

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 2004

THESE N° 361 / 4

L'INSOUTENABLE LIMITE DE L'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE.
EVOLUTIONS TECHNOLOGIQUES, REVOLUTION
METHODOLOGIQUE.

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 143362 3

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
obtenue après soutenance du

MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

présenté et soutenu publiquement

le 24 novembre 2004 à Toulouse
par

Maud Barbara REMONDET
Née le 6 avril 1974 à Pau

JURY

PRESIDENT : Monsieur le Professeur C. PASQUIER

JUGES : Monsieur le Docteur X. ALACOQUE
Monsieur le Docteur O. FAYET
Madame le Docteur MF. PRERE
Madame le Docteur M. MOUNIER

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

ASSESEURS

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard
Madame le Professeur **CHULIA** Dominique
Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE – CRYPTOLOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACIE GALENIQUE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE – CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE – CHIMIE MINERALE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE – BIOPHYSIQUE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE – CRYPTOLOGAMIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE – HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

Je dédie cette thèse,

Tout particulièrement à mamie Claire et à la mémoire de mes autres grands-parents,

Ce jour est malheureusement arrivé trop tard pour vous tous ; j'aurais aimé vous avoir auprès de moi et je sais que vous seriez fiers... Je garde tous ces moments merveilleux passés avec vous au fond de mon cœur. Vous me manquez...

A mes parents,

Pour votre soutien durant toutes ces années d'études ; me voilà enfin arrivée au bout et c'est un peu grâce à vous ! Merci pour tout ce que vous m'apportez, mais ce n'est pas fini, j'ai encore besoin de vous... Je vous aime.

A Thomas,

Tu m'aides à grandir un peu plus chaque jour. Merci pour ton Amour, ta patience (surtout ces derniers mois...), ta « force tranquille » et ton humour pour me faire relativiser « mes moments difficiles ». A toutes les choses merveilleuses qu'il nous reste à vivre ensemble. Je t'aime.

A Alexandra,

J'apprécie le lien nouveau qui s'est formé entre nous ces dernières années ; même si nos points de vue divergent de temps en temps, je sais, aujourd'hui, que nous serons toujours là l'une pour l'autre. Mais avant tout, sois heureuse...

A la famille de Thomas : à ses parents, à Anne et Jean-Marie,

Merci pour votre gentillesse et l'accueil chaleureux que vous m'avez toujours réservé.

A ma famille,

A tous mes amis,

De Pau, de Bordeaux, de Toulouse et d'ailleurs...et qui avez tous compté à un moment donné de ma vie. Je vous ai tous en mémoire.

A notre président de jury,

Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Laboratoire de virologie

Hôpital de Purpan – CHU de Toulouse

Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Nous avons apprécié vos enseignements et avons pu bénéficier de vos connaissances durant notre stage en virologie.

Soyez assuré de notre respectueuse considération et de notre profonde reconnaissance.

A notre jury de thèse,

Madame le Docteur Marcelle Mounier

Praticien hospitalier

Maître de conférence des Universités

Laboratoire de bactériologie – virologie – hygiène hospitalière

CHU Limoges

Je suis sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Je sollicite votre indulgence pour ce travail sachant votre expérience et vos compétences en bactériologie médicale et en hygiène hospitalière.

Nous vous exprimons notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Docteur Olivier FAYET

Directeur de recherche au CNRS

Responsable de l'équipe contrôle traductionnel chez les bactéries (LMGM Toulouse)

Vous avez accepté de vous intéresser à ce travail.

Nous vous sommes très reconnaissant de nous avoir accueilli dans votre unité de recherche et vous remercions de votre accueil chaleureux.

Veuillez recevoir notre profonde et sincère gratitude.

Monsieur de Docteur Xavier ALACOQUE

Chef de clinique – Assistant Hospitalo-Universitaire

Service de Réanimation

Hôpital de Purpan – CHU de Toulouse

Tu n'as pas hésité une seconde lorsque je t'ai demandé de faire partie de mon jury de thèse (une première pour toi !). J'ai beaucoup apprécié ton enthousiasme et ta volonté d'implication dans ce travail. Je suis, de mon côté, très flattée et fière de te compter dans mon jury de thèse et espère que tes qualités de clinicien, ton esprit, ta curiosité et ta culture soient mises à l'honneur ici.

A notre directeur de thèse,

Madame le Docteur Marie-Françoise PRERE

Praticien hospitalier

Maître de conférence des Universités

Habilitée à diriger des recherches

Laboratoire de bactériologie (CHU Purpan – Toulouse)

Lorsque vous m'avez parlé de « pluralité et de diversité bactériennes » pour la première fois, il y a bien longtemps maintenant, ceci était bien flou dans ma tête de jeune interne et bien loin de ce que l'on m'avait appris. Au moment de réfléchir à un sujet de thèse, je me suis tournée vers vous et ce sujet m'était encore « réservé » ! Je me suis donc lancée dans cette approche philosophique de l'art bactériologique... Ce travail ne serait pas né sans votre perfectionnisme, votre ouverture d'esprit et vos « idées révolutionnaires ». Votre enthousiasme et votre passion pour la bactériologie ont été communicatifs. Je souhaite de tout coeur que nos relations ne s'arrêteront pas à ce simple travail. Mille mercis pour votre disponibilité, votre compétence et votre gentillesse.

AVANT PROPOS	10
INTRODUCTION.....	11
PERSPECTIVES HISTORIQUES DE LA MICROBIOLOGIE	13
I. LES DEBUTS DE LA MICROBIOLOGIE	14
A. La civilisation grecque.....	14
B. La civilisation romaine	14
C. La civilisation chinoise	15
II. PREMIERS MICROSCOPES ET DECOUVERTE DES MICROORGANISMES.....	15
III. LA DECOUVERTE DU MONDE MICROBIEN.....	16
IV. LA CONTROVERSE DE LA GENERATION SPONTANEE.....	17
V. LOUIS PASTEUR : DEBUT DE L'ERE SCIENTIFIQUE	18
A. Fin du débat de la génération spontanée	18
B. Rôle des microorganismes dans la fermentation.....	19
C. Rôle des microorganismes dans les infections.....	21
D. La théorie des germes	21
VI. ROBERT KOCH : LE DEBUT DE L'ERE MEDICALE	22
A. Les postulats de Koch	22
B. Isolement de bactéries et techniques de culture pure	23
VII. 1876-1920 : L'AGE D'OR DE LA MICROBIOLOGIE	24
VIII. L'HISTOIRE PARTICULIERE D'ESCHERICHIA COLI : Dr Theodor Escherich (1857-1911).....	28
IX. ROLE ECOLOGIQUE DES MICRO-ORGANISMES	29
X. LE DEVELOPPEMENT DE LA MICROBIOLOGIE AU VINGTIEME SIECLE.....	30
XI. FIN DU VINGTIEME SIECLE : L'EMERGENCE DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE	33
A. L'émergence de la génétique formelle	33
B. Le chromosome support de l'hérédité	34
C. La convergence de la biochimie et de la génétique.....	34
D. L'ADN, support de l'information génétique.....	34
E. La structure de l'ADN	35
LES STRATEGIES BACTERIOLOGIQUES ACTUELLES : COMMENT LES FAIRE EVOLUER ET PAR QUELS MOYENS ?	37
I. LES TECHNIQUES CLASSIQUES DU DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE	38
II. LES METHODES D'AVENIR.....	40
A. LES MILIEUX CHROMOGENES	40
1. Principe	40
2. Applications	41
a) Urines	41
b) Streptocoque du groupe B.....	41
c) <i>Staphylococcus aureus</i>	42
i. Diagnostic	42
ii. Milieu CHROMagar SAMR	43
iii. Bénéfice apporté.....	46
3. Conclusion	46
B. LES TESTS RAPIDES	47
1. Définitions	47
2. Principes techniques.....	47
a) Méthodes immunologiques.....	47
i. Techniques d'agglutination et de coagglutination.....	48
ii. Techniques Elisa	48
b) Techniques biochimiques	49
3. Principales applications	49
a) Pour un diagnostic présomptif	49
b) Pour un diagnostic spécifique.....	50
i. <i>Streptococcus pyogenes</i>	50
ii. <i>Helicobacter pylori</i>	51
iii. <i>Clostridium difficile</i>	52

iv.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	53
v.	<i>Legionella</i>	54
4.	Avantages des tests rapides.....	55
5.	Limites des tests rapides	56
6.	Avenir des tests rapides immunologiques.....	57
C.	BIOLOGIE MOLECULAIRE	58
1.	Les techniques de biologie moléculaire	58
a)	Amplification génique in vitro ou PCR (Polymerase Chain Reaction).....	58
b)	Hybridation moléculaire	59
c)	Séquençage de l'ADN	59
2.	Application à l'identification bactérienne.....	60
a)	Les bactéries responsables d'infections génitales	60
i.	<i>Chlamydia trachomatis</i>	60
ii.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	61
iii.	<i>Treponema pallidum</i>	62
b)	Les mycobactéries.....	62
c)	Les bactéries responsables d'infections respiratoires autres que les mycobactéries	65
d)	Détection et reconnaissance de bactéries inconnues.....	65
e)	Mise en évidence du "genre" bactérien dans des prélèvements physiologiquement stériles.....	66
3.	Biologie moléculaire et détection de gènes de résistance aux antibiotiques	67
a)	<i>S. aureus</i> et gène <i>mec a</i>	67
b)	<i>M. tuberculosis</i> et gène <i>rpoB/pnca</i>	68
c)	Entérobactéries et gène <i>bla</i>	69
4.	Biologie moléculaire et virulence bactérienne.....	71
a)	<i>E. coli</i> entérovirulents	71
i.	<i>Etudes sur les EPEC et les EHEC</i>	73
ii.	<i>les E.coli impliqués dans les infections urinaires</i>	76
iii.	<i>Les souches d' E.coli des infections néonatales</i>	76
b)	<i>Providencia alcalifaciens</i>	77
c)	<i>Vibrio cholerae</i>	78
d)	<i>Clostridium difficile</i>	78
e)	<i>Staphylocoques</i>	79
5.	Difficultés de la mise en place des techniques de biologie moléculaire	79
6.	Avantages et perspectives de la technique.....	80
D.	LES PUCES A ADN	82
1.	Qu'est ce qu'une biopuce ?.....	82
2.	La réaction	83
3.	Diverses applications en développement :	83
a)	Une puce à ADN pour mieux contrôler la qualité de l'eau potable.....	83
b)	Une nouvelle approche pour le génotypage des mycobactéries	84
i.	Identifier les espèces et déterminer leur profil de résistance.....	84
ii.	Plusieurs réponses en une seule puce	85
	COMMENT CONCILIER BACTERIOLOGIE « ANCESTRALE » ET BACTERIOLOGIE MODERNE ?.....	87
	QUEL AVENIR POUR LA BACTERIOLOGIE DE DEMAIN ?.....	87
	EPILOGUE.....	94
	BIBLIOGRAPHIE	95
	ANNEXES	100

AVANT PROPOS

Ce manuscrit, rédigé en tant que thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en Pharmacie, ne se conforme pas à la présentation classique : généralités, matériel et méthodes, résultats, discussion et conclusion.

Il présente, après un rappel historique des moments forts de la découverte de l'analyse bactériologique, une revue non exhaustive des techniques modernes et de leurs applications puis quelques études en marge de l'analyse traditionnelle que nous avons effectuées. Notre objectif était d'illustrer par ces quelques exemples les limites de l'analyse bactériologique dans sa pratique de routine habituelle. Enfin dans un dernier chapitre, à la suite de la synthèse des réflexions apportées par nos travaux, nous proposons des règles méthodologiques appropriées à une analyse performante s'appuyant sur l'utilisation des nouvelles technologies.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Si les microorganismes sont des acteurs indispensables de notre environnement, ils causent aussi, depuis toujours, des problèmes aux hommes et à la société. Les maladies microbiennes ont certainement joué un rôle majeur dans les événements historiques tels que la chute de l'empire romain ou la conquête du nouveau monde. En l'an 1347, la peste frappa l'Europe avec une force brutale. En quatre ans, elle tua un tiers de la population. Pendant, les quatre-vingt années qui suivirent, la maladie sévit encore tuant 75% de la population européenne. Certains historiens pensent que ce désastre changea la culture européenne et prépara la voie de la Renaissance. On ne peut donc que souligner l'importance de cette discipline qui est à l'origine du développement des biotechnologies.

Née avec l'usage du microscope, la bactériologie s'est progressivement instaurée comme discipline scientifique ayant ses concepts (étiologie des maladies infectieuses, étude des résistances aux antibiotiques), ses techniques (cultures, colorations...), son expérimentation avec Louis Pasteur et ses élèves en France et Robert Koch en Allemagne. Avec les travaux de Sergei Winogradsky, Martinus Beijerinck et de leurs successeurs, la bactériologie s'est étendue à l'étude du rôle des microbes dans tous les cycles biogéochimiques qui se déroulent dans le sol et les eaux (écologie microbienne) et qui sont indispensables au fonctionnement des écosystèmes. Enfin, en étroite relation avec la génétique et la biochimie, elle est à l'origine de la biologie moléculaire, véritable révolution technologique dans de nombreux domaines. La biologie moléculaire a apporté un souffle nouveau à de nombreuses disciplines biologiques, dont la bactériologie n'a malheureusement pas su suffisamment profiter. En effet, les techniques bactériologiques de base utilisées en pratique quotidienne sont quasiment identiques à celles utilisées par nos prédécesseurs, il y a une centaine d'années ; l'approche diagnostique n'a également que peu évoluée depuis ces temps là. Or, les bactériologistes ont aujourd'hui les moyens techniques et les informations nécessaires pour faire évoluer les concepts de leur discipline et moderniser leur approche diagnostique.

L'objectif de ce travail est de mettre en avant les limites de l'analyse bactériologique dans sa pratique quotidienne. Après une rapide explication de l'approche diagnostique actuelle, nous ferons une revue des différentes techniques disponibles permettant de moderniser cette approche ; pour chaque technique, nous présenterons quelques applications diagnostiques déjà commercialisées ou encore réservées au domaine de la recherche.

Il sera fait auparavant un rappel des événements importants de l'histoire de la bactériologie.

PERSPECTIVES HISTORIQUES DE LA MICROBIOLOGIE

PERSPECTIVES HISTORIQUES DE LA MICROBIOLOGIE

I. LES DEBUTS DE LA MICROBIOLOGIE

La culture des micro-organismes, dans un objectif appliqué (production de vin, de vinaigre et de produits laitiers), est bien antérieure à leur découverte. L'usage des boissons fermentées remonte à des temps immémoriaux et les plus anciennes mentions écrites, l'histoire biblique de Noé ou le mythe hellénique de Dionysos, sont certainement les expressions déjà tardives d'une tradition venant de la préhistoire. Les processus fermentaires permettaient, en effet, d'obtenir des aliments agréables et des boissons savoureuses ; les changements qui se produisaient dans les cuves de fermentation laissaient croire à l'existence de forces mystérieuses... Une réelle méthodologie s'était développée sur une base empirique.

La « biotechnologie » traditionnelle concernait donc principalement le traitement des aliments, mais les mesures de prévention de la propagation des microorganismes pathogènes (le génie sanitaire) pouvaient aussi être considérées comme de la biotechnologie. Ainsi, les premières civilisations en Crète, Inde, Pakistan et Écosse ont inventé les toilettes et les égouts; les bains, datant approximativement de l'an 2800 avant Jésus Christ, ont été retrouvés aux îles Orkney (Ecosse) et dans des maisons au Pakistan. Un archéologue a affirmé: "Les équipements sanitaires de cette époque (environ 2500 avant Jésus Christ) pourraient être enviés dans plusieurs parties du monde, encore aujourd'hui" [1].

A. La civilisation grecque

Les Grecs ont été de grands précurseurs en microbiologie. L'illustre Hippocrate (400 av J-C) établit des standards éthiques pour la médecine, encore valables aujourd'hui. Il associa des signes et symptômes particuliers à certaines maladies et réalisa que ces dernières pouvaient être transmises d'une personne à l'autre par l'intermédiaire de vêtements ou d'autres objets.

B. La civilisation romaine

Les Romains contribuèrent également au développement de la microbiologie, et cela dès le 1er siècle avant J-C.

Ainsi, le savant et écrivain Marcus Terentius Varro (116-27 av J-C) suggéra que de très « petits animaux invisibles » pénétraient dans le corps humain par la bouche ou le nez pour provoquer la maladie. Déjà sensibilisés à une certaine forme d'hygiène, ils gardaient leurs sanitaires

propres et avaient établi un lien de causalité entre une eau de boisson souillée et l'apparition de maladies.

C. La civilisation chinoise

Les Chinois, quant à eux, avaient déjà touché du doigt les procédés d'immunisation. Dès le XI^e siècle, les chinois pratiquaient la variolisation par voie nasale en déposant le contenu d'une pustule sur des tampons de coton, qu'ils introduisaient dans les narines des sujets réceptifs.

Nos ancêtres avaient une notion des modes de transmission des maladies ainsi que du caractère contagieux pour certaines d'entre-elles; malheureusement, cette connaissance conduisait à la peur et la discrimination des malades qui existe toujours de nos jours.

De nombreuses civilisations ont reconnu et utilisé les plantes comme remède à certains maux. Par exemple, les Sud-américains connaissaient les vertus d'extraits du Quinquina pour soigner la malaria, traitement toujours en vigueur de nos jours. Les méthodes de médecine traditionnelle de certaines ethnies ont été reconnues par l'Occident et servent de point de départ pour la « redécouverte » de nombreux principes actifs.

II. PREMIERS MICROSCOPES ET DECOUVERTE DES MICROORGANISMES

Toutefois, les progrès réels de la microbiologie, en particulier la découverte de l'existence des micro-organismes, ne purent se faire sans l'avènement de progrès dans le domaine des sciences exactes. Une contribution importante fut apportée par Galilée, qui en 1610 ne construisit pas seulement un télescope, mais aussi un dispositif optique pour examiner des objets petits. Le premier microscope composé serait encore antérieur et aurait été réalisé en Hollande.

Ainsi, en 1590, Zacharias Janssen, un artisan allemand spécialisé dans la fabrication de lunettes confectionna le premier composant du microscope. Jusque là, les microscopes avaient des lentilles de faible qualité ne permettant pas d'observer le « monde microbien ». Ainsi, les premières observations furent sans doute réalisées sur des abeilles et des charançons par l'Italien Francesco Stelluti à l'aide d'un microscope, probablement fabriqué par Galilée. De même, en 1651, Nathaniel Highmore décrivit ses observations de développement embryonnaire de poulets grâce à ce qu'il appelait « lunettes », probablement une grosse loupe.

« Experimental Philosophy in Three Books : Containing New Experiments_ Microscopical, Mercurial, Magnetical » de Henry Power (1623-1668), publié en 1664, fut le premier livre anglais entièrement consacré à la microscopie. Un an plus tard, Robert Hooke publia son célèbre

ouvrage « Micrographia » dans lequel il décrivait de nombreuses observations faites à l'aide d'un microscope équipé d'une lentille simple.

Il écrivit avoir observé des « grains de sable » qu'il pensait être les débris d'un animal microscopique. Hooke fut également le premier à décrire des microorganismes eucaryotes comme les champignons. Cependant, il ne rapporta jamais d'observations de bactéries, sans doute parce qu'il ne travaillait que sur des préparations séchées [2].

III. LA DECOUVERTE DU MONDE MICROBIEN

La première personne qui réellement observa et décrivit des micro-organismes fut un Hollandais de Delft, amateur de microscopes, Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723).

Leeuwenhoek gagnait sa vie comme marchand drapier, mais passait la plupart de son temps libre à construire des microscopes simples, composés de lentilles doubles convexes maintenues entre deux plaques d'argent. Les lentilles que fabriquaient Van Leeuwenhoek étaient d'excellente qualité et permettaient d'obtenir des grossissements de 50 à 300 fois, il pouvait aussi observer des échantillons en milieu liquide en les plaçant entre deux morceaux de verre et en les éclairant sous un angle de 45° par rapport à l'échantillon, ceci produisant une sorte d'éclairage sur champ noir qui rendait les bactéries clairement visibles. A partir de 1673, Leeuwenhoek envoyait des lettres détaillées décrivant ses découvertes à la Royal Society de Londres. Dans une de ses lettres, écrite en 1676, il rapporta l'observation d'« animalcules » (petits animaux), ce qui prouvait qu'il avait clairement vu des bactéries. Dans son courrier du 17 septembre 1683, il fournit la première image d'une bactérie, observée dans sa propre bouche. Pendant 50 ans, jusqu'à sa mort en 1723, Van Leeuwenhoek décrivit toutes sortes de microorganismes : bactéries, levures, protozoaires et algues. Les nombreux dessins réalisés pendant ces années prouvèrent qu'il avait pu observer les principales morphologies bactériennes : cocci, bacilles, vibrions et spirilles. Durant toute son existence, Van Leeuwenhoek refusa de vendre ses microscopes à d'autres scientifiques, ce qui, malheureusement, retarda l'essor de la microbiologie.

A la fin du XVIII^e siècle, l'allemand Otto Friedrich Müller (1730-1784) confirma l'existence des bactéries. En 1773, puis dans un ouvrage posthume paru cinq ans après sa mort, Müller décrivit de nombreuses bactéries et les classa en genres et en espèces.

IV. LA CONTROVERSE DE LA GÉNÉRATION SPONTANÉE

La croyance en la génération spontanée (génération sans ancêtre ou hétérogénie) remonte à l'Antiquité. Pendant très longtemps, les gens crurent que les organismes vivants pouvaient se développer à partir de matière non vivante ou en décomposition. Même le grand Aristote (382-322 av J-C) pensait que certains des invertébrés simples étaient apparus par génération spontanée. Cette idée resta générale jusqu'à la fin du XVII^e siècle et garda de fervents adeptes au cours du XVIII^e mais seulement pour expliquer la genèse des animaux de petite taille ; on ne croyait plus aux hordes de souris naissant chaque année des limons du Nil (Diodore de Sicile, 50 av J-C), ni aux anguilles se formant à partir de la boue (*De animalibus* d'Albert le Grand, du XIII^e siècle) ou des moustiques de l'eau de pluie (A. Kircher in *Mundus subterraneus*, 1665) [3]. Cette opinion fut initialement mise en doute par le médecin italien Francesco Redi (1626-1697) qui réalisa une série d'expériences sur de la viande en décomposition et la capacité à produire spontanément des asticots. Redi mit de la viande dans trois récipients. Le premier n'était pas couvert, le second était couvert de papier et le troisième d'une fine gaze qui pouvait écarter les mouches. Celles-ci déposaient leurs œufs sur la viande non couverte et les asticots se développaient. Les deux autres morceaux de viande ne produisaient pas spontanément des asticots. Cependant, les mouches attirées par le récipient couvert de gaze pondaient leurs œufs sur la gaze ; mais ceux-ci ne produisaient pas de larves.

Ainsi, la production d'asticots par de la viande en décomposition était due à la présence d'œufs de mouches. La viande ne générait pas spontanément des asticots comme on le pensait précédemment. Des expériences similaires aidèrent à discréditer la théorie en ce qui concernait les organismes plus grands.

La découverte des micro-organismes par Van Leewenhoek en 1683 renouvela la controverse. Quelques-uns proposèrent que les micro-organismes apparaissaient par génération spontanée même si des organismes plus grands n'apparaissaient pas spontanément. Ils firent remarquer que des extraits bouillis de foin ou de viande donnaient naissance à des micro-organismes après incubation pendant un certain temps.

Certains biologistes du siècle des Lumières défendaient la théorie de la génération spontanée à laquelle d'autres s'opposaient tout aussi fermement.

En 1748, le prêtre anglais John Needham (1713-1781) rendit compte des résultats de ses expériences sur la génération spontanée. Needham introduisit des matières de toutes sortes dans des bocaux fermés hermétiquement, portés pendant quelque temps à une température proche de l'ébullition. Par la suite, de nombreux flacons se troublaient : ils contenaient des

micro-organismes. Il en conclut que la matière organique possédait une « force vitale » capable de conférer les propriétés de vie à la matière non vivante.

20 ans plus tard, le prêtre et naturaliste italien Lazzaro Spallanzani (1729-1799) améliora les expériences de Needham en chauffant, à la température d'ébullition de l'eau et pendant plus longtemps, une plus petite quantité d'infusion ou de bouillon de viande. Il obtint des liqueurs « infécondes » et prouva que la force vitale n'était qu'imagination. Si les flacons scellés étaient placés dans de l'eau bouillante pendant trois-quarts d'heure, il n'y avait pas de croissance tant que les flacons restaient fermés. Il suggéra que l'air transportait les germes dans l'infusion, mais aussi que l'air externe était nécessaire à la croissance des animaux déjà présents dans l'infusion. Ainsi, il conclut que les germes pouvaient être tués par différents traitements physiques et que ces « animalcules » n'apparaissaient pas *de novo*. Les expériences de Spallanzani furent publiées dans un ouvrage intitulé « *Opuscoli de Fisica, Animale e Vegetabile* » en 1776.

Les défenseurs de la génération spontanée rétorquèrent qu'un tel chauffage détruisait la force végétative des systèmes infusés. Quelques chercheurs essayèrent de contrer de tels arguments. Théodore Schwann (1810-1882) utilisa un dispositif permettant de faire passer de l'air préalablement chauffé à blanc sur de la viande bouillie, dans un ballon clos ; il n'observa ni vie, ni fermentation, ce que confirma Claude Bernard (1785) dans une expérimentation similaire. Plus tard, Georg Friedrich Schroder et Théodor von Dush laissèrent entrer de l'air dans un flacon de milieu stérilisé par la chaleur après l'avoir fait passer au travers d'ouate stérile. On n'observa pas de croissance même si l'air n'avait pas été chauffé.

En dépit de ces expériences, en 1859, le naturaliste français Félix-Archimède Pouchet, farouche adversaire de Pasteur, prétendit avoir réalisé des expériences prouvant de manière concluante que les micro-organismes se développaient sans contamination par l'air. Pour lui, renier la génération spontanée, c'était renier la création divine. Cette affirmation incita Louis Pasteur (1822-1895) à résoudre ce problème une fois pour toutes.

V. LOUIS PASTEUR : DEBUT DE L'ERE SCIENTIFIQUE

A. Fin du débat de la génération spontanée

En 1861, Louis Pasteur (1822-1895), fermement convaincu que la génération spontanée était impossible et que tout germe provenait nécessairement d'un autre germe, réalisa une série d'expériences montrant que ces organismes existaient tout simplement dans les poussières de l'air et qu'il suffisait de maintenir un milieu de culture à l'abri de l'air pour qu'il reste indéfiniment stérile. Il filtra d'abord l'air au travers de coton et trouva que des objets ressemblant à des

spores végétales y étaient piégés. Si le morceau de coton était placé dans un milieu stérile après que de l'air y ait été filtré, la croissance microbienne apparaissait. Ensuite, il plaça des solutions nutritives dans les flacons, chauffa leur goulot à la flamme et les étira en une variété de formes, en gardant leur extrémité ouverte à l'atmosphère. Pasteur fit alors bouillir les solutions pendant quelques minutes puis les refroidit ; aucune croissance n'apparut même si les contenus des flacons avaient été exposés à l'air. Pasteur fit observer qu'il n'y avait pas de croissance parce que la poussière et les germes avaient été piégés sur les bords des goulots courbes. Si les goulots étaient cassés, la croissance commençait immédiatement. Ainsi, Pasteur avait non seulement résolu la controverse, mais encore il avait montré comment garder des solutions stériles ; ce sera la base de l'asepsie et de la grande révolution chirurgicale du XX^e siècle.

« Il n'y a ni religion, ni philosophie, ni athéisme, ni matérialisme, ni spiritualisme qui tienne... Tant pis pour ceux dont les idées philosophiques sont gênées par mes études. »

C'est à la Sorbonne, le 7 avril 1864, que Pasteur fit sa communication selon laquelle il n'y avait aucune circonstance connue permettant d'affirmer que des êtres microscopiques étaient venus au monde sans parents semblables à eux. Cette expérience cruciale ouvrit à Pasteur les portes de l'Académie des Sciences à l'âge de 39 ans.

Ces débats se prolongèrent jusque dans les années 1870 et donnèrent un élan considérable à la microbiologie, et en particulier aux méthodes expérimentales.

