

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

BENGUETTAT Batoul Fatima Zohra

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Spécialité: Microbiologie appliquée

Thème

**Agents pathogènes bactériens
Et
Techniques d'identification**

Soutenue le 24/09/2020

Devant le Jury

Président	Mr. DJIBAOUI R.	Professeur	U. Mostaganem
Encadrante	Mme DALACHE F.	Professeur	U. Mostaganem
Examinatrice	Mme BENKENICHE N.	MAA	U. Mostaganem

Année universitaire : 2019-2020.

Remerciement

Un projet de fin d'étude ne se réalise jamais seul et par nos propres moyens. C'est pour cela je souhaiterai ici remercier toutes les personnes qui ont participé à ces cinq années d'aventure scientifique et humaine

*Je remercie avant tout, **Dieu** le tout puissant pour la volonté, la santé, et la patience qu'il m'a donné durant toutes les longues années d'études afin que je puisse arriver là.*

*Je tiens à remercier en premier lieu la professeure **Dalache Fatiha** pour m'avoir encadré et accepté la responsabilité de ce travail « je vous remercie pour votre aide, pour le choix du thème, votre gentillesse, votre patience, de votre générosité, de votre disponibilité, et le temps que vous m'avez accordé pour relire patiemment en corrigeant les pages mot par mot. J'ai eu un grand honneur de travailler sous votre direction, bénéficier de vos remarques, compétences, idées... je prie le bon dieu de vous garder pour toutes les promotions qui suivent, et de vous faire atteindre les plus hauts grades de réussite.*

*Mes remerciements et mon profond respect vont à **Mme BEKENICHE N.** pour avoir accepté d'examiner ce travail et **Mr DJIBAOUI R.** pour avoir présider le jury*

Et un remerciement spécial à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation dans ces 5 années universitaires ainsi que pour leur soutien, leur dévouement et le respect dont ils ont fait preuve à mon égard.

Et une pensée amicale à mes collègues de la promotion 2020 de Master 2 « Microbiologie appliquée», pour leur soutien et leur aide et pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Dédicace

Je dédie ce travail en guise de témoignage d'un grand respect et d'une profonde reconnaissance :

A ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consolider quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A mon cher père

Pour le gout de l'effort que vous avez suscité de moi, et pour l'amour, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Puisse ce travail témoigner de ma profonde affection et de ma sincère estime.

A ma chère tante Amina

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Que Dieu le tout puissant vous préserve, vous accorde santé, bonheur, et vous protège de tout mal.

A mes chers frères

Pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré, pour toute la spontanéité et vos élans chaleureux, Je vous dédie ce travail. Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous vos vœux.

Et enfin je dédie mon travail à des personnes qui sont très chères et qui compte beaucoup pour moi Kawter Sihem Affaf Hiba et Imene

Résumé

Par les microorganismes, les bactéries sont responsables d'une grande partie des maladies infectieuses humaines de plus elles ont développé un grand nombre de résistances aux antibiotiques ce qui rend leur élimination de plus en plus difficile.

Les soins apportés aux patients seront efficaces si l'agent causant l'infection est identifié rapidement et avec précision. Pour cela beaucoup de techniques et méthodes ont été développées par les chercheurs de par le monde. Les techniques seront du type traditionnelles dans ce cas elles seront chronophages et dans certains cas donneront des résultats imprécis. On peut aussi utiliser des techniques sophistiquées qui peuvent être immunologiques ou moléculaire dans ce cas l'identification de l'agent pathogène sera dans la plupart des cas précise et il y a un gain de temps considérable, même dans certains elles peuvent être très couteuse.

Mots clés : Microorganismes, Bactéries, Maladie Infectieuse, techniques d'identification.

Abstract

Through microorganisms, bacteria are responsible for a large part of human infectious diseases and they have developed a large number of resistance to antibiotics which makes their elimination more and more difficult.

Patient care will be effective if the agent causing the infection is identified quickly and accurately. For this many techniques and methods have been developed by researchers around the world. The techniques will be of the traditional type in this case they will be time consuming and in some cases will give imprecise results. One can also use sophisticated techniques which can be immunological or molecular in which case the identification of the pathogen will in most cases be precise and there is a considerable time saving, even in some they can be very expensive.

Key words : Microorganisms, Bacteria, Infectious Disease, identification techniques.

ملخص

من خلال الكائنات الحية الدقيقة، تكون البكتيريا مسؤولة عن جزء كبير من الامراض المعدية التي تصيب الإنسان و قد طورت عددا كبيرا من المقاومة للمضادات الحيوية مما يجعل التخلص منها أكثر صعوبة.

ستكون رعاية المرضى فعالة إذا تم تحديد العامل المسبب للعدوى بسرعة و بدقة. لهذا تم تطوير العديد من التقنيات و الأساليب من قبل الباحثين في جميع أنحاء العالم. التقنيات من النوع التقليدي تستغرق وقتا طويلا و في بعض الحالات ستعطي نتائج غير دقيقة. يمكن للمرء أيضا استخدام تقنيات متطورة يمكن أن تكون مناعية أو جزيئية و في هذه الحالة سيكون تحديد العامل الممرض دقيقا في معظم الحالات، وهناك توفير كبير للوقت، حتى في بعض الحالات قد تكون باهضة الثمن.

