSM30104	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV-1
M/11719	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM
M/11720	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2, SHV
M/12958	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	aac(6')-Ib, SHV, TEM, OXA-48, OXA-1, CTX-M-1
M/12959	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV
NCTC 13439	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV-36, aac(6')Ib, qnrS, VIM
NCTC 13465	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV-11, TEM CTX-M-26
Isolat clinique (KPC-1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-1, aac6(Ib), SHV
Isolat clinique (B16031128-2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Isolat clinique (10/134)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DHA-1, aac(6')-Ib, aad CTX-M-1, OXA-1, SHV
Isolat clinique (SHV2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV-2
Isolat clinique (8513)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
DSM 4611	<i>Kluyvera ascorbata</i>	-
ATCC 33152	<i>Legionella pneumophila</i>	-
DSM20600	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
M/12196	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
DSM9143	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
DSM18052	<i>Moraxella lacunata</i>	-
DSM 6998	<i>Moraxella osloensis</i>	-
DSM6675	<i>Morganella morganii</i>	-
DSM 44196	<i>Mycobacterium abscessus</i>	-
DSM 44256	<i>Mycobacterium avium</i>	-
DSM 43223	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	-
DSM 9188	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
M/14654	<i>Neisseria meningitidis</i>	-
DSM3493	<i>Pantoea agglomerans</i>	-
DSM20701	<i>Parabacteroides distasonis</i>	-
NCTC1877	<i>Pasteurella multocida</i>	-
DSM 8224	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-

DSM20514	<i>Prevotella bivia</i>	tetQ
DSM20706	<i>Prevotella intermedia</i>	-
DSM7089	<i>Prevotella melaninogenica</i>	ermF, tetQ
M/11726	<i>Propionibacterium acnes</i>	-
ATCC14153	<i>Proteus mirabilis</i>	-
Isolat clinique (P1)	<i>Proteus mirabilis</i>	CMY-16, AAC5-4°LB ? AAD
DSM 4544	<i>Proteus penneri</i>	-
DSM 13387	<i>Proteus vulgaris</i>	-
DSM 4542	<i>Providencia rettgeri/Proteus rettgeri</i>	-
DSM50071	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
M/7298	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SPM-1
NCTC 13437	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	aad, OXA-12, VEB, VIM
Isolat clinique (26398)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Isolat clinique (SPM)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SPM, OXA-10, aac(6'-Ib)
Isolat clinique (SBW25)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
Isolat clinique (KOB)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
DSM 17224	<i>Pseudomonas otitidis</i>	-
DSM6125	<i>Pseudomonas putida</i>	-
Isolat clinique (BIRD-1)	<i>Pseudomonas putida</i>	-
DSM 4166	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
DSM 5190	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
NCTC 12419	<i>Salmonella bongori</i>	-
DSM17058	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	-
ATCC 8385	<i>Salmonella enterica sv typhimurium</i>	-
ATCC 19430	<i>Salmonella enterica sv. typhi</i>	-
DSM554	<i>Salmonella enterica sv. typhimurium</i>	-
M/4813	<i>Salmonella enterica sv. typhimurium</i>	-
DSM30121	<i>Serratia marcescens</i>	-
NCTC 6340	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
DSM4782	<i>Shigella flexneri</i>	-
DSM 1098	<i>Sphingomonas paucimobilis/Flavobacterium devorans/Pseudomonas paucimobilis</i>	-
M/5467	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
M/8912	<i>Staphylococcus aureus</i>	mecC
USA 300 JE2	<i>Staphylococcus aureus</i>	mecA
Isolat clinique (SA5)	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
ATCC14990	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-

DSM20263	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
Isolat clinique (26396)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
ATCC7221	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
M/4674	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
M/6687	<i>Streptococcus anginosus</i>	-
DSM 20662	<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>	-
M/13989	<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	-
DSM 12643	<i>Streptococcus mitis</i>	-
M/12077	<i>Streptococcus mitis</i>	-
ATCC 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
DSM18670	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	-
DSM 20565	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
DSM20567	<i>Streptococcus sanguinis</i>	-
NCIMB 1187	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-
ATCC 14035	<i>Vibrio cholerae</i>	-
NCIMB 1902	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
NCIMB 2046	<i>Vibrio vulnificus</i>	-
DSM4780	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

Annexe 2 : Composition détaillée des bouillons de cultures**Bouillon de base pour anaérobies**

Composé	Concentration g/l
Peptone	16
Extrait de levure	7
Chlorure de sodium	5
Amidon	1
Dextrose	1
Pyruvate de sodium	1
Arginine	1
Succinate de sodium	0.5
Chlorhydrate de L-cystéine	0.5
Bicarbonate de sodium	0.4
Pyrophosphate de fer	0.5
Hémine	0.005
Vitamine K	0.0005
Thyoglycollate de sodium	0.5
Dithiothreitol	1

Bouillon Luria-Bertani

Composé	Concentration g/l
Peptone	10
Extrait de levure	5
Chlorure de sodium	5

Bouillon de cœur de cerveau

Composé	Concentration g/l
Infusion de cœur de bœuf	17.5
Protéose peptone	10
Glucose	2
Chlorure de sodium	5
Hydrogénophosphate de sodium	2.5

**Supplément pour bouillon de cœur
cervelle**

Composé	Concentration g/l
Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)	0.015
Hémine	0.015

Bouillon Middlebrook 7H9

Composé	Concentration g/l
Sulfate d'ammonium	0.5
Hydrogénophosphate de sodium	2.5
Phosphate de potassium monobasique	1
Citrate de sodium	0.1
Sulfate de magnésium	0.05
Chlorure de calcium	0.0005
Sulfate de zinc	0.001
Sulfate de cuivre	0.001
Citrate d'ammonium ferrique	0.04
Acide L-glutamique	0.5
Pyridoxine	0.001
Biotine	0.0005
Glycérol	4

Annexe 3 : Score final déterminé par les cliniciens pour différents pathogènes

Un score final de 1 indique un pathogène très important à détecter d'un point de vue clinique, un score de 2 indique une importance moyenne et un score de 3, une importance peu significative.

Fungi	Score
<i>Aspergillus ssp.</i>	1
<i>Candida glabrata</i>	1
<i>Candida ssp.</i>	1
<i>Candida tropicalis</i>	1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1
<i>Fusarium ssp.</i>	1
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Sporothrix schenckii</i>	1
<i>Malassezia ssp.</i>	1,5
<i>Penicillium ssp.</i>	1,5
<i>Alternaria ssp.</i>	2
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	2
<i>Coccidioides ssp.</i>	2
<i>Geotrichum ssp.</i>	2
<i>Trichosporon beigeli</i>	2
<i>Cladosporium ssp.</i>	2,5
<i>Rhinosporidium seeberi</i>	2,5
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	3
<i>Hortaea werneckii</i>	3
<i>Issatchenkia orientalis</i>	3
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3
<i>Trichoderma viride</i>	3
<i>Trichophyton rubrum</i>	3

Vers	Score
<i>Ancylostoma duodenale</i>	1
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1
<i>Echinococcus ssp.</i>	1
<i>Enterobius vermicularis</i>	1
<i>Fasciola ssp.</i>	1
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1
<i>Taenia ssp.</i>	1
<i>Toxocara ssp.</i>	1
<i>Trichuris trichiura</i>	1
<i>Schistosoma ssp.</i>	1,5
<i>Trichinella spiralis</i>	1,5
<i>Clonorchis sinensis</i>	2
<i>Necator americanus</i>	2
<i>Onchocerca volvulus</i>	2
<i>Diphyllobothrium</i>	2,5
<i>Fasciolopsis buski</i>	2,5
<i>Baylisascaris genus</i>	3
<i>Dracunculus medinensis</i>	3