Le médecin anglais John Tyndall (1820-1893) donna un coup final à la génération spontanée en 1877 en démontrant que la poussière portait réellement les germes et que si la poussière était absente, le bouillon restait stérile même s'il était exposé directement à l'air. Durant ses études, Tyndall montra l'existence de formes bactériennes exceptionnellement résistantes à la chaleur. Travaillant indépendamment, le botaniste allemand Ferdinand Cohn (1828-1898) découvrit, lui aussi, l'existence d'endospores bactériennes résistantes à la chaleur. Si Pasteur avait utilisé ces cultures lors de ses expériences, le débat sur la génération spontanée aurait pu finir tout autrement!!!

B. Rôle des microorganismes dans la fermentation

Bien que Theodore Schwann et d'autres aient proposé en 1837 que les cellules de levure soient responsables de la transformation des sucres en alcool, processus qu'ils appelèrent fermentation alcoolique, les chimistes de l'époque (Wohler, Berzelius et Von Liebig) croyaient que les micro-organismes n'étaient pas impliqués. Ils étaient convaincus que la fermentation était due à une sorte d'instabilité chimique qui dégradait le sucre en alcool.

En 1856, un distillateur de Lille, où Pasteur travaillait, lui demanda son aide : son entreprise produisait de l'éthanol à partir de la fermentation des sucres de betteraves ; cependant, les rendements de production d'alcool avaient diminué et le produit était devenu acide. Pasteur découvrit que la fermentation n'avait pas réussi parce que la levure normalement responsable de la formation d'alcool avait été remplacée par un micro-organisme produisant de l'acide lactique plutôt que de l'alcool. Dans les conditions naturelles, toutes les fermentations étaient l'œuvre d'un petit organisme vivant, le ferment et à chaque fermentation répondait un ferment particulier. Il arriva à multiplier ces microorganismes et c'est à cette occasion qu'il imagina la méthode des cultures pures, plus tard base des études bactériologiques. Il montra que certains ferments ne pouvaient vivre qu'en présence d'oxygène ; pour d'autres, au contraire, l'oxygène a la valeur de poison. Ainsi, la distinction était faite pour la première fois entre deux modes de vie : l'aérobiose et l'anaérobiose. Pasteur démontra donc que toutes les fermentations étaient dues à l'activité de levures et de bactéries spécifiques et il publia plusieurs articles sur la fermentation entre 1857 et 1860.

On raconte également qu'en 1857, Napoléon III fit appel à Pasteur sur le problème suivant : après quelques semaines en mer, les tonneaux de vins embarqués à bord des navires se transformaient en vinaigre, ce qui déclenchait régulièrement des mutineries. Les rêves de grandeur de Napoléon III étaient tenus en échec par quelques barils de vinaigre...

A l'aide de son microscope, Pasteur réalisa qu'il pouvait distinguer les contaminants qui causaient la perte du vin. Il réussit même à prédire le goût que le vin aurait par la seule observation microscopique mais il ne se contenta pas d'étudier les microorganismes qui les produisaient, il montra également qu'il était facile de les détruire en chauffant les vins malades à 50°C ou 55°C, sans gâcher le goût du vin.

Pasteur s'intéressa aussi au problème du lait aigre et proposa une solution similaire : chauffer le lait à haute température et le pressuriser avant la mise en bouteille ; ainsi naquit la pasteurisation.

L'étude de la transformation du vin en vinaigre lui permit d'indiquer aux fabricants de vinaigre d'Orléans des améliorations pour rendre la fabrication du vinaigre plus rapide et plus complète. Il s'occupa également d'améliorer la fabrication de la bière pour laquelle la France était tributaire de l'Allemagne, et il montra comment obtenir une bière claire et savoureuse au moyen de levures pures et sélectionnées.

Les études de Pasteur sur la fermentation se poursuivirent pendant une vingtaine d'années.

C. Rôle des microorganismes dans les infections

Bien que Fracastro et quelques autres aient suggéré que des organismes invisibles étaient responsables de maladies, beaucoup pensaient que les maladies étaient provoquées par des forces surnaturelles, des vapeurs empoisonnées appelées miasmes et des déséquilibres entre les quatre humeurs que l'on croyait présentes dans le corps. Les arguments en faveur du rôle des micro-organismes dans la maladie s'accumulèrent au début du dix-neuvième siècle. Agostino Bassi (1773-1856) démontra d'abord qu'un micro-organisme pouvait provoquer une maladie quand il prouva en 1835 qu'une maladie du ver à soie était due à une infection fongique. Il suggéra que la plupart des maladies étaient causées par des infections microbiennes. En 1845, Berkeley prouva que la pourriture des pommes de terre en Irlande était aussi due à un champignon. Après les succès de Pasteur dans l'étude de la fermentation, le gouvernement français lui demanda d'étudier le problème de la maladie des vers à soie, appelée pébrine, qui ruinait l'industrie de la soie. Au terme de quatre ans d'observations et d'expériences, Pasteur aboutit à la conclusion que certains petits corpuscules ovoïdes de 2 à 3 μ de longueur, qui abondaient dans les différents organes des vers à soie et des papillons et qui existaient même dans les œufs étaient des organismes pathogènes. Il surveilla alors les éclosions et démontra que la pébrine paraissait être héréditaire. Il en conclut qu'il fallait séparer les œufs malades des œufs sains ; c'était le « grainage sélectionné » qui lui permettra de supprimer l'épidémie en détruisant les pontes contaminées. En adoptant cette méthode de sélection, l'industrie de la soie fut sauvée. Une autre maladie des vers à soie, la flacherie, se transmettait par des « vibrions » présents dans les excréments des animaux malades et qui souillaient les feuilles de mûrier dont se nourrissaient les animaux sains ; ainsi Pasteur démontra le rôle de chaque microorganisme dans la responsabilité des maladies du ver à soie.

D. La théorie des germes

Ses travaux sur la fermentation, la génération spontanée, les maladies de la bière et du vin et les maladies du ver à soie, amenèrent Pasteur à la conviction que la plupart des maladies de l'homme étaient également dues à des microorganismes. Cette idée eut un impact considérable en médecine. En effet, Pasteur pensait que l'origine et le développement des maladies étaient comparables à la fermentation : une maladie apparaissait à cause des germes externes attaquant l'organisme, de la même façon que des microorganismes envahissaient le lait et entraînaient sa fermentation. Ce concept, appelé « théorie des germes » fut longuement débattu par les médecins et les scientifiques du monde entier.

L'idée que des microorganismes puissent tuer des organismes beaucoup plus gros semblait ridicule. Le débat dura plusieurs années, puis les recherches de Pasteur plaidèrent en sa faveur. Au cours de sa carrière, il put développer la théorie des germes pour expliquer plusieurs maladies.

Les travaux du chirurgien anglais Joseph Lister (1827-1912) sur la prévention des infections des plaies, montrèrent indirectement que les micro-organismes étaient les agents de maladies humaines. Lister, se basant sur les études de Pasteur sur le rôle des micro-organismes dans la fermentation et la putréfaction, développa une méthode chirurgicale aseptique, destinée à empêcher l'infection des plaies par les micro-organismes. Les instruments furent stérilisés par la chaleur et on utilisa le phénol sur les pansements chirurgicaux et parfois en vaporisation sur la zone à soigner. Ces méthodes furent couronnées de succès et transformèrent la chirurgie. Elles constituèrent aussi une preuve indirecte du rôle des micro-organismes dans les maladies puisque le phénol qui tue les bactéries, prévient aussi l'infection des plaies.

En février 1874, Joseph Lister écrivait à Pasteur : « Mes plus cordiaux remerciements pour m'avoir, par vos brillantes recherches, démontré la vérité de la théorie des germes de putréfaction et m'avoir ainsi donné le seul principe qui peut mener à bonne fin le système antiseptique. »

Il faut mentionner que dès 1847, l'obstétricien hongrois Ignatz Semmelweis (1818-1865) avait entrevu l'antisepsie à l'occasion de ses observations sur l'origine de la fièvre puerpérale dans une maternité de Vienne.

En 1877, Pasteur confirma l'origine microbienne du charbon, maladie terrible s'attaquant aux ruminants et surtout aux moutons. De son côté, un physicien allemand Robert Koch étudiait lui aussi le germe du charbon [4].

VI. ROBERT KOCH : LE DEBUT DE L'ERE MEDICALE

A. Les postulats de Koch

Robert Koch (1843-1910), médecin libéral, menait de front consultations et recherche scientifique. Il partage avec Pasteur le mérite d'avoir fondé la science de la microbiologie. Opposés par leurs caractères, leurs formations intellectuelle et scientifique, leurs modes de vie et séparés par une frontière que la guerre de 1870 avait transformée en fossé, Pasteur et Koch ont abordé en réalité les mêmes problèmes mais des voies différentes.

La première démonstration directe du rôle des bactéries dans les maladies, vint de l'étude du charbon. Robert Koch utilisa le critère proposé par son ancien professeur Jacob Henle (1809-1885) pour établir la relation entre *Bacillus anthracis* et le charbon. Koch injecta à une souris

saine de la « matière » provenant d'animaux malades et la souris devint malade. Après avoir transféré le charbon par inoculation à une série de 20 souris, il incuba dans du sérum de bœuf un morceau de rate contenant le bacille du charbon. Les bacilles se multiplièrent et produisirent des spores. Quand les bacilles isolés ou les spores furent injectées à une souris, la maladie se développa.

Ces critères pour établir les relations causales entre un micro-organisme et une maladie spécifique, sont connus sous le nom de « Postulats de Koch ».

Ils comportent 4 étapes :

- _ Le micro-organisme doit être présent dans chaque cas de maladie, mais absent des organismes sains.
- _ Le micro-organisme suspect doit être isolé et cultivé en culture pure.
- _ La maladie doit se développer quand le micro-organisme isolé est inoculé à un hôte sain.
- _ Le même micro-organisme doit de nouveau être isolé de l'hôte malade.

En 1876, dès ses premières recherches sur la bactérie charbonneuse décelée dans le sang d'animaux, Koch comprit l'importance de la voie nouvelle qui se présentait. Moins attiré que Pasteur par les problèmes généraux de la biologie et des microorganismes, moins immédiatement orienté vers la mise au point des vaccinations, Koch a principalement développé la technique bactériologique proprement dite et poursuivi activement l'identification des germes pathogènes. Ses travaux ont grandement bénéficié des perfectionnements apportés dans l'appareillage microscopique et de l'emploi des objectifs à immersion ; il innova par l'utilisation des premières colorations spécifiques (Gram, Ziehl) et mit au point des milieux de culture solides appropriés ainsi que les frottis sur lames de verre.

B. Isolement de bactéries et techniques de culture pure

Les techniques de culture pure furent développées par De Bary et Brefeld pour étudier les champignons. Ils réussirent à isoler des spores et à cultiver des champignons sur des milieux solides à base de gélatine mais ceux-ci ne convenaient pas à la pousse bactérienne.

Pendant les études de Koch sur les maladies bactériennes, il devint nécessaire d'isoler les bactéries pathogènes suspectes. D'abord, Koch les cultiva à la surface des pommes de terre cuites coupées, ce qui n'était pas satisfaisant parce que les bactéries ne se multipliaient pas toujours bien. Il essaya de solidifier un milieu liquide normal en ajoutant de la gélatine. Des colonies bactériennes isolées se développaient à la surface de ce milieu qui avait été strié à

l'aide d'un échantillon de bactéries. L'échantillon pouvait aussi être mélangé à un milieu gélatineux liquéfié. Quand le milieu à base de gélatine se solidifiait, les bactéries individuelles produisaient des colonies séparées. En dépit de ses avantages, la gélatine n'était pas un agent solidifiant idéal parce qu'elle était digérée par de nombreuses bactéries et fondait à une température supérieure à 28°C.

Une meilleure alternative fut apportée par Fanny Angelina Hesse, épouse de Walter Hesse, un des assistants des Koch. Elle suggéra d'employer l'agar pour solidifier les milieux de culture, elle l'avait utilisé pour faire de la gelée de fruits. L'agar n'était pas attaqué par les bactéries et ne fondait qu'à une température de 100°C.

Un des assistants de Koch, Richard Pétri, proposa une boîte pour milieu de culture solide, munie d'un couvercle afin d'éviter les contaminations externes, qui porte son nom; Paul Ehrlich affina la méthode de coloration au bleu de méthylène et Hans Christian J. Gram développa la coloration de Gram, technique d'identification bactérienne : les bactéries retenant le violet de méthyle ont été dites « Gram positif ». Les différences de coloration furent, plus tard reliées à d'autres différences biochimiques et morphologiques.

Ces développements rendirent possible l'isolement de cultures pures contenant un seul type de bactéries et firent progresser tous les domaines de la bactériologie.

Koch développa aussi des milieux permettant la croissance de bactéries isolées du corps. A cause de leur similarité avec les liquides corporels, des extraits de viande et des protéines digérées furent essayés comme source nutritive. Le résultat fut la mise au point de bouillon nutritif et d'agar nutritif, milieux qui sont largement utilisés aujourd'hui.

Pasteur et Koch furent les fondateurs de la bactériologie médicale dont le but était de préciser le rôle des bactéries pathogènes, le diagnostic bactériologique, et qui aboutit à l'antisepsie chirurgicale et à la recherche d'agents bactéricides, comme au développement de l'immunologie. Plus tard, les pastoriens vont rapidement découvrir les microbes responsables de divers fléaux sociaux de l'époque [5].

VII. 1876-1920 : L'AGE D'OR DE LA MICROBIOLOGIE

En 1882, Koch employa ses techniques pour cultiver le bacille responsable de la tuberculose. Vint alors l'âge d'or, d'environ 30 à 40 ans, pendant lequel la plupart des bactéries pathogènes furent isolées.

Les grandes découvertes sont rappelées dans le tableau suivant, où l'on remarque quelques parentés entre les noms des bactéries et de savants.

MALADIE	AGENT RESPONSABLE	SCIENTIFIQUE	DATE
Lèpre	<i>Mycobacterium leprae</i>	Hansen	1873
Charbon	<i>Bacillus anthracis</i>	Koch	1876
Suppurations	<i>Staphylococcus sp.</i>	Koch	1878
Blennorragie	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Neisser	1879
Fièvre typhoïde	<i>Salmonella typhi</i>	Eberth	1880
Infections	<i>Streptococcus sp.</i>	Ogston	1881
Tuberculose	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Koch	1882
Choléra	<i>Vibrio cholerae</i>	Koch	1883
Diphthérie	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Klebs et Loeffler	1883-1884
Tétanos	<i>Clostridium tetani</i>	Nicolaier	1885
Diarrhée	<i>Escherichia coli</i>	Escherich	1885
Pneumonie	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Fraenkel	1886
Méningite	<i>Neisseria meningitidis</i>	Weischselbaum	1887
Fièvre ondulante	<i>Brucella sp.</i>	Bruce	1887
Gangrène gazeuse	<i>Clostridium perfringens</i>	Welch et Nuttal	1892
Peste	<i>Yersinia pestis</i>	Kitasato et Yersin	1894
	<i>Spirillum desulfuricans</i>	Beijerinck	1894
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	Winogradsky	1895
Botulisme	<i>Clostridium botulinum</i>	Van Ermengem	1896
Dysenterie	<i>Shigella dysenteriae</i>	Shiga	1898
	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Beijerinck	1904
Syphilis	<i>Treponema pallidum</i>	Schaudin et Hoffmann	1905
Coqueluche	<i>Bordetella pertussis</i>	Bordet et Gengou	1906
Crown galls	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Smith et Townsend	1907
Fièvre pourprée des montagnes	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Ricketts	1909
Listériose	<i>Listeria monocytogenes</i>	Murray	1926

La découverte des virus et de leur rôle dans la maladie devint possible quand Charles Chamberland (1851-1908), un des collaborateurs de Pasteur, construisit en 1884 un filtre en porcelaine retenant les bactéries. Le premier virus pathogène étudié fut le virus de la mosaïque de tabac.

Au cours des dix-huitième et dix-neuvième siècles, le pouvoir pathogène expérimental, pratiqué par certains médecins, et en particulier les chirurgiens, permit d'associer bon nombre de germes à un pouvoir pathogène ; ainsi, la distinction entre syphilis et gonococcie fut mise en évidence par un éminent médecin et chirurgien, professeur d'Edward Jenner, John Hunter, qui, en 1767, s'inocula, sur le gland et le prépuce, du pus de patient souffrant d'urétrite ; quelques jours plus tard, il présenta avec satisfaction les symptômes typiques d'une « chaude-pisse » ; malheureusement, quelques mois plus tard, il développa une éruption de syphilis secondaire qui faussa l'ensemble de ses conclusions puisqu'il en déduit que « le pus de la gonorrhée pouvait induire un chancre ». En réalité, il est probable que son patient était porteur des deux affections. En 1844, un jeune médecin, Joseph-Alexandre Auzias-Turenne remarqua qu'en inoculant itérativement des chancres syphilitiques à des singes, les ulcérations devenaient de plus en plus bénignes, comme si leur organisme se vaccinait. Ce fut le concept de syphilisation auquel Auzias-Turenne consacra toute sa vie et qui malheureusement était totalement erroné. A sa mort, en 1870, on découvrit lors de son autopsie qu'il était « le plus ancien syphilité du monde » [6].

Plus proche de nous, en 1985, le médecin australien Barry Marshall, démontra l'implication d'*Helicobacter pylori* dans les gastrites et ulcères, en avalant une suspension de cette bactérie ; la gastroscopie, normale avant l'expérience, montra, quelques jours après, des signes indiscutables de gastrite. Le « charlatan » était devenu « visionnaire »... [7]

Ces phénomènes d'inoculation concernèrent de nombreuses maladies, les sujets inoculés étant le plus souvent les expérimentateurs eux-mêmes, des étudiants en médecine volontaires, mais également des malades jamais informés, des condamnés, des forçats dont on pensait qu'ils avaient ainsi la possibilité de racheter leur faute. Il existe donc une longue et riche histoire de l'inoculation en médecine, avec ses succès magnifiques comme la vaccination, mais aussi ses échecs et ses hontes morales [8].

Ainsi, pendant cette période, on progressa dans la compréhension de la résistance des animaux à la maladie et dans le développement de techniques protégeant les hommes et le bétail des agents pathogènes.

Durant son travail sur le choléra des poules en 1879, Pasteur découvrit que de vieilles cultures bactériennes étaient atténuées, ce qui signifiait qu'elles avaient perdu leur capacité à provoquer

des maladies. Si ces cultures atténuées étaient injectées à des poulets, ceux-ci restaient sains et devenaient résistants à la maladie. Pasteur appela cette culture atténuée un vaccin(du latin *vacca*, vache) en hommage à Edward Jenner qui de nombreuses années auparavant, s'était servi du liquide provenant des pustules de la vaccine des vaches pour protéger les hommes de la variole. La même approche générale fut utilisée pour préparer un vaccin contre le charbon.

Pasteur prépara ensuite le vaccin contre la rage par une approche différente. L'agent pathogène était atténué en le faisant se développer dans un hôte inhabituel, le lapin. Quand les lapins infectés étaient morts, leurs cerveaux et leurs cordons médullaires étaient prélevés et séchés. L'injection d'un mélange de ce matériel et de glycérine stimula la résistance des chiens à la rage. Un garçon âgé de 9 ans, Joseph Meister, mordu par un chien enragé, fut alors amené à Pasteur. Comme la mort de l'enfant était certaine en l'absence de traitement, Pasteur accepta de vacciner. Joseph subit 13 injections sur 10 jours, avec des préparations de plus en plus virulentes du virus atténué, et survécut.

Pour remercier Pasteur de son travail sur les vaccins, les hommes du monde entier contribuèrent à la construction de l'Institut Pasteur à Paris en France. Une des premières tâches de l'Institut fut la production de vaccins.

Après que l'on ait découvert que le bacille de la diphtérie produisait une toxine, Emile von Behring (1854-1917) et Shibasaburo Kitasato (1852-1931) injectèrent la toxine inactivée à des lapins, induisant la production d'une antitoxine, substance présente dans le sang du lapin qui pouvait inactiver la toxine et le protéger ainsi de la maladie. L'antitoxine du tétanos fut alors préparée et ces deux antitoxines furent utilisées pour le traitement des malades.

Les travaux sur les antitoxines apportèrent la preuve que l'immunité pouvait provenir de substances solubles présentes dans le sang, maintenant connues comme étant les anticorps, supports de l'immunité humorale.

Il devint clair que les cellules sanguines étaient aussi importantes dans l'immunité (immunité cellulaire) quand Elie Metchnikoff (1845-1916) découvrit que quelques leucocytes pouvaient englober des bactéries pathogènes. Il appela ces cellules phagocytes et le processus, la phagocytose (du grec *phagein*, manger). Il proposa la théorie d'immunité cellulaire.

En 1889, A. Charrin et J. Roger découvrirent que les bactéries pouvaient être agglutinées par du sérum. Quelques années plus tard, en 1896, Max Gruber et Herbert Durham précisèrent l'observation de Charrin et Roger en montrant que l'agglutination d'une bactérie par un sérum était spécifique. Ceci fut donc reconnu comme un nouveau moyen diagnostique.

VIII. L'HISTOIRE PARTICULIERE D'ESCHERICHIA COLI : Dr Theodor Escherich (1857-1911)

Theodor Escherich, remarquable pédiatre et bactériologiste, fut le premier à s'être intéressé aux « bactéries intestinales du nouveau-né et de l'enfant », sujet sur lequel il soutint sa thèse de médecine en 1881. Ses connaissances en bactériologie furent complétées par sa collaboration avec un élève de Koch, Wilhelm Frobenius, qui lui enseigna les principes d'isolement et de culture pure prônées par Robert Koch, ainsi que les méthodes d'identification bactériennes.

Dès 1885, Escherich avait noté que le méconium des nouveaux-nés était stérile et que, en quelques heures, des bactéries colonisaient l'intestin de ces enfants.

Il décrivit un certain nombre d'organismes qu'il avait réussi à isoler de ces selles et 2, en particulier, qu'il dénomma *Bacterium coli commune* et *Bacterium lactis aerogenes*. Ces bactéries furent, plus tard, rebaptisées *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Escherich qualifia *Bacterium coli* de bactérie inoffensive, à une époque où le terme « commensal » n'existait pas encore.

Ses recherches s'orientèrent ensuite sur une des grandes maladies de ce siècle, la diphtérie, puis, en collaboration avec Koch, sur la tuberculose et plus particulièrement la réaction à la tuberculine.

En 1890, il revint sur son premier centre d'intérêt, la flore intestinale en pédiatrie, et suggéra que *Pseudomonas aeruginosa* et les entérocoques pouvaient être à l'origine de désordres intestinaux chez les bébés. En 1894, il montra que *Bacterium coli commune* était la cause d'infections urinaires infantiles et que, en particulier chez les petites filles, la colonisation du tractus urinaire se faisait par voie ascendante à partir de la flore intestinale.

A la même époque, Escherich travaillait sur des selles issues d'enfants atteints de dysentérie. Ses cultures mettaient en évidence un germe ressemblant à *B. coli commune*, mais qui ne produisait pas de gaz [9]. Escherich avança ainsi le concept qu'une même bactérie pouvait, selon sa localisation, avoir ou non un pouvoir pathogène et que cette même bactérie, sous des aspects morphologiques identiques devait posséder des propriétés particulières qui lui conféraient son pouvoir pathogène. Cependant, Escherich ne savait pas comment distinguer ces *E. coli* pathogènes, des bactéries majoritaires constituant la flore aéroanaérobie du colon.

Lors du premier congrès international de bactériologie à Paris en 1930, *Bacterium coli commune* fut rebaptisée *Escherichia coli* en l'honneur de Theodor Escherich.

IX. ROLE ECOLOGIQUE DES MICRO-ORGANISMES

Sous l'influence des travaux de Koch, l'étude des microorganismes comme agents de maladies infectieuses fut la principale motivation des bactériologistes durant la dernière décennie du XIX^e siècle. Cependant, le rôle des microorganismes dans la fermentation démontré par Pasteur initia une nouvelle approche de la bactériologie ; celui du rôle écologique des microorganismes.

Ferdinand Cohn (1872) fut le premier à réaliser que les bactéries, en dégradant la matière organique et inorganique, avaient un pouvoir de recyclage nécessaire au bio équilibre des êtres vivants.

Quelques années plus tard, certains microbiologistes choisirent d'investiguer le rôle écologique des micro-organismes. Ils étudièrent, en particulier, le rôle de ceux-ci dans les cycles du carbone, de l'azote et du soufre qui se déroulent dans le sol et les eaux. Deux des pionniers de cette approche furent Sergei Winogradsky (1856-1953) et Martinus Beijerinck (1851-1931).

Le microbiologiste Sergei Winogradsky apporta beaucoup à la microbiologie du sol. Il découvrit que les bactéries du sol oxydaient le fer, le soufre et l'ammoniaque pour obtenir de l'énergie et que de nombreuses bactéries pouvaient incorporer du CO₂ dans la matière organique comme les organismes photosynthétiques. Winogradsky isola aussi du sol des bactéries anaérobies, fixatrices d'azote et étudia la décomposition de la cellulose.

Martinus Beijerinck fut un des plus grands microbiologistes pour sa contribution fondamentale à l'écologie microbienne et à de nombreux autres domaines. Il isola la bactérie fixatrice d'azote, *Azotobacter* ; puis une bactérie d'un nodule radicaire également capable de fixer l'azote (appelée plus tard *Rhizobium*), ainsi que des bactéries sulfatoréductrices. Beijerinck et Winogradsky développèrent la technique d'enrichissement des cultures et l'utilisation de milieux sélectifs, qui sont tellement importants en microbiologie.

On oppose couramment l'approche de Winogradsky et Beijerinck à celle de Koch. Pourtant, cette première présentation de leur travail peut conduire à penser que les principes diffèrent peu puisqu'ils ont isolé des agents responsables de phénomènes jusqu'alors non expliqués. Une première différence réside dans la méthode d'isolement. En effet, ils ne procédèrent pas par isolement sur géloses, mais grâce à la méthode des cultures d'enrichissement, qui consistait à ensemercer un échantillon de sol ou de tout autre milieu naturel, dans un milieu où la substance dont on voulait étudier le métabolisme était la seule source possible d'énergie de carbone ou d'azote. Dans ces conditions hautement sélectives, les organismes capables d'utiliser la substance considérée se trouvaient favorisés, de sorte qu'après quelques repiquages, ils finissaient par être aisément isolés en culture pure, même s'ils n'étaient présents dans

l'inoculum initial qu'en nombre très faible par rapport à d'autres. L'application de cette méthode révéla l'extraordinaire diversité des bactéries et montra qu'il n'existait pratiquement aucune substance organique qui ne puisse être dégradée par elles.

Winogradsky et Beijerinck soulevèrent le problème de la différence entre culture en conditions de laboratoire (*in vitro*) et croissance dans les habitats naturels (*in situ*).

X. LE DEVELOPPEMENT DE LA MICROBIOLOGIE AU VINGTIEME SIECLE

Durant la première partie du vingtième siècle, la microbiologie se développa indépendamment des autres disciplines biologiques. En effet, la plupart des biologistes se préoccupaient de sujets tels que la structure et la fonction cellulaire, l'écologie végétale et animale, la reproduction et le développement des organismes, la nature de l'hérédité et le mécanisme de l'évolution.

Au contraire, les microbiologistes étaient beaucoup plus concernés par les agents des maladies infectieuses, la réponse immunitaire, la recherche de nouveaux agents chimiothérapeutiques et le métabolisme bactérien.

Voici quelques dates clés de cette première moitié de siècle qui marquèrent l'évolution de la bactériologie [10] :

1901 : Jules Bordet et Octave Gengou développèrent la réaction de fixation du complément : toute réaction antigène-anticorps, conduit à la fixation du complément sur la cible antigénique.

E. Wildiers mit en évidence le premier facteur de croissance bactérienne, ouvrant la voie des recherches sur les vitamines ; il observa qu'un extrait soluble de levure contenait une substance nécessaire à la pousse de cette levure. On découvrit, plus tard, qu'il s'agissait de la vitamine B.

1906 : August Von Wassermann décrivit la réaction de Wassermann pour le diagnostic de la syphilis chez les singes ; ce test, utilisant la réaction de fixation du complément, devint la base générale de l'utilisation du complément comme moyen de diagnostic.

1910 : Charles Henry Nicolle montra que la fièvre typhoïde était transmise de personne à personne par les poux; cette information fut utilisée lors des deux guerres mondiales pour réduire l'incidence de cette maladie.