الكلمات المفتاحية: الكائنات الحية الدقيقة، البكتيريا، الامراض المعدية، و تقنيات تحديد الهوية.

Liste des Abréviations

MGG : May-Grünwald-Giemsa.

BHI : Brain Heart Infusion

CLED : Cystine Lactose Electrolyte Deficient

MH : Mueller Hinton

PVS : Supplément PolyVitaminique

ESI : Electrospray Ionization

MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)-Time-of-Flight (TOF)

PCR : **Polymérase Chain Reaction**

LCR : **Ligase Chain Reaction**

NASBA : Nucleic acid sequence-based amplification

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

TMA : Transcription-mediated amplification

SDA : Strand displacement amplification

RCA : Rolling circle amplification

CPT : Cycling probe technology

LiPA : line probe assay

HPA : Hybridization protection assay

RAPD-PCR : Random Amplification of Polymorphic DNA

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis

WGS : Whole-Genome Sequencing

Liste des Tableaux

1. **Tableau 1** : les différents types respiratoires des bactéries pathogènes.....8
2. **Tableau 2** : classification des virus par type de génome.....15
3. **Tableau 3** : techniques de l'examen microscopique bactériologique.....20
4. **Tableau 4** : milieux sélectifs de quelques agents pathogènes.....25

Liste des Figures

1. Figure 01 : Bactérie Gram négative (<i>E.coli</i>).....	6
2. Figure 02 : Bactérie Gram positive (<i>Bacillus subtilis</i>).....	6
3. Figure 03 : mycobactérium tuberculosis après coloration de ziehl-neelsen.....	7
4. Figure 04 : schéma d'un virus enveloppé.....	10
5. Figure 05 : schéma d'un virus nu.....	10
6. Figure 06 : Morphologie de <i>Candida albicans</i>	13
7. Figure 07 : une pure culture de <i>candida albicans</i> sur gélose sabouraud.....	14
8. Figure 08 : œufs d'helminthes intestinaux.....	15
9. Figure 09 : protozoaire intestinal (<i>Entamoeba histolytica</i>).....	15
10. Figure 10 : schéma général de la démarche bactériologique.....	17
11. Figure 11 : cellule de Malassez.....	18
12. Figure 12 : cellule de KovaSlide.....	18
13. Figure 13 : Compteur de cellules automatisé.....	19
14. Figure 14 : Résultats positif et négatif d'une galerie API 20E.....	29
15. Figure 15 : Le système Vitek® pour l'identification bactérienne.....	29
16. Figure 16 : Etapes du déroulement de la spectrométrie de masse.....	30
17. Figure 17 : Schéma du spectromètre de masse et principe de la technique MALDI-TOF.....	31
18. Figure 18 : Principales étapes d'analyse d'un échantillon en biologie moléculaire...35	

Table des matières

- Page de Garde.
- Remerciement.
- Dédicace.
- Résumé.
- Liste des abréviations.
- Liste des tableaux.
- Liste des figures.
- Table des matières.

Introduction générale

Chapitre I : Présentation des micro-organismes.

1. Historique.....	1
2. Microbiologie médicale.....	2
3. Les microorganismes pathogènes.....	2
3.1. Infection microbienne.....	3
3.1.1. Le pouvoir pathogène.....	3
3.1.2. Le pouvoir invasif (virulence).....	4
3.2. Les maladies infectieuses.....	4
3.3. La flore normale.....	5
4. Les agents pathogènes.....	5
4.1. Bactéries et infections bactériennes.....	6
4.1.1. Structure des bactéries.....	6
4.1.2. Classifications des bactéries selon Manuel de Bergey.....	7
4.2. Virus et infections virales.....	8
4.2.1. Structure des virus.....	9
4.2.2. Classification des virus.....	10
4.2.3. Classification des virus selon Baltimore.....	11
4.3. Les infections fongiques.....	11
4.3.1. Morphologie de <i>Candida albicans</i>	12
4.4. Les infections parasitaires.....	14
4.4.1. Caractéristiques d'identifications des parasites.....	15
5. Les méthodes d'identification des agents infectieux bactériens.....	16

Chapitre II : Identification par des méthodes traditionnelles.