Bactéries	Score		Score
<i>Acinetobacter ssp.</i>	1	<i>Bartonella ssp.</i>	2
<i>Bacteroides ssp.</i>	1	<i>Burkholderia ssp.</i>	2
<i>Bordetella ssp.</i>	1	<i>Calymmatobacterium granulomatis</i>	2
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1	<i>Cardiobacterium hominis</i>	2
<i>Brucella ssp.</i>	1	<i>Chlamydophila ssp.</i>	2
<i>Campylobacter ssp.</i>	1	<i>Dermabacter hominis</i>	2
<i>Chlamydia ssp.</i>	1	<i>Ehrlichia ssp.</i>	2
<i>Citrobacter ssp.</i>	1	<i>Eikenella ssp.</i>	2
<i>Clostridium ssp.</i>	1	<i>Fingoldia magna</i>	2
<i>Enterobacter ssp.</i>	1	<i>Gemella ssp.</i>	2
<i>Enterococcus ssp.</i>	1	<i>Hafnia ssp.</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	1	<i>Helicobacter pylori</i>	2
<i>Gardnerella ssp.</i>	1	<i>Kingella ssp.</i>	2
<i>Haemophilus ssp.</i>	1	<i>Kluyvera georgiana</i>	2
<i>Klebsiella ssp.</i>	1	<i>Lactobacillus ssp.</i>	2
<i>Legionella ssp.</i>	1	<i>Lactococcus lactis</i>	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	<i>Leuconostoc spp.</i>	2
<i>Moraxella ssp.</i>	1	<i>Micrococcus ssp.</i>	2
<i>Morganella morganii</i>	1	<i>Micromonas micros</i>	2
<i>Mycobacterium ssp.</i>	1	<i>Peptoniphilus ssp.</i>	2
<i>Mycoplasma ssp.</i>	1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2
<i>Neisseria ssp.</i>	1	<i>Rhizobium radiobacter</i>	2
<i>Prevotella ssp.</i>	1	<i>Rothia ssp.</i>	2
<i>Propionibacterium ssp.</i>	1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	1	<i>Streptomyces ssp.</i>	2
<i>Providencia ssp.</i>	1	<i>Aeromonas caviae</i>	2,5
<i>Pseudomonas ssp.</i>	1	<i>Anaplasma ssp.</i>	2,5
<i>Salmonella ssp.</i>	1	<i>Bifidobacterium spp</i>	2,5
<i>Serratia spp</i>	1	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2,5
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	<i>Raoultella ssp.</i>	2,5
<i>Staphylococcus ssp.</i>	1	<i>Acetobacter aurantius</i>	3
<i>Stenotrophomonas ssp.</i>	1	<i>Achromobacter spp.</i>	3
<i>Streptococcus ssp.</i>	1	<i>Actinobaculum schaalii</i>	3
<i>Treponema ssp.</i>	1	<i>Aggregatibacter ssp.</i>	3
<i>Ureaplasma ssp.</i>	1	<i>Agrobacterium ssp.</i>	3
<i>Vibrio ssp.</i>	1	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	3
<i>Yersinia ssp.</i>	1	<i>Arcanobacterium ssp.</i>	3
<i>Corynebacterium ssp.</i>	1,5	<i>Arthrobacter ssp.</i>	3
<i>Coxiella burnetii</i>	1,5	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	3
<i>Francisella ssp.</i>	1,5	<i>Azotobacter vinelandii</i>	3
<i>Fusobacterium ssp.</i>	1,5	<i>Cupriavidus pauculus</i>	3
<i>Leptospira ssp.</i>	1,5	<i>Delftia acidovorans</i>	3
<i>Nocardia ssp.</i>	1,5	<i>Desulfovibrio ssp.</i>	3
<i>Pasteurella ssp.</i>	1,5	<i>Elizabethkingia ssp.</i>	3
<i>Peptostreptococcus ssp.</i>	1,5	<i>Ewingella americana</i>	3
<i>Rickettsia ssp.</i>	1,5	<i>Granulicatella adiacens</i>	3
<i>Rochalimaea ssp.</i>	1,5	<i>Kocuria ssp.</i>	3
<i>Actinomyces ssp.</i>	2	<i>Methanobacterium extroquens</i>	3
<i>Aerococcus spp.</i>	2	<i>Microbacterium ssp.</i>	3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	<i>Ochrobactrum ssp.</i>	3
<i>Alcaligenes faecalis</i>	2	<i>Pantoea agglomerans</i>	3
<i>Bacillus ssp.</i>	2	<i>Wolbachia ssp.</i>	3

Virus	Score
<i>BK virus (DNA)</i>	1
<i>Enterovirus genus (RNA)</i>	1
<i>Epstein-Barr Virus (DNA)</i>	1
<i>Hepatitis A-E Virus (RNA/DNA)</i>	1
<i>Human adenoviruses (DNA)</i>	1
<i>Human herpes virus 1-5 (DNA)</i>	1
<i>Human papillomavirus (DNA)</i>	1
<i>JC virus (DNA)</i>	1
<i>Mumps virus (RNA)</i>	1
<i>Orthomyxoviridae family (RNA)</i>	1
<i>Parvovirus B19 (DNA)</i>	1
<i>Rabies virus (RNA)</i>	1
<i>Respiratory syncytial virus (RNA)</i>	1
<i>Rotavirus (RNA)</i>	1
<i>Rubella virus (RNA)</i>	1
<i>Varicella zoster virus (DNA)</i>	1
<i>Caliciviridae family (RNA)</i>	1,5
<i>Dengue viruses DEN1-4 (RNA)</i>	1,5
<i>Ebolavirus (RNA)</i>	1,5
<i>Human metapneumovirus (RNA)</i>	1,5
<i>Human parainfluenza viruses (RNA)</i>	1,5
<i>Measles virus (RNA)</i>	1,5
<i>Rhinovirus (RNA)</i>	1,5
<i>West Nile virus (RNA)</i>	1,5
<i>Alphavirus (RNA)</i>	2
<i>Bunyaviridae family (RNA)</i>	2
<i>Lassa virus (RNA)</i>	2
<i>Lymphocytic choriomeningitis virus (RNA)</i>	2
<i>Rift Valley fever virus (RNA)</i>	2
<i>Yellow fever virus (RNA)</i>	2
<i>Astroviridae family (RNA)</i>	2,5
<i>Human bocavirus (DNA)</i>	2,5
<i>Marburg virus (RNA)</i>	2,5
<i>Molluscum contagiosum virus (DNA)</i>	2,5
<i>Coltivirus (RNA)</i>	3
<i>Junin virus (RNA)</i>	3
<i>Sabia virus (RNA)</i>	3
<i>Variola viruses (DNA)</i>	3
<i>Venezuelan equine encephalitis virus (RNA)</i>	3
<i>Human coronavirus</i>	3
<i>Mers-CoV</i>	3
<i>SARS-CoV</i>	3

Protozoaires	Score
<i>Cryptosporidium</i>	1
<i>Entamoeba histolytica</i>	1
<i>Giardia lamblia</i>	1
<i>Plasmodium ssp.</i>	1
<i>Plasmodium ssp.</i>	1
<i>Toxoplasma gondii</i>	1
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1
<i>Leishmania ssp.</i>	1,5
<i>Trypanosoma ssp.</i>	1,5
<i>Acanthamoeba</i>	2
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	2
<i>Naegleria fowleri</i>	2
<i>Babesia ssp.</i>	2,5
<i>Blastocystis ssp.</i>	2,5
<i>Isospora belli</i>	2,5
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	3
<i>Balantidium coli</i>	3
<i>Dientamoeba fragilis</i>	3
<i>Papulaspora ssp.</i>	3
<i>Sarcocystis ssp.</i>	3

Bibliographie

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 19 août 2016;14(8):e1002533.
2. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers.* 2 oct 2017;5(4):e1373208.
3. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *Journal of Obesity.* 2016;2016:1-27.
4. Mangiola F. Gut microbiota in autism and mood disorders. *WJG.* 2016;22(1):361.
5. Sharma S, Tripathi P. Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go? *The Journal of Nutritional Biochemistry.* janv 2019;63:101-8.
6. Didelot X, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Wilson DJ. Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol.* mars 2016;14(3):150-62.
7. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia Associated With Toothbrushing and Dental Extraction. *Circulation.* 17 juin 2008;117(24):3118-25.
8. Le Moing V, Alla F, Doco-Lecompte T, Delahaye F, Piroth L, Chirouze C, et al. Staphylococcus aureus Bloodstream Infection and Endocarditis - A Prospective Cohort Study. Greub G, éditeur. *PLoS ONE.* 28 mai 2015;10(5):e0127385.
9. Widmer E, Que Y-A, Entenza JM, Moreillon P. New concepts in the pathophysiology of infective endocarditis. *Curr Infect Dis Rep.* août 2006;8(4):271-9.
10. Bell T, O'Grady NP. Prevention of Central Line-Associated Bloodstream Infections. *Infectious Disease Clinics of North America.* sept 2017;31(3):551-9.
11. [cité 24 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins/documents/rapport-synthese/enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-france-mai-juin-2012.-r>
12. Donelli G. Vascular Catheter-Related Infection and Sepsis. *Surgical Infections.* :4.
13. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* sept 2002;8(9):881-90.
14. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology.* oct 1998;30(2):295-304.
15. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. :7.

16. Karatan E, Watnick P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1 juin 2009;73(2):310-47.
17. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. sept 2010;8(9):623-33.
18. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1 sept 2014;78(3):510-43.
19. Bearman GML, Wenzel RP. Bacteremias: A Leading Cause of Death. *Archives of Medical Research*. nov 2005;36(6):646-59.
20. Ding R, Meng Y, Ma X. The Central Role of the Inflammatory Response in Understanding the Heterogeneity of Sepsis-3. *BioMed Research International*. 7 juin 2018;2018:1-10.
21. Wentowski C, Mewada N, Nielsen ND. Sepsis in 2018: a review. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. janv 2019;20(1):6-13.
22. Cawcutt KA, Peters SG. Severe Sepsis and Septic Shock: Clinical Overview and Update on Management. *Mayo Clinic Proceedings*. nov 2014;89(11):1572-8.
23. Calderari B, Liaudet L. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dysfonction d'organes au cours du sepsis. *Revue Médicale Suisse*. 2010;4.
24. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. oct 2008;8(10):776-87.
25. Hamers L, Kox M, Pickkers P. Sepsis-induced immunoparalysis: mechanisms, markers, and treatment options. *MINERVA ANESTESIOLOGICA*. 2015;81(4):14.
26. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, et al. Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. *Physiological Reviews*. juill 2013;93(3):1247-88.
27. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest*. juin 1992;101(6):1644-55.
28. Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. juin 2012;10(6):701-6.
29. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 févr 2016;315(8):801.
30. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. mars 2017;43(3):304-77.
31. Vallés J, Rello J, Ochagavía A, Garnacho J, Alcalá MA. Community-Acquired Bloodstream Infection in Critically Ill Adult Patients: Impact of Shock and Inappropriate Antibiotic Therapy on Survival. *CHEST*. 1 mai 2003;123(5):1615-24.

32. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of Inappropriate Antimicrobial Therapy Results in a Fivefold Reduction of Survival in Human Septic Shock. *Chest*. nov 2009;136(5):1237-48.
33. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med*. août 2014;42(8):1749-55.
34. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 29 août 2013;369(9):840-51.
35. Linnér A, Sundén-Cullberg J, Johansson L, Hjelmqvist H, Norrby-Teglund A, Treutiger CJ. Short- and Long-Term Mortality in Severe Sepsis/Septic Shock in a Setting with Low Antibiotic Resistance: A Prospective Observational Study in a Swedish University Hospital. *Front Public Health* [Internet]. 15 nov 2013 [cité 6 avr 2020];1. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3859970/>
36. Miller RR, Dong L, Nelson NC, Brown SM, Kuttler KG, Probst DR, et al. Multicenter Implementation of a Severe Sepsis and Septic Shock Treatment Bundle. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 juill 2013;188(1):77-82.
37. Jawad I, Lukšić I, Rafnsson SB. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *J Glob Health*. juin 2012;2(1):010404.
38. Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends in Molecular Medicine*. avr 2014;20(4):195-203.
39. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 27 oct 2010;304(16):1787-94.
40. Anderson DJ, Moehring RW, Sloane R, Schmader KE, Weber DJ, Fowler VG, et al. Bloodstream Infections in Community Hospitals in the 21st Century: A Multicenter Cohort Study. *Planet PJ*, éditeur. *PLoS ONE*. 18 mars 2014;9(3):e91713.
41. Nielsen SL, Pedersen C, Jensen TG, Gradel KO, Kolmos HJ, Lassen AT. Decreasing incidence rates of bacteremia: A 9-year population-based study. *Journal of Infection*. juill 2014;69(1):51-9.
42. Wilson J, Elgohari S, Livermore DM, Cookson B, Johnson A, Lamagni T, et al. Trends among pathogens reported as causing bacteraemia in England, 2004–2008. *Clinical Microbiology and Infection*. mars 2011;17(3):451-8.
43. Laupland KB. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clinical Microbiology and Infection*. juin 2013;19(6):492-500.
44. Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. juin 2013;19(6):501-9.
45. Javaloyas M., Garcia-Somoza D, Gudiol F. Epidemiology and Prognosis of Bacteremia: A 10-y Study in a Community Hospital. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. janv 2002;34(6):436-41.

46. Martin GS, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine*. 2003;9.
47. Vincent J-L. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*. 2 déc 2009;302(21):2323.
48. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. févr 2006;34(2):344-53.
49. Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med*. 1 avr 2004;30(4):589-96.
50. Cohen J, Cristofaro P, Carlet J, Opal S. New method of classifying infections in critically ill patients. *Crit Care Med*. juill 2004;32(7):1510-26.
51. Dolin HH, Papadimos TJ, Chen X, Pan ZK. Characterization of Pathogenic Sepsis Etiologies and Patient Profiles: A Novel Approach to Triage and Treatment. *Microbiol Insights*. 1 janv 2019;12:1178636118825081.
52. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. janv 2014;5(1):4-11.
53. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med*. févr 2002;28(2):108-21.
54. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study*: *Critical Care Medicine*. févr 2006;34(2):344-53.
55. McKenzie FE. Case mortality in polymicrobial bloodstream infections. *J Clin Epidemiol*. juill 2006;59(7):760-1.
56. Pavlaki M, Poulakou G, Drimousis P, Adamis G, Apostolidou E, Gatselis NK, et al. Polymicrobial bloodstream infections: Epidemiology and impact on mortality. *J Glob Antimicrob Resist*. déc 2013;1(4):207-12.
57. Wang Y-C, Ku W-W, Yang Y-S, Kao C-C, Kang F-Y, Kuo S-C, et al. Is Polymicrobial Bacteremia an Independent Risk Factor for Mortality in *Acinetobacter baumannii* Bacteremia? *JCM*. 6 janv 2020;9(1):153.
58. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*. 15 avr 2008;197(8):1079-81.
59. Marturano JE, Lowery TJ. ESKAPE Pathogens in Bloodstream Infections Are Associated With Higher Cost and Mortality but Can Be Predicted Using Diagnoses Upon Admission. *Open Forum Infectious Diseases*. 1 déc 2019;6(12):ofz503.
60. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR. Gram-negative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med*. mars 1980;68(3):332-43.
61. Wain J, Diep TS, Ho VA, Walsh AM, Nguyen TT, Parry CM, et al. Quantitation of bacteria in blood of typhoid fever patients and relationship between counts and clinical features, transmissibility, and antibiotic resistance. *Journal of clinical microbiology [Internet]*. 1998 [cité 7 avr

- 2020];36(6). Disponible sur: <https://ora.ox.ac.uk/objects/uuid:c71916ba-8f91-4dee-beb5-d1958da83230>
62. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev.* juill 1997;10(3):444-65.
 63. Laupland KB, Church DL. Population-Based Epidemiology and Microbiology of Community-Onset Bloodstream Infections. *Clin Microbiol Rev.* oct 2014;27(4):647-64.
 64. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of Bloodstream Infections in Adults: How Many Blood Cultures Are Needed? *Journal of Clinical Microbiology.* 1 nov 2007;45(11):3546-8.
 65. Cockerill FR, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis.* 15 juin 2004;38(12):1724-30.
 66. Li J, Plorde JJ, Carlson LG. Effects of volume and periodicity on blood cultures. *J Clin Microbiol.* nov 1994;32(11):2829-31.
 67. Nasa P, Juneja D, Singh O. Severe sepsis and septic shock in the elderly: An overview. *World J Crit Care Med.* 4 févr 2012;1(1):23-30.
 68. Garcia RA, Spitzer ED, Beaudry J, Beck C, Diblasi R, Gilleeny-Blabac M, et al. Multidisciplinary team review of best practices for collection and handling of blood cultures to determine effective interventions for increasing the yield of true-positive bacteremias, reducing contamination, and eliminating false-positive central line-associated bloodstream infections. *Am J Infect Control.* nov 2015;43(11):1222-37.
 69. Selwyn S, Ellis H. Skin Bacteria and Skin Disinfection Reconsidered. *BRITISH MEDICAL JOURNAL.* 1972;5.
 70. Viscoli C. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. *Virulence.* 2 avr 2016;7(3):248-51.
 71. Ombelet S, Barbé B, Affolabi D, Ronat J-B, Lompo P, Lunguya O, et al. Best Practices of Blood Cultures in Low- and Middle-Income Countries. *Front Med.* 18 juin 2019;6:131.
 72. Li G, Sun J, Pan S, Li W, Zhang S, Wang Y, et al. Comparison of the Performance of Three Blood Culture Systems in a Chinese Tertiary-Care Hospital. *Front Cell Infect Microbiol.* 7 août 2019;9:285.
 73. Biomerieux Bact-Alert 3D-60 - User Manual.pdf.
 74. Fiori B, D'Inzeo T, Di Florio V, De Maio F, De Angelis G, Giaquinto A, et al. Performance of Two Resin-Containing Blood Culture Media in Detection of Bloodstream Infections and in Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Broth Assays for Isolate Identification: Clinical Comparison of the BacT/Alert Plus and Bactec Plus Systems. *J Clin Microbiol.* oct 2014;52(10):3558-67.
 75. BACT/ALERT Flacons [Internet]. bioMérieux France. [cité 8 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/bactalert-flacons>
 76. Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clinical Microbiology and Infection.* juin 2013;19(6):513-20.

77. Coico R. Gram staining. *Curr Protoc Microbiol.* oct 2005;Appendix 3:Appendix 3C.
78. Pajerski W, Ochonska D, Brzychczy-Wloch M, Indyka P, Jarosz M, Golda-Cepa M, et al. Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *J Nanopart Res.* 17 août 2019;21(8):186.
79. Riegel P, Briel D de, Dauwalder O. Automatisation de l'identification bactérienne. *Revue Francophone des Laboratoires.* mai 2016;2016(482):39-47.
80. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* janv 2008;36(1):296-327.
81. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents.* nov 2007;30:7-15.
82. Hanscheid T, Monteiro C, Cristino JM, Lito LM, Salgado MJ. Growth of Mycobacterium tuberculosis in Conventional BacT/ALERT FA Blood Culture Bottles Allows Reliable Diagnosis of Mycobacteremia. *J Clin Microbiol.* févr 2005;43(2):890-1.
83. Bentley J, Thakore S, Muir L, Baird A, Lee J. A change of culture: reducing blood culture contamination rates in an Emergency Department. *BMJ Qual Improv Rep.* 2016;5(1).
84. Bates DW, Goldman L, Lee TH. Contaminant Blood Cultures and Resource Utilization: The True Consequences of False-Positive Results. *JAMA.* 16 janv 1991;265(3):365-9.
85. Willems E, Smismans A, Cartuyvels R, Coppens G, Van Vaerenbergh K, Van den Abeele A-M, et al. The preanalytical optimization of blood cultures: a review and the clinical importance of benchmarking in 5 Belgian hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* mai 2012;73(1):1-8.
86. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Front Microbiol* [Internet]. 12 mai 2016 [cité 8 avr 2020];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00697/abstract>
87. Vitrat-Hincky V, François P, Labarère J, Recule C, Stahl JP, Pavese P. Appropriateness of blood culture testing parameters in routine practice. Results from a cross-sectional study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* nov 2010;30(4):533-9.
88. van Ingen J, Hilt N, Bosboom R. Education of Phlebotomy Teams Improves Blood Volume in Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol.* mars 2013;51(3):1020-1.
89. Coorevits L, Van den Abeele A-M. Evaluation of the BD BACTEC FX blood volume monitoring system as a continuous quality improvement measure. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2015;34(7):1459-66.
90. Chang J, Park JS, Park S, Choi B, Yoon NS, Sung H, et al. Impact of monitoring blood volume in the BD BACTEC™ FX blood culture system: virtual volume versus actual volume. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* févr 2015;81(2):89-93.