1912 : Paul Ehrlich annonça la découverte d'un traitement efficace contre la syphilis ; le Salvarsan® fut le premier agent chimiothérapeutique spécifique d'une maladie bactérienne.

1915 : Ce fut l'année de la découverte (fortuite) des bactériophages par Frederick Twort ; celui-ci avait passé plusieurs années à cultiver des virus et avait remarqué que les bactéries qui

contaminaient ses cultures devenaient transparentes. Félix d'Herrelle fit indépendamment la même observation deux ans plus tard.

1919 : James Brown utilisa un milieu agar additionné de sang pour étudier les réactions hémolytiques du genre *Streptococcus* qu'il divisa en trois classes : alpha, bêta et gamma.

1924 : George et Gladys Dick décrivirent le « Dick-test », un test cutané pour le diagnostic de la scarlatine ; ils utilisaient une exotoxine soluble extraite d'un *Streptococcus pyogenes* hémolytique. Ils se servirent des postulats de Koch pour montrer que la scarlatine était due à un streptocoque, que l'on retrouvait chez tous les malades.

Albert Calmette et Camille Guérin introduisirent une lignée vivante mais non virulente de bacilles tuberculeux pour immuniser contre la maladie ; ceci fut l'aboutissement d'un travail débuté en 1906. Plus de 200 subcultures furent nécessaires avant d'obtenir cette lignée de bacilles tuberculeux d'origine bovine atténuée.

1926 : Naissance de la spécialité « virologie »

1929 : Alexander Fleming découvrit la pénicilline et ses effets sur les bactéries à Gram positif; cette observation était unique puisque c'était un exemple rare de lyse bactérienne et non pas seulement d'antagonisme due à une moisissure. Alors qu'il étudiait l'inhibition de la croissance de colonies staphylococciques sur une boîte de Pétri, il observa qu'une moisissure verte perturbait sa culture et même anéantissait ses colonies. Au microscope, il découvrit un champignon, qu'il appela « *penicillium notatum* » et décida que la substance antibactérienne porterait le nom de pénicilline. Il fallut attendre 1941, grâce aux travaux de Howard Florey et Ernst Boris Chain portant sur l'extraction et la purification de la pénicilline, pour que l'effet thérapeutique de celle-ci et son innocuité soient reconnus.

1933 : Rebecca Lancefield établit la classification moderne des streptocoques basée sur les propriétés antigéniques des hydrates de carbone ; celle-ci s'appuya sur des critères immunologiques permettant de détecter des antigènes spécifiques de groupe.

1935 : Gerhard J. Domagk se servit d'un antimétabolite chimique pour tuer les streptocoques chez les souris. Il fut démontré plus tard, que le Prontosil était hydrolysé in vivo en un composé actif, le sulfanilamide.

1940 : Ernst Chain et E. P. Abraham découvrirent une substance capable d'inactiver la pénicilline chez *E. coli* ; ce fut le premier produit bactérien reconnu comme capable de conférer une résistance à des agents antibactériens.

1942 : Selman Waksman proposa le mot « antibiotique » après que le Dr Flynn, l'éditeur des « Biological Abstracts » lui ait demandé de trouver un terme pour ces substances, chimiques ou produites par des bactéries, ayant des propriétés antimicrobiennes.

A. H. Coons, H. J. Creech, R. N. Jones et E. Berliner utilisèrent un anticorps fluorescent pour détecter des antigènes pneumococciques sur des tissus humains. Ils apportèrent les prémices des notions de sensibilité et de spécificité.

1944 : Albert Shatz, E. Bugie et Selman Waksman découvrirent la streptomycine.

Les années 40 ont donc marqué un tournant entre une bactériologie artisanale encore empreinte de l'époque pastorienne et une approche plus moderne qui a pris place à la fin de la décennie. Quoique le terme de microbiologie englobait l'étude de tous les microorganismes, ce terme était peu utilisé à l'époque pour désigner l'activité des laboratoires qui pratiquaient cette discipline et qui étaient généralement appelés laboratoires de bactériologie parce que cette branche était dominante aussi bien par son importance que par les possibilités diagnostiques qu'elle offrait. La virologie quittait à peine le domaine de la recherche et n'avait pas encore sa place dans le diagnostic de routine ; les quelques analyses de parasitologie et de mycologie étaient assurées par le laboratoire de bactériologie.

A la fin de la dernière guerre mondiale, la plupart des agents des grandes maladies étaient connus et les analyses pratiquées étaient essentiellement axées sur le diagnostic de maladies telles que diphtérie, fièvre typhoïde, syphilis, tuberculose, streptococcies, méningites... Les infections opportunistes et nosocomiales n'avaient pas atteint le niveau préoccupant que nous connaissons et ne mobilisaient que peu de moyens. Par contre, la découverte récente puis l'utilisation des antibiotiques constitua une avancée considérable en médecine et modifia complètement le pronostic de certaines maladies infectieuses. Après les sulfamides, découverts en 1935, la pénicilline et la streptomycine devinrent disponibles dès les premières années de l'après-guerre, suivies quelques décennies plus tard par les tétracyclines, la chloromycétine, l'érythromycine et les premières pénicillines semi-synthétiques. Le spectre variable de ces antibiotiques et l'apparition précoce de résistances chez les bactéries obligèrent rapidement le laboratoire à tester la sensibilité des germes *in vitro*, analyse qui reçut, très tôt, le nom d'« antibiogramme » et qui devint une des missions principales du laboratoire de bactériologie. Le bouleversement provoqué par les antibiotiques et les résultats spectaculaires dans le traitement de nombreuses maladies infectieuses donnèrent l'impression que le problème de ces maladies était résolu. C'est ainsi que les cliniciens prirent l'habitude de ne s'intéresser qu'à la sensibilité du germe en négligeant son identification, ainsi que le rôle de la flore commensale.

Il était donc courant de pratiquer l'antibiogramme sur la flore totale d'échantillons tels que selles ou expectorations qui étaient ensemencées comme telles sans bien savoir ce que l'on testait. L'antibiotique actif sur toute la flore était alors choisi, puisqu'il impliquait que le germe

éventuellement pathogène était couvert. Ce n'est que, plusieurs années plus tard, que cette optique changea lorsque l'épidémiologie des infections nosocomiales exigea de connaître l'identité des germes et que le rôle de la barrière protectrice de la flore commensale fut mieux compris. La démarche était, bien sûr, intéressante lorsqu'il s'agissait de prélèvements physiologiquement stériles tels que des urines ou des liquides de ponction.

Durant la période 1960-1970, la bactériologie évolua encore beaucoup, le terme de « bactériologie médicale » apparut et de nouvelles situations surgirent, en particulier avec la résistance aux antibiotiques, de plus en plus diversifiés et de plus en plus utilisés. L'hygiène hospitalière impliqua une nouvelle tâche pour le laboratoire ; la prise de conscience des infections nosocomiales modifia, une fois de plus, la vision de la bactériologie : les antibiotiques n'étaient pas la panacée dans la lutte contre les maladies infectieuses, la prévention passant par des mesures d'hygiène et par une bonne connaissance de l'épidémiologie hospitalière. Par conséquent, l'identification exacte des espèces bactériennes, quelque peu négligée depuis 10 ans reprit de l'importance. On alla même jusqu'à chercher des marqueurs permettant de typer des souches particulières dans une même espèce, ce qui deviendra, plus tard, une application importante en biologie moléculaire.

XI. FIN DU VINGTIEME SIECLE : L'EMERGENCE DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

L'émergence des techniques de biologie moléculaire dans la quasi-totalité des disciplines biologiques marqua la fin du vingtième siècle.

En effet, le XX^e siècle coïncide avec la naissance de la génétique : débutant avec la redécouverte des travaux de Mendel, se poursuivant par l'élaboration de la théorie chromosomique de l'hérédité au début du siècle, la découverte de l'ADN comme support biochimique de l'information génétique et l'élucidation de sa structure participent à l'explosion de la biologie moléculaire à partir des années 70.

A. L'émergence de la génétique formelle

La génétique moderne remonte aux travaux de Gregor Mendel, qui le premier établit les lois de l'hérédité. Il publia ses résultats en 1866, mais ils passèrent alors à peu près inaperçus. Leur redécouverte n'eut lieu qu'en 1900.

B. Le chromosome support de l'hérédité

Ce furent les travaux de Thomas Morgan, sur la drosophile, la mouche du vinaigre, qui conduisirent au développement de la théorie chromosomique de l'hérédité. Les gènes furent alors localisés sur les chromosomes, et avec Alfred Sturtevant, ils y furent même ordonnés, constituant les premières cartes génétiques. C'est encore dans le laboratoire de Morgan que furent développées les procédures de mutagenèse expérimentales, par Hermann Müller.

C. La convergence de la biochimie et de la génétique

Si la présence des gènes sur les chromosomes était alors établie, rien n'était connu de la nature biochimique des gènes ou de leur mode d'action. La première relation entre un gène et une enzyme fut établie en 1902 par Archibald Garrod, à partir d'une observation portant sur une maladie génétique humaine. George Wells Beadle et Edward Tatum approfondirent cette relation sur un système accessible à l'expérimentation, le champignon *Neurospora crassa*. L'ensemble de ces travaux aboutirent finalement à la conclusion que les gènes contrôlaient la synthèse des enzymes, et que chaque protéine était codée par un gène différent.

D. L'ADN, support de l'information génétique

Le premier phénomène, qui permit de progresser dans l'identification du support de l'hérédité, fut celui de la transformation bactérienne, rapporté en 1928 par l'anglais Fred Griffith. Ce phénomène représentait alors un test d'activité biologique, grâce auquel il était possible de déterminer la nature du matériel génétique. Ce test ne fut pas mis à profit par Griffith lui-même, mais par l'équipe d'Oswald Avery, en 1944, qui l'utilisa pour élucider la nature biochimique du matériel génétique : il montra que cette substance « transformante » était constituée d'ADN. Cette découverte fut toutefois accueillie avec beaucoup de scepticisme. En 1949, le chimiste autrichien Erwin Chargaff démontra que le ratio entre la quantité d'adénine et de thymine (A/T) d'une part, et la quantité de guanine et de cytosine (G/C) d'autre part, était constant et proche de 1 mais que la composition en bases des acides nucléiques variait suivant les espèces. A la même époque, les travaux des chercheurs français Colette et Roger Vendrely et André Boivin confirmèrent la présence d'ADN dans le noyau des cellules. La confirmation définitive du rôle primordial de l'ADN comme support du message génétique fut finalement apportée par les travaux d'Alfred Hershey et de Martha Chase, en 1952, utilisant le modèle du bactériophage ; si ces travaux démontrèrent le caractère essentiel de l'ADN dans la transmission de l'information génétique, ils ne fournirent cependant que peu d'informations sur la structure de la molécule.

L'acceptation définitive ne vint qu'avec l'élucidation de la structure de l'ADN par Watson et Crick [11].

E. La structure de l'ADN

C'est avec l'élucidation de la structure de l'ADN que la biologie moléculaire connut son apothéose. C'est à partir de 1952, que se joua l'acte final de cette structure dont les principaux acteurs furent James Watson et Francis Crick. Physicien de formation, Crick décida après la guerre de s'intéresser à la biologie et rejoignit le groupe de Max Perutz à Cambridge pour étudier la structure des protéines par diffraction des rayons X. De son côté, Watson se forma à la biologie, à l'Université d'Indiana, dans le laboratoire de génétique de Salvador Luria, membre éminent du « groupe du bactériophage ». Après quelques courts séjours dans divers laboratoires européens, Watson arriva, en 1951, dans le laboratoire de Bragg pour travailler sur la structure de la myoglobine. Dès son arrivée à Cambridge, une collaboration s'établit entre les deux hommes dans le but de déterminer la structure de l'ADN. A cette même époque, prenant appui sur la structure en hélice de certains motifs polypeptidiques, Linus Pauling et Robert Corey aux Etats-Unis, décrivent un modèle d'ADN formé par une triple hélice, structure qui se révéla rapidement erronée. Par l'entremise du fils de Pauling, Watson aurait eu, semble-t-il, rapidement connaissance des problèmes rencontrés par son père dans l'élaboration de ce modèle à trois hélices. Cela le conforta dans son hypothèse de structure à deux brins et stimula sa volonté d'aboutir rapidement à l'élucidation de la structure de l'ADN. A partir des informations de diffraction des rayons X obtenues par les groupes de Maurice Wilkins et de Rosalind Franklin, les deux hommes construisirent à l'aide de fil de fer un modèle structural en double hélice conciliant les données cristallographiques montrant une structure hélicoïdale et celles obtenues par Chargaff, indiquant une équiconcentration entre l'adénine et la thymine d'une part, et la guanine et la cytosine, d'autre part.

Ainsi, s'achevait la quête de la structure du matériel génétique, mais cette première page de la jeune biologie moléculaire était à peine écrite que déjà s'ouvraient les chapitres relatifs à la réplication, à la réparation et à l'expression du message génétique [12].

Tout un arsenal technologique (électrophorèse, chromatographie, spectrophotométrie, radioactivité, séquençage...) fut mis en œuvre au service de l'approche moléculaire des phénomènes biologiques. Les virus furent une voie d'étude de la réplication de l'ADN, de l'expression des gènes, de l'oncogenèse et de l'apoptose.

En 1980, Moseley et coll. furent les premiers à utiliser l'hybridation ADN-ARN pour la détection d'*Escherichia coli* entérotoxigènes isolés des selles [13].

En 1985, Kary B. Mullis mit au point la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction), processus d'amplification de séquences spécifiques d'ADN permettant, pour un très faible échantillon d'en obtenir un nombre de copies considérables. La Taq polymérase est l'enzyme moteur de la PCR, permettant la copie des brins ; elle a été isolée en 1969 chez *Thermus aquaticus*, archéobactérie thermophile vivant dans les sources chaudes du parc de Yellow Stone- USA. Son utilisation a constitué une véritable révolution puisqu'elle présentait l'avantage par rapport aux autres polymérases d'être stable, et donc de survivre au chauffage nécessaire à la dénaturation (séparation des 2 brins d'ADN). Avant elle, de la polymérase devait être rajoutée au cours de chaque cycle [14].

Ainsi, la technique de PCR fit son apparition dans le diagnostic des maladies infectieuses il y a une vingtaine d'années. Tous les secteurs de la microbiologie furent concernés. Toutefois, les retombées au quotidien furent inégales. L'apport pour le diagnostic, très important en virologie, le devint de plus en plus en bactériologie, mais resta moindre en parasitologie.

Cependant, le diagnostic bactériologique ne constituait pas, à première vue, un domaine prioritaire pour l'application de la biologie moléculaire dans la mesure où il existait déjà de nombreuses techniques performantes. En effet, le rôle du laboratoire de bactériologie clinique reposait sur l'isolement et l'identification de l'agent pathogène ainsi que sur l'étude de la résistance aux agents antibactériens.

Les méthodes dites traditionnelles comprenaient ainsi l'examen direct des prélèvements, la mise en culture et l'identification phénotypique alors que la bactériologie moléculaire reposait sur la mise en évidence d'une séquence d'acides nucléiques bactériens et la génotypie.

Le développement de la biologie moléculaire a été le moteur de formidables progrès technologiques au cours des cinquante dernières années. L'apport de la microélectronique, de l'informatique et de la robotique dans ce domaine se traduit par des méthodes s'adressant à des systèmes moléculaires de plus en plus petits et l'on parle déjà de nanobiologie...

**LES STRATEGIES BACTERIOLOGIQUES
ACTUELLES : COMMENT LES FAIRE EVOLUER ET
PAR QUELS MOYENS ?**

LES STRATEGIES BACTERIOLOGIQUES ACTUELLES : COMMENT LES FAIRE EVOLUER ET PAR QUELS MOYENS ?

I. LES TECHNIQUES CLASSIQUES DU DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

Au dix-neuvième siècle, la mise au point des méthodes d'isolement par Robert Koch, bien qu'essentielles au développement de la microbiologie, a peut-être occulté l'intérêt d'une étude globale des populations bactériennes au sein d'un prélèvement donné.

En effet, les postulats de Koch, ont ancré dans les esprits des microbiologistes et des cliniciens, la notion restrictive suivante :

1 pathogène \Leftrightarrow 1 maladie.

C'est ainsi, qu'au cours des siècles, les bactériologistes n'ont eu de cesse d'améliorer les milieux de culture afin de les rendre plus appropriés et sélectifs.

L'approche diagnostique classique consiste en la détection d'un germe pathogène connu dans un prélèvement éventuellement polymicrobien.

L'identification des bactéries repose sur la séquence suivante:

- examen direct du prélèvement;
- mise en culture et isolement;
- identification, basée sur des caractères phénotypiques : morphologiques, biochimiques, antigéniques et culturels;
- étude du comportement vis-à-vis des antibiotiques.

Une deuxième approche diagnostique, celle-ci indirecte, est la sérologie qui peut-être plus ou moins tardive, et pouvant présenter des problèmes de réactions croisées. Elle a cependant l'avantage d'être une dernière ressource diagnostique.

Ainsi, pendant longtemps, l'objectif classique d'une analyse bactériologique s'est limité à la recherche de pathogènes « officiels » c'est-à-dire de germes attendus dans certaines pathologies et/ou dans certains types de prélèvements.

Or, on sait aujourd'hui qu'à la fois le contexte et la situation créent la pathogénicité. Prenons l'exemple des staphylocoques à coagulase négative, hôtes normaux de la peau saine, mais qui se révèlent être redoutables sur du matériel de prothèse. Il en est de même pour *E. coli*, qui

peut coloniser le tractus urinaire et être à l'origine d'infections, mais que l'on retrouve à l'état de commensal dans la flore intestinale.

De plus, il nous est, aujourd'hui, plus facile d'admettre qu'une bactérie considérée comme commensale ou contaminante puisse être la cause d'infections.

Reprenons l'exemple des staphylocoques à coagulase négative: retrouvés dans des suppurations cutanées, sous certaines conditions, il serait erroné aujourd'hui de rendre une conclusion telle que « présence de bactéries de la flore commensale de la peau ». Au contraire, il conviendrait d'étudier plus précisément ce germe retrouvé seul et en quantité suffisante et de l'incriminer dans cette pathogenèse. De la même façon, un staphylocoque à coagulase négative mis en évidence de façon itérative dans un prélèvement d'hémoculture doit conduire à une prise en charge thérapeutique et ne doit pas être abordé comme un simple contaminant...Encore une fois, tout dépendra de la situation considérée.

Il est également admis, aujourd'hui, que l'on puisse parler de diversité bactérienne au sein d'un prélèvement (une maladie pouvant résulter de co-infections bactériennes), comme au sein d'une espèce (différentes souches d'une même espèce pouvant être responsable de la maladie).

.....

Notre étude

Pour illustrer ceci, nous rapportons une étude originale que nous avons menée dans l'UF pédiatrie du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Purpan, en collaboration avec l'unité de pathologie néonatale. Les staphylocoques, n'appartenant pas à l'espèce *S. aureus* et improprement dénommés staphylocoques à coagulase négative, constituent le principal agent des infections post natales chez les prématurés hospitalisés. L'étude a consisté en l'analyse approfondie de divers prélèvements chez sept enfants suspects d'infection néo-natale et post-natale. L'objectif de cette étude était de connaître exactement les bactéries impliquées, en ne se limitant pas à un diagnostic de genre, et de suivre l'implantation des espèces chez ces nouveaux-nés.

Un suivi bactériologique a donc été effectué avec la réalisation de trois séries de prélèvements (selles, prélèvement cutané et liquide gastrique) chez ces sept enfants de pédiatrie suspects d'infection. Chaque série a été réalisée à une semaine d'intervalle pour chacun d'entre eux. Les résultats, ont montré la nette prédominance de staphylocoques avec dans la majorité des cas présence, au sein d'un même prélèvement ou d'une série, de différentes espèces de staphylocoques (*S. epidermidis, warneri, capitis...*) et de différents antibiotypes.

Au terme de cette étude, il a donc été démontré que les nouveaux-nés étaient colonisés par une multitude d'espèces bactériennes avec prédominance de staphylocoques non *S. aureus* et que chaque individu constituait un écosystème propre évoluant de façon individuelle. Une grande diversité de staphylocoques en terme d'espèce et d'antibiotype a été retrouvée chez ces enfants, diversité rarement mise en évidence parce que les analyses bactériologiques classiques ne donnent qu'un reflet partiel du résultat bactériologique et ne permettent pas de visualiser l'étendue de la diversité des différentes flores.

.....

II. LES METHODES D'AVENIR

A. LES MILIEUX CHROMOGENES

Les milieux de culture, développés par Robert Koch au dix-neuvième siècle étaient étudiés pour être favorable à la pousse du plus grand nombre de germes possibles ; ils étaient donc largement enrichis en substances nutritives.

Ces milieux ont lentement évolué, alors qu'un grand nombre de bactéries était identifié et que l'on comprenait que tous les germes n'avaient pas les mêmes exigences culturales. C'est en conséquence que furent développés des milieux spécifiques et/ou sélectifs de certains genres bactériens.

On joua sur le mode respiratoire des micro-organismes (aérobiose, anaérobiose, micro-aérophilie), sur leurs exigences nutritives (gélose chocolat pour les *Haemophilus*, milieu sélénite pour les salmonelles et shigelles...), et sur leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques (gélose à l'acide nalidixique inhibant la pousse des bactéries Gram négatif, milieu Thayer-Martin pour *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*...). Ces milieux, pas assez sélectifs, nécessitaient toujours, une identification bactérienne supplémentaire par des moyens biochimiques classiques.

Puis, est arrivée l'ère des milieux chromogènes, qui sans être parfaits en tous points, apportèrent un plus à la discipline, notamment en permettant de réaliser simultanément les étapes de culture et d'identification pour quelques germes.

1. Principe

Le principe de ces géloses repose sur la présence d'un analogue structural d'une molécule, naturellement clivée par une enzyme bactérienne ou fongique. Initialement le substrat ne

possède aucune propriété observable. Après clivage, l'aglycone libéré acquiert des propriétés chromogéniques, il précipite sans diffuser dans la gélose afin de permettre une bonne différenciation des colonies dans une culture plurimicrobienne. Les limites de cette technique sont la nécessité de trouver des enzymes spécifiques d'une espèce ou d'un groupe d'espèce ; si cette spécificité enzymatique est insuffisante, il faudra recourir à des techniques d'identification complémentaires. Une autre difficulté de mise au point de ces géloses est l'importance de l'équilibre entre la pousse bactérienne et la réaction enzymatique ; il faut chercher un compromis entre un milieu appauvri en éléments nutritifs permettant une hydrolyse correcte des substrats chromogéniques et un milieu suffisamment riche permettant une croissance suffisante des microorganismes recherchés.

2. Applications

a) Urines

Ces géloses sont largement utilisées aujourd'hui pour étudier les prélèvements urinaires : elles ont été conçues pour distinguer rapidement les principales espèces responsables d'infections urinaires (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus sp.*).

Voici quelques exemples de milieux proposés par les différents fabricants : Chromagar Orientation (Beckton Dickinson), Uriselect 4 (BIO RAD), UTI 4 (OXOID), CPS ID 2 (BioMérieux). Ainsi, l'identification directe sur le primo-isolément de certaines bactéries ou groupes de bactéries, représentant plus de 60% des espèces bactériennes retrouvées dans les infections urinaires, permet un délai de réponse au clinicien plus court, entraînant une antibiothérapie plus rapidement adaptée. De plus, elle entraîne une économie de réactifs (galeries et autres réactifs d'identification) et de « temps technicien ». Malheureusement, la spécificité de ces milieux demeure encore imparfaite.

b) Streptocoque du groupe B

Le streptocoque du groupe B est le pathogène principal des infections néo-natales et est systématiquement recherché chez la femme enceinte entre la 35 et 37ème semaine d'aménorrhée. On parle beaucoup aujourd'hui du milieu Granada dans le dépistage du portage vaginal du streptocoque B chez la femme enceinte. Toutes les études s'accordent pour souligner l'excellente spécificité de ce milieu et sa bonne sensibilité, supérieure à celle de la gélose au sang utilisée classiquement (95% versus 85%) [15].

Ainsi, l'utilisation de ce milieu présente l'intérêt de pouvoir rendre un diagnostic de certitude en 18 à 24 heures grâce à la mise en évidence de colonies pigmentées spécifiques, permettant une identification directe et immédiate. Les résultats sont obtenus plus rapidement et plus facilement qu'avec les milieux traditionnels pour lesquels la nécessité d'une subculture et le recours à des tests d'identification complémentaires d'agglutination, retarde de 24 heures le résultat définitif [16].

c) *Staphylococcus aureus*

Une autre avancée majeure dans le domaine des milieux chromogéniques a été le développement de milieux spécifiques pour *Staphylococcus aureus*. En effet, les staphylocoques sont parmi les bactéries les plus fréquemment isolées en pratique médicale ; parmi eux, *Staphylococcus aureus* une espèce très redoutée parce qu'elle est la cause la plus fréquente de sepsis, qu'elle peut créer des foyers disséminés et que certaines souches peuvent produire différentes enzymes et toxines extracellulaires. Depuis l'introduction du premier antibiotique antistaphylococcique, la pénicilline, il y a plus de soixante ans, jusqu'à nos jours, la capacité d'adaptation de ces bactéries leur a permis de mettre en échec au cours du temps bon nombre de nos thérapeutiques et les isolats présentent fréquemment un état de multi résistance. Il est donc important, aujourd'hui, de faire une identification précise de ces germes et de connaître rapidement leur état de résistance.

i. Diagnostic

Actuellement, le diagnostic d'infection staphylococcique repose sur des méthodes bactériologiques traditionnelles ; l'identification de l'espèce *aureus* fait appel à des tests de mise en évidence de certaines enzymes telles que la coagulase libre ou la DNase, ou bien à des tests d'agglutination pour la mise en évidence de facteurs spécifiques, le clumping factor et la protéine A. Tous ces tests peuvent donner des réactions faussement positives avec d'autres espèces de *Staphylococcus*.

La détection de la méticillino-résistance passe par différentes techniques dont la réalisation d'antibiogrammes par diffusion en gélose ou en milieu liquide; en raison de la possibilité d'une expression hétérogène, la réalisation de ces antibiogrammes nécessite une parfaite maîtrise des facteurs pouvant influencer cette résistance tels que la température d'incubation, la concentration en NaCl du milieu de culture, le pH du milieu, l'inoculum et la durée d'incubation. Ces conditions étant respectées, la sensibilité de ces méthodes est de l'ordre de 97% [17].

A l'heure actuelle, c'est l'oxacilline, molécule analogue de la méticilline, antibiotique de choix dans le traitement des infections à Staphylocoques (Bristopen®), qui est utilisée au laboratoire pour détecter la méticillino-résistance chez le staphylocoque. L'utilisation d'un disque de Latamofex, céphalosporine de troisième génération a été récemment recommandée [18].

Des tests rapides de détection de la sensibilité à l'oxacilline (sensibilité moyenne de l'ordre de 75%) ainsi que des kits permettant la recherche de la PLP2a (Protéine, Liant la Pénicilline, additionnelle d'affinité diminuée pour les bêta-lactamines et synthétisées sous la dépendance du gène *mecA*) sont des méthodes simples et rapides mais nécessitent un isolement préalable.

La détection du gène *mecA* par biologie moléculaire est considérée comme étant la méthode de référence pour toutes les espèces de Staphylocoques [19], mais reste réservée aux laboratoires spécialisés, équipés pour la biologie moléculaire.

ii. Milieu CHROMagar SAMR

Il existe actuellement sur le marché deux types de milieux qui nous ont paru intéressants pour notre étude :

- le milieu CHROMagar *Staph aureus* (CHROMagar Microbiologie, Paris, France), milieu chromogène permettant d'isoler et de détecter, après 24 heures d'incubation à 37°C, *Staphylococcus aureus* dans des prélèvements plurimicrobiens grâce à une pigmentation rose spécifique des colonies (sensibilité 98,5% et spécificité 97%). Sur ce milieu, les staphylocoques à coagulase négative (SCN) donnent des colonies grises, blanches ou sont inhibées ;

- une gélose Mueller-Hinton (hypersalée ou non) contenant 6 mg/l d'oxacilline: la souche de staphylocoque est ensemencée en strie puis incubée 18 heures à 37°C ; elle est considérée comme résistante si la culture est positive. Ce milieu, peu utilisé en France, présente l'intérêt de permettre une détection aisée des souches résistantes quel que soit le mécanisme de leur résistance ; cependant elle demande encore à être validée.

.....