1. Les techniques microbiologiques.....	17
1.1. Examen cytologique.....	18
1.2. Examen microscopique bactériologique.....	19
1.3. Culture et isolement des bactéries.....	20
1.3.1. Milieu de base.....	21
1.3.2. Milieu d'enrichissement.....	22
1.3.3. Milieu d'isolement.....	22
2. Diagnostic rapide en bactériologie par recherche d'antigène.....	26
3. Méthodes analytiques biochimiques pour détecter les micro-organismes.....	27
3.1. Méthodes biochimiques traditionnelles.....	27
3.2. Méthodes biochimiques basées sur la spectrométrie de masse.....	29
3.2.1. Désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI) -Temps de vol (TOF).....	30
3.2.2. Ionisation par électronébulisation	32
3.3. Méthodes spectroscopiques.....	32

Chapitre III : Identification par des méthodes moléculaires

1. Méthodes moléculaires utilisées pour détecter les bactéries.....	34
1.1. Détection d'un pathogène bactérien spécifique.....	34
1.1.1. Amplification par cycle thermique.....	34
1.1.2. Technologie d'amplification isotherme et autre	38
1.2. Détection des bactéries pathogènes par des cibles multiples ou universelles.....	41
1.3. Détection des bactéries par hybridation d'acide nucléique ou spectrométrie de masse.....	43
1.4. Autres techniques d'identification moléculaire.....	46
2. Comment choisir le test le mieux adapté ?.....	50
3. Tendances futures des tests basés sur les acides nucléiques.....	50
Conclusion.....	52
Références bibliographique	53

Introduction générale

Les micro-organismes ont toujours été extrêmement importants pour la vie humaine et les bactéries, les levures et les moisissures sont connues pour des raisons à la fois positives et négatives. Tout comme dans le passé, comme c'est le cas maintenant, ils sont inévitablement associés à la biotechnologie, aux sciences alimentaires, à la médecine, au génie génétique et à d'autres domaines de la vie. D'une part, ils sont utilisés pour leurs caractéristiques uniques qui permettent la production d'antibiotiques, d'hormones, d'acides aminés et d'autres composés thérapeutiques, ainsi que la production d'aliments et de produits alimentaires, ainsi que la décomposition de composants tels que la biomasse lignocellulosique pour éthanol ou biogaz de deuxième génération. En même temps, certaines caractéristiques génétiques et capacités biochimiques des micro-organismes les rendent dangereux pour l'industrie (détérioration des aliments) ainsi que pour la santé humaine (*Prakach et al., 2007*). En fait, on estime qu'environ 1 400 agents pathogènes peuvent causer des maladies humaines. Les bactéries pathogènes à elles seules sont des agents étiologiques de 350 millions de cas de maladies d'origine alimentaire (*Manafi, 1996*). Aux États-Unis seulement, 48 millions de maladies d'origine alimentaire surviennent chaque année, ce qui entraîne environ 128 000 hospitalisations et 3 000 décès. Une mauvaise hygiène de l'eau peut être la cause de 1,7 million de décès par an dans le monde, et neuf décès sur 10 concernent des enfants et la quasi-totalité des décès surviennent dans les pays en développement. En outre, la majorité des agents pathogènes responsables de ces maladies et de ces décès comprennent *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* entérotoxigène, *Shigella spp.* et *Vibrio cholerae*, *Aeromonas spp.*, *Bacteroides fragilis* entérotoxigènes, *Clostridium difficile* ainsi que *Cryptosporidium parvum* (*Ramamurthy et al., 2014*).

Deux facteurs déterminent l'utilisation potentielle des micro-organismes dans les processus biotechnologiques, il s'agit de leurs caractéristiques génétiques et leurs capacités biochimiques. Cependant la pathogénicité des souches utilisées doit être aussi prise en considération. L'application industrielle ainsi que le traitement de l'infection sont possibles après caractérisation, identification et après classification taxonomique du matériel biologique. Il faut souligner que la taxonomie et la systématique, sont très souvent utilisées de manière interchangeable, elles sont en fait deux termes différents. Bien que la systématique traite de la diversité des organismes, des relations et des interactions possibles, la taxonomie est une classification des organismes dans une structure hiérarchique de groupes homogènes constitués de descendants de l'ancêtre commun le plus proche. Malgré un degré élevé de similitude

phénotypique, chaque assemblage d'un individu montre un certain degré de diversité phénotypique en raison de la variation génotypique. Plus les différences au niveau génétique sont importantes, plus les organismes apparentés sont éloignés. Les exemples communément connus et utilisés de classification hiérarchique sont le règne, la division, la classe, la famille, le genre, l'espèce et enfin la souche. Les travaux de recherche dans le domaine de la classification, de la systématique et de l'identification des micro-organismes sont interconnectés et ont un impact les uns sur les autres. Une identification précise affecte la classification taxinomique des micro-organismes ainsi que leur systématique, et vice versa. Par conséquent, plus la recherche vise à caractériser un micro-organisme individuel, plus son identification est précise, et donc sa classification et sa systématique. En conséquence, la méthodologie «polyphasique» est centrée sur des données morphologiques et biochimiques complétées par des données de techniques moléculaires. La combinaison de l'approche classique avec des gènes d'ARNr 16S, des techniques d'empreinte moléculaire et / ou d'autres marqueurs moléculaires est considérée comme une base extrêmement importante pour l'identification et la classification des microorganismes comme les bactéries (*Prakach et al., 2007*). L'identification précise des microbes est essentielle pour les scientifiques impliqués dans de nombreux domaines de la recherche appliquée et de l'industrie qui vont de la microbiologie clinique à la production alimentaire.