91. Lin H-H, Liu Y-F, Tien N, Ho C-M, Hsu L-N, Lu J-J. Evaluation of the blood volume effect on the diagnosis of bacteremia in automated blood culture systems. *J Microbiol Immunol Infect*. févr 2013;46(1):48-52.
92. Mermel LA, Maki DG. Detection of bacteremia in adults: consequences of culturing an inadequate volume of blood. *Ann Intern Med*. 15 août 1993;119(4):270-2.
93. brochure_prelevement_hemoculture.pdf [Internet]. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: https://www.biomerieux.fr/sites/subsidiary_fr/files/brochure_prelevement_hemoculture.pdf
94. Choi J, Ensafi S, Chartier LB, Van Praet O. A Quality Improvement Initiative to Decrease the Rate of Solitary Blood Cultures in the Emergency Department. *Theodoro DL*, éditeur. *Acad Emerg Med*. sept 2017;24(9):1080-7.
95. Bassett EJ, Keith MS, Armelagos GJ, Martin DL, Villanueva AR. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science*. 26 sept 1980;209(4464):1532-4.
96. Disease in Ancient Nubia | Science [Internet]. [cité 27 avr 2020]. Disponible sur: <https://science.sciencemag.org/content/163/3864/255>
97. Cook M, Molto E, Anderson C. Fluorochrome labelling in roman period skeletons from dakhleh oasis, Egypt. *American Journal of Physical Anthropology*. 1989;80(2):137-43.
98. Mohr KI. History of Antibiotics Research. In: Stadler M, Dersch P, éditeurs. *How to Overcome the Antibiotic Crisis* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 9 juin 2020]. p. 237-72. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 398). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/82_2016_499
99. Ribeiro da Cunha, Fonseca, Calado. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? *Antibiotics*. 24 avr 2019;8(2):45.
100. Aminov RI. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbio* [Internet]. 2010 [cité 24 avr 2020];1. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2010.00134/abstract>
101. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*. juin 1929;10(3):226-36.
102. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, et al. THE CLASSIC: penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. *Clin Orthop Relat Res*. oct 2005;439:23-6.
103. Lewis K. Recover the lost art of drug discovery. *Nature*. mai 2012;485(7399):439-40.
104. Waksman SA. What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia*. oct 1947;39(5):565-9.
105. Bentley R, Bennett JW. What is an antibiotic? Revisited. *Adv Appl Microbiol*. 2003;52:303-31.
106. Smith PW, Watkins K, Hewlett A. Infection control through the ages. *American Journal of Infection Control*. févr 2012;40(1):35-42.
107. Livermore DM, on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug Discovery and Development, Blaser M,

- Carrs O, Cassell G, Fishman N, et al. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 sept 2011;66(9):1941-4.
108. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*. janv 2007;6(1):29-40.
109. Renwick MJ, Brogan DM, Mossialos E. A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)*. févr 2016;69(2):73-88.
110. Projan SJ. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Current Opinion in Microbiology*. oct 2003;6(5):427-30.
111. Tan Q, Qiu J, Luo X, Zhang Y, Liu Y, Chen Y, et al. Progress in One-pot Bioconversion of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic Acid. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(1):30-42.
112. Nelson ML, Levy SB. The history of the tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci*. déc 2011;1241:17-32.
113. Bisacchi GS. Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded “Discovery Story”: Miniperspective. *J Med Chem*. 25 juin 2015;58(12):4874-82.
114. Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother*. 1 juill 2000;46(suppl_3):17-24.
115. Antimicrobial consumption - Annual Epidemiological Report for 2018 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2019 [cité 16 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-consumption-europe-2018>
116. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. sept 2016 [cité 4 mai 2020];6(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5008060/>
117. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*. 23 mars 2001;104(6):901-12.
118. Arenz S, Wilson DN. Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. sept 2016 [cité 6 mai 2020];6(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5008061/>
119. Dinos GP. The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol*. sept 2017;174(18):2967-83.
120. Bozdogan B, Appelbaum PC. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents*. févr 2004;23(2):113-9.
121. Wiest DB, Cochran JB, Tecklenburg FW. Chloramphenicol Toxicity Revisited: A 12-Year-Old Patient With a Brain Abscess. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2012;17(2):182-8.
122. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. avr 2016 [cité 5 mai 2020];6(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817740/>

123. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. juin 2016 [cité 16 mai 2020];6(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888811/>
124. Then R, Angehrn P. Sulphonamide-induced « thymineless death » in *Escherichia coli*. J Gen Microbiol. juin 1973;76(2):255-63.
125. Gleckman R, Blagg N, Joubert DW. Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications. Pharmacotherapy. août 1981;1(1):14-20.
126. Wang X, Borges CA, Ning X, Rafi M, Zhang J, Park B, et al. A Trimethoprim Conjugate of Thiomaltose Has Enhanced Antibacterial Efficacy In Vivo. Bioconjug Chem. 16 2018;29(5):1729-35.
127. Murima P, McKinney JD, Pethe K. Targeting bacterial central metabolism for drug development. Chem Biol. 20 nov 2014;21(11):1423-32.
128. Bourne CR. Utility of the Biosynthetic Folate Pathway for Targets in Antimicrobial Discovery. Antibiotics (Basel). 21 janv 2014;3(1):1-28.
129. Wright PM, Seiple IB, Myers AG. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. Angew Chem Int Ed Engl. 18 août 2014;53(34):8840-69.
130. Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol Rev. mars 2008;32(2):149-67.
131. Abrahams KA, Besra GS. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. Parasitology. févr 2018;145(2):116-33.
132. Ruiz N. Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. PNAS. 7 oct 2008;105(40):15553-7.
133. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiol Rev. mars 2008;32(2):234-58.
134. Mashalidis EH, Kaeser B, Terasawa Y, Katsuyama A, Kwon D-Y, Lee K, et al. Chemical logic of *MraY* inhibition by antibacterial nucleoside natural products. Nat Commun. 02 2019;10(1):2917.
135. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. Clin Microbiol Rev. avr 2016;29(2):321-47.
136. Sarkar P, Yarlagadda V, Ghosh C, Haldar J. A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics †The authors declare no competing interests. Medchemcomm. 26 janv 2017;8(3):516-33.
137. Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. nov 1989;8(11):943-50.
138. Ostash B, Walker S. Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, biological activity. Nat Prod Rep. 21 nov 2010;27(11):1594-617.

139. Ostash B, Doud E, Lin C, Ostash I, Perlstein D, Fuse S, et al. Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway. *Biochemistry*. 22 sept 2009;48(37):8830-41.
140. van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front Microbiol* [Internet]. 28 sept 2011 [cité 16 mai 2020];2. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202223/>
141. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. août 2016 [cité 4 mai 2020];6(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968164/>
142. Nordmann P. Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Med Sci (Paris)*. nov 2010;26(11):950-9.
143. Osei Sekyere J. Current State of Resistance to Antibiotics of Last-Resort in South Africa: A Review from a Public Health Perspective. *Front Public Health* [Internet]. 30 sept 2016 [cité 15 mai 2020];4. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5042966/>
144. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*. mai 2013;12(5):371-87.
145. Weigel BJ, Burgett SG, Chen VJ, Skatrud PL, Frolik CA, Queener SW, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of isopenicillin N synthetase genes from *Streptomyces lipmanii* and *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol*. sept 1988;170(9):3817-26.
146. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. sept 2011;477(7365):457-61.
147. Newswire M-P. CDC releases 2019 AR Threats Report [Internet]. MultiVu. [cité 9 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.multivu.com/players/English/8627551-cdc-antibiotic-resistance-threat-report-2019/>
148. AMR Review Paper - Tackling a crisis for the health and wealth of nations_1.pdf [Internet]. [cité 11 mai 2020]. Disponible sur: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
149. WHO | WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 11 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>
150. Iredell J, Brown J, Tagg K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ*. 8 févr 2016;352:h6420.
151. Navidinia M. The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Archives of Advances in Biosciences*. 5 juin 2016;7(3):43-57.
152. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol*. 1 avr 2019;10:539.

153. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(3):268-81.
154. Karakonstantis S, Kritsotakis EI, Gikas A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *J Antimicrob Chemother*. 1 févr 2020;75(2):271-82.
155. Zayyad H, Eliakim-Raz N, Leibovici L, Paul M. Revival of old antibiotics: needs, the state of evidence and expectations. *Int J Antimicrob Agents*. mai 2017;49(5):536-41.
156. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2000;44(7):1818-24.
157. Brooun A, Liu S, Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. mars 2000;44(3):640-6.
158. Shigeta M, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy*. oct 1997;43(5):340-5.
159. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng*. mai 1994;43(11):1131-8.
160. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. janv 2001;9(1):34-9.
161. Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol*. juill 2012;65(2):183-95.
162. Pagès J-M, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. déc 2008;6(12):893-903.
163. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*. juill 2000;37(2):239-53.
164. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. déc 2003;67(4):593-656.
165. Choi U, Lee C-R. Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* [Internet]. 30 avr 2019 [cité 12 mai 2020];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6503746/>
166. Doménech-Sánchez A, Pascual A, Suárez AI, Alvarez D, Benedí VJ, Martínez-Martínez L. Activity of nine antimicrobial agents against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases and deficient or not in porins. *J Antimicrob Chemother*. 1 nov 2000;46(5):858-60.
167. Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, del Carmen Conejo M, Pascual Á, Tomás JM, et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. *AAC*. oct 2003;47(10):3332-5.

168. Sharma A, Sharma R, Bhattacharyya T, Bhando T, Pathania R. Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter-AbaF. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(1):68-74.
169. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 juill 2005;56(1):20-51.
170. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* avr 2006;19(2):382-402.
171. Handzlik J, Matys A, Kieć-Kononowicz K. Recent Advances in Multi-Drug Resistance (MDR) Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive Bacteria *S. aureus*. *Antibiotics (Basel).* 5 févr 2013;2(1):28-45.
172. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum [Internet].* 1 avr 2016 [cité 13 mai 2020];4(2). Disponible sur: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
173. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence.* 15 août 2012;3(5):421-569.
174. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* 1 nov 2004;28(5):519-42.
175. Huang L, Yuan H, Liu M-F, Zhao X-X, Wang M-S, Jia R-Y, et al. Type B Chloramphenicol Acetyltransferases Are Responsible for Chloramphenicol Resistance in *Riemerella anatipestifer*, China. *Front Microbiol [Internet].* 1 mars 2017 [cité 10 juin 2020];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5331189/>
176. Murray IA, Shaw WV. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 1997;41(1):1-6.
177. Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell.* 23 mars 2007;128(6):1037-50.
178. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis.* mai 2011;11(5):381-93.
179. Ruppé E, Bidet P, Verdet C, Arlet G, Bingen E. First Detection of the Ambler Class C 1 AmpC β -Lactamase in *Citrobacter freundii* by a New, Simple Double-Disk Synergy Test. *J Clin Microbiol.* nov 2006;44(11):4204-7.
180. Antunes NT, Fisher JF. Acquired Class D β -Lactamases. *Antibiotics (Basel).* 21 août 2014;3(3):398-434.
181. Li W, Atkinson GC, Thakor NS, Allas Ü, Lu C, Chan K-Y, et al. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nat Commun.* juin 2013;4(1):1477.
182. Dönhöfer A, Franckenberg S, Wickles S, Berninghausen O, Beckmann R, Wilson DN. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 oct 2012;109(42):16900-5.

183. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother.* avr 2011;17(2):149-82.
184. Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol.* 30 nov 2018;9:2928.
185. Leclercq R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases.* 15 févr 2002;34(4):482-92.
186. Courvalin P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases.* 1 janv 2006;42(Supplement_1):S25-34.
187. Eliopoulos GM, Huovinen P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis.* 1 juin 2001;32(11):1608-14.
188. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* août 1993;37(8):1563-71.
189. Ramdani-Bouguessa N, Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Tazir M, Caniça M. Role of SHV β -lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to β -lactams in an Algerian hospital. *J Med Microbiol.* juill 2011;60(Pt 7):983-7.
190. Koraimann G, Wagner MA. Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 29 avr 2014 [cité 10 juin 2020];4. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4010749/>
191. Wein T, Hülter NF, Mizrahi I, Dagan T. Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. *Nat Commun.* déc 2019;10(1):2595.
192. Hayes F. Toxins-Antitoxins: Plasmid Maintenance, Programmed Cell Death, and Cell Cycle Arrest. *Science.* 12 sept 2003;301(5639):1496-9.
193. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Reviews.* 1 août 2018;31(4):e00088-17, /cmr/31/4/e00088-17.atom.
194. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* janv 2009;22(1):161-82, Table of Contents.
195. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* juin 2002;40(6):2153-62.
196. Intestinal microbiota and antibiotic resistance_ Perspectives and solutions | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 18 mai 2020]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2452231718300113?token=8F5390E80B8CA484EDCBA2F612D9162549060402931A5062C114B3A6661C316DB6596A79006E5C6D55F59BBF30986DC1>
197. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F. Mobility of Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* sept 2010;74(3):434-52.

198. Brunton J, Meier M, Erhman N, Clare D, Almawy R. Origin of small beta-lactamase-specifying plasmids in *Haemophilus* species and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* oct 1986;168(1):374-9.
199. Roy PH. Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. Dissemination of antibiotic resistance [Internet]. 1997 [cité 15 mai 2020]; Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/489>
200. Genetic support of extended-spectrum $\hat{2}$ -lactamases | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 18 mai 2020]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1198743X14604778?token=8DD289BED2D5A99FF00F6043F8A7421B1B20A7BD3BA30E49667DFA8AFD2C5AC0A3DF927C1EBD4A2255A32978E20535F3>
201. Giakkoupi P, Petrikos G, Tzouveleki LS, Tsonas S, Legakis NJ, Vatopoulos AC. Spread of Integron-Associated VIM-Type Metallo- β -Lactamase Genes among Imipenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Greek Hospitals. *J Clin Microbiol.* févr 2003;41(2):822-5.
202. Rather IA, Kim B-C, Bajpai VK, Park Y-H. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi J Biol Sci.* mai 2017;24(4):808-12.
203. Dougan G, Baker S. *Salmonella enterica* Serovar Typhi and the Pathogenesis of Typhoid Fever. *Annu Rev Microbiol.* 8 sept 2014;68(1):317-36.
204. Dodds DR. Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochem Pharmacol.* 15 2017;134:139-46.
205. 2018 Summary Report On Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. :49.
206. ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal.* 2017;15(7):e04872.
207. Prévost S. Le dispositif de contrôle des promoteurs de croissance. 2014;8.
208. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health.* oct 2015;109(7):309-18.
209. Aćimović SG, Zeng Q, McGhee GC, Sundin GW, Wise JC. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Front Plant Sci* [Internet]. 2015 [cité 7 mai 2020];6. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00016/full>
210. Moore AM, Patel S, Forsberg KJ, Wang B, Bentley G, Razia Y, et al. Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. *PLoS ONE.* 2013;8(11):e78822.
211. Forslund K, Sunagawa S, Kultima JR, Mende DR, Arumugam M, Typas A, et al. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome Res.* juill 2013;23(7):1163-9.
212. Hu Y, Yang X, Qin J, Lu N, Cheng G, Wu N, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat Commun.* oct 2013;4(1):2151.

213. Imran M, Das KR, Naik MM. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. *Chemosphere*. janv 2019;215:846-57.
214. Davis IJ, Roberts AP, Ready D, Richards H, Wilson M, Mullany P. Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*. *Plasmid*. juill 2005;54(1):26-38.
215. Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, et al. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. juill 2013;10(7):2643-69.
216. Baietto L, Corcione S, Pacini G, Di Perri G, D'Avolio† A, Giuseppe De Rosa† F. A 30-years Review on Pharmacokinetics of Antibiotics: Is the Right Time for Pharmacogenetics? *Curr Drug Metab*. juill 2014;15(6):581-98.
217. Khennavong M, Davone V, Vongsouvath M, Phetsouvanh R, Silisouk J, Rattana O, et al. Urine Antibiotic Activity in Patients Presenting to Hospitals in Laos: Implications for Worsening Antibiotic Resistance. *Am J Trop Med Hyg*. 1 août 2011;85(2):295-302.
218. Berkner S, Konradi S, Schönfeld J. Antibiotic resistance and the environment—there and back again: Science & Society series on Science and Drugs. *EMBO Rep*. juill 2014;15(7):740-4.
219. Homem V, Santos L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – A review. *Journal of Environmental Management*. 1 oct 2011;92(10):2304-47.
220. Joss A, Zabczynski S, Göbel A, Hoffmann B, Löffler D, McArdell CS, et al. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research*. mai 2006;40(8):1686-96.
221. Carvalho IT, Santos L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*. sept 2016;94:736-57.
222. Ranjbar R, Sami M. Genetic Investigation of Beta-Lactam Associated Antibiotic Resistance Among *Escherichia Coli* Strains Isolated from Water Sources. *Open Microbiol J*. 2017;11:203-10.
223. Kummerer K. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 juill 2004;54(2):311-20.
224. Baquero F, Martínez J-L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 1 juin 2008;19(3):260-5.
225. Berkner S, Konradi S, Schönfeld J. Antibiotic resistance and the environment—there and back again. *EMBO Rep*. juill 2014;15(7):740-4.
226. Girardi C, Greve J, Lamshöft M, Fetzer I, Miltner A, Schäffer A, et al. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. *Journal of Hazardous Materials*. 30 déc 2011;198:22-30.
227. Martinez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci*. 22 juill 2009;276(1667):2521-30.

228. Liu Y, Liu J-H. Monitoring Colistin Resistance in Food Animals, An Urgent Threat. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 3 juin 2018;16(6):443-6.
229. Madec J-Y. La résistance à la colistine. 2017;5.
230. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. janv 2016;529(7586):336-43.
231. Autret N, Charbit A. Lessons from signature-tagged mutagenesis on the infectious mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. sept 2005;29(4):703-17.
232. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 16 mai 2019 [cité 20 mai 2020];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6524306/>
233. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *The Lancet Infectious Diseases*. 1 févr 2016;16(2):239-51.
234. Jehl F, Chabaud A, Grillon A. L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? *Journal des Anti-infectieux*. 1 déc 2015;17(4):125-39.
235. CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf [Internet]. [cité 21 mai 2020]. Disponible sur: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf
236. Oct 18 P par SM |, Éducation 2017 |. Comment VITEK® 2 génère-t-il des valeurs de CMI ? [Internet]. *BIOMÉRIEUX iNEWS*. 2017 [cité 21 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.biomerieux-microbio.com/fr/education-fr/comment-vitek-2-genere-t-il-des-valeurs-de-cmi/>
237. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *CLIN INFECT DIS*. déc 2009;49(11):1749-55.
238. Wolk DM, Dunne WM. New Technologies in Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 sept 2011;49(9 Supplement):S62-7.
239. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. juin 1987;51(2):221-71.
240. Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res*. 1 sept 1996;24(17):3381-91.
241. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. mai 2007;69(2):330-9.
242. Ueda K, Seki T, Kudo T, Yoshida T, Kataoka M. Two Distinct Mechanisms Cause Heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol*. 1 janv 1999;181(1):78-82.
243. Yap WH, Zhang Z, Wang Y. Distinct Types of rRNA Operons Exist in the Genome of the Actinomycete *Thermomonospora chromogena* and Evidence for Horizontal Transfer of an Entire rRNA Operon. *J Bacteriol*. sept 1999;181(17):5201-9.