Nos études/ Première étude : Milieu CHROMagar supplémenté

Dans le cadre de notre étude, nous avons imaginé fabriquer un milieu hybride permettant simultanément la mise en évidence de *S. aureus* (SA) au sein d'un prélèvement ainsi que sa méticillino-résistance par l'adjonction d'oxacilline dans un milieu CHROMagar. L'équipe de A. Rambach, concepteur du milieu CHROMagar, a devancé nos ambitions, en mettant au point ce type

de gélose. Plusieurs millilitres de ce milieu nous ont été confié afin d'en tester la performance pour la détection des *S. Aureus* multi-résistants (SAMR).

Après avoir testé la fiabilité du milieu CHROMagar *S. aureus* (SA) et sa version MR (mécilline résistance) sur une variété de souches, nous avons conduit une étude sur des prélèvements d'hémoculture. L'étude a concerné 40 hémocultures pour lesquelles l'examen microscopique révélait la présence de cocci en amas Gram positif. Toutes ces hémocultures ont été ensemencées sur gélose SA et gélose MR. Parallèlement, une analyse classique de l'hémoculture était réalisée après ensemencement d'une gélose au sang avec identification biochimique et antibiogramme d'un exemplaire de chaque type de colonies phénotypiquement différentes, donc le plus souvent d'une seule colonie.

Nos résultats ont été comparés à ceux rendus par les techniciennes du laboratoire.

Résultats concordants :

	colonies roses 6 cas	colonies blanches 2 cas	pas de colonies 7 cas	colonies blanches et grises 20 cas
Milieu SA	+	+	-	+
Milieu MR	+	-	-	+
	↓	↓	↓	↓
Technique laboratoire	SAMR 6 cas	SCN MS 2 cas	SCN MS 3 cas SCN MR 4 cas	SCN MR 17 cas SCN MR+SCN MS 3 cas

Résultats discordants:

	colonies roses et grises 2 cas	colonies blanches et grises 3 cas
Milieu SA	+	+
Milieu MR	+	+
	↓	↓
Technique laboratoire	SCN MR 2 cas	SCN MS 3 cas

Abréviations utilisés:

SA= *Staphylococcus aureus*
 SCN=staphylocoque coagulase négative
 MS=mécillino sensible
 MR=mécillino résistant

Dans les 2 cas où des colonies roses et grises avaient poussé sur les deux milieux SA et MR, le laboratoire n'a rendu que des SCN MR ; dans ces 2 cas discordants, les souches roses retrouvées sur les milieux ont été analysées par la technique classique, qui a permis de confirmer leur identité de SA. Ainsi, notre étude a permis de détecter des SAMR alors que l'analyse classique ne les avait pas identifiés, ceci parce qu'une seule colonie prise sur la gélose au sang avait été étudiée. Pour ces 2 malades, l'espèce *aureus* avait été dépistée à côté de SCN dans le cathéter veineux. Dans les 3 autres cas discordants où le laboratoire a rendu SCN MS, le nombre de colonies sur la gélose SA était très supérieur à celui présent sur la gélose MR. La population résistante était donc minoritaire et a été ignorée par l'analyse classique.

Au total, dans 5 cas sur 40, l'analyse classique a été prise en défaut : dans 2 cas, omission des SA, et dans 3 cas, détection de SCN MS alors que des souches MR étaient également présentes dans le prélèvement.

Deuxième étude : Détection du portage de SAMR

Cette étude a été réalisée sur deux groupes de population et son but premier était de tester nos milieux de culture SA et MR :

- 24 étudiants internes en pharmacie (toutes spécialités confondues);
- 95 étudiants en troisième année de médecine (DCEM1).

Un écouvillonnage cutané (main) et nasal a été effectué chez les internes en pharmacie tandis que, chez les futurs médecins, il n'a été prélevé qu'un échantillon nasal.

Les résultats ont été assez surprenants :

- dans le groupe des 24 internes en pharmacie, 12 étaient porteurs de SA au niveau du nez mais une seule de ces souches était MR ; nous n'avons retrouvé qu'un seul individu porteur de SA MS sur les mains ;
- sur les 95 écouvillons nasaux des étudiants en médecine, il a été détecté 6 SAMR.

Dans notre étude, la prévalence du portage de SAMR au niveau nasal est de l'ordre de 5%. Dans l'étude réalisée à Limoges sur 88 employés dans le service de soins intensifs de l'hôpital seulement 1,1% du personnel était porteur de SAMR [20].

.....

iii. Bénéfice apporté

L'intérêt d'un tel type de milieu est de pouvoir donner rapidement (en 24 heures), grâce à une technique facile et accessible à tout laboratoire de bactériologie, une information au clinicien quant à la présence de SAMR chez un patient ; celui-ci pourra prendre au plus tôt des mesures d'isolement et de mise en place de traitement chez ces porteurs.

L'utilisation de ce type de milieu permet de détecter, directement à partir du prélèvement toute la population de germes présentant un certain niveau de résistance. Cette étape, permettant de donner rapidement un premier élément diagnostique, n'élimine pas la réalisation ultérieure d'un antibiogramme: mais celui-ci sera alors réalisé avec les souches ayant poussé sur le milieu sélectif c'est-à-dire, les plus résistantes. En effet, l'inconvénient de travailler sur des isolements de culture est de négliger certaines colonies importantes d'un point de vue de leur pathogénicité ou de leur niveau de résistance. C'est pourquoi, on préconise pour certains germes, notamment pour les staphylocoques de réaliser des antibiogrammes non plus sur des colonies isolées mais dans la « masse » de la culture.

Ce milieu a été testé par plusieurs équipes, notamment celle de John Merlino en Australie [21] ou de Jan Kluytmans aux Pays Bas [22]. Il ressort de ces études que le milieu CHROMagar seul est très sensible et spécifique, cependant l'adjonction d'oxacilline fait chuter sa sensibilité : environ 15% des SARM testés ne seraient pas détectés par ce milieu, ce qui est loin d'être acceptable. Il nécessite donc d'être encore amélioré car le principe reste intéressant.

3. Conclusion

Dix ans d'utilisation du milieu Rambach, milieu chromogène pour la détection des salmonelles dans les coprocultures, ont permis d'apprécier l'utilité de tels milieux et de conforter nos espérances ; en effet la sensibilité du milieu Rambach est supérieure à celle du BCP (Bromocrésol pourpre utilisé classiquement pour la culture des entérobactéries), sa fertilité est également meilleure pour les salmonelles et la distinction aisée de colonies roses spécifiques des salmonelles permet une agglutination rapide [23].

Le principe des milieux chromogènes, sans être la solution idéale, est un premier pas vers cette nouvelle approche de l'analyse bactériologique puisqu'ils permettent d'orienter rapidement le diagnostic. Pour être totalement fiables et mériter la confiance absolue des bactériologistes, ils devront encore être améliorés afin d'augmenter leur spécificité. Quoiqu'il en soit, le délai de pousse de 24 heures est incompressible, ce qui en fait une technique peu contributive dans certaines situations.

B. LES TESTS RAPIDES

Ils sont basés sur des méthodes immunologiques ou biochimiques et présentent de nombreux avantages par rapport aux tests classiques tels que rapidité et simplicité de réalisation.

1. Définitions

Lorsque l'on évoque les tests rapides, on ne désigne pas un examen en particulier, mais plutôt un ensemble de situations analytiques dont les caractéristiques varient en fonction des pays. Ainsi aux Etats-Unis, sous le terme vague de tests rapides sont regroupés les:

- « Patient self testing » ou « home testing » ou PST qui sont les tests réalisés par le patient lui-même ;
- « Doctor's tests » ou « Physician office labs » ou POL ou tests réalisés par le médecin ;
- « Point of care testing » ou POCT ou tests réalisés par un centre de soins (hôpital, dispensaire, ambulance).

Ces tests possèdent, en plus des appellations citées plus haut, un grand nombre de dénominations anglo-saxonnes telles que « bedside testing », « near-patient testing », « extra-laboratories testing », « off-site »... ou françaises telles que « biologie délocalisée » ou « tests décentralisés » [24].

Certains critères communs à l'ensemble de ces tests permettent de définir un test rapide comme un test analytique répondant à des conditions essentielles telles que la réalisation rapide même en dehors du laboratoire permettant l'obtention de résultats précoces, ainsi que l'utilisation aisée.

A l'heure actuelle, les tests rapides occupent une place croissante au sein du marché du diagnostic biologique. Des enjeux économiques considérables incitent les firmes pharmaceutiques à investir dans cette nouvelle voie.

2. Principes techniques

a) Méthodes immunologiques

Ce sont des méthodes d'agglutination ou des méthodes Elisa réalisées sur des échantillons biologiques. Elles reposent sur la détection des antigènes bactériens (méthodes directes) et des anticorps dirigés contre ces derniers (méthodes indirectes). Dans ce dernier cas, le diagnostic

précoce est impossible car l'élévation des anticorps nécessite un certain délai. La lecture de ces tests est, le plus souvent, visuelle.

i. Techniques d'agglutination et de coagglutination

En présence d'antigènes bactériens, des particules de latex recouvertes d'anticorps correspondants vont permettre de visualiser une agglutination. Cette méthode proposée dans les années 1980 a représenté une avancée dans le domaine du diagnostic par un rendu rapide des résultats (10 minutes contre 24 heures pour la culture); cependant, sa sensibilité peu élevée par rapport à la méthode de référence, qu'est la culture bactérienne, représente un lourd frein à son utilisation. Outre leur manque de sensibilité et les réactions croisées fréquentes, la difficulté de leur lecture a entraîné un désintérêt croissant au profit d'autres techniques immunologiques. Les tests d'agglutination demeurent cependant encore largement utilisés pour l'identification sur milieu de culture (par exemple identification de *S. aureus* ou du pneumocoque), ou pour des sérogroupages (streptocoques, salmonelles, *Escherichia coli* O157 :H7, K1...).

ii. Techniques Elisa

De la même façon que précédemment, les antigènes bactériens sont mis en contact avec les anticorps de l'échantillon. Il y a alors formation d'un complexe antigène-anticorps, et lors de l'étape de révélation, les couples formés sont caractérisés. Il existe différentes techniques de révélation.

♦ Méthodes basées sur une révélation par réaction enzymatique

Dans ces méthodes telles que la *Rapid enzyme immuno assay*, les anticorps, utilisés pour la détection des antigènes bactériens, sont associés à une enzyme. La révélation du complexe antigène-anticorps se fait par addition d'un substrat incolore de l'enzyme ; l'action de cette enzyme sur le substrat entraîne l'apparition d'une coloration, plus facilement détectable que les réactions d'agglutinations précédentes. Cette méthode se révèle donc plus sensible et plus spécifique que l'agglutination alors que le temps de réalisation est le même pour les deux techniques. La sensibilité n'est cependant pas encore assez satisfaisante et implique la nécessité de contrôler les tests négatifs par une mise en culture de la bactérie afin d'éviter tout faux négatif.

♦ Méthodes basées sur les principes d'immunochromatographie (ICT)

Une migration chromatographique est couplée à une révélation immunologique. Ces dispositifs reposent sur la migration d'un échantillon liquide au travers d'une membrane de nitrocellulose.

Dans cette membrane, les réactifs permettant la mise en évidence d'une molécule sont concentrés au niveau de bandes; la migration du flux entraîne la coloration de ces zones. Une bande de contrôle apparaît systématiquement permettant d'affirmer la bonne migration du flux. Cette technique présente de nombreuses utilisations en bactériologie mais également dans d'autres domaines de la biologie (notamment en virologie, biochimie et parasitologie).

♦ L'immunoessai optique

C'est une réaction basée sur le changement des propriétés optiques d'une plaque de silicium. En présence de l'antigène bactérien, il y a formation d'un complexe immun qui entraîne une coloration jaune; dans le cas contraire, la coloration est violette.

Cette rapidité, et cette facilité d'utilisation et d'interprétation des tests de détection antigénique, représentent une importante avancée, non seulement, dans une stratégie diagnostique permettant un traitement plus précoce et plus efficace, mais aussi lorsqu'il s'agit de détecter des germes pour lesquels la culture est difficile ou longue. De plus, ces tests ont été perfectionnés de façon considérable grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

b) Techniques biochimiques

Elles sont basées sur la mise en évidence d'une activité enzymatique bactérienne et sont surtout utilisées pour le dépistage des infections urinaires.

A côté de ces tests urinaires, d'autres tests biochimiques existent par exemple pour la mise en évidence de l'activité uréasique d'*Helicobacter pylori*.

3. Principales applications

a) Pour un diagnostic présomptif

Les infections urinaires se classant au deuxième rang des pathologies infectieuses après les infections respiratoires, les analyses d'urine ou ECBU (Examen Cyto-Bactériologique des Urines) représentent les examens bactériologiques les plus fréquemment réalisés en laboratoire de ville. L'intérêt des tests rapides dans le diagnostic présomptif d'infection urinaire a été largement démontré car ils permettent une décision thérapeutique immédiate.

Ces tests se présentent habituellement sous forme de bandelettes au niveau desquelles l'activité leucocyte estérase et la production de nitrites sont mises en évidence. La spécificité et la valeur prédictive positive de ces méthodes sont excellentes, mais elles sont peu sensibles et

ont une valeur prédictive négative faible. Cette méthode fournit parfois des résultats erronés comme de faux positifs en présence de leucorrhées, d'acide ascorbique, d'une grande quantité d'albumine, de nitrofurantoïne ou de gentamicine.

La bactériurie est mise en évidence par le test des nitrites ; ces molécules sont produites par des bactéries qui possèdent une nitrate reductase. Au cours du métabolisme, cette enzyme réduit les nitrates en nitrites. C'est le cas notamment des entérobactéries dont *E. coli*. Le seuil de détection de ces tests est d'environ 10^6 UFC/mL et la lecture se fait en 30 secondes.

Des faux négatifs sont observés en présence de micro-organismes ne réduisant pas les nitrates (cocci à Gram positif et certains bacilles à Gram négatif aérobies, levures), mais aussi avec des urines diluées ou n'ayant pas séjourné suffisamment longtemps dans la vessie, un régime sans légumes, une prise de diurétiques ou un pH inférieur à 6. Des faux positifs sont observés en présence de sang ou de colorants rouges.

Ces tests ont donc une certaine limite qu'il s'agit de connaître lorsqu'on les utilise et ne peuvent, en aucun cas, être utilisés seuls.

b) Pour un diagnostic spécifique

i. Streptococcus pyogenes

Streptococcus pyogenes, connu sous le vocable streptocoque du groupe A bêta-hémolytique, est responsable de nombreuses infections du haut appareil respiratoire en particulier l'angine dite « à points blancs ». En France, 9 à 11 millions de personnes consultent chaque année pour cette infection dont les critères de reconnaissance clinique sont imparfaits. Les examens bactériologiques, pour leur part, nécessitent au moins 24 heures de délai [25]. Très souvent, les médecins préfèrent traiter ces patients de façon empirique pour prévenir tout risque de complication et limiter toute diffusion de la souche. Or, ces angines bactériennes ne représentent pas la majorité des angines, puisque environ les deux tiers sont d'origine virale et ne nécessitent donc pas de traitement antibiotique. On estime que seulement 25 à 50% des angines sont dues à *Streptococcus pyogenes* chez l'enfant et 10 à 25% chez l'adulte. En France, chaque année, 8 à 9 millions de prescriptions abusives d'antibiotiques sont délivrées devant un tableau d'angine et l'utilisation erronée de ces antibiotiques présente de nombreux inconvénients que nous connaissons bien (risque de survenue d'effets indésirables, coût élevé des médicaments utilisés et surtout émergence de souches résistantes) [26].

Le souhait des prescripteurs est donc de différencier rapidement une angine bactérienne d'une angine virale afin de limiter ces phénomènes ; les tests rapides ont, ainsi, très vite justifié leur

intérêt dans le diagnostic de l'angine à streptocoque. La plupart des tests proposés sont de type immunologique reposant sur des réactions de coagglutination, agglutination de particules de latex, Elisa et utilisant des anticorps dirigés contre des antigènes du streptocoque (streptolysine O, DNase B, hyaluronidase et streptokinase).

Le problème essentiel de ces tests est leur manque de sensibilité ; bien que des progrès significatifs aient été réalisés ces dernières années, permettant d'obtenir une sensibilité de l'ordre de 90%, 10% des angines streptococciques restent non détectées par cette technique. Aux Etats-Unis, ce manque de sensibilité a conduit l'*American academy of pediatrics* et l'*American heart association* à recommander la prescription d'un prélèvement bactériologique classique afin de confirmer la négativité des résultats [27].

En France, les conclusions de la X^e conférence de consensus rapportent qu'il n'y a pas lieu de vérifier un test négatif chez un adulte. En revanche, pour l'enfant où le risque de RAA (rhumatisme articulaire aigu) est présent, il semble préférable de contrôler ces résultats négatifs. Aux Etats-Unis, où cette approche diagnostique est à présent généralisée, aucune augmentation des taux de complications liées aux angines n'a été observée.

Le marché étant très prometteur, de nombreux laboratoires ont mis sur le marché leur test rapide pour la détection du streptocoque A.

ii. *Helicobacter pylori*

Cette bactérie à Gram négatif est responsable, en association avec d'autres facteurs environnementaux, du développement de la maladie ulcéreuse. Elle est retrouvée dans 90% des ulcères duodénaux et dans 70% des ulcères gastriques ; elle se trouve également associée au carcinome gastrique, au lymphome de MALT et à certaines maladies cardiovasculaires. Elle représente le portage bactérien le plus fréquent au monde après la carie dentaire, avec une prévalence variant en fonction du niveau de vie.

Plusieurs alternatives invasives ou non invasives sont à la disposition du médecin pour le diagnostic d'infection à *Helicobacter pylori* [28]. Les méthodes d'investigation invasives sont réalisées à partir de biopsies ; il s'agit d'une part de la mise en culture (technique de référence) et d'autre part du test à l'uréase, test basé sur la production de cette enzyme par *Helicobacter pylori*. De plus en plus, les professionnels de santé souhaitent rendre ces méthodes moins traumatisantes pour les malades en cherchant à utiliser d'autres prélèvements plus facilement accessibles.

C'est pourquoi, des méthodes d'investigation non invasives sont développées depuis quelques années ; il s'agit notamment du test respiratoire à l'urée marquée au carbone 13. Ce test est basé sur la recherche, avant et après absorption d'une solution d'urée marquée, de CO₂ marqué au 13C dans l'air expiré. Le CO₂ marqué est mesuré par spectrométrie infrarouge ou par spectrométrie atomique. Cette technique apporte un avantage certain puisque sa sensibilité et sa spécificité (respectivement 95,3% et 97,7%) sont comparables à celles des méthodes directes d'investigation tout en étant moins contraignante pour le patient [29]. Elle nécessite néanmoins de disposer d'un spectrophotomètre.

Une toute nouvelle technique encore peu connue est la recherche d'*Helicobacter* dans les selles par un test rapide immunologique ; cette technique recherche la présence d'un antigène spécifique d'*Helicobacter pylori* dans les selles à l'aide d'anticorps polyclonaux; il s'agit d'un test ELISA (Premier Platinum HpSa Enzyme Immunoassay® Meridian Diagnostics), dont les sensibilités et spécificités sont presque égales au test respiratoire à l'urée marquée (respectivement 94,1% et 91,8%). Ce test présente les avantages d'être encore plus confortable pour le patient (un seul échantillon de selles est nécessaire), d'être simple de réalisation et, de plus, il ne nécessite pas d'équipement particulier [30]. A l'avenir, cette méthode sera sûrement améliorée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Malheureusement, ce test n'est pas encore remboursé par la sécurité sociale et le montant de l'analyse s'élève à 31 euros.

iii. *Clostridium difficile*

Cette bactérie à Gram positif, anaérobie et sporulée, représente un pathogène nosocomial très fréquent. Elle est l'agent causal de diarrhées et même de colites pseudo-membraneuses qui peuvent être liées à un traitement antibiotique à large spectre. *Clostridium difficile* produit deux toxines, la toxine A ou entérotoxine, et la toxine B ou cytotoxine, qui sont à l'origine du pouvoir pathogène.

La détection de *Clostridium difficile* repose sur différentes méthodes basées, soit sur la culture de la bactérie suivie de la caractérisation de la toxine, soit sur la mise en évidence directe des toxines dans les selles par technique immunochromatographique, ou par technique ELISA. Ces dernières sont des techniques rapides, simples, spécifiques et sensibles, qui se sont imposées puisqu'elles permettent une prise en charge thérapeutique rapide de l'infection et donc une diminution des coûts. En comparaison, la culture de la bactérie demande 48H de pousse, sur milieu approprié et dans des conditions de culture particulières, suivie de la recherche du caractère toxigène de la souche.

Plusieurs kits commercialisés détectent la présence des toxines dans les fèces par une technique immuno-enzymatique. La plupart détectent la toxine A mais certains d'entre eux détectent également la toxine B ce qui permet de diagnostiquer les infections dues à des souches A-/B+.

Le test Triage® C. difficile Panel (Biosite Diagnostics) permet la détection simultanée de la toxine A et d'un antigène (la glutamate déshydrogénase) commun à toutes les souches de *Clostridium difficile*. Le principal avantage de ce test est d'avoir une valeur prédictive négative de, pratiquement, 99,7% pour la mise en évidence de la toxine A et pour la recherche de l'antigène commun [31].

Le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Purpan utilise le test MERIDIAN® qui détecte les 2 toxines A et B à partir de la selle ou des colonies, soit sous forme puits avec lecture spectrophotométrique soit sous forme de test unitaire de type « savonnette » à lecture optique. Le test unitaire évite l'attente d'une série d'examen et permet une réponse immédiate, économisant un antibiogramme dans le cas de négativité.

iv. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae ou pneumocoque est responsable de pneumonies sévères, de septicémies et de suppurations surtout de la sphère ORL. C'est la première cause de méningites bactériennes, n'épargnant aucune tranche d'âge. L'incidence de l'infection est plus importante chez les enfants de moins de deux ans et chez les sujets âgés de plus de soixante ans. En dépit des traitements antibiotiques, le taux de mortalité est élevé notamment lors de septicémies ou de méningites chez les sujets âgés et/ou immunodéprimés.

Pour poser le diagnostic d'infection à pneumocoque, les outils du bactériologiste manquent de performance et l'identification biochimique classique est souvent prise en défaut. Il existe des tests rapides d'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps dirigés contre les principaux sérovars de *Streptococcus pneumoniae*. Ces tests permettent une identification simple des colonies suspectes, à condition d'avoir préalablement vérifié que la bactérie à tester était bien un coque à Gram positif (il existe en effet des réactions croisées avec certains bacilles à Gram négatif), mais manquent de spécificité et sont inopérants quand la souche a perdu sa capsule. L'innovation dans le diagnostic rapide provient du développement de tests immunochromatographiques permettant la recherche de l'antigène pneumococcique directement dans les urines. Les études divergent quant à la sensibilité de ce test mais toutes s'accordent pour souligner l'excellente spécificité, la rapidité et la simplicité de ce test pour un

diagnostic précoce de pneumonie à pneumocoque, même dans les cas où une antibiothérapie a déjà été mise en place [32]. L'espoir d'un bon diagnostic en urgence repose sur la PCR [33].

v. *Legionella*

Les légionelles sont des bactéries ubiquitaires susceptibles d'entraîner une maladie quand l'inoculum de l'environnement est aérosolisé et inhalé par l'hôte humain. L'évolution de la maladie qui en découle est déterminée à la fois par des facteurs de virulence de la bactérie et par l'immunocompétence de l'hôte. La maladie des légionnaires, qui est une pneumopathie causée par *Legionella pneumophila* est l'exemple type de maladie due à ces organismes.

Le diagnostic bactériologique d'une légionellose repose sur différentes techniques dont les sensibilités vont être extrêmement variables selon le type de prélèvement utilisé. La détection du germe sur biopsie pulmonaire reste la plus spécifique mais le choix d'un autre prélèvement s'il est possible est préférable.

_ La culture sur milieu spécifique bien qu'étant difficile, reste la méthode de choix pour un diagnostic de certitude. Sa sensibilité varie entre 80 et 99% dans les liquides de lavages broncho-alvéolaires (LBA), les sécrétions bronchiques et la biopsie pulmonaire et tombe à 10 à 30% dans le sang ; sa spécificité est de 99 à 100% [34]

_ l'immunofluorescence directe permet le diagnostic de tous les sérogroupes de *Legionella pneumophila* mais aucun kit ne permet la détection de toutes les espèces du genre. Sa sensibilité, de même que pour la culture est très variable selon le prélèvement : 80-90% sur une biopsie pulmonaire, 25-75% sur les sécrétions bronchiques ou le LBA ; les spécificités sont bonnes de 95 à 99% [34].

_ la sérologie est la technique la plus utilisée mais n'est pas dénuée d'inconvénients : elle doit mettre en évidence une augmentation significative (x4) des titres d'anticorps dans deux sérums, l'un prélevé dès le début de la maladie, l'autre prélevé après 3 à 6 semaines d'évolution. Chez environ 15% des malades, la séroconversion n'apparaît qu'au-delà de six semaines ce qui peut nécessiter de répéter les tests et, chez certains patients, en dépit d'un diagnostic de certitude, la séroconversion n'est jamais observée. De plus, la spécificité d'un titre unique élevé (supérieur ou égal à 256) est médiocre. Il faut également noter que de nombreuses réactions croisées avec d'autres espèces bactériennes ont été observées [35].

la biologie moléculaire est encore peu utilisée en routine ; cependant, l'étude d'une équipe écossaise montre que la recherche de l'antigène soluble urinaire et la PCR dans le sérum sont tous deux des tests très utiles dans la phase aiguë de la maladie, avec d'excellentes spécificités et sensibilités. Alors qu'aujourd'hui, le diagnostic d'espèce de *Legionella* repose sur l'immunofluorescence et/ou la culture, méthodes longues et/ou invasives, l'utilisation de séquences spécifiques d'espèces permettrait un diagnostic rapide et non invasif par biologie moléculaire [36].

les tests rapides de détection des antigènes solubles urinaires: cette recherche est positive chez environ 80% des malades dès l'apparition des symptômes et se prolonge pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois chez certains sujets. La mise en évidence d'antigènes solubles de *Legionella sp.* dans les urines, se réalise grâce à des tests commercialisés faisant appel à la radio-immunologie, à l'immunoenzymologie ou à une immunochromatographie sur membrane. Les sensibilités et spécificités de ces tests sont bonnes (respectivement 85 et 99%) [37]. Seul ombre au tableau, ils ne permettent pas la détection de tous les sérogroupes de *Legionella pneumophila* et de toutes les espèces de légionelles.

Malgré tout, les avantages sont nombreux, précocité, rapidité, détection possible des antigènes malgré une antibiothérapie, recueil facile du prélèvement et contribuent donc à rendre ce test très attrayant.

4. Avantages des tests rapides

Ils sont constitués par la rapidité, la simplicité de lecture et d'interprétation et la possibilité de délocaliser les tests au lit du malade, dans les ambulances ou sur le terrain. De plus, ces tests devraient, en théorie, permettre de réduire les coûts hospitaliers. Cette notion est difficile à appréhender mais il faudrait réaliser une étude en regroupant diverses données (durée des séjours, traitements antibiotiques et autres, examens complémentaires, mise en œuvre des équipements et structures du laboratoire central). Le test en lui-même est, en effet, souvent plus coûteux que l'analyse effectuée au laboratoire mais une étude plus globale incluant tous les paramètres précédents montrerait que finalement, les tests rapides permettraient de réduire les coûts.

Enfin, d'un point de vue purement pratique, ces tests sont généralement peu volumineux, robustes et demandant des conditions de stockage peu rigoureuses. Cet aspect représente un

point essentiel pour l'implantation de ces tests dans les pays en voie de développement où l'obtention de la chaîne du froid pour la conservation des réactifs est souvent précaire.

5. Limites des tests rapides

Malgré tous les avantages qui leur sont reconnus, les tests rapides ne font pas l'unanimité auprès des biologistes et des bactériologistes en particulier. Une des raisons permettant d'expliquer cette réticence est leur relative jeunesse. Malgré leur expansion et le développement actuel important, on manque encore de recul vis-à-vis de l'ensemble de ces tests, et la documentation les concernant n'est pas encore suffisante. De nombreuses questions se posent quant à leur fiabilité, leur sensibilité et leur spécificité par rapport aux méthodes de référence. On peut citer le cas de la recherche du streptocoque du groupe A dans la gorge où un test rapide n'empêche pas la culture comme cela est recommandé par la législation américaine. D'autres critiques peuvent être émises concernant ces tests rapides telles que le panel réduit de tests proposés encore trop faible par rapport aux multiples pathologies bactériennes et aux exigences des médecins et leur coût plus important qu'un test classique de laboratoire [24].