Le temps nécessaire à l'identification des microorganismes basée sur l'approche traditionnelle qui inclut la morphologie, la physiologie, la chimie et la caractérisation biochimique est estimé à au moins 2 à 5 jours, voire jusqu'à une douzaine de jours dans le cas des moisissures. De plus, la plupart des méthodes phénotypiques utilisées dans les laboratoires de microbiologie nécessitent le travail intensif et le matériel. De plus les méthodes phénotypiques ne sont pas toujours suffisantes pour identifier le micro-organisme (*Bochner, 2009*). L'une des stratégies pour réduire le temps d'identification microbienne est l'utilisation de techniques de biologie moléculaire qui peuvent également être complétées par de nombreuses techniques d'empreintes moléculaires (*Castro-Escarpulli et al., 2016*). Chaque méthode a ses forces et ses faiblesses, et l'approche de recherche la plus récente implique l'utilisation d'une compilation de techniques multi variées. Une telle réalisation semble avoir un grand potentiel pour l'avenir. Afin d'obtenir l'identification, la classification et la systématique les plus précises des micro-organismes, il est extrêmement important de choisir des techniques appropriées, ainsi que d'avoir une compréhension approfondie des mécanismes de leur action.

Dans le cas de maladies infectieuses, il est très important de procéder à l'identification la plus rapide et la plus précise de l'agent pathogène. Pour cela de nombreux chercheurs essaient de mettre au point des techniques de plus en plus sophistiquées. Ceci a pour objectif final une prise en charge médicale rapide des patients.

Dans ce sens, notre travail se propose de fournir une description des méthodes traditionnelles et nouvelles d'identification, ainsi que de leurs forces et limites. Nous nous sommes intéressées essentiellement aux agents pathogènes bactériens et notre mémoire s'articule autour de quatre chapitres qui sont :

1. Description globale des agents pathogènes
2. Techniques d'identification traditionnelles des bactéries
3. Techniques biochimiques et immunologiques
4. Techniques moléculaires d'identification par les protéines ou les acides nucléiques.



*Chapitre I : Présentation
des microorganismes*

1. Historique

L'histoire des micro-organismes en biologie commence avec la fabrication du microscope au milieu du XVII^{ème} siècle par le hollandais Antony Van Leeuwenhoek. Malgré le perfectionnement des techniques de microscopie et la multiplication des observations, pendant deux siècles, le statut des micro-organismes reste flou, comme le reflète la quasi-absence de débat autour de leur position taxonomique. La plupart des biologistes les interprètent comme des intermédiaires entre le monde minéral et le monde vivant trouvant probablement leur origine par génération spontanée (selon laquelle les « animalcules » provenaient de la transformation de la matière organique (*Meyer et al., 2014*)). Les autres se contentent trop souvent de suivre le dogme, stipulant que tout être vivant est soit un animal, soit une plante. Suivant cette logique, les micro-organismes photosynthétiques sont classés avec les plantes alors que les autres sont intégrés au sein des animaux dans le groupe mal défini des « vers ». (*Brochier et al., 2008*).

En 1969 Whittaker a proposé une nouvelle classification en cinq règnes (*Monera, Protista, Fungi, plantae* et *animalia*) en se basant sur les critères suivants :

- La complexité de la structure cellulaire
- La complexité du corps de l'organisme
- Le mode de nutrition
- Le style de vie
- Les relations phylogénétiques

Les bactéries étant classées dans le règne *Monera*.

Au XIX^{ème} siècle, la connaissance des microorganismes connaît de grandes avancées et s'accompagne d'une multiplication du nombre d'espèces décrites. Leur rôle en tant qu'agents infectieux, est mis en évidence et leur implication au niveau de processus biochimiques primordiaux est démontrée. Cependant, leur place au sein des êtres vivants reste peu débattue. Tout change en 1866, lorsqu'Haeckel propose de briser la dichotomie *Plantae/Animalia* en proposant la création d'un troisième règne du vivant, qu'il nomme *Protista*. Il regroupe sous ce nom tous les organismes unicellulaires, à l'exception des algues bleues-vertes, qu'il maintient au sein des *Plantae*. A l'intérieur des *Protista*, Haeckel rassemble plusieurs groupes d'eucaryotes unicellulaires ainsi que le groupe des *Monera* (organismes unicellulaires dépourvus de noyau). Cette définition des *Monera*, préfigure de celle que Chatton donnera des Procaryotes cinquante ans plus tard. Peu de temps après Cohn établit un lien entre les *Monera*

et les algues bleues-vertes. En 1904, Haeckel rejoint le point de vue de Cohn et les reclasse au sein des Monera. (*Brochier et al., 2008*).

De nombreux scientifique, notamment Louis Pasteur qui a déterminé le rôle des bactéries dans la fermentation et les maladies et le médecin allemand Robert Koch (1843-1910) sont les véritables fondateurs de la bactériologie médicale où la théorie des germes trouve une nouvelle forme en même temps qu'une nouvelle vigueur.