244. Poole S, Kidd SP, Saeed K. A review of novel technologies and techniques associated with identification of bloodstream infection etiologies and rapid antimicrobial genotypic and quantitative phenotypic determination. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 3 juin 2018;18(6):543-55.
245. FilmArray BCID (Blood Culture IDentification) Panel - Panel d'identification pour hémocultures [Internet]. bioMérieux France. [cité 25 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/filmarray-bcid-blood-culture-identification-panel-panel-didentification-pour>
246. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. déc 2013;51(12):4130-6.
247. Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL, Fisher MA, Barker E, Garrone NF, et al. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. déc 2012;74(4):349-55.
248. Peters RPH, van Agtmael MA, Simoons-Smit AM, Danner SA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Rapid Identification of Pathogens in Blood Cultures with a Modified Fluorescence In Situ Hybridization Assay. *J Clin Microbiol*. nov 2006;44(11):4186-8.
249. HTFA-PRT-0049_Torch_Melting_Curve_Analysis_Tech_Note.pdf [Internet]. [cité 25 mai 2020]. Disponible sur: https://www.biofire.com/wp-content/uploads/2016/06/HTFA-PRT-0049_Torch_Melting_Curve_Analysis_Tech_Note.pdf
250. Blood Culture Identification (BCID) Panels [Internet]. GenMark. [cité 26 mai 2020]. Disponible sur: <https://genmarkdx.com/solutions/panels/eplex-panels/blood-culture-identification-panels/>
251. Huang T-D, Melnik E, Bogaerts P, Evrard S, Glupczynski Y. Evaluation of the ePlex Blood Culture Identification Panels for Detection of Pathogens in Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. 30 janv 2019 [cité 26 mai 2020];57(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6355516/>
252. Electrowetting Technology [Internet]. GenMark. [cité 26 mai 2020]. Disponible sur: <https://genmarkdx.com/int/solutions/technology/electrowetting/>
253. Teng P, Tian D, Fu H, Wang S. Recent progress of electrowetting for droplet manipulation: from wetting to superwetting systems. *Materials Chemistry Frontiers*. 2020;4(1):140-54.
254. Schmitz JE, Tang Y-W. The GenMark ePlex®: another weapon in the syndromic arsenal for infection diagnosis. *Future Microbiol*. 2018;13:1697-708.
255. Pierce VM, Hodinka RL. Comparison of the GenMark Diagnostics eSensor Respiratory Viral Panel to Real-Time PCR for Detection of Respiratory Viruses in Children. *J Clin Microbiol*. nov 2012;50(11):3458-65.
256. 00345_Rev-3.0_BCU_ApplicationManual_EN.pdf [Internet]. [cité 26 mai 2020]. Disponible sur: https://curetis.com/wp-content/uploads/00345_Rev-3.0_BCU_ApplicationManual_EN.pdf

257. Master Diagnostica® - DNA Flow Technology for Sepsis and Infectious Diseases [Internet]. ADT Biotech. [cité 27 mai 2020]. Disponible sur: <http://adt-biotech.com/master-diagnostica-dna-flow-technology-for-sepsis-and-infectious-diseases/>
258. Galiana A, Coy J, Gimeno A, Guzman NM, Rosales F, Merino E, et al. Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections. *PLoS One* [Internet]. 18 mai 2017 [cité 26 mai 2020];12(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5436663/>
259. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, Mero S, Savolainen L, Vaara M, et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *The Lancet*. janv 2010;375(9710):224-30.
260. 200107-Mobidiag-Secures-Additional-Funding-from-Business-Finland-for-Rapid-Sepsis-Diagnostic-Test.pdf [Internet]. [cité 27 mai 2020]. Disponible sur: <https://mobidiag.com/wp-content/uploads/2020/02/200107-Mobidiag-Secures-Additional-Funding-from-Business-Finland-for-Rapid-Sepsis-Diagnostic-Test.pdf>
261. Liu H, Heflin K, Han J, Conover M, Wagner L, Bertrand J, et al. Development of the iCubate Molecular Diagnostic Platform Utilizing Amplicon Rescue Multiplex Polymerase Chain Reaction. *J Biomed Nanotechnol*. 1 juill 2019;15(7):1598-608.
262. Granato PA, Unz MM, Widen RH, Silbert S, Young S, Heflin KL, et al. Clinical Evaluation of the iCubate iC-GPC Assay for Detection of Gram-Positive Bacteria and Resistance Markers from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* [Internet]. 27 août 2018 [cité 1 juin 2020];56(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113461/>
263. Gram-Positive & Gram-Negative, FDA Cleared [Internet]. iCubate. 2016 [cité 4 juin 2020]. Disponible sur: <https://icubate.com/gpcandgn/>
264. Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, Wassill L. Evaluation of the Hyplex BloodScreen Multiplex PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay System for Direct Identification of Gram-Positive Cocci and Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. juill 2004;42(7):3147-52.
265. Chun K, Syndergaard C, Damas C, Trubey R, Mukindaraj A, Qian S, et al. Sepsis Pathogen Identification. *J Lab Autom*. 1 oct 2015;20(5):539-61.
266. Venkatesh M, Flores A, Luna RA, Versalovic J. Molecular microbiological methods in the diagnosis of neonatal sepsis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. sept 2010;8(9):1037-48.
267. Pellestor F, Paulasova P, Hamamah S. Peptide nucleic acids (PNAs) as diagnostic devices for genetic and cytogenetic analysis. *Curr Pharm Des*. 2008;14(24):2439-44.
268. Salimnia H, Fairfax MR, Lephart P, Morgan M, Gilbreath JJ, Butler-Wu SM, et al. An International, Prospective, Multicenter Evaluation of the Combination of AdvanDx Staphylococcus QuickFISH BC with mecA XpressFISH for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. nov 2014;52(11):3928-32.
269. Maurer FP, Christner M, Hentschke M, Rohde H. Advances in Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory: Implications for Patient Care and Antimicrobial Stewardship Programs. *Infect Dis Rep* [Internet]. 30 mars 2017

- [cité 22 mai 2020];9(1). Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5391540/>
270. Pancholi P, Carroll KC, Buchan BW, Chan RC, Dhiman N, Ford B, et al. Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 26 mars 2018 [cité 5 juin 2020];56(4). Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869823/>
271. Beal SG, Ciorca J, Smith G, John J, Lee F, Doern CD, et al. Evaluation of the Nanosphere Verigene Gram-Positive Blood Culture Assay with the VersaTREK Blood Culture System and Assessment of Possible Impact on Selected Patients. *J Clin Microbiol*. déc 2013;51(12):3988-92.
272. Pence MA, McElvania TeKippe E, Burnham C-AD. Diagnostic Assays for Identification of Microorganisms and Antimicrobial Resistance Determinants Directly from Positive Blood Culture Broth. *Clinics in Laboratory Medicine*. sept 2013;33(3):651-84.
273. Yui S, Bercades G, Muzslay M, Blackburn E, Ali S, Smyth D, et al. Assessment of a rapid diagnostic test to exclude bacteraemia and effect on clinical decision-making for antimicrobial therapy. *Sci Rep*. déc 2020;10(1):3122.
274. Dryden M, Sitjar A, Gunning Z, Lewis S, Healey R, Satchithanathan P, et al. Can rapid negative exclusion of blood cultures by a molecular method, enzyme template generation and amplification technique (Cognitor® Minus), aid antimicrobial stewardship? *Int J Pharm Pract*. juin 2018;26(3):267-72.
275. Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, et al. Comparative Evaluation of Six Commercialized Multiplex PCR Kits for the Diagnosis of Respiratory Infections. Chan KH, éditeur. *PLoS ONE*. 23 août 2013;8(8):e72174.
276. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. mars 2012;36(2):380-407.
277. Chen JHK, Ho P-L, Kwan GSW, She KKK, Siu GKH, Cheng VCC, et al. Direct Bacterial Identification in Positive Blood Cultures by Use of Two Commercial Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems. *J Clin Microbiol*. juin 2013;51(6):1733-9.
278. Sakarikou C, Altieri A, Bossa MC, Minelli S, Dolfa C, Piperno M, et al. Rapid and cost-effective identification and antimicrobial susceptibility testing in patients with Gram-negative bacteremia directly from blood-culture fluid. *Journal of Microbiological Methods*. mars 2018;146:7-12.
279. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β -Lactam Antibiotics. *J Clin Microbiol*. mars 2012;50(3):927-37.
280. Hrabák J, Študentová V, Walková R, Žemličková H, Jakubů V, Chudáčková E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 Carbapenemases by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. juill 2012;50(7):2441-3.
281. Dd R, H W, J K, Ss R. The Presence of a Single MALDI-TOF Mass Spectral Peak Predicts Methicillin Resistance in Staphylococci [Internet]. Vol. 86, *Diagnostic microbiology and*

- infectious disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 2016 [cité 29 mai 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27568365/>
282. MBT STAR-Carba Kit IVD [Internet]. Bruker.com. [cité 29 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/ivd-ce-certified-maldi-biolyser/mbt-star-carba-kit-ivd.html>
283. Schulz S, Dickschat JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep*. 25 juill 2007;24(4):814-42.
284. Bos LDJ, Sterk PJ, Schultz MJ. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog*. mai 2013;9(5):e1003311.
285. Wiesner K, Jaremek M, Pohle R, von Sicard O, Stuetz E. Monitoring of Bacterial Growth and Rapid Evaluation of Antibiotic Susceptibility by Headspace Gas Analysis. *Procedia Engineering*. 1 janv 2014;87:332-5.
286. Rees CA, Burklund A, Stefanuto P-H, Schwartzman JD, Hill JE. Comprehensive volatile metabolic fingerprinting of bacterial and fungal pathogen groups. *J Breath Res*. 3 janv 2018;12(2):026001.
287. Lim SH, Mix S, Xu Z, Taba B, Budvytiene I, Berliner AN, et al. Colorimetric Sensor Array Allows Fast Detection and Simultaneous Identification of Sepsis-Causing Bacteria in Spiked Blood Culture. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 févr 2014;52(2):592-8.
288. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ*. 11 juin 1994;308(6943):1552.
289. Peker N, Couto N, Sinha B, Rossen JW. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clinical Microbiology and Infection*. sept 2018;24(9):944-55.
290. Carroll KC, Reid JL, Thornberg A, Whitfield NN, Trainor D, Lewis S, et al. Clinical Performance of the Novel GenMark Dx ePlex Blood Culture ID Gram-Positive Panel. *J Clin Microbiol*. 25 mars 2020;58(4).
291. Burrack-Lange SC, Personne Y, Huber M, Winkler E, Weile J, Knabbe C, et al. Multicenter assessment of the rapid Unyvero Blood Culture molecular assay. *Journal of Medical Microbiology*. 1 sept 2018;67(9):1294-301.
292. Buchan BW, Reymann GC, Granato PA, Alkins BR, Jim P, Young S. Preliminary Evaluation of the Research-Use-Only (RUO) iCubate iC-GPC Assay for Identification of Select Gram-Positive Bacteria and Their Resistance Determinants in Blood Culture Broths: TABLE 1. Bourbeau P, éditeur. *J Clin Microbiol*. déc 2015;53(12):3931-4.
293. Dortet L, Tandé D, de Briel D, Bernabeu S, Lasserre C, Gregorowicz G, et al. MALDI-TOF for the rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: comparison of the commercialized MBT STAR®-Carba IVD Kit with two in-house MALDI-TOF techniques and the RAPIDEC® CARBA NP. *J Antimicrob Chemother*. 01 2018;73(9):2352-9.
294. Anantharajah A, Tossens B, Olive N, Kabamba-Mukadi B, Rodriguez-Villalobos H, Verroken A. Performance Evaluation of the MBT STAR®-Carba IVD Assay for the Detection of Carbapenemases With MALDI-TOF MS. *Front Microbiol* [Internet]. 20 juin 2019 [cité 4 juin 2020];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6596351/>