Du fait de leur nouveauté, des remarques portent sur la valeur des contrôles de qualité et de leur réalisation pratique (compétence de l'opérateur, formation des personnels). Enfin, il faut également envisager le risque d'erreurs post-analytiques, de transfert de données et d'enregistrement des résultats pouvant facilement survenir. Dans l'urgence, la transmission orale est privilégiée par rapport à la transmission écrite ; cet inconvénient est d'autant plus important que les tests rapides vont potentiellement engendrer une augmentation des informations médicales, d'où un risque accru de perte de ces informations.

Devant l'augmentation du nombre de méthodes et d'instruments, la nécessité de programmes d'assurance qualité devient indispensable. De plus, une uniformisation des pratiques et procédures législatives dans l'ensemble du domaine de la santé et entre les pays s'avèrerait indispensable.

Du point de vue réglementaire, une question essentielle se pose sur l'entité responsable du test. S'agit-il du laboratoire pharmaceutique produisant le test, du biologiste, du clinicien, ou du patient le réalisant ? Cette question ne semble pas aujourd'hui correctement éclaircie. En France, ce sont les directeurs des laboratoires d'analyses biologiques qui sont juridiquement responsable, aussi bien des tests que de la formation du personnel les utilisant.

Ces inconvénients permettent d'expliquer pourquoi certains biologistes s'opposent à une implantation généralisée des tests rapides.

6. Avenir des tests rapides immunologiques

L'avenir des tests rapides repose en premier lieu sur une augmentation du nombre d'espèces de bactéries détectées. En plus de cette augmentation, un regroupement d'analyses pourrait être envisagé ; ainsi, à partir d'un seul kit, plusieurs pathogènes pourraient être rapidement recherchés ce qui permettrait un diagnostic différentiel rapide.

A l'heure actuelle, la demande de rapidité au niveau du rendu des résultats des examens biologiques par le milieu médical et le patient, est croissante ; les tests rapides pourront répondre à cette nouvelle exigence. C'est pourquoi, ces méthodes devraient logiquement trouver leur place aux côtés des tests classiques de laboratoire, mais plutôt dans un cadre de diagnostic de consultation ou d'urgence, réalisé aussi bien par le praticien que par le laboratoire d'analyses.

C. BIOLOGIE MOLECULAIRE

Le diagnostic bactériologique « classique » repose, comme il a déjà été vu, sur la séquence : examen direct et mise en culture, avec, le cas échéant, isolement et identification des agents microbiens suspects de pathogénicité, puis évaluation *in vitro* de leur sensibilité aux antibiotiques. D'autres méthodes, apparues dans les années 1980, reposant sur l'analyse ou la détection d'antigènes ou de séquences d'acides nucléiques spécifiques ont été d'un apport majeur dans le diagnostic microbiologique, permettant souvent de s'affranchir des délais incompressibles de la culture. Si ces méthodes ont connu un essor majeur dans le domaine de la virologie, leur développement encore restreint en bactériologie est cependant amené à se développer.

Nous envisagerons successivement, dans ce chapitre, le principe de la technique, ses potentialités et quelques unes de ses applications en bactériologie, les problèmes d'interprétation qu'elle suscite et les espoirs qu'elle engendre pour le diagnostic des infections bactériennes. Il faut cependant garder en tête qu'il appartiendra au biologiste de limiter les indications de cette nouvelle méthode aux situations apportant un service réel au patient et à son prescripteur.

1. Les techniques de biologie moléculaire

a) Amplification génique *in vitro* ou PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique décrite en 1985 permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier et seront donc capables de s'apparier spécifiquement avec chacun des deux brins d'ADN complémentaires. Ces deux amorces, mélangées avec de l'ADN génomique dénaturé (séparation des deux brins par chauffage à 92-95°C), vont s'hybrider (lors du refroidissement du mélange à 55-60°C) avec leurs séquences complémentaires respectives. A partir de ces amorces, une ADN polymérase résistante à la chaleur, la Taq polymérase, synthétise une copie de chaque brin multipliant par deux le nombre initial du fragment d'ADN choisi. Les brins néo synthétisés serviront eux-mêmes de matrice pour initier l'étape de polymérisation du cycle

suivant ; la répétition des trois étapes (dénaturation, hybridation, élongation) aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible : pour n cycles, le facteur d'amplification est théoriquement égal à 2^n .

La visualisation du fragment d'ADN amplifié est obtenue par électrophorèse en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

Cette technique a considérablement évolué et de nouveaux types de PCR ont été introduits tels que : la PCR dite « multiplex » (pour amplifier des gènes avec de nombreux exons, il est possible d'introduire dans le milieu d'amplification différents couples d'amorces spécifiques), la PCR dite « nested PCR » ou « PCR nichée » (correspond à une seconde PCR réalisée en utilisant de nouvelles amorces situées à l'intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR), la PCR quantitative (où l'on cherche à estimer le nombre de copies présentes dans la séquence cible d'ADN ou d'ARN), la LCR (Ligase Chain Reaction) (technique d'amplification de sonde qui utilise une ligase thermostable et deux sondes oligonucléotidiques choisies de manière à être juxtaposées lorsqu'elles s'hybrident à l'ADN cible)...

b) Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Après séparation de brins par fusion, si la solution d'ADN est refroidie lentement dans des conditions de milieu favorables, une réassociation des brins est progressivement observée. L'hybridation est à la base de nombreuses techniques de biologie moléculaire impliquant la mise en présence d'au moins deux brins simples d'acides nucléiques, dans des conditions physico chimiques précises. Le brin, dont on connaît au moins une partie de la séquence, est une sonde, l'autre brin, celui que l'on souhaite caractériser, constitue la cible. L'un des deux brins est marqué par couplage radioactif ou chimique avec une molécule pouvant générer un signal.

c) Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. La méthode utilisée aujourd'hui, proposée par F. Sanger en 1977 (prix Nobel de chimie en 1980), repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didésoxynucléotides, qui bloquent la synthèse d'ADN, par les ADN polymérases, après leur incorporation. Depuis 1977, la méthode a considérablement évolué grâce à la mise au point de séquenceurs automatiques

et de marquages des nucléotides à l'aide de fluorochromes. C'est un outil puissant d'aide à l'identification bactérienne.

2. Application à l'identification bactérienne

La détection directe, par PCR, des bactéries présentes dans des échantillons biologiques prend tout son intérêt pour des germes difficilement ou non cultivables, ayant des délais de croissance élevés et/ou des exigences nutritionnelles complexes, et/ou présents dans l'échantillon en quantités infimes.

Ces méthodes ont été initialement décrites en 1989 pour *C. trachomatis* et *L. pneumophila*. Depuis cette date, cette technique s'est développée et, peu à peu son domaine d'application s'est élargi à d'autres bactéries à culture fastidieuse et à des prélèvements variés. Voici une petite revue des principaux exemples.

a) Les bactéries responsables d'infections génitales

i. *Chlamydia trachomatis*

La détection de *Chlamydia trachomatis* par biologie moléculaire est un des grands succès de cette technique appliquée au diagnostic d'identification en routine.

La culture sur cellules McCoy a longtemps été considérée comme la méthode de référence mais sa sensibilité (comprise entre 30 et 90% selon le type de prélèvement [38]) n'était pas parfaite du fait de la fragilité de cette bactérie ; d'autres techniques directes (ELISA) ont vu le jour mais donnent des résultats très variables. La sérologie, quant à elle, a montré son inutilité dans les infections basses et son manque de spécificité (réactions croisées) dans les infections hautes.

Au sein de cet éventail de méthodes diagnostiques, les techniques de détection des acides nucléiques, ont, par leurs performances et leur rapidité de mise en œuvre, trouvé leur place et profondément modifié le diagnostic biologique des infections à *C. trachomatis*. Ainsi, cette technique a supplanté celle des cultures cellulaires et actuellement, la détection des acides nucléiques est la méthode la plus adaptée. Les techniques commercialisées comprennent une technique d'hybridation moléculaire (Pace 2®) et 3 techniques d'amplification. Les deux premières amplifient un fragment d'un plasmide cryptique de *C. trachomatis*, soit par PCR (Polymerase Chain Reaction) suivie d'une détection par sonde, soit par LCR (Ligase Chain Reaction) avec détection automatisée. La troisième correspond à une amplification isotherme des ARN ribosomiaux (TMA) [38].

Ces méthodes sont à la fois sensibles et spécifiques (le plus souvent supérieures à 98%). C'est pour cette raison qu'elles ont été incluses dans la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale depuis 1997 sur certains prélèvements (urines, sperme, endocol, urètre, liquide de ponction, conjonctive, biopsie, sécrétions broncho-pharyngées, péritoine) ; en effet, ces méthodes sont particulièrement intéressantes pour certains échantillons (liquide articulaire, sperme, tissus et urines) pour lesquels la culture et les tests antigéniques sont soit inutilisables soit peu sensibles [39].

La recherche de *C. trachomatis* par amplification génique est certainement l'apport majeur de la biologie moléculaire au diagnostic bactériologique de routine.

ii. *Neisseria gonorrhoeae*

La culture de *Neisseria gonorrhoeae* sur gélose, au sang cuit enrichie, est délicate et nécessite l'ensemencement immédiat du prélèvement.

La sensibilité de cette culture varie selon les études de 50 à 95% [40] et la faible viabilité de ce germe est un facteur limitant important : ceci explique que la mise au point de techniques de biologie moléculaire pour la détection de cette bactérie, puisse être d'un intérêt majeur dans le diagnostic des gonococcies.

Les techniques disponibles sont une hybridation moléculaire (Pace2®), ainsi qu'une amplification génique (PCR Roche®, LCR Roche®). Déjà, en 1987, une sonde Orthoprobe® très sensible avait été proposée [41].

Ces techniques ont montré avoir une meilleure sensibilité que la culture sur les prélèvements endocervicaux, urétraux et urinaires et seraient également plus intéressantes pour les prélèvements rectaux ; en effet, dans ces échantillons, la culture sur milieux sélectifs est souvent contaminée par des bactéries commensales qui inhibent la pousse de ce germe fragile. Cependant, les trousse actuellement commercialisées, ne sont validées que pour les échantillons endocervicaux, urétraux et urinaires.

Une association intéressante et judicieuse, proposée par Roche permet la recherche couplée de *N. gonorrhoeae* et de *C. trachomatis* ; cependant, cette trousse présente encore quelques limites et mérite d'être améliorée.

Ces techniques ne sont malheureusement que rarement utilisées dans les laboratoires, en routine ; en effet, leur coût comparé à celui de la culture sur gélose « chocolat », l'impossibilité d'étudier la sensibilité aux antibiotiques (rendue indispensable en raison de l'apparition, en

France, de résistances depuis 1979), et la possibilité de faux positifs par réactions croisées avec *N. cinerea* et *N. subflava*, font qu'elles sont difficilement recommandables à l'heure actuelle.

iii. *Treponema pallidum*

C'est l'agent responsable de la syphilis et l'un des rares pathogènes de l'homme dont la culture est impossible. Le diagnostic des différentes formes cliniques de la syphilis repose à l'heure actuelle, essentiellement sur le sérodiagnostic, qui manque, soit de sensibilité, soit de spécificité, soit des deux dans certaines formes cliniques de la maladie (syphilis congénitale, neurosyphilis). Différentes PCR ont été testées, notamment celle d'une équipe américaine d'Atlanta qui a utilisé deux séquences spécifiques du gène de la DNA polymérase I (PCR Roche®) de *T. pallidum*. Divers prélèvements tels que sang total, fractions sanguines, LCR, liquide amniotique ou prélèvements d'ulcération génitale ont été testés. Les résultats obtenus, très concluants quant à la sensibilité et à la spécificité de ce test, permettent d'espérer des progrès dans la diagnostic bactériologique de la syphilis [42].

Cette même équipe a tenté une PCR multiplex pour *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi* et *Herpes simplex virus*, qui a montré, également, des résultats très satisfaisants.

Aujourd'hui, cette recherche par méthode moléculaire demeure exceptionnelle dans la quasi-totalité des laboratoires de bactériologie.

b) Les mycobactéries

L'examen direct permet de suspecter rapidement les patients les plus contagieux, bien qu'il ne permette pas de différencier l'agent de la tuberculose, des mycobactéries atypiques ; l'isolement par culture est l'examen clef qui permet un diagnostic de certitude et, ultérieurement, de tester la sensibilité aux antibiotiques ; cet isolement, sur milieu gélosé, prend classiquement de 3 à 6 semaines.

Les tentatives d'amélioration du diagnostic ont été nombreuses dans le domaine du diagnostic des mycobactéries. Le premier milieu mis au point, et toujours utilisé aujourd'hui, a été celui de Lowenstein et Jensen, milieu gélosé à l'œuf. Coletsos l'a amélioré en y ajoutant diverses substances nutritives. Puis, est apparue la génération des milieux mixtes (BBL Septi-Chek® AFB, Becton-Dickinson) qui ont combiné milieu liquide et milieux gélosés spécifiques, portés par une lame. Ces milieux permettaient un repiquage des colonies plus aisé ainsi qu'une différenciation provisoire possible, des mycobactéries cultivées dans le flacon.

Les premiers appareils « semi-automatisés » ont été développés par la firme américaine Becton-Dickinson. Ainsi, l'appareil Bactec 460® utilisait des milieux de culture liquides pour y détecter par respirométrie radiométrique la croissance des mycobactéries. Le principe de cette méthode était basé sur la mesure du CO₂, marqué par du carbone 14, et libéré par la respiration des mycobactéries au cours de leurs multiplications dans ce milieu, où la seule source de carbone était de l'acide palmitique marqué. Le Bactec 460® réalisait le dosage du ¹⁴CO₂ et le traduisait sous forme numérique, proportionnelle au nombre de bactéries et à leur taux de croissance. Les avantages étaient, entre autres, une réduction du temps nécessaire pour la détection d'une primoculture et la réalisation d'antibiogrammes plus rapides par l'inoculation de flacons positifs. Cependant, la manipulation et l'élimination des flacons d'isotopes radioactifs étaient une contrainte importante, qui, de plus, augmentait considérablement le coût de ces analyses. Aujourd'hui, cet appareil est de moins en moins utilisé car d'autres milieux liquides ne contenant pas de produits radioactifs ont été développés et donnent des résultats tout aussi rapides avec, pour certains, une lecture automatisée.

Ainsi, Becton-Dickinson propose différents systèmes basés sur le même principe : un bouillon contenant un composé fluorescent est incorporé à de la silicone au fond du flacon. Ce composé fluorescent est sensible à la présence d'oxygène dissous dans le bouillon. Initialement, la concentration en oxygène dissous dans le milieu inhibe les émissions de ce composé. La respiration des mycobactéries et des bactéries, consommant l'oxygène du milieu, permet l'observation d'une fluorescence.

La société Organon Teknika, commercialise le BacT/Alert® ; cet appareil mesure le gaz carbonique à l'aide d'un sensor, qui change de couleur en fonction de la concentration en CO₂ produit par les mycobactéries ou les bactéries (variation de pH). C'est une mesure colorimétrique, par réflectométrie au travers du flacon.

Ces appareils permettent d'accélérer la pousse des mycobactéries et d'avoir une détection automatisée des cultures positives. Ce ne sont donc que des « milieux de culture » modernes, qui ne permettent pas une identification précise des mycobactéries. En complément de ces automates, la biologie moléculaire s'est alors développée pour tenter de donner une identification rapide. Malheureusement, les déceptions ont été nombreuses dans cette tentative. Ainsi, BioMérieux a mis au point une technique d'hybridation moléculaire pour l'identification des mycobactéries à partir d'une culture : c'est la technique Accuprobe Gen-Probe® qui détecte le complexe tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*), le complexe avium (*M. avium*, *M. intracellulaire*), *M. kansasii* et *M. goodii*. Le fabricant recommande une identification biochimique systématique, afin de contrôler et de

confirmer le résultat de la sonde d'hybridation. C'est dire le peu de confiance de cette technique !

L'évolution logique a été d'essayer de mettre en évidence les mycobactéries directement à partir des prélèvements, afin de s'affranchir de la durée de culture. La technique d'amplification Gen-Probe®, BioMérieux, permet ainsi, la détection, à partir d'un échantillon clinique, d'une mycobactérie appartenant au complexe tuberculosis, grâce à l'amplification de son ARN ribosomal. Les prélèvements pouvant être utilisés sont les crachats, les prélèvements bronchiques et les liquides de ponction (LCR, liquide pleural). Là encore, les recommandations du fabricant laissent planer le doute quant à la fiabilité de la technique. Ainsi, il est spécifié que tous les échantillons doivent être mis en culture afin de confirmer le résultat du test d'amplification ou de pouvoir déterminer la présence d'une mycobactérie atypique. Et que, l'isolement permettra d'effectuer un antibiogramme et de faire une identification précise de la mycobactérie, en particulier au sein du complexe tuberculosis. De plus, il est à noter qu'un résultat négatif n'exclut pas la présence d'une mycobactérie, du complexe tuberculosis dans l'échantillon !

Tout ceci, souligne le manque de sensibilité et de spécificité, significatif selon le type de prélèvement testé et qui a limité la substitution des méthodes de référence par la seule biologie moléculaire. Selon les études publiées depuis une dizaine d'années, la sensibilité et la spécificité de ces tests varient de 15 à 95% ! La plupart des auteurs s'accordent actuellement sur une sensibilité proche de celle de l'examen direct.

La présence d'inhibiteurs dans les liquides biologiques, les difficultés d'extraction de l'ADN des mycobactéries en raison de la résistance de la paroi à la lyse, ainsi que leur répartition inhomogène dans les produits pathologiques sont les principales raisons de ces résultats décevants.

A l'heure actuelle, la recommandation devrait être une limitation de ces tests aux situations critiques, dans lesquelles il existe de solides arguments de tuberculose active (miliaire, méningite tuberculeuse) ou bien dans les cas où l'examen direct est positif. Dans ces conditions, la PCR permettrait de déterminer en quelques heures s'il s'agit d'une infection à *M. tuberculosis* ou à une autre mycobactérie, guidant par là même, l'attitude thérapeutique, qui est différente pour ces deux types d'infection.

c) Les bactéries responsables d'infections respiratoires autres que les mycobactéries

La biologie moléculaire, en matière d'infections respiratoires a été évaluée pour le diagnostic des infections à *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* et *Bordetella pertussis*. Des trousse « diagnostic » ont été évaluées et commercialisées ; elles permettent la détection spécifique des différentes espèces de Légionelles dans des prélèvements aussi bien d'origine humaine qu'environnementaux, avec des seuils de sensibilité tout à fait performants. La PCR est également très intéressante pour le diagnostic des infections à mycoplasmes ou à *Chlamydia* en raison, des difficultés de culture de ces bactéries.

Des trousse permettant d'amplifier, par PCR multiplex, simultanément *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* et *L. pneumophila* ont été testées dans le cadre de diagnostic de pneumopathies atypiques [43]. Les études menées montrent une parfaite adéquation entre les résultats obtenus par les techniques conventionnelles et par la multiplex, excellente sensibilité, gain de temps « technique », réduction de volume de prélèvement et rapidité d'obtention des résultats [44].

Bordetella pertussis, l'agent de la coqueluche, est un bacille à Gram négatif dont la culture sur milieu spécial (milieu de Bordet-Gengou) est délicate et requiert au minimum 72 heures d'incubation. Le diagnostic par PCR des infections à *B. pertussis* a fait l'objet de nombreuses publications, et l'ensemble des travaux rapportés souligne la fiabilité, la sensibilité et la facilité (grâce à des techniques parfaitement standardisées) de la technique [45].

d) Détection et reconnaissance de bactéries inconnues

La biologie moléculaire peut-être mise à profit pour la recherche de micro-organismes inconnus. En pratique, certaines séquences de gènes, codant pour les ARN ribosomaux (16S, 23S) sont hautement conservées dans le monde vivant ; dès lors, on utilise des amorces universelles qui vont permettre l'amplification d'un fragment d'ADN bactérien, correspondant à une partie du gène codant pour l'ARN ribosomal. La détermination de sa séquence nucléotidique permettra, après interrogation des banques de données, de le classer dans l'arbre phylogénique universel. Il est également possible d'amplifier certains gènes bactériens tels que le gène *sod* de la superoxyde dismutase ou bien le gène *rpoB* de la RNA polymérase.

La nature du prélèvement est primordiale dans ce type d'approche pour l'interprétation des résultats. Il est nécessaire de travailler sur des prélèvements issus de tissus normalement stériles.

C'est par cette approche qu'ont pu être identifiés *Bartonella henselae* (agent responsable de l'angiomatose bacillaire et de la péliose hépatique, identifié en 1993), *Afipia felis* (reconnu responsable de la maladie des griffes du chat) et *Tropheryma whippelii* (imputé dans une infection intestinale chronique, la maladie de Whipple) entre autres [45].

e) Mise en évidence du "genre" bactérien dans des prélèvements physiologiquement stériles

En allant plus loin dans la démarche précédente, pourquoi ne pas imaginer que l'utilisation d'amorces universelles puisse être mise à profit pour détecter la présence du genre microbien au sein d'un prélèvement ?

Cette technique serait intéressante dans le cas de prélèvements physiologiquement stériles (recherche d'une étiologie bactérienne à une méningite, ponctions diverses articulaires ou autres...) où une information rapide et simple (présence ou absence de germes) pourrait être donnée au clinicien.

Un test PCR, effectué avec des amorces universelles, qui permet la détection de plus de cent espèces bactériennes, incluant la totalité des espèces responsables d'infections méningées, a été mis au point par la société Roche. Le fragment d'ADN amplifié est ensuite caractérisé à l'aide de sondes oligonucléotidiques spécifiques d'espèces permettant l'identification de l'agent infectieux responsable. Cette méthode de diagnostic, lourde mais très sensible, prend tout son intérêt dans les cas où le nombre de bactéries présentes dans les méninges ou dans les tissus cérébraux est très faible et par conséquent, difficilement détectable par les techniques bactériologiques usuelles. Cette technique est également applicable à tout liquide physiologiquement stérile (sang, liquides de ponction...) [46].

En particulier, dans les infections méningées, les techniques conventionnelles ne sont pas toujours informatives (infection décapitée, germes fragiles) où si elles le sont, c'est souvent dans un délai trop long, compte tenu de l'urgence médicale ; la mise en place d'une PCR pouvant attester de l'origine bactérienne d'une méningite permettrait une adaptation plus rapide de l'antibiothérapie, une limitation des investigations supplémentaires et également d'établir un meilleur pronostic et une information épidémiologique réaliste [47].

La liste des germes qui pourrait grandement bénéficier de la biologie moléculaire est longue ; nous pourrions énumérer rapidement, les genres *Borrelia*, *Leptospira*, *Rickettsi*... rarement diagnostiqués parce que sans doute peu recherchés et mal détectés.

Au travers de ces quelques exemples, nous voyons que la biologie moléculaire a un rôle certain à jouer dans l'identification bactérienne. Elle permet de raccourcir les délais, d'augmenter la sensibilité pour certains germes difficilement cultivables ou de détecter des microorganismes non cultivables. La diversité microbienne se dévoile ainsi bien davantage...

3. Biologie moléculaire et détection de gènes de résistance aux antibiotiques

Un des problèmes majeur et grandissant de la bactériologie, à l'heure actuelle, est l'émergence de résistances ; une des causes de développement de ces résistances est l'utilisation abusive et non appropriée d'antibiotiques. En effet, les bactéries sont dotées d'une capacité d'adaptation leur permettant de modifier leur patrimoine génétique afin d'assurer leur survie. De plus, les gènes de résistances sont transmissibles de bactérie à bactérie, transmission à la fois horizontale (inter espèce) et verticale (inter genre). Certains de ces gènes, dont la séquence nucléotidique a été déterminée, peuvent, dès lors, être amplifiés par PCR.

La biologie moléculaire pourrait donc donner une information plus précoce et adéquate, limitant ainsi, les prescriptions empiriques réalisées dans certains cas.

a) *S. aureus* et gène *mec a*

En raison des difficultés d'interprétation rencontrées avec les techniques bactériologiques usuelles, pour la détection des souches de staphylocoques résistantes à la méticilline (SAMR), la détection du gène *mecA*, responsable de cette résistance, est devenue la méthode de référence à laquelle on compare les techniques de détection de la méticillino-résistance chez les staphylocoques. Cette méthode permet également, la mise en évidence des souches possédant le gène, mais ne l'exprimant que de façon hétérogène, qu'après induction par une bêta-lactamine. De plus, les souches dites « borderline » paraissant « intermédiaires » sur l'antibiogramme par diffusion et pourtant accessibles au traitement in vivo par l'oxacilline, sont correctement dépistées *mecA* négatives.

La détection du gène *mecA* par PCR, applicable dans tout laboratoire équipé pour la biologie moléculaire, permet un gain notable en termes de sensibilité et de spécificité par rapport aux méthodes phénotypiques. Quant aux techniques d'hybridation moléculaire, elles tombent en désuétude à l'heure actuelle en raison de leur moins bonne sensibilité ; toutefois, des méthodes dites « ADN branché » (bDNA), en cours d'évaluation, pourraient être prometteuses puisqu'elles présentent les mêmes sensibilités et spécificités que la PCR [48].

Cette détection moléculaire est la seule application routinière, dans de nombreux laboratoires hospitaliers, de l'utilisation de la biologie moléculaire pour la mise en évidence de gènes de résistance. Elle est pratiquement toujours réalisée, à partir de colonies de staphylocoque doré obtenues par culture. Elle pourrait, cependant, être pratiquée directement à partir de certains prélèvements, comme par exemple les hémocultures [49].

Enfin, il convient d'insister sur l'intérêt qu'il peut y avoir à détecter rapidement la méticillino-résistance chez *S.aureus*, puisqu'on peut, dans ce cas, mettre en place immédiatement les mesures destinées à éviter la dissémination des SAMR et adapter correctement le traitement antibiotique. Les méthodes génotypiques ont l'avantage de cette rapidité [17].

b) *M. tuberculosis* et gène *rpoB/pnca*

Il a été vu précédemment que le problème majeur de la détection des mycobactéries et de la réalisation d'un antibiogramme était dû à une croissance très lente de ces germes. La révolution moléculaire a eu un impact important tant sur le diagnostic de ces infections que sur la compréhension des mécanismes de résistance.

Le contrôle de la tuberculose est menacé par la propagation des souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antibiotiques. Ainsi, la biologie moléculaire a pu déterminer les bases moléculaires de la résistance à la rifampicine, un des antituberculeux majeurs ; elle implique une altération de l'ARN polymérase codée par le gène *rpoB*.

Des mutations ponctuelles dans ce gène *rpoB* entraînant une résistance de haut niveau à la rifampicine chez *M. tuberculosis* ou chez *M. leprae* peuvent aujourd'hui être détectées par amplification génique [50]. De même, la résistance au pyrazinamide peut être détectée grâce à la mise en évidence de mutations dans le gène *pnca*. Malgré les progrès obtenus ces dernières années, il est évident qu'il existe encore chez *M. tuberculosis* des mécanismes de résistance qui ne sont pas connus à ce jour.

Sur ces bases génétiques, de nombreuses méthodes ont été développées, certaines applicables à la détection de la résistance à un antibiotique et déterminées par le choix des amorces pour l'amplification du ou des gènes cibles. Les méthodes de détection de la résistance les plus prometteuses sont celles utilisant l'amplification génique malgré des systèmes d'analyse de l'amplificat délicats et parfois fastidieux. La détection de bacilles résistants, par les méthodes d'amplification, dans des produits pathologiques est réalisable. La concentration initiale de bacilles doit être importante pour réaliser l'amplification des gènes cibles [51].

Cette approche technique est particulièrement intéressante puisqu'elle permet, avec un matériel bactérien minimal de rendre des résultats en 2 ou 3 jours, et de guider le choix du traitement antituberculeux.

c) Entérobactéries et gène *bla*

Le gène *bla* est très répandu dans le monde bactérien et peut être transmis naturellement de bactérie à bactérie à des fréquences élevées. Il peut-être aujourd'hui retrouvé au sein de tous les genres des entérobactéries ainsi que d'autres familles bactériennes telles que les *Haemophilus* ou encore les *Neisseria*. Ce gène code pour une enzyme bêta-lactamase (de type TEM1) qui inactive l'ampicilline.