Koch puis Pasteur démontrent de manière irréfutable que la bactériodie observée par Rayet et Davaine dans le sang des animaux charbonneux est l'agent responsable (*B.anthraxis*) du charbon épidémique. Dans un célèbre mémoire ; Koch énonce les fameuses règles connues sous le nom de postulats de Koch.

2. La microbiologie médicale

La microbiologie médicale est l'étude des micro-organismes pathogènes pour l'homme. Elle a pour principal objectif le diagnostic spécifique des infections, mais embrasse également l'épidémiologie, la pathogénèse, le traitement et la prévention des maladies infectieuses bien que l'incidence des maladies microbiennes ne soit pas très élevée dans les pays développés, les épidémies d'infections restent encore inquiétantes. Dans les pays en voie de développement, les maladies microbiennes font un grand nombre de victimes, en termes de morbidité comme de mortalité.

3. Les microorganismes pathogènes

Les micro-organismes sont des êtres vivants de taille microscopique. Il en existe des milliers d'espèces différentes dans notre environnement. Si certains ont un fort pouvoir pathogène pour l'homme, la plupart d'entre eux sont indispensables à sa survie ainsi qu'au bon fonctionnement de la planète (équilibre atmosphérique, purification des eaux, fertilisation des sols...).

A l'état naturel, les micro-organismes sont stables. Ils se développent dans des milieux comme l'environnement (sol, surfaces, eau, air) ou sur un hôte spécifique (végétal, animal), appelé réservoir. Ils se reconstituent à chaque fois que l'on cherche à les éliminer. On parle de flore saprophyte lorsque dans l'environnement, les micro-organismes se nourrissent de matières en décomposition. En revanche, on parle de flore commensale lorsque ces agents microscopiques consomment les produits d'un organisme vivant, sans lui nuire, voire en lui

procurant certains avantages (protection, nutrition...). Chez l'homme par exemple, la flore cutanée empêche la colonisation de la peau par d'autres organismes pathogènes, tandis que la flore intestinale assure un rôle métabolique dans la digestion. L'homme vit donc au quotidien avec des milliers de micro-organismes, dont il est parfois lui-même porteur. D'ailleurs, sans eux, la vie humaine ne serait pas possible...

Si la plupart des espèces sont inoffensives pour l'homme, certaines sont plus ou moins pathogènes, on parle alors d'agents infectieux. Leur pouvoir pathogène est strict lorsqu'ils provoquent une maladie chez un hôte dont les défenses immunitaires sont normales (ex : tuberculose, grippe...). D'autres peuvent être pathogènes de façon occasionnelle, c'est le cas notamment des micro-organismes des flores commensales de l'homme qui, lorsqu'ils ne se trouvent plus dans leur milieu habituel, peuvent devenir agressifs et provoquer des maladies (ex : les bactéries *Escherichia Coli* de la flore digestive sont souvent à l'origine d'infections urinaires). Parfois, des agents non pathogènes se révèlent offensifs chez des sujets immunodéprimés, on dit alors que ce sont des micro-organismes opportunistes (ex : *Pneumocystis jirovecii*, *aspergillus sp...*

3.1. Infection microbienne

3.1.1. Le pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène d'un agent infectieux est sa capacité à causer une maladie chez un hôte, homme ou animal. La gravité des symptômes varie et peut aboutir à la mort. Elle dépend du degré d'agressivité, ou virulence, de l'agent pathogène et des réactions chez l'hôte. Tous ces éléments se déterminent au laboratoire ou dans la nature.

Le pouvoir pathogène des micro-organismes est conditionné par plusieurs facteurs :

- la capacité des bactéries à se multiplier dans l'hôte : le pouvoir invasif
- la capacité des bactéries à libérer des toxines : le pouvoir toxique

Un agent infectieux peut être transmis par le biais d'un environnement souillé, d'un vecteur (moustique, tique...) ou de façon interhumaine (horizontale = d'homme à homme ; verticale = in utéro). Pour ce faire, deux modes sont possibles :

- **les transmissions de contact**
 - **directes** : contact avec une personne infectée (poignée de main...);
 - **indirectes** : contact avec un objet souillé par une personne infectée (surface, objets, transfusion...)

- **les transmissions aéroportées** : émises lors de la parole, la toux, l'éternuement...
 - **par gouttelettes** : grosses particules présentes à court termes.
 - **par aérosols** : petites particules présentes à long termes.

3.1.2. Pouvoir invasif (virulence)

La virulence était opposée à la toxinogénèse pour faire référence à la capacité de certains germes de se multiplier dans les tissus de l'hôte (malgré les moyens de défense de celui-ci) comme les bacilles de la peste et du charbon, le pneumocoque. Les germes virulents possèdent des structures ou des constituants spéciaux qui les protègent efficacement, en particulier de la phagocytose

La virulence dépend aussi de l'hôte et de ses facultés de résistance. Cette résistance est fonction de l'espèce animale, de la race, de l'individu, de son âge et de tout facteur susceptible de modifier ou de diminuer ses moyens de défense (*Meyer et al., 2014*).