295. Kühn C, Disqué C, Mühl H, Orszag P, Stiesch M, Haverich A. Evaluation of Commercial Universal rRNA Gene PCR plus Sequencing Tests for Identification of Bacteria and Fungi Associated with Infectious Endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 août 2011;49(8):2919-23.
296. Opota O, Jaton K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clinical Microbiology and Infection*. avr 2015;21(4):323-31.
297. Zboromyrska Y, Cillóniz C, Cobos-Trigueros N, Almela M, Hurtado JC, Vergara A, et al. Evaluation of the Magicplex™ Sepsis Real-Time Test for the Rapid Diagnosis of Bloodstream Infections in Adults. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 12 mars 2019 [cité 30 mai 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6423426/>
298. Seegene Inc [Internet]. [cité 30 mai 2020]. Disponible sur: http://www.seegene.com/assays/magicplex_sepsis_realtime_test
299. SepsitTest™-UMD: Unbiased rDNA PCR Pathogen Diagnosis [Internet]. [cité 30 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.molzym.com/molzym-blog/categories/molecular-diagnostics/166-sepsitest-umd-unbiased-rdna-pcr-pathogen-diagnosis>
300. O'Grady J. A powerful, non-invasive test to rule out infection. *Nature Microbiology*. avr 2019;4(4):554-5.
301. Le test iDTECT™ Blood de PathoQuest est marqué CE | PathoQuest [Internet]. [cité 1 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.pathoquest.com/?p=1049>
302. Jordana-Lluch E, Giménez M, Quesada MD, Ausina V, Martró E. Improving the Diagnosis of Bloodstream Infections: PCR Coupled with Mass Spectrometry. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [cité 31 mai 2020];2014. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4000954/>
303. Neely LA, Audeh M, Phung NA, Min M, Suchocki A, Plourde D, et al. T2 magnetic resonance enables nanoparticle-mediated rapid detection of candidemia in whole blood. *Sci Transl Med*. 24 avr 2013;5(182):182ra54.
304. Pfaller MA, Wolk DM, Lowery TJ. T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiology*. janv 2016;11(1):103-17.
305. Szemes M, Bonants P, de Weerd M, Baner J, Landegren U, Schoen CD. Diagnostic application of padlock probes—multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(8):e70.
306. Dahl F, Baner J, Gullberg M, Mendel-Hartvig M, Landegren U, Nilsson M. Circle-to-circle amplification for precise and sensitive DNA analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 30 mars 2004;101(13):4548-53.
307. Technology | DNAe [Internet]. [cité 1 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.dnae.com/technology--dnae.html>
308. FAST-ID BSI | qvella.com [Internet]. [cité 1 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.qvella.com/fast-id-bsi/>
309. Metzgar D, Frinder MW, Rothman RE, Peterson S, Carroll KC, Zhang SX, et al. The IRIDICA BAC BSI Assay: Rapid, Sensitive and Culture-Independent Identification of Bacteria and Candida in

- Blood. PLoS One [Internet]. 6 juill 2016 [cité 3 juin 2020];11(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4934770/>
310. Sinha M, Jupe J, Mack H, Coleman TP, Lawrence SM, Fraley SI. Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis. *Clin Microbiol Reviews*. 28 févr 2018;31(2):e00089-17, /cmr/31/2/e00089-17.atom.
311. Nguyen MH, Clancy CJ, Pasculle AW, Pappas PG, Alangaden G, Pankey GA, et al. Performance of the T2Bacteria Panel for Diagnosing Bloodstream Infections. *Annals of Internal Medicine*. 14 mai 2019;170(12):845-52.
312. Oligo Analyzer [Internet]. [cité 3 févr 2020]. Disponible sur: <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
313. Multiple Primer Analyzer - FR [Internet]. [cité 3 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>
314. Silva [Internet]. [cité 3 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.arb-silva.de/>
315. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. [cité 18 janv 2020]. Disponible sur: <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
316. Zacharow I, Bystron J, Walecka-Zacharska E, Podkowik M, Bania J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from retail meat in Lower Silesia region, Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 1 mars 2015;18(1):63-9.
317. Byrne BG, McColm S, McElmurry SP, Kilgore PE, Sobek J, Sadler R, et al. Prevalence of Infection-Competent Serogroup 6 *Legionella pneumophila* within Premise Plumbing in Southeast Michigan. Shuman HA, éditeur. *mBio*. 6 févr 2018;9(1):e00016-18.
318. Oliveira MGX de, Gomes VT de M, Cunha MPV, Moreno LZ, Moreno AM, Knöbl T. Genotypic Characterization of *Arcobacter* spp. Isolated from Chicken Meat in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*. mai 2018;15(5):293-9.
319. Tulane University, Aw T. Environmental Aspects and Features of Critical Pathogen Groups. In: Michigan State University, Rose J, Jiménez-Cisneros B, UNESCO - International Hydrological Programme, éditeurs. *Global Water Pathogen Project* [Internet]. Michigan State University; 2019 [cité 24 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.waterpathogens.org/book/environmental-aspects-and-features-of-critical-pathogen-groups>
320. Wauters, G. 1981. Antigens of *Yersinia enterocolitica*, p. 41-53. In E. J. Bottone (ed.), *Yersinia enterocolitica*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
321. McLean K, Rosenthal CA, Sengupta D, Owens J, Cookson BT, Hoffman NG, et al. Improved Species-Level Clinical Identification of *Enterobacteriaceae* through Broad-Range *dnaJ* PCR and Sequencing. Ledebor NA, éditeur. *J Clin Microbiol*. 21 août 2019;57(11):e00986-19, /jcm/57/11/JCM.00986-19.atom.
322. Dauga C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1 mars 2002;52(2):531-47.

323. Hendling M, Pabinger S, Peters K, Wolff N, Conzemius R, Barišić I. Oli2go: an automated multiplex oligonucleotide design tool. *Nucleic Acids Research*. 2 juill 2018;46(W1):W252-6.
324. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*. sept 1997;23(3):504-11.
325. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *CLIN MICROBIOL REV*. 2000;13:12.
326. Wu L-C, Horng J-T, Huang H-Y, Lin F-M, Huang H-D, Tsai M-F. Primer design for multiplex PCR using a genetic algorithm. *Soft Comput*. 17 avr 2007;11(9):855-63.
327. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *Genome Research*. 1 déc 1993;3(3):S30-7.
328. Barišić I, Kamleithner V, Schönthaler S, Wiesinger-Mayr H. Fast and highly specific DNA-based multiplex detection on a solid support. *Appl Microbiol Biotechnol*. janv 2015;99(1):413-23.
329. Lehner A, Loy A, Behr T, Gaenge H, Ludwig W, Wagner M, et al. Oligonucleotide microarray for identification of *Enterococcus* species. *FEMS Microbiology Letters*. mai 2005;246(1):133-42.
330. RDP Release 11 -- Sequence Analysis Tools [Internet]. [cité 3 févr 2020]. Disponible sur: <https://rdp.cme.msu.edu/>
331. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 27 nov 2012;41(D1):D590-6.
332. Improved species level clinical identification of Enterobacteriaceae through broad range dnaJ PCR and sequencing. :28.
333. Li Y, He W, Wang T, Piao C -g., Guo L -m., Chang J -p., et al. *Acinetobacter qingfengensis* sp. nov., isolated from canker bark of *Populus x euramericana*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 1 mars 2014;64(Pt 3):1043-50.
334. Wexler HM. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 oct 2007;20(4):593-621.
335. McBride JA, Sterkel AK, Rehrauer WM, Smith JA. First described case of prosthetic joint infection with *Clostridium disporicum*. *Anaerobe*. déc 2017;48:56-8.
336. Allen S. *Clostridium*. In: *Manual of clinical microbiology*. 8^e éd. 2003. p. 835-56.
337. Zheng J, Li H, Pu Z, Wang H, Deng X, Liu X, et al. Bloodstream infections caused by *Enterococcus* spp: A 10-year retrospective analysis at a tertiary hospital in China. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]*. avr 2017;37(2):257-63.
338. Cargill JS, Scott KS, Gascoyne-Binzi D, Sandoe JAT. Granulicatella infection: diagnosis and management. *Journal of Medical Microbiology*. 1 juin 2012;61(Pt_6):755-61.
339. Brenner DJ, Fanning GR, Steigerwalt AG, Ørskov I, Ørskov F. Polynucleotide Sequence Relatedness Among Three Groups of Pathogenic *Escherichia coli* Strains. *Infection and Immunity*. 1972;6(3):308-15.