.....
Notre étude : détection du gène *bla*-TEM1 dans les urines

Dans les infections urinaires, la bactérie en cause au premier rang reste *E. coli* avec 53% de souches résistantes à l'ampicilline, traitement de première intention. Dans la perspective d'une orientation rapide du traitement, nous avons cherché à réaliser un test de détection de la sensibilité aux antibiotiques, directement dans les urines. Nous avons choisi la technique d'amplification génique du gène *bla* de la beta-lactamase de type TEM1. Le protocole « maison » de PCR a été validé sur des souches témoin isolées d'urines *bla+* et *bla-* (souche sensible) et sur des urines stériles.

L'étude a été conduite sur 20 échantillons d'urines pour lesquels l'examen direct montrait la présence de bacilles Gram négatifs ; d'une part, une analyse classique d'uroculture était effectuée, d'autre part la PCR était réalisée directement à partir de l'urine.

Les résultats ont été les suivants :

BIOLOGIE MOLEculaire <i>Bla</i> -TEM1	UROculture/ANTIBIOGRAMME	
		<i>E. coli</i> sensible
PCR -	10	0
PCR +	2	8

Résultats concordants

- dans 10 cas, aucune amplification n'a été détectée et l'analyse classique a bien trouvé à chaque fois une souche d'*E. coli* sensible à l'ampicilline ;
- dans 8 cas, la PCR était positive (présence du fragment génique attendu) et l'uroculture était concordante.

Résultats discordants

Ils ont été mis en évidence dans 2 cas : *E. coli* sensible à l'uroculture et PCR positive. Dans ces 2 cas, nous avons repris l'analyse de l'urine et avons effectué un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques sur gélose directement à partir de l'urine conservée à +4°C. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une double population d'*E. coli*, l'une résistante, l'autre sensible à l'ampicilline.

Le fait que la population résistante était un peu moins abondante permettait de distinguer une double zone autour du disque d'ampicilline : une zone de colonies directement en contact du disque (population résistante) et une zone plus dense à distance du disque (ensemble de la population majoritairement sensible). L'analyse classique consistant à identifier une seule colonie de même morphotype et à réaliser l'antibiogramme sur cette seule colonie, selon le principe d'isolement, néglige la possibilité de diversité dans la population bactérienne. Le résultat de nos observations a été à l'origine d'un changement de méthodologie dans l'analyse des urines au sein de l'UF pédiatrie du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Purpan. Un antibiogramme, adapté au traitement de l'infection urinaire basse et de la pyélonéphrite aiguë en pédiatrie est aujourd'hui réalisé d'emblée sur l'urine dans tous les cas de bactériuries. Cette attitude permet, dès le lendemain, d'avoir une détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries présentes dans l'urine et d'orienter le traitement à la grande satisfaction des cliniciens, même si l'espèce ou les espèces bactérienne(s) restent non précisées.

Il est apparu ainsi qu'il fallait réviser la fréquence des bactériuries pluri microbiennes considérées jusqu'alors comme rares. Les cas de double population de la même espèce ou de population d'espèce de colonies de même morphotype (*E. coli* et *Proteus* par exemple) passaient totalement inaperçues dans l'analyse classique ; de plus, la présence d'entérocoques, souvent en moindre quantité que les entérobactéries était la plupart du temps négligée, alors que leur rôle dans l'infection et le retard de la guérison lors d'un traitement inadapté est reconnu.

Certains auteurs ont recommandé d'analyser plusieurs colonies afin d'avoir une analyse plus juste dans le cas de bactériuries. Notre pratique a montré que, statistiquement, la chance de réduire

l'erreur est proche de zéro en procédant de cette façon. L'expérience a été réalisée à partir d'urines où existait une double population d'*E. coli*; les trois colonies étudiées dans chaque échantillon se sont avérées être sensibles...

Notre méthodologie nous semble donc être la plus performante à moindre coût à ce jour.

.....

La biologie moléculaire, ayant permis de découvrir cette faille dans l'analyse classique, demeure donc un moyen très efficace de recherche de gènes de résistance directement dans les prélèvements ; en effet, comme il a été démontré précédemment, si morphologiquement les souches sont identiques, leur génome ne l'est pas forcément... C'est pourquoi, l'intérêt d'une recherche directe dans les prélèvements, des gènes de résistance et avant même de connaître l'identité bactériologique, est évident et permet d'apporter une réponse plus fiable et plus rapide au clinicien.

4. Biologie moléculaire et virulence bactérienne

a) *E. coli* entérovirulents

E. coli représente l'espèce quantitativement la plus importante de la flore aéro-anaérobie du tube digestif humain, où elle y entretient des relations saprophytiques avec l'hôte. Cependant, certains clones ne s'inscrivent pas dans cette relation et peuvent être à l'origine d'infections intestinales de symptomatologies variées.

Ainsi, les *Escherichia coli* entéropathogènes ou EPEC furent isolés de selles d'enfants diarrhéiques dans les années 1940-1950 et leur pouvoir pathogène fut suspecté devant l'absence d'isolement de tout autre agent entéropathogène connu.

Les *Escherichia coli* entérotoxinogènes ou ETEC furent mis en évidence chez des soldats américains présentant une diarrhée cholériforme lors de la guerre du Vietnam.

Dans les années 1970, Dupont décrit certaines souches capables de causer un syndrome dysentérique semblable aux shigelloses : les *Escherichia coli* entéroinvasifs ou EIEC.

Un quatrième type, les *Escherichia coli* entérohémorragiques ou EHEC, fut découvert, dans les années 1980, lors d'épidémies de colites hémorragiques aux Etats-Unis et au Canada.

Les *Escherichia coli* entéroagrégatifs ont été décrit pour la première fois en 1987 chez des enfants chiliens présentant des diarrhées aqueuses persistantes de plus de 14 jours.

Les *Escherichia coli* à adhésion diffuse ou DAEC ont récemment été associés à des diarrhées aqueuses aiguës ou persistantes dans une population pédiatrique où la tranche d'âge des 4-5 ans semble être la plus sensible.

Enfin, de nouveaux pathotypes ont été récemment décrits sur la base de l'identification de cytotoxines :

- les *E. coli* producteurs de facteurs cytonécrotiques ou CNF, isolés dans les infections extra-intestinales chez l'homme,
- les *E. coli* producteurs de cytotoxines létales par distension cellulaire ou CLDT,
- les *E. coli* producteurs d'hémolysine et capables d'induire des symptômes diarrhéiques chez le lapin.

A côté des *E. coli* pathogènes intestinaux, on distingue les pathogènes extra intestinaux : les *E. coli* des bactériémies et des méningites néonatales possédant souvent une capsule K1 de même composition que la capsule des *N. meningitidis* du groupe B et les *E. coli* dits uropathogènes responsables des pyélonéphrites aiguës de l'enfant.

Il existe une classification sérotypique des *Escherichia coli* entérovirulents qui repose sur la combinaison des antigènes flagellaires H et capsulaires K ou B et des antigènes O somatiques ; les antigènes O seuls définissent le sérogroupe. Des tableaux de relation entre sérogroupe et pathotypes sont présents dans les livres de bactériologie.

Les facteurs de virulence des différents pathotypes d' *E. coli* sont de mieux en mieux connus et les gènes impliqués ont été déterminés et séquencés. Ces facteurs de virulence sont représentés par de nombreuses toxines, invasines, adhésines, système de l'aérobactine et capsules comme le polysaccharide capsulaire K1.

La recherche des *E. coli* pathogènes reste très limitée en routine. Les EPEC, les mieux connus, devraient être détectés systématiquement dans les coprocultures diarrhéiques des jeunes enfants, les EHEC devant un tableau d'entérocologie hémorragique ou de syndrome hémolytique et urémique (SHU).

Aujourd'hui, la détermination du sérogroupe est LE moyen utilisé, par les laboratoires, en routine, pour identifier les souches pathogènes et repose sur des techniques rapides d'agglutination. Un coffret permettant la détection des 12 différents sérogroupe (Biorad®) réputés pour correspondre à des EPEC est commercialisé, ainsi que des tests de détection du groupe O157 pour les EHEC.

i. Etudes sur les EPEC et les EHEC

.....
Plusieurs études sur les EPEC et EHEC ont été menées au laboratoire de bactériologie secteur pédiatrique du CHU Toulouse.

Première étude réalisée en 2000 par Marie-Laure Lalanne [52]

L'étude a porté sur 79 souches d' *E.coli* isolées de coprocultures d'enfants et sélectionnées sur la base de leur caractère antigénique, grâce aux réactifs commercialisés, utilisés en routine au laboratoire de bactériologie. Par une « PCR maison », les gènes *eae* de l'intimine et les gènes *stx* des Shigalike toxines ont été recherchés dans ces souches. L'intimine est la protéine essentielle dans la lésion intime d'attachement-effacement créée par les EPEC au niveau des microvillosités du pôle apical de l'entérocyte. Les shigatoxines, également appelées vérotoxines d'*E.coli*, induisent des lésions hémorragiques et des troubles de la coagulation entraînant la thrombocytopénie et l'anémie avec schizocytose caractéristiques du SHU. Les EHEC produisent l'une et/ou l'autre des 2 Shigatoxines (gènes *stx1* et *stx2*) et peuvent posséder le même système d'attachement-effacement à l'entérocyte que les EPEC ; ils sont maintenant dénommés STEC lorsqu'ils sont dépourvus de ce dernier.

L'étude de Marie-Laure Lalanne a montré que 14 souches avaient un génotype *eae+* donc de type EPEC, 4 souches étaient *eae+stx+* donc de type EHEC et 1 souche *stx+* seul de type STEC, alors que 60 souches restaient négatives. Deux enseignements majeurs ont émergés de cette étude. D'une part les souches de séro groupe O157 (6 souches), séro groupe faisant considérer les souches comme automatiquement EHEC, n'étaient pas obligatoirement shigatoxinogènes, sur les 6 étudiées 2 ne possédaient aucun des gènes recherchés. D'autre part les souches de type EHEC et STEC pouvaient appartenir à des « sérogroupes d'EPEC » : 1 souche O111 et une souche O26.

De la même façon, certaines souches non sérotypables se sont révélées porteuses de gènes de virulence.

Cette étude a ainsi révélé la limite de la détermination du sérogroupage dans la mesure où celui-ci n'est pas prédictif du pouvoir pathogène.

Deuxième étude

Nous avons reconduit en 2003 la même étude que celle conduite par ML Lalanne sur 59 souches de « séro groupe EPEC » et 3 souches O157. Nous avons obtenus les résultats suivants : sur les 59

souches sérogroupées EPEC, 8 souches étaient effectivement des EPEC et 3 d'entre elles étaient des EHEC (2 souches O26 et 1 souche O111 possédant à la fois les gènes *eae* et *stx*). Pour les 3 souches O157, 2 seulement possèdent le gène *eae* et aucun gène *stx* n'a été détecté. Ainsi, au total sur 62 souches nous n'avons trouvé que 10 souches EPEC soit seulement 16% de souches virulentes. De plus, comme dans la première étude, il a été détecté des souches EHEC non O157 et des souches O157 ne correspondant pas obligatoirement au pathovar EHEC .

Nous avons donc confirmé les résultats de la première étude.

Troisième étude

En septembre 2004, sur 40 coprocultures d'enfants présentant une gastro-entérite dans lesquelles les tests d'agglutination « séro groupe EPEC » étaient négatifs, il a été effectué, à partir de la boîte de culture des entérobactéries du premier jour, une recherche par PCR des gènes *eae* et *stx*. La détection a été positive dans 15% des cas pour le gène *eae* et 2,5% pour *stx*.

Ces chiffres illustrent l'importance de la défaillance de nos analyses de routine.

.....

On peut donc affirmer que, à l'heure actuelle, la recherche des *E. coli* entérovirulents dans les fécès est déficiente puisque, dans de nombreux cas, ces souches ne se distinguent ni par leurs caractères biochimiques ni par le sérogroupage et que seuls ces caractères sont exploités en routine.

Pourtant, nous disposons d'outils pertinents pour détecter les différents pathotypes d' *E. coli* : par un jeu de PCR multiplex, il serait aisément possible de mettre en évidence des gènes de virulence ainsi que de nouvelles associations de gènes définissant des génotypes particuliers.

.....

*Dans le travail de Sarah Cerdan [53], en 2000-2001, 13 gènes de virulence caractéristiques des 9 pathovars d'*E.coli* ont été recherchés à partir d'un pool de colonies prélevé sur la première boîte de culture de 103 prélèvements de selles, dans le cadre de diagnostic d'infection intestinale. Dans cette série les prévalences des bactéries pathogènes classiques étaient les suivantes : 4% *Salmonella*, 2% *Campylobacter*, 3% *Clostridium difficile* toxinogènes, 0% *Shigella*, alors que dans 22% des cas des *E.coli* portaient différents gènes de virulences avec une prévalence de 2% d'EHEC. Certaines souches

possédaient des associations de gènes non encore décrites dans la littérature, ne permettant pas de les rattacher à un simple pathovar.

*Par la suite, le travail a été étendu à une collection de 300 prélèvements de flore fécale d'enfants hospitalisés en 2001-2002, et des résultats semblables ont été obtenus. Chez 22% des enfants il a été trouvé une souche d'*E.coli* virulente correspondant pour 17% à un pathovar (dont 2% STEC, 1,5% EPEC) et 5% de génotypes complexes. Les pathogènes classiquement recherchés se décomptaient ainsi dans cette série : *Salmonella* 4%, *Campylobacter* 2%, *C.difficile* toxigène 1%, et moins de 1% pour *Shigella*, *Aeromonas* et *Yersinia* réunis. Les 6 souches de EHEC-STECS étaient différentes.

Ces travaux montrent la multiplicité des génotypes de virulence témoin de la diversité génomique des *E.coli* entérovirulents et les limites de la classification actuelle. L'association de plusieurs facteurs de virulence augmente potentiellement l'agressivité des souches et peuvent les rendre responsables de symptomatologies sévères dans lesquelles leur implication n'est pas soupçonnée [54].

*En 2003 il a été mené une étude consacrée plus spécifiquement à deux toxines responsables d'apoptose cellulaire : le facteur cytotoxique nécrosant (CNF) et la toxine cytodistendante (CDT) qui peuvent être produites par des souches d'*Escherichia coli* ne présentant pas de caractères phénotypiques particuliers permettant de les identifier.

Nous avons recherché dans 200 isolats cliniques distincts d' *E. coli*, trouvés en situation pathogène dans différents prélèvements en Pédiatrie, la présence des gènes de ces deux toxines par amplification génique.

La prévalence des gènes *cnf* était de 23,5% (47 souches) contre 10,5% (21 souches) pour les gènes *cdt*, avec 5% des souches (10 souches) possédant les 2 gènes simultanément. Nous avons déterminé pour les 58 souches *cnf*⁺ et /ou *cdt*⁺ ainsi détectées le génotype de virulence comprenant les gènes d'adhésines (*pap*, *sfa*, *afa*), le gène de l'aérobactine et le gène de l'hémolysine *Hly*. Au moins un de ces facteurs de virulence était présent dans 72,4% (42 souches). La moitié des souches possédait 3 ou plus des marqueurs de virulence cherchés. Nous avons dénombré 22 formules génotypiques différentes.

Ce travail a permis de montrer la diversité de l'équipement de virulence des souches d'*E.coli* et la dissémination dans de multiples localisations de souches toxigènes qui mériteraient d'être prises en compte dans l'explication de certaines pathologies.

.....

ii. *les E.coli impliqués dans les infections urinaires*

Les souches d'*E.coli* isolées lors de pyélonéphrites aiguës (PNA) produisent des facteurs de virulence qui contribuent à leur pathogénicité. La présence de six facteurs de virulence, les adhésines, a été recherchée dans cent souches, par Isabelle Eychenne [55], puis dans deux cents souches d'*E.coli* isolées de PNA chez l'enfant, par amplification génique. Les amorces utilisées permettaient d'amplifier les gènes des adhésines fimbriales (*pap* et *sfa*), de deux toxines, l'hémolysine (*hly*) et le facteur cytotoxique nécrosant CNF1 et de l'aerobactine (*aer*). Ces travaux ont montré que beaucoup de souches ne possédaient pas les systèmes d'adhésines classiques recherchés, que dans 48,5% des souches au moins trois gènes étaient présents associés. Les associations trouvées remettaient en cause les schémas établis sur ces souches dites uropathogènes et sur les groupes de gènes dénommés « îlots de pathogénicité » situés sur leurs génomes. En effet la diversité des génotypes d'urowirulence (32 différents) était remarquable.

iii. *Les souches d' E.coli des infections néonatales*

E.coli est l'espèce bactérienne prédominante des infections materno-fœtales. Les souches isolées dans les cas de méningite néonatale sont souvent équipées d'une capsule de type K1. De ce fait, elles sont redoutées et la recherche de cette capsule est prescrite dans les recommandations de l'ANAES. Plus récemment, un facteur d'invasion de l'endothélium des microvaisseaux cérébraux, permettant à la bactérie de se retrouver facilement dans le LCR, a été reconnu dans les souches K1.

.....

Notre étude sur les *E.coli* des nouveaux-nés : a porté sur 100 souches isolées en 2003-2004 chez 100 nouveaux nés (à 1 jour de vie) hospitalisés dans l'unité de pathologie néonatale de l'hôpital des enfants de Toulouse. Les gènes *kps* de la capsule K1 et *ibeA* du facteur d'invasion, ainsi que onze gènes de virulence (toxines, adhésines) ont été recherchés par PCR. La prévalence des souches *kps+*

et *ibeA+* étaient respectivement de 30% et 25%. Le gène *ibeA* n'était pas significativement plus fréquent dans les souches *kps+* que *kps-* (14% versus 11%). Les génotypes de virulence étaient variés : 47 différents dénombrés. Les facteurs de virulence classiquement associés aux *E.coli* uropathogènes étaient retrouvés dans 20% des souches K et non K1. Ce travail nous donne une nouvelle vision sur les *E.coli* pathogènes des nouveaux-nés : de nombreux facteurs de virulence sont plus fréquents que la capsule K1. Une fois de plus la catégorisation des pathotypes d'*E.coli* est prise en défaut.

.....

b) *Providencia alcalifaciens*

C'est un germe, rarement isolé, de la famille des entérobactéries ; le genre *Providencia* comprend actuellement cinq espèces dont la première, décrite chez l'homme, l'espèce type, est *Providencia alcalifaciens*. Deux autres espèces ont, plus tard, été isolées chez l'homme : *P. rettgeri* et *P. stuartii* dans les urines. Enfin, deux espèces de découverte plus récente ont été retrouvées chez l'animal uniquement (selles de pingouins) : il s'agit de *P. rustiganni* (1983) et de *P. heimbachae* (1986).

Ces bactéries du para colon reconnues par Stuart doivent leur nom à la ville de Providence, capitale du Rhodes Island, où ce dernier effectuait ses travaux.

Providencia alcalifaciens, germe peu connu, est classiquement considéré comme un commensal de la flore intestinale. Cependant, quelques études lui confèrent un rôle dans les gastro-entérites humaines sans que son entéropathogénicité ne soit bien établie. Un plasmide de virulence semblerait être impliqué dans la capacité d'invasion cellulaire de la bactérie mais sa présence seule serait insuffisante pour expliquer la diarrhée ; la pathogénicité pourrait donc faire intervenir une toxine. En effet, en 1987, une nouvelle cytotoxine d' *E. coli* avait été mise en évidence par Johnson et Lior qui travaillaient sur des souches, isolées de selles d'enfants, présentant des symptômes diarrhéiques ; cette toxine avait été nommée « Cytolethal Distending Toxin » (CDT) en raison de son activité particulière à provoquer un allongement puis élargissement et apoptose des cellules d'ovaires de hamsters chinois. Ces toxines CDT avaient ensuite été mises en évidence chez d'autres espèces bactériennes appartenant à des genres très variés mais toujours isolées dans des contextes de pathologie diarrhéique.

.....

Une étude réalisée en 2001 par N. Wilhelm et portant initialement sur la « résistance aux antibiotiques et la virulence des *Escherichia coli* de la flore fécale » d'enfants sains et malnutris mauritaniens, a permis de mettre en évidence la présence, dans une selle diarrhéique, d'un gène de toxine *cdt* n'appartenant pas à un *E. coli*. C'est ainsi qu'une souche de *P. alcalifaciens* porteuse du gène de toxine *cdt* a pu être isolée [56]. La même année, une deuxième souche de *P. alcalifaciens* a été isolée au laboratoire dans la flore fécale d'un enfant (15 mois) hospitalisé à l'hôpital des enfants de Toulouse et présentant un tableau de gastro-entérite aiguë. Des cultures de cellules Hep-2 ont été inoculées par des extraits de ces 2 souches ; il a été observé un arrêt de division cellulaire, une condensation des nucléoles et la présence d'éléments apoptotiques, aspects caractéristiques d'un effet cytotoxique avec blocage du cycle cellulaire en phase G2. Le séquençage nucléotidique de ces deux génomes bactériens révèle une homologie avec les gènes *cdt A*, *B* ou *C* des opérons *cdt* (cytodistendant toxin) décrits chez *Escherichia coli* et une homologie plus faible avec l'opéron *cdt* de *Campylobacter jejuni*. L'homologie la plus forte concerne le cadre *cdt B* : elle est de 88% avec celui d'*E.coli* et de 53% avec celui de *C.jejuni*.

.....

L'ensemble de ces résultats suggère que les gènes identifiés constituent le support moléculaire de l'effet cytotoxique et de la virulence de la bactérie.

Ainsi, sans l'accès aux informations moléculaires, l'analyse bactériologique classique aurait occulté la présence de *P. alcalifaciens*, considéré comme commensal, au profit de la recherche de germes mieux connus pour leur virulence; au final, la conclusion de ces coprologies aurait été « absence de germes pathogènes et présence d'une flore commensale »...

c) *Vibrio cholerae*

La détection par PCR du gène *ctxA* codant pour la sous-unité A de la toxine cholérique a été utilisée pour différencier les souches toxigènes des souches non toxigènes [57].

d) *Clostridium difficile*

Différents tests PCR, permettant la mise en évidence des gènes de toxines A et/ou B (*tcdA* et *tcdB*) de *C.difficile* dans les selles, ont donné des résultats prometteurs et intéressants [58] [59].

e) *Staphylocoques*

Dans les infections sévères à staphylocoques dorés, il importe de connaître le statut de virulence de la souche isolée pour expliquer les manifestations cliniques. En effet les souches de *S. aureus* peuvent produire de puissantes toxines. La biologie moléculaire permet la recherche des gènes en cause dans la production : de la toxine TSST-1 responsable du choc staphylococcique [60], des exfoliatines A et B [61], des entérotoxines [62] et la leucocidine de Panton-Valentine, responsable de pneumonie nécrosante foudroyante. Le centre de référence des Staphylocoques assure la détection des gènes de virulence.

5. Difficultés de la mise en place des techniques de biologie moléculaire

L'ensemble des applications précédemment décrites de la PCR dans le domaine de la bactériologie médicale semble suggérer que cette technique, de par sa simplicité, sa sensibilité et sa rapidité constitue une technique de choix. En fait, cette notion doit être extrêmement nuancée, surtout si elle est utilisée en routine dans un but diagnostique car, en matière d'amplification génique, et plus particulièrement dans le cadre diagnostique, la reproductibilité et la fiabilité des résultats sont indispensables.

Certains avantages de la PCR, et notamment celui concernant la sensibilité, peuvent paradoxalement constituer des désavantages en permettant de rendre des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. La cause majeure des faux positifs est la contamination des réactifs et/ou des prélèvements par de l'ADN étranger ayant les séquences recherchées. Cet ADN contaminant peut provenir d'un autre prélèvement ou de produits d'une précédente amplification. Il est donc nécessaire de respecter scrupuleusement des règles draconiennes lors du traitement des échantillons afin que ceux-ci ne soient pas contaminés. Il y a également nécessité de disposer de locaux séparés et adaptés afin de réduire ces risques.

L'existence de faux négatifs, c'est-à-dire l'impossibilité d'amplifier la séquence recherchée dans un échantillon contenant le pathogène, est le plus souvent liée à la présence d'inhibiteurs (hémoglobine, sels, phénol, détergents). Ceci implique l'impossibilité actuelle de travailler sur certains types de produits pathologiques.

De plus, les techniques de biologie moléculaire sont, incontestablement, plus coûteuses et techniquement plus lourdes que celles de bactériologie classique ; elles nécessitent un appareillage onéreux (thermocycleur, séquenceur, four d'hybridation, cuves d'électrophorèse, système d'acquisition vidéo, automates) et du personnel qualifié. Les réactifs sont également très coûteux (enzymes de restriction, gel d'agarose, Taq polymerase, amorces...).

En outre, un accès aux banques de données informatiques de séquences d'ADN et d'ARN ainsi que des logiciels adaptés sont indispensables.

A l'heure actuelle, finalement peu de « trousse » prêtes à l'emploi pour la détection des microorganismes par ce type de technique sont commercialisées, compte tenu de la potentialité de la méthode, et leur utilisation fait appel à des mises au point dites « maison ». Par conséquent, le choix des sondes oligonucléotidiques constitue une étape primordiale qui nécessite une bonne maîtrise des méthodes d'analyse des séquences. Cependant, l'utilisation de ces PCR « maison » permet une économie budgétaire importante.

Toutes ces contraintes font que, pour certains biologistes, ce type de biologie demeure encore totalement ésotérique. Cependant, les efforts considérables effectués par les fabricants dans le sens de la simplification, de l'automatisation de « trousse » diagnostic devraient permettre, dans un futur plus ou moins proche, leur diffusion en routine dans la plupart des laboratoires.

6. Avantages et perspectives de la technique

Les avantages ont été largement exposés au cours du chapitre et, outre l'accès aux germes difficiles et la réduction du délai de diagnostic, la biologie moléculaire permet d'avoir accès à des informations précises concernant la virulence et la réponse aux antibiotiques des bactéries. De plus, à la différence des prélèvements destinés à la mise en culture, la viabilité de l'agent recherché n'est plus nécessaire ; les prélèvements peuvent ainsi tolérer un délai plus important et être conservés plus longtemps avant d'être techniques (quelques à +4°C au lieu de quelques heures). Un traitement antibiotique récent n'est plus, par cette méthode, une contre-indication. Ces techniques de biologie moléculaire offrent des sensibilité et spécificité remarquables, associées à une rapidité des résultats, notamment pour la PCR en temps réel, évolution des procédés classiques.

Alors que les tests de PCR « classique » requièrent au moins trois voire quatre étapes distinctes, la PCR en temps réel permet une détection spécifique et immédiate de l'amplicon et ce en des temps variant, en fonction des appareils, entre 30 et 120 minutes.

Si les deux techniques possèdent des performances qualitatives identiques, la PCR en temps réel présente l'avantage de pouvoir quantifier la cible détectée dans l'échantillon biologique. En effet, le temps de détection du signal est directement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans le mélange réactionnel. Cette possibilité de quantification est à la base des techniques développées en virologie qui permettent la détection des charges virales.

En terme d'assurance qualité, cette nouvelle technique offre d'énormes avantages, les systèmes de PCR en temps réel étant des systèmes « fermés », ce qui limite les risques de contamination contrairement aux méthodes classiques qui sont des systèmes « ouverts » et nécessitent de multiples manipulations.

Enfin, en terme de coût, le prix des automates reste plus élevé que celui des thermocycleurs standard ; il en est de même du prix des consommables. Cependant, globalement, elles permettent de réduire les coûts en temps de main d'œuvre et de matériel nécessaire à l'étape de détection. Le surcoût calculé, qui tient compte de l'ensemble de ces données a été estimé entre deux et trois euros par réaction [63].

La mise en pratique quotidienne de la biologie moléculaire dans le diagnostic bactériologique sera une révolution culturelle dans les laboratoires de microbiologie, alors que du point de vue des cliniciens, elle apportera une amélioration de la qualité des soins par la rapidité du rendu des résultats.

D. LES PUCES A ADN

La biologie médicale est au début d'une réelle révolution grâce à l'apport de nouveaux développements technologiques, en particulier grâce à l'apparition des biopuces, qui vont de pair avec une utilisation croissante de la robotique et de l'informatique au sein des laboratoires de biologie médicale.