Le pouvoir pathogène et la virulence d'un agent infectieux restent parfois à préciser. Au laboratoire, ils se mesurent dans des modèles expérimentaux après inoculation des agents pathogènes à :

- Des cellules en culture *in vitro*.
- Des animaux *in vivo*.

3.2. Les maladies infectieuses

Les maladies infectieuses qui ont émergé au cours de l'histoire ont inclus certains des fléaux les plus redoutés du passé. De nouvelles infections continuent d'émerger aujourd'hui, alors que bon nombre des anciens fléaux sont toujours présents à l'échelle mondiale.

Les maladies infectieuses regroupent toutes les maladies provoquées par la transmission d'un agent pathogène tel que les bactéries, les virus, les parasites, les prions et les champignons. Elles recouvrent donc un large spectre de pathologies bénignes comme le rhume ou l'angine, mais également très graves comme le sida, les hépatites, le paludisme ou la tuberculose. Si la recherche a permis l'éradication de certaines d'entre elles grâce à la mise au point de vaccins spécifiques et des antibiotiques, il reste encore beaucoup de chemin à parcourir pour que toutes ces pathologies soient traitées. On assiste aujourd'hui également à une augmentation des résistances aux antibiotiques par les bactéries, ainsi qu'à l'émergence de nouveaux virus encore

méconnus. Les investigations continuent afin de mettre au point des traitements innovants de ces maladies.

3.3. La flore normale

Les virus, bactéries et champignons sont souvent considérés comme des micro-organismes agressifs et invasifs pour le corps humain, ce qui n'est cependant pas l'exact reflet de la réalité. En fait, le corps humain est normalement colonisé par un grand nombre de germes qui constituent la « flore normale ».

In utero, le fœtus reste microbiologiquement stérile. Le premier contact avec des microorganismes a lieu à la naissance lors du passage de la filière maternelle, puis lors de l'alimentation par le contact maternel. L'installation d'une flore normale et stable prend environ 2 à 3 semaines pour les enfants nés à terme et nourris au sein. Le processus est plus lent pour les prématurés et les enfants nourris au biberon, chez lesquels peut se produire une colonisation par une flore anormale.

La flore normale n'est pas répartie uniformément et certains sites sont normalement stériles. À leur niveau, la mise en évidence d'un micro-organisme signe une infection. Les bactéries constituent la plus grande part de la flore normale, et les bactéries anaérobies prédominent dans la plupart des sites. Des bactéries potentiellement pathogènes peuvent aussi faire partie de la flore normale. Par exemple, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Neisseria meningitidis*, qui peuvent être à l'origine de méningites bactériennes ou colonisent la gorge de nombreux individus. L'infection survient quand ces micro-organismes accèdent à des sites normalement stériles. Les champignons sont moins fréquemment rencontrés, par exemple *Pityrosporon (Malassezia)* ovale sur la peau et *Candida albicans* dans la bouche et le vagin. Des protozoaires comme *Entamoeba coli* et *Endolimax nana*, parfois même certaines souches d'*E.histolytica*, peuvent être retrouvés dans l'intestin en l'absence de maladie (*Hart et al., 1997*).

4. Les agents pathogènes

Une fois dans l'organisme, l'agent infectieux se développe, envahit les cellules humaines et les détruit. Les agents pathogènes les plus connus à ce jour sont les bactéries, les virus, les champignons et les parasites.

4.1. Bactéries et infections bactériennes :

Les infections bactériennes sont responsables de maladies allant de l'angine bénigne aux épidémies de choléra et de peste. Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables, à l'origine de maladies graves ou de simple colonisation de la peau. Elles sont capables de survivre et se multiplier dans l'environnement et certaines forment des spores qui survivent pendant des décennies. Un grand nombre parasite les animaux et n'infecte l'homme que par hasard. D'autres ne peuvent survivre qu'au contact intime de leur hôte humain. Alors que la plupart des bactéries se répliquent en quelques heures ou jours, d'autres ont une croissance beaucoup plus lente, entraînant des infections chroniques difficiles à traiter. En plus d'une grande diversité d'habitat, les bactéries ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques (*Hart et al., 1997*).

4.1.1. Structure des bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires qui ont une variété de tailles, de formes et de structures d'enveloppe. Les exigences minimales sont le cytoplasme, une membrane cellulaire qui entoure le cytoplasme et un chromosome d'ADN. Quelques-uns ont des structures internes telles que des vacuoles et des corps de stockage, mais aucun n'a de véritables organites. L'enveloppe cellulaire peut être aussi simple qu'une simple membrane. Cependant, il s'agit généralement d'une structure multicouche qui comprend une membrane cytoplasmique, une paroi cellulaire et des structures supplémentaires extérieures à la paroi cellulaire. La nature de l'enveloppe bactérienne détermine si la souche est un microorganisme Gram positif, Gram négatif ou organisme acido-résistant (ex : *Mycobacterium tuberculosis*), (voir les figures 01, 02 et 03).



Figure 01 : Bactérie Gram négative
(*E. coli*).