340. Afra K, Laupland K, Leal J, Lloyd T, Gregson D. Incidence, risk factors, and outcomes of *Fusobacterium* species bacteremia. *BMC Infect Dis.* déc 2013;13(1):264.
341. Anderson R, Wang X, Briere EC, Katz LS, Cohn AC, Clark TA, et al. *Haemophilus haemolyticus* Isolates Causing Clinical Disease. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 juill 2012;50(7):2462-5.
342. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY.* 1 juin 2010;60(6):1280-8.
343. Walterson AM, Stavriniades J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. van der Meer JR, éditeur. *FEMS Microbiology Reviews.* nov 2015;39(6):968-84.
344. Riou J-Y, Guibourdenche M. *Neisseria polysaccharea* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* avr 1987;p.163-165.
345. Abbott SL, Janda JM. Isolation of *Yokenella regensburgei* (« *Koserella trabulsii* ») from a patient with transient bacteremia and from a patient with a septic knee. *Journal of Clinical Microbiology.* 1994;32(11):2854-5.
346. Chun J, Huq A, Colwell RR. Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999;65(5):2202-8.
347. Kumar S, Stecher G, Li M, Niyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Battistuzzi FU, éditeur. *Molecular Biology and Evolution.* 1 juin 2018;35(6):1547-9.
348. Hong Nhung P, Ohkusu K, Mishima N, Noda M, Monir Shah M, Sun X, et al. Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on *dnaJ* sequences. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* juin 2007;58(2):153-61.
349. Home - Nucleotide - NCBI [Internet]. [cité 4 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>
350. Sousa SA, Ramos CG, Leitão JH. *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. *International Journal of Microbiology.* 2011;2011:1-9.
351. Lee R, Choi S-M, Jo SJ, Lee J, Cho S-Y, Kim S-H, et al. Clinical Characteristics and Antimicrobial Susceptibility Trends in *Citrobacter* Bacteremia: An 11-Year Single-Center Experience. *Infect Chemother.* 2019;51(1):1.
352. Flores-Carrero A, Labrador I, Paniz-Mondolfi A, Peaper DR, Towle D, Araque M. Nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter ludwigii* co-harboring CTX-M-8, SHV-12 and TEM-15 in a neonatal intensive care unit in Venezuela. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* déc 2016;7:114-8.
353. Chen P-L, Lamy B, Ko W-C. *Aeromonas dhakensis*, an Increasingly Recognized Human Pathogen. *Front Microbiol* [Internet]. 27 mai 2016 [cité 4 févr 2020];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00793/abstract>

354. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, et al. ARG-ANNOT, a New Bioinformatic Tool To Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2014;58(1):212-20.
355. ARG-ANNOT - IHU Méditerranée Infection [Internet]. [cité 4 févr 2020]. Disponible sur: <http://backup.mediterranee-infection.com/article.php?laref=282&titre=arg-annot>
356. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database [Internet]. [cité 4 févr 2020]. Disponible sur: <https://card.mcmaster.ca/>
357. SantaLucia, J, Allawi HT, Seneviratne PA. Improved Nearest-Neighbor Parameters for Predicting DNA Duplex Stability [†]. *Biochemistry.* janv 1996;35(11):3555-62.
358. Rychlik W, Spencer' WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. :4.
359. Chiang C-S, Liu C-P, Weng L-C, Wang N-Y, Liaw G-J. Presence of -Lactamase Gene TEM-1 DNA Sequence in Commercial Taq DNA Polymerase. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 janv 2005;43(1):530-1.
360. Tenover FC, Huang MB, Rasheed JK, Persing DH. Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae*. *Journal of Clinical Microbiology.* 1994;32(11):2729-37.
361. Stadhouders R, Pas SD, Anber J, Voermans J, Mes THM, Schutten M. The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay. *The Journal of Molecular Diagnostics.* janv 2010;12(1):109-17.
362. Pozhitkov AE, Tautz D, Noble PA. Oligonucleotide microarrays: widely applied poorly understood. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics.* 3 sept 2007;6(2):141-8.
363. Wu C. Sequence dependence of cross-hybridization on short oligo microarrays. *Nucleic Acids Research.* 16 mai 2005;33(9):e84-e84.
364. Matveeva OV, Nechipurenko YD, Riabenko E, Ragan C, Nazipova NN, Ogurtsov AY, et al. Optimization of signal-to-noise ratio for efficient microarray probe design. *Bioinformatics.* 1 sept 2016;32(17):i552-8.
365. Pozhitkov A, Noble PA, Domazet-Lozo T, Nolte AW, Sonnenberg R, Staehler P, et al. Tests of rRNA hybridization to microarrays suggest that hybridization characteristics of oligonucleotide probes for species discrimination cannot be predicted. *Nucleic Acids Research.* 17 mai 2006;34(9):e66-e66.
366. Halperin A, Buhot A, Zhulina EB. Brush Effects on DNA Chips: Thermodynamics, Kinetics, and Design Guidelines. *Biophysical Journal.* août 2005;89(2):796-811.
367. Stedtfeld RD, Wick LM, Baushke SW, Turlousse DM, Herzog AB, Xia Y, et al. Influence of Dangling Ends and Surface-Proximal Tails of Targets on Probe-Target Duplex Formation in 16S rRNA Gene-Based Diagnostic Arrays. *Applied and Environmental Microbiology.* 1 janv 2007;73(2):380-9.
368. Wally N, Schneider M, Thannesberger J, Kastner MT, Bakonyi T, Indik S, et al. Plasmid DNA contaminant in molecular reagents. *Sci Rep.* déc 2019;9(1):1652.

369. Newsome T, Li B-J, Zou N, Lo S-C. Presence of Bacterial Phage-Like DNA Sequences in Commercial Taq DNA Polymerase Reagents. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mai 2004;42(5):2264-7.
370. Niimi H, Mori M, Tabata H, Minami H, Ueno T, Hayashi S, et al. A Novel Eukaryote-Made Thermostable DNA Polymerase Which Is Free from Bacterial DNA Contamination. *J Clin Microbiol*. sept 2011;49(9):3316-20.
371. Rand KH, Houck H. Taq polymerase contains bacterial DNA of unknown origin. *Molecular and Cellular Probes*. déc 1990;4(6):445-50.
372. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ. Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(5):1747-52.
373. Devanga Ragupathi NK, Muthuirulandi Sethuvel DP, Inbanathan FY, Veeraraghavan B. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies. *New Microbes and New Infections*. janv 2018;21:58-62.
374. Paauw A, Jonker D, Roeselers G, Heng JME, Mars-Groenendijk RH, Trip H, et al. Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol*. août 2015;305(4-5):446-52.
375. Armbruster DA, Pry T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev*. août 2008;29(Suppl 1):S49-52.
376. Dierig A, Berger C, Agyeman PKA, Bernhard-Stirnemann S, Giannoni E, Stocker M, et al. Time-to-Positivity of Blood Cultures in Children With Sepsis. *Front Pediatr [Internet]*. 8 août 2018 [cité 9 juill 2020];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6092514/>
377. Lambregts MMC, Bernards AT, van der Beek MT, Visser LG, de Boer MG. Time to positivity of blood cultures supports early re-evaluation of empiric broad-spectrum antimicrobial therapy. *PLoS One [Internet]*. 2 janv 2019 [cité 9 juill 2020];14(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6314566/>
378. Issa N, Peuchant O, Lecomte R, Dijos M, Laine M, Cornolle C, et al. Quel est le délai de positivité des hémocultures dans l'endocardite infectieuse ? *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1 juin 2018;48(4, Supplement):S70-1.

PCR multiplexe et biopuce pour la détection rapide d'agents infectieux

Résumé Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans le cadre projet Européen H2020 FAPIC (« *Fast Assay for Pathogen Identification and Characterization* »), dont le but est de développer deux outils de diagnostic automatisés. Chacun permet l'identification au sein d'un seul test de 53 pathogènes et genres bactériens ainsi que l'identification de 40 gènes de résistance, directement à partir d'échantillons de sang. La première partie du travail présenté dans ce manuscrit concerne le processus de sélection des cibles génétiques qui seront détectées avec ce test et la conception des sondes et des amorces ainsi que l'optimisation des protocoles de PCR multiplexes et d'hybridation sur les biopuces. Une deuxième partie de ce manuscrit concerne le développement du logiciel d'analyse afin d'identifier les pathogènes et gènes de résistance à partir des images obtenues sur les biopuces. La reconnaissance des cibles s'effectue à l'aide de seuils d'intensités et/ou à un système de reconnaissance de signatures spécifiques associées à chaque pathogène. La troisième partie des travaux décrit les performances de ce test et l'identification des cibles à partir d'ADN extrait de souches bactériennes, puis provenant d'échantillons de sang artificiellement contaminés et enfin à partir d'échantillons cliniques de patient.

Microarrays and Multiplex PCR for the identification and characterization of pathogens

Abstract The work presented in this thesis is part of the European project H2020 FAPIC (Fast Assay for Pathogen Identification and Characterization), which aims to develop two automated diagnostic platforms, allowing the identification of 53 pathogens and bacterial genus as well as the identification of 40 resistance genes, directly from blood samples and within a single test. The first part of the work presented in this manuscript concerns the selection process of the genetic targets that will be identified in this test, the design of primers and probes and the optimization of the protocols of the multiplex PCR and microarrays. The second part of this manuscript concerns the development of the analysis software in order to identify pathogens and resistance genes from pictures of the microarrays. The recognition of the targets is carried out through the use of intensity thresholds and/or using a recognition system, specific towards patterns associated with each pathogen. The third part of this work describes the test performance and the identification of the targets from extracted bacterial strains DNA, then using samples artificially contaminated blood sample and finally using clinical blood samples from patient.

Discipline Biochimie

Mots-clés Sepsis; Bactériémie; Antibiorésistance ; Biopuces; PCR Multiplexe; Plateforme automatisée ; Test de diagnostic

Keywords Bloodstream Infection; Sepsis; Antimicrobial resistance; Multiplex PCR; Microarray; Automated platform ; Diagnostic test

Laboratoire

Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
Équipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires
UMR 5246 Université Lyon 1 / CNRS
Bâtiment Lederer, 1 rue Victor Grignard, 69100 Villeurbanne

Entreprise

AXO Science SAS
36bis rue de Bruxelles, 69100 Villeurbanne