La technologie des biopuces, encore appelées puces à ADN (DNA microarray en anglais), est une profonde révolution qui, dépassant de loin l'effet de mode, s'inscrit plutôt comme une conséquence de la maturation d'une discipline scientifique. En effet, cette technologie, associée à une compréhension sans cesse accrue du génome, est indispensable pour permettre aux biologistes de travailler avec des milliers de données génétiques. Elle permet également d'accroître le débit des analyses de plusieurs ordres de grandeur.

1. Qu'est ce qu'une biopuce ?

Le concept de biopuce date du début des années 1990. Les puces à ADN sont des microsystèmes faisant appel à un ensemble de techniques relevant de la biologie moléculaire, la microélectronique, la chimie, l'analyse d'images et la bioinformatique. Cet outil vise à analyser un nombre considérable de séquences contenues dans un échantillon biologique (sang, biopsie, mais aussi eau, aliments, etc.).

Le principe de fonctionnement de ces puces repose sur un fondement de la biologie moléculaire: l'appariement des bases de deux séquences d'ADN.

Les puces à ADN sont constituées d'un support de petite taille (de quelques centimètres carrés) en plastique, en verre ou en silicium, sur lequel sont synthétisées ou greffées des milliers de sondes (brins synthétiques) selon différentes techniques. Les bases qui composent ces sondes oligonucléotidiques ont été synthétisées directement sur le verre (synthèse in situ) selon une technique issue de la microélectronique qui s'apparente à celle de la gravure. Cette technique repose sur la protection ou l'exposition à la lumière, par un jeu de pochoirs, de zones définies de la puce, afin d'activer les groupements chimiques photosensibles désirés (c'est-à-dire les empilements de bases A, T, C, G, dans l'ordre choisi). Par conséquent, l'emplacement des différentes sondes sur la puce et l'enchaînement des bases qui les composent sont très précisément connus.

2. La réaction

Lors d'une analyse, on cherche à détecter des fragments de matériel génétique (ADN ou ARN cibles) contenus dans un échantillon biologique. L'ADN à analyser peut être celui des cellules d'un patient ou bien celui d'un microorganisme infectieux.

On va d'abord procéder à la copie en de multiples exemplaires des séquences génétiques recherchées dans cet échantillon. Ce processus d'amplification est nécessaire pour pouvoir disposer du matériel génétique en quantité suffisante en vue de sa détection ultérieure par la puce. Une fois amplifié, l'ADN est marqué par fluorescence.

Il peut alors être déposé sur la puce. La présence de l'ADN cible dans l'échantillon est révélée par son hybridation avec la sonde qui lui est complémentaire sur la puce.

Il s'agit ensuite, en mesurant la fluorescence, de repérer les sondes qui ont effectivement réagi avec l'ADN marqué contenu dans l'échantillon testé. La lecture de la puce nécessite des méthodes optiques sophistiquées (balayage laser, caméra, etc.), couplées à un traitement informatique de l'image.

Ces puces ont de nombreuses applications potentielles dans le domaine de la santé : étude du niveau d'expression d'un gène, caractérisation de remaniements chromosomiques, détection de nouvelles mutations, caractérisation de polymorphismes....

3. Diverses applications en développement :

a) Une puce à ADN pour mieux contrôler la qualité de l'eau potable

La Lyonnaise des Eaux et BioMérieux ont décidé d'unir leurs compétences pour mettre au point, dans le cadre d'un programme de recherche commun, une nouvelle technique d'analyse de l'eau potable qui utilisera une puce à ADN. Plus précis, plus rapide et moins coûteux que les techniques actuelles, ce nouveau procédé apportera aux consommateurs une garantie renforcée en matière de contrôle de la qualité de l'eau.

La puce à ADN permettra d'identifier de manière précise tout microorganisme recherché dans l'eau en le reconnaissant à travers son empreinte génétique. De surcroît, la puce à ADN devrait permettre de détecter des concentrations plus faibles que celle détectées par les techniques actuelles. Elle offre ainsi la possibilité de surveiller la qualité de l'eau au-delà de ce que la réglementation actuelle impose.

b) Une nouvelle approche pour le génotypage des mycobactéries

Alain Troesch et coll. [64] ont démontré pour la première fois qu'il était possible, grâce à une puce à ADN à haute densité (GeneChip®), de typer génétiquement (génotypage) toutes les espèces de mycobactéries d'intérêt clinique, incluant les espèces du complexe de *M. tuberculosis*, et les mycobactéries atypiques.

i. Identifier les espèces et déterminer leur profil de résistance

Dans les travaux qu'ils rapportent, Troesch et coll. sont parvenus, en utilisant une même puce à ADN, GeneChip®, à répondre simultanément à deux questions du diagnostic biologique des infections à mycobactéries : l'identification de l'espèce, et son profil de résistance à la rifampicine (l'antibiotique de référence de la trithérapie recommandée en première intention pour le traitement de la tuberculose). Dans le contexte de l'émergence de souches multirésistantes, les réponses à ces questions sont devenues cruciales pour la mise en oeuvre immédiate d'un traitement adapté.

L'identification des espèces de mycobactéries repose sur le génotypage d'une région du génome bactérien présentant un fort polymorphisme, la région de l'ARN ribosomal 16S. Cette région, utilisée dans plusieurs tests de diagnostic moléculaire déjà commercialisés, est considérée comme "l'étalon or" de la spécificité d'espèces pour les mycobactéries, et son analyse permet d'en retrouver la signature.

Une approche similaire permet de définir le profil de résistance à la rifampicine des espèces du complexe *M. tuberculosis*. On sait en effet, que dans 90 % des cas, cette résistance est conférée par des mutations très localisées, situées dans la région du gène codant pour une ARN-polymérase bactérienne, le gène *rpoB*.

Troesch et coll. ont amplifié ces deux régions à partir d'isolats référencés de mycobactéries. Les produits d'amplification ont ensuite été marqués par fluorescence, puis hybridés à des sondes oligonucléotidiques spécifiques de l'une ou l'autre de ces régions présentées à la surface de la puce GeneChip®. Ces sondes, que les auteurs ont disposées sur la puce suivant une répartition ordonnée, sont identifiées d'après leur position.

Une fiabilité de 100 % pour chacune des réponses cherchées a été obtenue par cette approche méthodologique. Soixante-dix souches représentant 27 espèces de mycobactéries d'intérêt clinique, ont été testées. Les séquences de toutes ces espèces ont été correctement identifiées. Par ailleurs, parmi les souches de *M. tuberculosis* testées, les 15 souches résistantes à la

rifampicine ont été reconnues comme telles. L'étude confirme également le pouvoir hautement résolutif du GeneChip®. Les résistances liées à des mutations ponctuelles (n'impliquant qu'un seul nucléotide) ont été détectées, aussi bien que celles impliquant un nombre plus élevé de nucléotides.

ii. Plusieurs réponses en une seule puce

L'approche traditionnelle du diagnostic d'infection à mycobactérie (examen microscopique puis culture et identification) qui était jusqu'à récemment, la seule méthode disponible, comporte l'inconvénient majeur de nécessiter un délai de 3 à 4 semaines afin d'obtenir un résultat. Elle est, de ce fait, peu à peu supplantée par les méthodes moléculaires qui consistent à identifier les mycobactéries par génotypage. Produisant un résultat en 4 ou 5 heures, ces tests autorisent une réduction considérable du délai de mise en oeuvre d'un traitement adapté et d'isolement éventuel du patient. Ils peuvent être réalisés directement à partir de l'échantillon biologique dans les cas où l'examen microscopique est positif (quantité suffisante de bactéries dans l'échantillon). Quand cet examen est négatif, les méthodes génotypiques nécessitent, au préalable, de réaliser une amplification par culture du matériel biologique ou une amplification enzymatique du matériel génétique.

La technique de GeneChip® ne se contente pas d'accélérer le diagnostic. Elle apporte deux avantages supplémentaires au regard des autres techniques moléculaires : son pouvoir résolutif et le traitement en parallèle de plusieurs questions diagnostiques. Son pouvoir hautement résolutif permet de distinguer un bien plus grand nombre d'espèces de mycobactéries pathogènes chez l'homme, contrairement aux autres tests moléculaires, qui n'identifient que les plus fréquentes. Or, l'émergence de mycobactéries atypiques responsables d'infections opportunistes rend nécessaire l'identification précise de chaque espèce. Elle permettra non seulement d'améliorer la prise en charge thérapeutique de ces infections, mais aussi d'améliorer la connaissance épidémiologique des mycobactéries atypiques, et en particulier leur répartition dans l'environnement.

Grâce aux possibilités offertes par la puce, il est envisageable de multiplier les réponses diagnostiques. En particulier, il est prévu d'intégrer sur la puce, des marqueurs de la résistance à d'autres antibiotiques, dont les bases moléculaires se précisent peu à peu.

Ainsi, la résistance à l'isoniazide a été récemment associée à des mutations dans les gènes de la catalase-peroxidase (*KatG*), dans les promoteurs des gènes *inhA* et *ahpC*, et dans le gène de

la protéine kas A. De même, la résistance à la pyrazinamide semble associée à des mutations du gène *pncA* et, la résistance à l'éthambutol, au gène *emb*.

Les résultats de Troesch et coll. marquent une étape importante dans la réalisation des objectifs que se sont fixés Affymetrix, Inc. et BioMérieux aux termes de leur accord de collaboration.

Cet accord signé le 21 octobre 1996 et élargi le 21 janvier 1998 prévoit le développement de tests de diagnostic fondés sur la technique du GeneChip® développée par Affymetrix, Inc.

Il devrait aboutir à la commercialisation par Biomérieux d'un système de diagnostic complètement automatisé. Le principal domaine ciblé est la bactériologie infectieuse qui fait l'objet d'un accord exclusif. Deux autres domaines sont également concernés, le génotypage des souches du VIH résistantes aux thérapies antirétrovirales, et celui des agents microbiens de contamination dans le domaine alimentaire et cosmétique.

A long terme, ces réactifs devraient faire partie d'un système complètement automatisé de diagnostic des maladies infectieuses, intégrant toutes les étapes de la procédure, depuis la préparation de l'échantillon jusqu'au rendu des résultats. Le projet prévoit également l'extension du menu à d'autres marqueurs, de telle sorte que, face à une situation pathologique donnée (infections respiratoires, infections génitales, etc.), un seul test GeneChip® suffise pour identifier l'agent pathogène en cause (bactérie, virus, levure ou parasite), à la fois en terme d'espèce et en terme de résistance aux traitements.

**COMMENT CONCILIER BACTERIOLOGIE
« ANCESTRALE » ET BACTERIOLOGIE MODERNE ?**

**QUEL AVENIR POUR LA BACTERIOLOGIE DE
DEMAIN ?**

COMMENT CONCILIER BACTERIOLOGIE « ANCESTRALE » ET BACTERIOLOGIE MODERNE ? QUEL AVENIR POUR LA BACTERIOLOGIE DE DEMAIN ?

Au terme de cette revue des approches innovantes trouvées dans la littérature, des études réalisées antérieurement dans le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Purpan, de nos propres travaux expérimentaux et des idées reçues concernant l'analyse bactériologique, notre opinion se trouve confortée. Nous pouvons soutenir l'idée de la dénonciation de l'insuffisance de l'analyse bactériologique aujourd'hui.

Les pionniers de la microbiologie ont inculqué certains postulats qu'il convient de remettre en question aujourd'hui.

Ainsi, les règles

- UN malade ⇔ UNE maladie,
- UNE infection ⇔ UNE bactérie,
- UNE espèce bactérienne ⇔ UN clone, UN antibiotype,

sont totalement désuètes aujourd'hui. Une nouvelle notion commence à poindre dans l'esprit des scientifiques ; au-delà du dogme, une infection ⇔ une bactérie, c'est maintenant l'hypothèse une infection ⇔ un microorganisme qui est remise en question et l'on s'oriente vers des concepts polymicrobiens des maladies où bactéries, virus, parasites et même champignons coexisteraient fréquemment pour déclencher une pathologie [65].

La pratique actuelle de la bactériologie possède de nombreuses limites en terme de rapidité et de sensibilité et ignore totalement l'étude génotypique des bactéries.

Nos observations ont montré la réalité de plusieurs concepts : pluralité, diversité, inégalité de virulence, méconnaissance de pathogène. La pluralité bactérienne dans certaines suppurations a été décrite, en dehors du cadre des surinfections nosocomiales, dans les conjonctivites suppurantes de l'enfant par exemple avec la fréquence de la triple association *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Branhamella catarrhalis* [66]. Toutes nos études présentées ici par exemple chez les prématurés, sur les hémocultures positives à staphylocoques ou sur les urines témoignent de la possibilité de co-infection. L'immense diversité bactérienne a été illustrée par les différents travaux sur les *E.coli* ; déjà, la variété phénotypique au sein d'une même espèce est un constat de tous les jours pour le

bactériologiste puisque l'identification bactérienne repose sur un ensemble de caractères avec la notion de continuum dans le passage d'une espèce à l'autre et la possibilité de bactéries hybrides pratiquement inclassables. Les échanges génétiques sont nombreux et les acquisitions de gènes par transfert horizontaux sont de plus en plus reconnus que ce soit un seul gène ou un groupe de gènes formant un îlot de pathogénicité. La production de nombreuses toxines résulte de l'infection de bactéries par un bactériophage : c'est le cas de la toxine diphtérique, de la toxine érythrogyène du *Streptococcus pyogenes* du groupe A ou des Shiga-toxines des *E.coli*. L'acquisition de gènes de résistances se fait aussi à partir des génomes des espèces saprophytes des flores commensales par transformation (c'est le cas des pneumocoques à partir des *Streptococcus viridans* et des *Neisseria* pathogènes à partir des espèces commensales [67]) ou par conjugaison (cas de toutes les entérobactéries cohabitant dans la flore intestinale). Ne pas intégrer ce concept de diversité dans l'analyse bactériologique conduit obligatoirement à une interprétation erronée de l'analyse.

E.coli O157 constitue un exemple récent remarquable : cette bactérie a été reconnue responsable d'épidémies d'entérocrites hémorragiques aux USA où elle sévit à l'état endémique puisque la contamination d'origine alimentaire provient le plus souvent de la viande de bœuf hachée. D'autres épidémies à travers le monde ont été rattachées à *E.coli* O157. En raison de la gravité de la symptomatologie, la recherche de *E.coli* O157 sur la base de son identification antigénique est actuellement recommandée. Nous avons apporté les arguments expérimentaux de l'absence de corrélation entre sérotype et pathotype, des erreurs par excès et surtout par défaut de la détermination limitée au sérotype.

Le domaine médical évolue rapidement et avec lui l'ensemble des disciplines biologiques se doit de suivre cette progression afin d'apporter une aide diagnostique fiable et efficace. Les cliniciens, tout comme les patients, sont demandeurs d'informations toujours plus précises et rapides auxquelles la bactériologie a souvent du mal à répondre.

La progression de la discipline bactériologique ne pourra se faire sans l'aide des microbiologistes qui, jusqu'à un passé récent se montraient plutôt réticents face à toutes ces nouvelles techniques.

En effet, la bactériologie a toujours été une discipline d'observation et de reconnaissance (par le biais de l'examen direct, de l'observation des colonies sur milieux de culture, de l'observation des diamètres d'inhibition sur les antibiogrammes...) et le passage à des techniques où l'on ne visualise pas la bactérie en elle-même ne rassure pas et a été mal accueilli par bon nombre de bactériologistes.

La méthode d'isolement ou de « culture pure », à la base des techniques bactériologiques classiques, est une méthode de sélection qui biaise les données en limitant l'étude d'une population bactérienne à quelques colonies choisies. Ces techniques sont basées sur des caractères morphologiques et phénotypiques, qui ne prédisposent pas des caractères génétiques des germes. Pourtant, il ne faut pas oublier que les bactéries sont des organismes vivants en perpétuelle mutation. Les études moléculaires ont apporté à la microbiologie (et à toutes les disciplines biologiques) une masse considérable de données qu'il serait dommage de ne pas exploiter aujourd'hui. De plus, les interactions des microorganismes entre eux et dans leur environnement jouent un rôle important dans l'évolution bactérienne et sont totalement occultées par ces techniques classiques. C'est ce qu'avaient compris Winogradsky et Beijerinck, dès la fin du XIX^e siècle, qui, pour détecter de nouveaux pathogènes, n'utilisaient pas la méthode d'isolement prônée par Koch, mais une méthode d'enrichissement des cultures, qui permettait une sélection naturelle de l'espèce que l'on cherchait à déterminer.

De plus, les techniques classiques, de part leur « base phénotypique » ne peuvent prendre en compte, ni les notions de facteurs de virulence, ni celles de transfert horizontal des bactéries.

En ce sens, la biologie moléculaire trouve toute sa place.

Pour constituer un réel progrès par rapport aux méthodes classiques, cette technique se doit d'apporter certains avantages, notamment une simplicité et une rapidité d'exécution pouvant être utile à un diagnostic d'urgence. C'est le cas pour des infections mettant en jeu le pronostic vital où la biologie moléculaire pourrait permettre un diagnostic rapide, entraînant une prise en charge thérapeutique adaptée d'emblée. Cette notion d'urgence est également importante dans l'identification des risques de contagion, où des mesures d'isolement et de renforcement d'hygiène pourraient être plus précoces, limitant ainsi les risques d'infection nosocomiales. Cela concerne également la reconnaissance rapide de portage de bactéries multi-résistantes.

La biologie moléculaire pourrait également être une solution lorsque le diagnostic classique est difficile ou impossible ; par exemple, dans des situations d'infections décapitées par un traitement préalable, puisque cette technique ne nécessite pas de disposer de microorganismes vivants.

Parallèlement à une identification bactérienne précoce, le choix thérapeutique serait aussi amélioré par la connaissance de la sensibilité aux agents anti-infectieux ; cette connaissance orienterait vers des choix thérapeutiques plus spécifiques, visant notamment à choisir des antibiotiques empêchant l'expression des gènes de résistance ou restant actifs s'ils étaient susceptibles de s'exprimer.

Indiscutablement, la biologie moléculaire apporte une amélioration du diagnostic, par rapport aux techniques classiques, dans la mesure où elle permet une étude globale des populations bactériennes. Elle peut permettre d'identifier, au sein d'un produit pathologique, plusieurs espèces différentes, ou dans la même espèce, des bactéries ayant des caractéristiques différentes, notamment vis-à-vis de leur résistance aux antibiotiques, mais qui concourent toutes au même processus infectieux. En effet, certaines bactéries peuvent se présenter de façon différente sur les milieux de cultures, mais qui ne seront pas toujours faciles à identifier (micro colonies translucides pour les *Staphylococcus epidermidis* par exemple) ; ces bactéries peuvent également avoir des antibiogrammes différents, ce qui ne sera pas toujours repéré si l'antibiogramme n'est réalisé qu'à partir d'une seule colonie. Les techniques moléculaires, peuvent, elles, permettre d'alerter les cliniciens sur l'existence d'une infection à germes multiples ou au même germe avec des clones d'antibiogrammes différents.

Les techniques de biologie moléculaire sont conceptuellement très attractives mais supposent un changement d'attitude radical de la part des bactériologistes ; nous pourrions nous prendre à rêver que dans quelques décennies il ne sera plus question de colonies ou d'antibiogrammes mais de gènes spécifiques de genre ou d'espèce, de gènes de virulence ou encore de gènes de résistance aux antibiotiques. Cependant, l'histoire de la discipline pèse encore trop lourd dans l'esprit des bactériologistes et l'abandon complet des techniques classiques est loin d'être accepté. Aujourd'hui, il n'est donc pas envisageable que la biologie moléculaire ne prenne la place, ni ne supplante les techniques classiques de bactériologie mais, au contraire, qu'elle réalise avec celles-ci, un processus fusionnel où chacune des méthodes pourra apporter sa contribution.

Il convient peut-être ici de rappeler la complexité de la bactériologie par rapport à la virologie. La virologie est une discipline récente qui a bénéficié très rapidement des technologies nouvelles, grâce au Sida enjeu d'un dépistage dans les pays industrialisés, et qui s'est construite avec les outils moléculaires en plein développement. La bactériologie comme nous l'avons rappelé dans notre revue historique est encombrée par tout le passé des approches phénotypiques, par la préoccupation de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques ou par la recherche de clonalité. De plus, le nombre de virus impliqués dans les infections humaines reste moindre face à la liste sans cesse croissante d'espèces bactériennes identifiées.

Comment concilier techniques rapides et techniques classiques ?

Parlons d'abord de l'intérêt des cliniciens : si l'on voulait hiérarchiser leurs demandes, c'est d'abord sur les urgences vitales, puis sur les infections ayant une gravité particulière, du fait du

terrain par exemple, que devrait se porter l'effort des microbiologistes. Le second objectif serait l'amélioration du choix thérapeutique, par une approche de la connaissance du ou des agent(s) en cause, mais surtout par des renseignements précis sur leurs mécanismes de résistance. La connaissance de ces informations permettrait d'améliorer de façon certaine la qualité des choix thérapeutiques, surtout chez des patients en réanimation, suspects ou atteints d'infections nosocomiales, surtout s'ils ont déjà reçu des traitements antibiotiques probabilistes non documentés et apparemment en échec, et chez les immunodéprimés.

Le facteur principal de leurs exigences est donc la rapidité du rendu des résultats, lorsque cela est nécessaire. Les microbiologistes pourraient donc, en collaboration avec les cliniciens, distinguer les situations cliniques où une réponse urgente est impérative et celles, au contraire, où une réponse différée est possible, conditionnant ainsi le choix de la technique à mettre en œuvre. L'analyse bactériologique pourrait se décomposer, selon les cas, en deux temps.

Une première étape permettrait une étude ciblée et rapide des produits pathologiques par des techniques adéquates telles que tests rapides antigéniques ou biologie moléculaire ; ce diagnostic précoce permettrait d'incriminer, dans de brefs délais et dans un même temps, des pathogènes attendus ou suspectés selon le contexte clinique, et de donner des informations précises sur leur comportement vis-à-vis des antibiotiques. Cette étape aurait un impact direct et immédiat dans l'intérêt du malade.

La deuxième étape, consisterait en une étude plus globale du prélèvement, grâce en partie, aux techniques classiques de mise en culture. L'observation des colonies bactériennes sur milieux de culture permet, en effet, d'apprécier la diversité et la répartition de la flore microbienne au sein d'un prélèvement et est un point de départ important pour des études moléculaires ultérieures.

De la même façon et sans abandonner les techniques classiques de nos prédécesseurs, il existe des solutions simples et « idéologiquement accessibles » pour améliorer et accélérer le diagnostic bactériologique actuel ; ainsi, nous avons démontré que l'étape préliminaire d'isolement était un handicap pour une analyse réaliste des populations bactériennes au sein d'un échantillon biologique. Il pourrait donc être intéressant de réaliser un antibiogramme directement à partir des prélèvements, en particulier ceux physiologiquement stériles ; ainsi, en 24 heures (au lieu de 48 ou 72 heures), une information précise concernant le traitement antibiotique efficace sur l'ensemble des populations bactériennes pourrait être apportée au clinicien, avant même d'en connaître l'identification précise. C'est ce qui est couramment utilisé dans les protocoles de selles d'enfants aplasiques où l'on cherche à obtenir des fécès stériles.

En résumé, en diagnostic de pratique quotidienne, il est tout à fait envisageable d'imaginer et de préparer un diagnostic à deux vitesses, avec une réponse rapide au clinicien, informative pour le traitement. Voici quelques exemples de champs d'application : 1) bactériurie et sensibilité aux antibiotiques clés, 2) staphylocoques et sensibilité à la méticilline, 3) identification des pathogènes dans les diarrhées, les infections respiratoires avec les bactéries et les virus (*Bordetella* et VRS pour l'enfant), les méningites où se pose le problème de la mise en place des mesures de prophylaxie, les infections ostéo-articulaires dont l'étiologie fait trop souvent défaut... En parallèle la bactériologie classique peut se consacrer à certains examens et prendre le temps d'une analyse à visée exploratrice et plus épidémiologique. Il serait dommage en terme de santé publique que les moyens de diagnostic rapide soient réservés aux enquêtes d'hygiène ou aux alertes de bio terrorisme !!!

L'avenir de la bactériologie est aujourd'hui entre les mains des microbiologistes ; les patients et les cliniciens étant demandeurs de progrès, les scientifiques ayant mis à notre disposition de nouveaux procédés, il revient aux bactériologistes d'explorer les opportunités capables d'améliorer la discipline. Il est indispensable d'accepter des changements de stratégie diagnostique d'une discipline vieille de presque deux siècles et savoir utiliser au mieux les technologies disponibles afin d'accéder à un diagnostic précis.

Il n'est pas question de remettre complètement en cause les préceptes de la discipline mais de savoir s'adapter en fonction du type clinique, du type d'infection, du type de patient ou de prélèvement et des techniques disponibles : chaque diagnostic ne nécessite pas une technologie de pointe !

L'augmentation de la durée de vie humaine, l'impact des traitements antibiotiques sur les résistances bactériennes, le rôle des micro-organismes dans des manoeuvres chirurgicales de plus en plus complexes, le spectre de nouvelles infections opportunistes chez les sujets immunodéprimés sont autant de challenges que le microbiologiste se devra d'assumer. La crédibilité de la profession dépendra de notre capacité à accepter et à aller au devant de ces challenges...

EPILOGUE

« La microbiologie, comme toute science, doit s'efforcer à l'objectivité ; dans la définition de l'espèce bactérienne, seule compte la notion de clone, c'est-à-dire la communauté des individus dérivant d'un même ancêtre et présentant des caractères biochimiques et antigéniques semblables aux siens ; le savant doit classer les germes en genres, familles et ordres, d'après les caractères précédents, appartenant au germe en soi, sans se laisser impressionner par les conditions fort contingentes, dans lesquelles il a pu être amené à les rencontrer : une mare, le liquide céphalo-rachidien d'un enfant ou le mésentère d'une grenouille.

Tout autre est l'optique du médecin ; son but est d'exploiter toutes les connaissances actuelles, égoïstement, en faveur de ses semblables ; son art mérite-t-il le nom de science ? La question a été posée depuis longtemps ; en tout cas, si le nom de science est prononcé, c'est, à coup sûr de science engagée qu'il s'agit, engagée au service de l'homme. »

Robert Fasquelle, professeur de microbiologie de la faculté de Médecine de Paris, 1957

BIBLIOGRAPHIE

1. HURLBERT R.E., *The fundamentals of microbiology.*, in *A brief history of microbiology*. 1999, www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/pages/101hmpg.html.
2. GOTTSCHAL J.C., HARDER W., and PRINS R.A., *Principles of enrichment, isolation, cultivation and preservation of bacteria*. 2000.
3. DE PUYTORAC P., *De la microbiologie à la biologie moléculaire.*, in *Panorama de la biologie d'hier à aujourd'hui*, Ellipses, Editor. 1999. p. 51-79.
4. FRENEY J. and HANSEN W., *Des bactéries et des hommes*. Privat ed. 2002. 142.
5. PRESCOTT L.M., et al., *Historique et domaine de la microbiologie.*, in *Microbiologie.*, D. Boeck, Editor. 2003. p. 1162.
6. CABUT S., *Un gland pas pour la médecine.*, in *Libération*. 2004: Paris.
7. CABUT S., *L'épopée d'un buveur de bactéries.*, in *Libération*. 2004: Paris.
8. WALLACH D., *Les inoculations dans l'histoire des maladies vénériennes*. 2002, <http://www.bium.univ-paris5.fr/sfhd/ecrits/inocul.htm>.
9. SUSSMAN M., *Dr Theodor Escherich (1857-1911): Bacteriologist and Paediatrician*. Culture, 1997. 18(1): p. 5-7.
10. BROCK T.D., *Significant events of the last 125 years.*, in *Milestones in microbiology*, Brock T.D., Editor. 1998, ASM Press. p. 280.
11. DELLAMONICA P., *Apport de la biologie moléculaire au diagnostic des maladies infectieuses. "Les rêves d'un clinicien"*. La lettre de l'infectiologue, 1998. XIII(2): p. 81-84.
12. LUNARDI J., *[Fifty years ago, the double helix gave birth to molecular biology.]*. Ann Biol Clin (Paris), 2003. 61(6): p. 623-33.
13. MOSELEY S.L., et al., *Detection of enterotoxigenic Escherichia coli by DNA colony hybridization*. J Infect Dis, 1980. 142(6): p. 892-8.
14. LARAN JF., *Incidence du gène qacA, codant pour la résistance à certains antiseptiques et désinfectants, recherché par la méthode PCR, chez Staphylococcus aureus, dans le service de Réanimation Infantile des Hôpitaux de Toulouse au cours de l'année 1996*. 1997, Université Paul Sabatier: Toulouse. p. 80.
15. CLAEYS G., VERSCHRAEGEN G., and TEMMERMAN M., *Modified Granada Agar Medium for the detection of group B Streptococcus carriage in pregnant women*. Clin Microbiol Infect, 2001. 7(1): p. 22-4.
16. ROLLAND C., et al., *[Evaluation of the Granada medium used for the determination of Streptococcus agalactiae at the eighth month of pregnancy.]*. Ann Biol Clin (Paris), 2003. 61(6): p. 705-8.
17. SEVIN E., LARMARAUD-SEVIN O., and LEGRAND P., *Approche moléculaire de la résistance à la méticilline de Staphylococcus aureus*. Revue Française des Laboratoires, 1999(315): p. 25-31.
18. FELTEN A., G.B., LAGRANGE PH., CASIN I., *Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test*. J Clin Microbiol, 2002. 40(8): p. 2766-2771.
19. PRERE MF. et al. *Identification of methicillin resistance in coagulase negative staphylococci*. in *8th International symposium on staphylococci and staphylococcal infections*. 1996. Aix-les-Bains.
20. PLOY MC., F.B., MOUNIER M., VIGNON P., DENIS F., *Nasal carriage of Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus among intensive care unit staff*. Clinical Infectious Diseases, 2001. 33: p. 1951.
21. MERLINO J., et al., *New chromogenic identification and detection of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus*. J Clin Microbiol, 2000. 38(6): p. 2378-80.