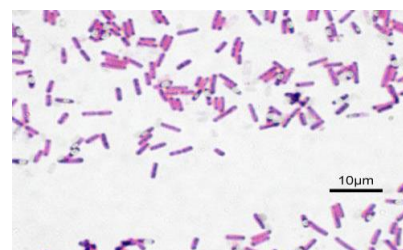


Figure 02 : Bactérie Gram positive
(*Bacillus subtilis*).

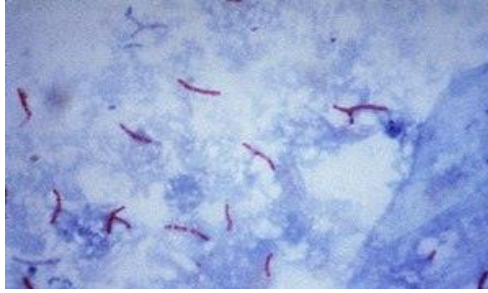


Figure 03 : mycobactérium tuberculosis après coloration de ziehl-neelsen.

Les bactéries à Gram positif ont des parois cellulaires épaisses, les bactéries à Gram négatif ont des parois cellulaires minces plus une deuxième membrane extérieure, et les bactéries résistantes aux acides ont une paroi cellulaire mince plus une épaisse couche de lipides spécialisés. Les parois cellulaires fonctionnent comme un exosquelette qui définit la forme globale des cellules. Les membranes extérieures protègent les cellules Gram négatives des détergents et des enzymes mais limitent la perméabilité. Ils contiennent des protéines de formation de canaux spécialisés qui permettent aux petites molécules de diffuser à travers cette barrière. La couche externe de la membrane externe contient des lipopolysaccharides. Les lipopolysaccharides sont des glycolipides uniques qui forment une barrière qui protège la cellule des agents hydrophobes. Ce sont des endotoxines, hautement immunogéniques et les composants de surface reconnus par les anticorps de sérotypage. Les bactéries peuvent avoir une variété d'appendices de surface. Il s'agit notamment des flagelles pour le mouvement cellulaire, des fimbriae pour l'adhérence et des pili pour les échanges génétiques. De nombreuses bactéries s'entourent d'une épaisse couche de polysaccharide (le glycocalyx) sous forme de capsule ou de bave (*Benson, 1997*).

La forme des bactéries et leur affinité pour les colorants constituent la base de leur classification. Les bactéries peuvent être sphériques (coques ou cocci), en forme de bâtonnet (bacilles), ou intermédiaires (coccobacilles). La plupart prennent la coloration de Gram, les bactéries à Gram positif en bleu-violet, les bactéries à Gram négatif en rosé. Les mycobactéries (ex :*Mycobacterium tuberculosis*) sont colorées en rosé par la technique de Ziehl-Neelsen.

4.1.2. Classification des bactéries selon le Manuel de Bergey

Ce qu'il faut savoir c'est qu'il n'existe pas une classification officielle des bactéries, mais on se réfère à la classification du manuel de Bergey. Cette classification est la plus acceptée par tous les microbiologistes.

Présentation des microorganismes

Dans ces premières éditions, en 1936, elle se basait sur l'étude des :

- Paramètres microscopiques : généralement les cellules bactériennes sont sous forme de coques, ou bacilles, la disposition donnera des cellules isolées, groupées en deux, en chaînette, en amas...etc.

- Paramètres macroscopiques : taille, forme, couleur et contour des colonies bactériennes.

- Résultats de la coloration : la coloration de Gram pour les bactéries Gram positives et Gram négatives, et la coloration de Ziehl-neelsen pour les mycobactéries (acido-alcool-résistante).

- Températures de croissance : Les bactéries peuvent être classées selon leur température optimale de croissance aux : bactéries mésophiles, thermophiles, hyperthermophiles, psychrophiles et psychrotrophes.

Les Bactéries mésophiles (Ex. : *Escherichia coli*) ont la température de croissance la plus proche de celle du corps humain (37°C).

- Types respiratoires : Il existe plusieurs classes de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène (voir tableau 01).

Tableau 01 : les différents types respiratoires des bactéries pathogènes :

Types respiratoires	Rapport avec l'oxygène	Exemples
Aérobie strict	Présence d'air	<i>Neisseria, Pseudomonas</i>
Microaérophile	pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air	<i>Campylobacter, Mycobactérium</i>
Aéro-anaérobie facultatif	Avec ou sans air	<i>E.coli, Salmonella</i> , les staphylocoques, les streptocoques
Anaérobie strict	Absence totale d'oxygène	<i>Clostridium</i>

- Mobilité : bactéries immobiles comme les streptocoques, mobiles comme *E.coli*
- Présence de spores à l'état frais ou après coloration (Ex : *Clostridium*)
- Besoins nutritionnels : nécessité de substances particulière pour le développement tels que : les vitamines, les acides aminés...etc.

4.2.Virus et infections virales

Bien que l'on ait su depuis un certain temps que de très petits agents « filtrables » étaient responsables de certaines infections humaines, « l'ère des virus » n'a pas débuté avant 1950. Au

cours des quarante années qui ont suivi, nos connaissances se sont accrues de façon exponentielle grâce aux cultures cellulaires et virales, à la sérologie et aux techniques sans cesse plus performantes de biologie moléculaire.