22. KLUYTMANS J., et al., *Performance of CHROMagar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying Staphylococcus aureus and detecting methicillin resistance.* J Clin Microbiol, 2002. 40(7): p. 2480-2.
23. PRERE MF. et al. *Rambach agar: a very useful plate medium for detection of salmonella.* in *Symposium International Salmonella.* 1992. Ploufragan.
24. DOLEANS A., ISAABRE Y., and FRENEY J., *Les tests rapides en bactériologie.* Annales de Biologie Clinique, 2003. 61(4): p. 379-92.
25. GHANASSIA J. P. and REINERT P., *[How to recognize streptococcal pharyngitis?]*. Arch Pediatr, 1996. 3(8): p. 749-51.
26. COHEN R., et al., *[Utilization of rapid diagnostic tests for group A streptococcus and and bacteriologic and clinical correlations with acute angina in general medicine.]*. Presse Med, 1998. 27(23): p. 1131-4.
27. WEBB K.H., *Does culture confirmation of high-sensitivity rapid streptococcal tests make sense? A medical decision analysis.* Pediatrics, 1998. 101(2): p. E2.
28. SPALINGER J., *Helicobacter pylori en pédiatrie: Comment tester, qui tester, quand tester?* 2002.
29. VAKIL N. and VAIRA D., *Non-invasive tests for the diagnosis of H. pylori infection.* Rev Gastroenterol Disord, 2004. 4(1): p. 1-6.
30. METZ D.C., *Stool testing for Helicobacter pylori infection: yet another noninvasive alternative.* Am J Gastroenterol, 2000. 95(2): p. 546-8.
31. BARBUT F., et al., *Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of Clostridium difficile-associated diseases.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. 19(6): p. 481-4.
32. SMITH M.D., et al., *Rapid diagnosis of bacteremic pneumococcal infections in adults by using the Binax NOW Streptococcus pneumoniae urinary antigen test: a prospective, controlled clinical evaluation.* J Clin Microbiol, 2003. 41(7): p. 2810-3.
33. PEZE C., *Streptococcus pneumoniae: recherche et validation d'un outil génotypique d'identification.*, in TOULOUSE. 2004, Université Paul Sabatier Toulouse III. p. 41.
34. HUBERT B., INFUSO A., and LEDRANS M., eds. *Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionellose. Circulaire DGS n°97/3111.* Bulletin épidémiologique hebdomadaire. Vol. 20-22. 1997.
35. EUZEBY J.P., *Dictionnaire de la bactériologie vétérinaire.* 2002, www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html.
36. LINDSAY D.S., et al., *Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods.* J Med Microbiol, 2004. 53(Pt 3): p. 183-7.
37. HELBIG J. H., et al., *Detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen EIA.* J Med Microbiol, 2001. 50(6): p. 509-16.
38. ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé), *Place des techniques de biologie moléculaire dans l'identification des infections uro-génitales basses à Chlamydia trachomatis.* 2003.
39. BLACK C.M., *Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections.* Clin Microbiol Rev, 1997. 10(1): p. 160-84.
40. STOESSEL P., et al., *Applications et limites des techniques d'amplification génique in vitro en bactériologie médicale en 2000.* Feuillet de Biologie, 2000. XXXI(232): p. 13-21.
41. PRERE MF. et al, *Sondes ADN pour l'identification de N. gonorrhoeae. Diagnostic et pathologie: nouvelles perspectives.* Elsevier, 1988.

42. LIU H., et al., *New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of Treponema pallidum in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene.* J Clin Microbiol, 2001. 39(5): p. 1941-6.
43. PINAR A., et al., *Rapid detection of bacterial atypical pneumonia agents by multiplex PCR.* Cent Eur J Public Health, 2004. 12(1): p. 3-5.
44. GARIN D., et al., *Diagnostic moléculaire en pathologie infectieuse: intérêt d'un diagnostic multiplex dans les pneumopathies atypiques.* Revue Française des Laboratoires, 1999. 315: p. 33-37.
45. POYART C., *Applications de la PCR au diagnostic des infections bactériennes.*, in *La lettre de l'infectiologue.* 1998. p. 59-65.
46. GREISEN K., et al., *PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid.* J Clin Microbiol, 1994. 32(2): p. 335-51.
47. READ S.J., JEFFERY K.J., and BANGHAM C.R., *Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory.* J Clin Microbiol, 1997. 35(3): p. 691-6.
48. KOLBERT C.P., et al., *Branched-DNA assay for detection of the mecA gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci.* J Clin Microbiol, 1998. 36(9): p. 2640-4.
49. ZHENG X., et al., *Direct mecA detection from blood culture bottles by branched-DNA signal amplification.* J Clin Microbiol, 1999. 37(12): p. 4192-3.
50. TELENTI A., et al., *Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis.* Lancet, 1993. 341(8846): p. 647-50.
51. HERRMANN J.L. *Analyse de la résistance de M. tuberculosis aux antibiotiques et épidémiologie moléculaire.* in *17ème colloque en immuno-analyse et biologie spécialisée.* 2000. Poitiers.
52. LALANNE ML., *Evolution de l'identification des Escherichia coli entéropathogènes et entérohémorragiques: du sérotype au pathotype à propos de 79 isolats en pédiatrie.* 2000, Université Victor Segalen: Bordeaux. p. 119.
53. CERDAN S., *De nouveaux génotypes de virulence chez Escherichia coli: recherche de neuf pathovars d'Escherichia coli entéropathogènes par un jeu de cinq multiplex PCR.* 2001, Université Victor Segalen Bordeaux II: Bordeaux. p. 97.
54. PRERE MF., L.P., FAYET O., *Escherichia coli entérovirulents impliqués dans des tableaux abdominaux sévères de l'enfant.*, B.e.v. entéropathogènes, Editor. 2003: Paris.
55. EYCHENNE I., *Diversité des profils de virulence des E. coli uropathogènes (UPEC) dans les pyélonéphrites de l'enfant.*, in *TOULOUSE.* 2000, Université Paul Sabatier Toulouse III. p. 94.
56. WILHELM N., *Mauritanie 2001: résistance aux antibiotiques et virulence des Escherichia coli de la flore fécale infantile. Providencia alcalifaciens: un pathogène méconnu?* 2002, Université Paul Sabatier Toulouse III: Toulouse. p. 118.
57. LEE H.F., et al., *Detection and identification of toxigenic Vibrio cholerae O1 strains by a simplified polymerase chain reaction method.* Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi, 1993. 26(1): p. 6-14.
58. MORELLI M.S., et al., *Clinical application of polymerase chain reaction to diagnose Clostridium difficile in hospitalized patients with diarrhea.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2004. 2(8): p. 669-74.
59. WONGWANICH S., et al., *Detection of Clostridium difficile toxin A and B genes from stool samples of Thai diarrheal patients by polymerase chain reaction technique.* J Med Assoc Thai, 2003. 86(10): p. 970-5.
60. MCLAUCHLIN J., et al., *The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction.* J Food Prot, 2000. 63(4): p. 479-88.

61. JOHNSON W.M., et al., *Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in Staphylococcus aureus by the polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol, 1991. 29(3): p. 426-30.
62. LOVSETH A., LONCAREVIC S., and BERDAL K.G., *Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates.* J Clin Microbiol, 2004. 42(8): p. 3869-72.
63. REGLIER-POUPET H., PROTS L., and POYART C., *La PCR en temps réel: principe et applications en bactériologie médicale.*, in *BioTribune*. 2003. p. 21-24.
64. TROESCH A., et al., *Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays.* J Clin Microbiol, 1999. 37(1): p. 49-55.
65. KIM A., GUTHMILLER B., and GUTHMILLER J.M., *Polymicrobial diseases, a concept whose time has come.* American Society for Bacteriology, 2003. 69(2): p. 69-73.
66. PRERE MF. et al. *Infections à Branhamella catarrhalis associée à H. influenzae et S. pneumoniae en pédiatrie.* in *Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse*. 1990. Paris.
67. PRERE MF. et al, *Neisseriaceae.*, in *L'antibiogramme automatisé*. M. VIGOT, Editor. 1988.

ANNEXES

C. P. Edgeworth
 EXPERIMENTAL *Adelsia*
PHILOSOPHY,

In Three Books : 1902
 1844
 Containing 238 Years

New Experiments } Microscopical,
 } Mercuial,
 } Magnetical.

With some *Deductions*, and Probable *Hypotheses*, raised from them, in Avouchment and Illustration of the now famous *Atomical Hypothesis*.

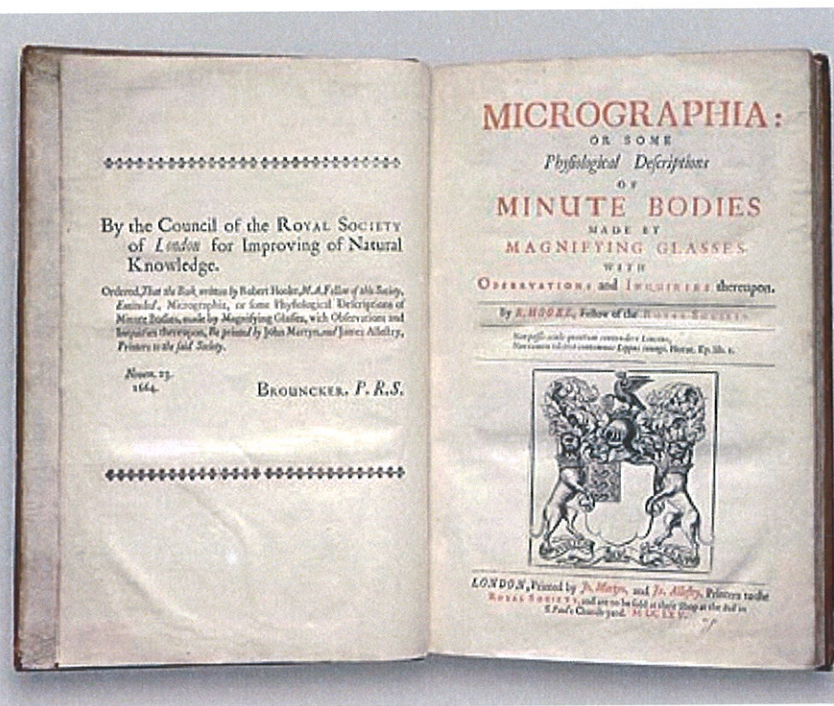
By HENRY POWER, D. of Physick.

Pessicillam (Microscopicam scilicet) si vidisset Democritus, existeret seris & modum vobis hanc Atomum (quam ille invisibilem tantum affirmavit) inventam fuisse jactitasset. Fr. Verulam. lib. 2. Novi Organ. sect. 39.

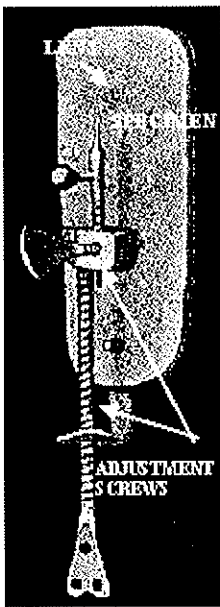
Nonne ipsius scilicet intelligere possemus, quam suavit, quam inanes sunt vestigia humanae sapientiae, quae se ferunt caeca inveniunt, nisi velle ratione, experientiaque (sitentiam omnium magistra) nitatur & opinione salubri occurat vitata. Maffei. De Intellect. cap. 15. pag. 115.

LONDON,

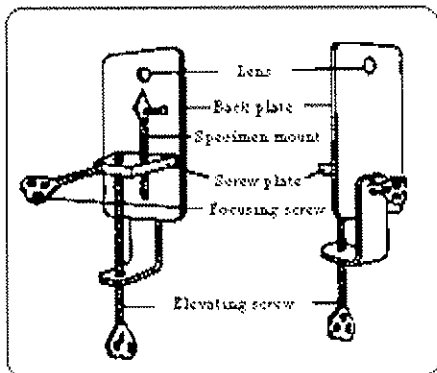
Printed by T. Roycroft, for John Martin, and James Allosry, at the Bell in S. Pauls Church-yard. 1664.



ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1632-1723) tenant un microscope



PREMIER MICROSCOPE MIS AU POINT PAR ANTONIE VAN LEEUWENHOEK



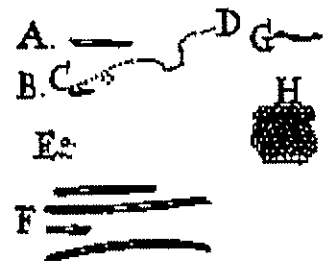
Van Leeuwenhoek's Descriptions of Bacteria

Examples from a letter to the Royal Society dated September 17th, 1683

(A) & (E) represent rod forms with (C) & (D) indicating the pathway of motion.

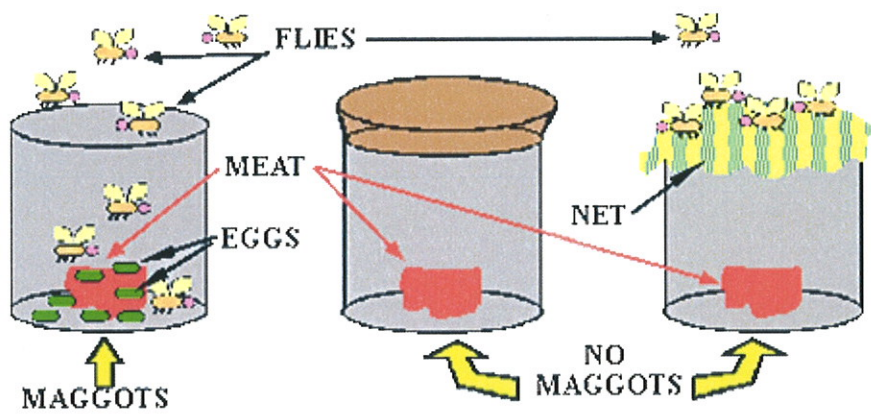
A spherical form is shown in (E) & longer types depicted in (F). The longer type shown in (G) appears to be a spiral form & a cluster of spheres is shown in (H).

Van Leeuwenhoek found many of these organisms between his teeth!



Bactéries provenant de la bouche de Van Leeuwenhoek

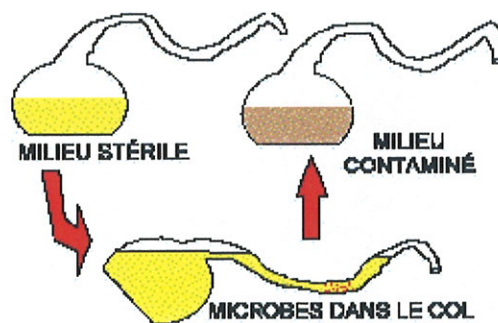
EXPERIENCES DE FRANCESCO REDI (1626-1697)



LOUIS PASTEUR (1822-1895) ET SES FLACONS A COL DE CYGNE



EXPERIENCES DE PASTEUR SUR LA GENERATION SPONTANEE





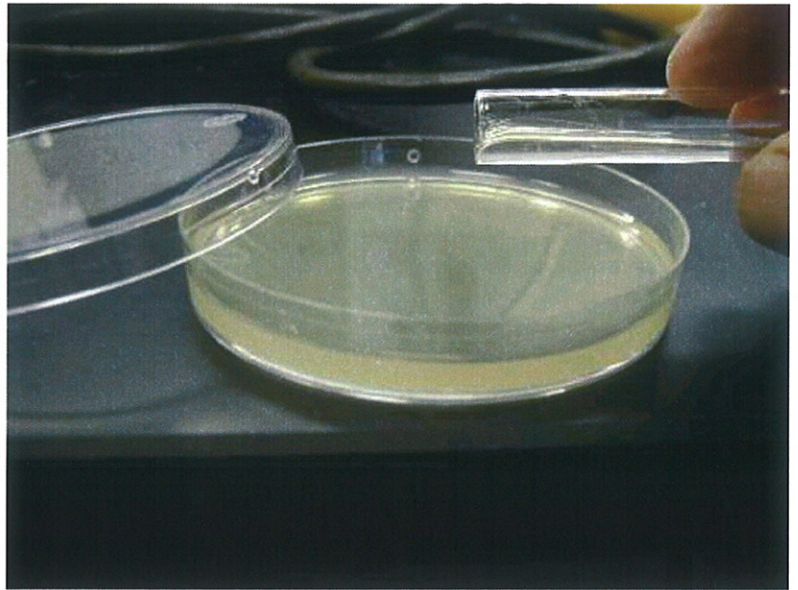
ROBERT KOCH (1843-1910)

JOSEPH LISTER (1827-1912)



IGNATZ SEMMELWEIS (1818-1865)

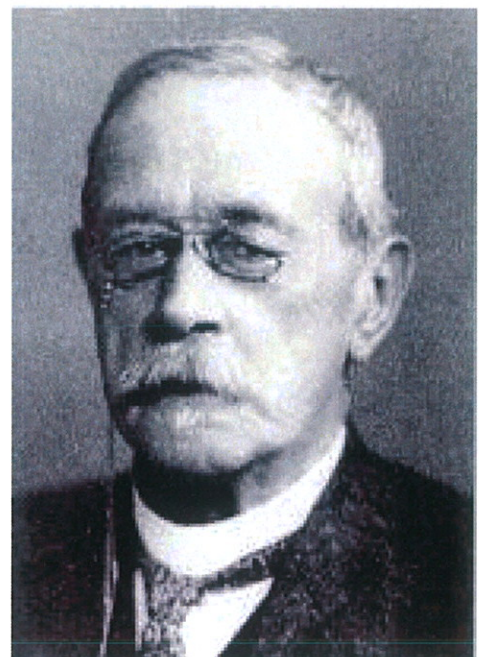
BOITE DITE « DE PETRI »



PAUL EHRLICH (1854-1915)



HANS CHRISTIAN J GRAM
(1853-1928)



THEODOR ESCHERICH.



E. Escherich.

MARTINUS BEIJERINCK (1851-1931)



SERGEI WINOGRADSKY (1856-1953)



ALEXANDER FLEMING

REBECCA LANCEFIELD





OSWALD AVERY
(1877-1955)

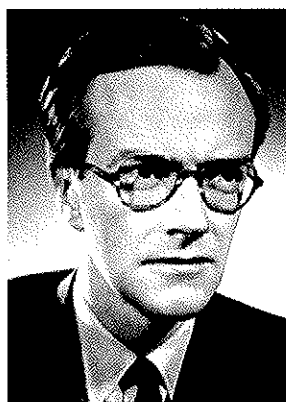
JAMES WATSON
(1928-...)



FRANCIS CRICK
(1916-2004)



MAURICE WILKINS
(1916-...)



ROSALIND FRANKLIN
(1920-1958)

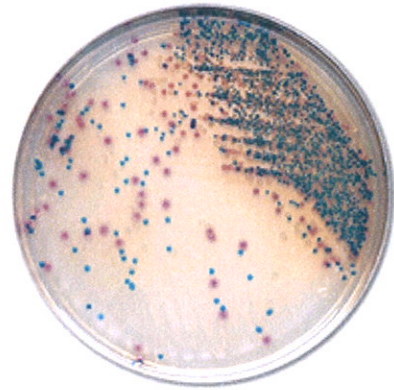


MILIEUX CHROMOGENES



URISELECT 4®

CHROMAGAR ORIENTATION®



CHROMAGAR STAPH AUREUS®

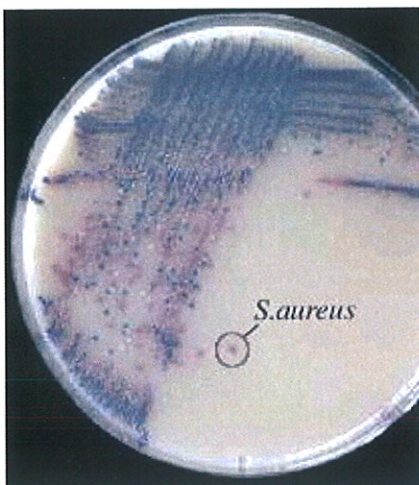
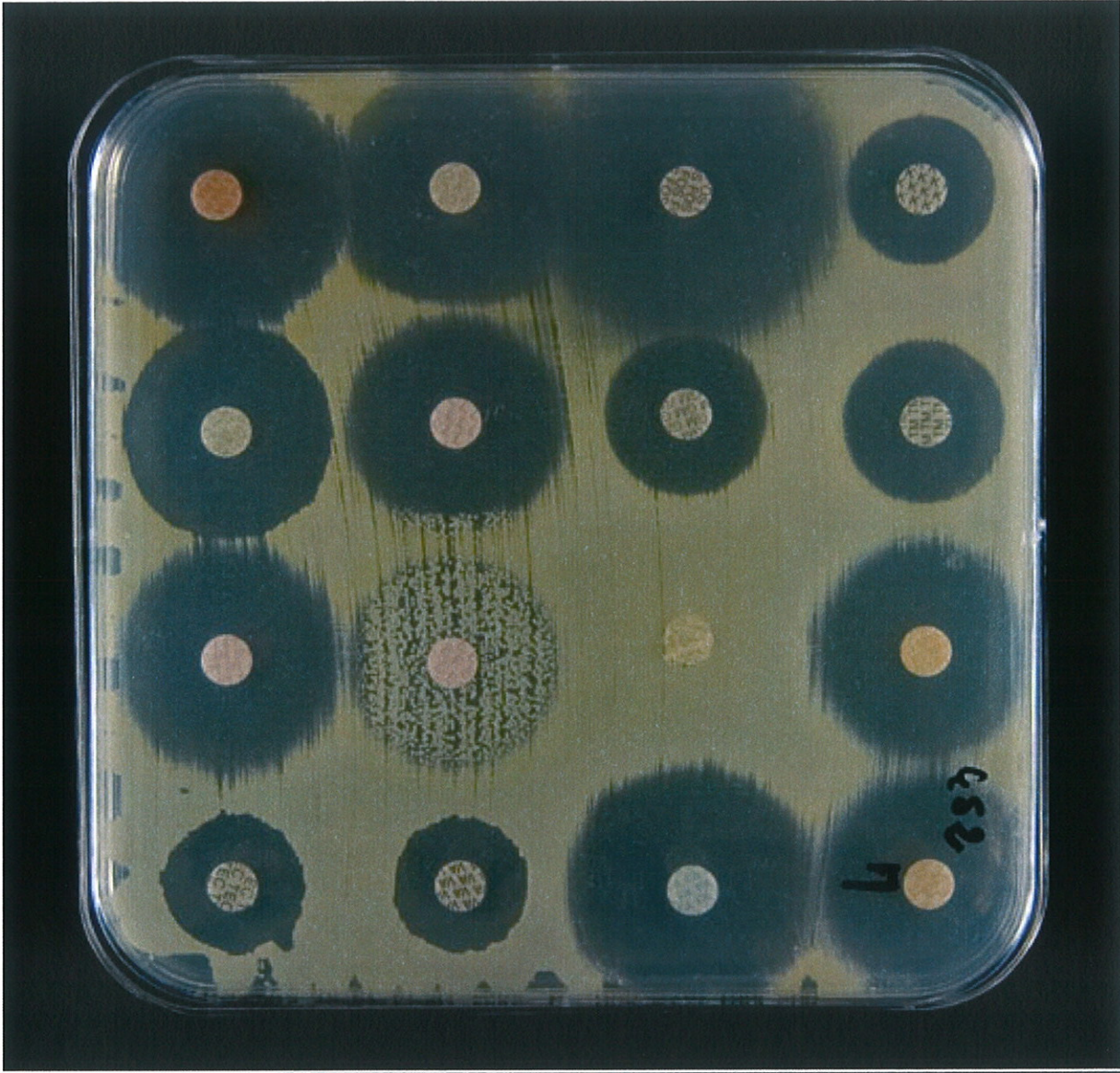
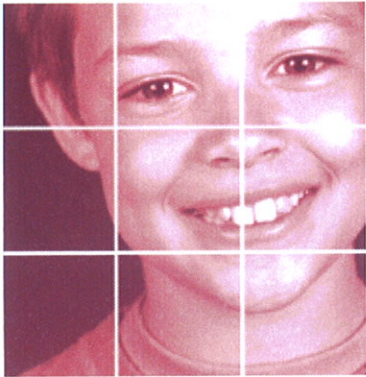


IMAGE DE DOUBLE POPULATION BACTERIENNE



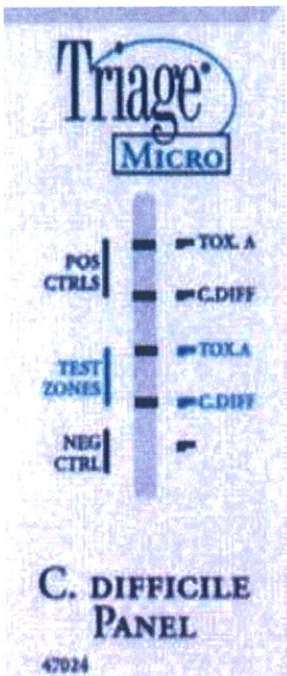
TESTS RAPIDES



CLEARVIEW STREP A®



IMMUNOCARD STAT!
TOXIN A®



TEST TRIAGE®

BON A IMPRIMER N° 341

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et FERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME :

La bactériologie est née avec l'invention du microscope ; dès le dix-septième siècle, les bactéries ont pu être observées et les scientifiques de l'époque, médecins pour la plupart, ont peu à peu compris leur importance dans le développement des maladies. Pasteur et Koch ont été les pionniers de la discipline en mettant au point les moyens de cultiver ces bactéries afin de pouvoir les étudier. Les techniques d'analyse ont ensuite bénéficié du développement de la biochimie et de la génétique, et la biologie moléculaire a fait son apparition au vingtième siècle. Cependant, la démarche diagnostique a peu évolué et n'a pas profité de cette révolution technologique pour remettre en question les dogmes établis selon lesquels une maladie est provoquée par un seul type de bactérie.

A l'aide de quelques exemples, nous avons fait une revue des nouveaux moyens diagnostiques permettant d'avoir une approche différente de l'analyse bactériologique. Ces moyens sont représentés par les milieux chromogènes, les tests rapides immunologiques et les tests de biologie moléculaire. Ils devraient permettre de modifier les règles méthodologiques de l'analyse bactériologique en prenant en compte les notions de pluralité, de diversité et de virulence bactériennes, notions ignorées par l'analyse traditionnelle. L'utilisation de ces technologies innovantes permettrait une étude de la population bactérienne dans son ensemble et l'accès direct à leurs caractéristiques génétiques.

TITRE en Anglais

The unbearable limit of bacteriological analysis: technological evolution, methodological revolution.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : PHARMACIE

MOTS-CLES :

Historique - milieux chromogènes - tests rapides - biologie moléculaire - pluralité bactérienne – génotypes de virulence – diversité bactérienne.

U.F.R Toulouse III – 118 route de Narbonne – 31062 Toulouse cedex 04 – France

Directeur de thèse : Docteur MF PRERE