Les virus sont les plus petits et les plus primitifs des agents infectieux conventionnels. Ils diffèrent de la plupart des bactéries, champignons et protozoaires par le fait qu'ils sont des parasites intracellulaires obligés. Les virus ne disposent pas de l'équipement enzymatique nécessaire pour leur réplication. Pour se reproduire, ils doivent donc « pirater » les réserves énergétiques de la cellule hôte, ses nucléotides, ses acides aminés, ses lipides, ainsi que ses voies métaboliques de biosynthèse. En fait, la plupart des virus possèdent des facteurs qui détournent les processus métaboliques des cellules hôtes, au profit de la production de nouvelles particules virales. Ceci est en partie responsable de la mort des cellules infectées, et contribue aux manifestations cliniques infectieuses.

Les autres différences majeures entre les virus et les micro-organismes plus complexes sont les suivantes :

- un génome viral est constitué d'ARN ou d'ADN, jamais les deux simultanément
- les bactéries, champignons et protozoaires se reproduisent par scissiparité, tandis que les virus utilisent un mode complexe de désassemblage, réplication et réassemblage au sein de la cellule hôte
- les virus n'ont ni paroi ni organisation cellulaire et sont beaucoup plus petits que les autres micro-organismes.

Deux conséquences majeures découlent de ces différences. La première est qu'après excrétion par l'hôte, le nombre des particules virales ne peut que décroître, celles-ci étant incapables de se multiplier dans un environnement inanimé, à la différence des bactéries et des champignons. La seconde est qu'il est beaucoup plus difficile de concevoir des antiviraux efficaces et atoxiques que des drogues antibactériennes, les virus utilisant les systèmes cellulaires de l'hôte (*Hart et al., 1997*).

4.2.1. Structure des virus

Le virus, en tant que particule infectieuse, est constitué d'une molécule d'acide nucléique associée souvent à des protéines internes et protégées par une coque rigide de nature protéique : la capside. On donne souvent à cet ensemble le nom de nucléocapside. La capside peut être nue ou entourée d'une enveloppe ou péplos (*Meyer et al., 2014*) (voir figure 04 et 05).

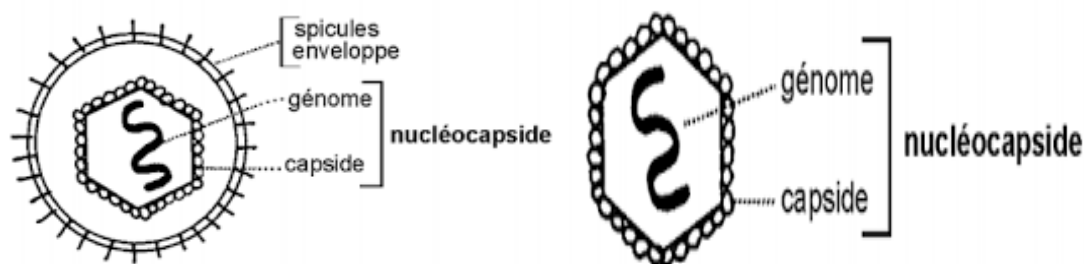


Figure 04 : schéma d'un virus enveloppé **Figure 05** : schéma d'un virus nu

À l'origine, les virus ont été classés selon leur pouvoir pathogène, et selon des considérations épidémiologiques et écologiques. La classification actuelle repose largement sur des considérations biophysiques, antigéniques, et de biologie moléculaire. Les virus sont divisés en familles, sous-familles et genres selon la structure et l'organisation de leur génome, la symétrie de leur capsid, la taille, le lieu d'assemblage et la présence éventuelle d'une enveloppe lipidique. Au sein d'un même genre, les différents membres sont définis par la présence de différents antigènes (ex. les subdivisions des *Echovirus* et *Coxsackievirus*), par des différences génomiques (*Papillomavirus* humains), ou même par des différences dans la présentation clinique ou les vecteurs (ex. *Flaviviridae*) (*Hart et al., 1997*).

4.2.2. La classification des virus

Les éléments de structure qui viennent d'être décrits autorisent une classification appelée système LHT (du nom de ses promoteurs, Lwoff, Horne, et Tounier). Elle retient principalement (*Meyer et al., 2014*):

- **Au niveau de l'acide nucléique** : Sa nature (ribonucléique ou désoxyribonucléique), le nombre de brins (simple (**SB**) ou double (**DB**)), pour les SB, l'orientation, positive (+) (du même sens qu'un ARN messager) ou négative (-) (complémentaire à un ARNm) et la structure et l'organisation du génome (circulaire, segmenté, non segmenté).
- **Au niveau de la morphologie** : Le type de symétrie (cubique ou hélicoïdale avec, selon ce type, le nombre de capsomères dans le premier cas, le diamètre de l'hélice dans le second) et la présence d'une enveloppe ou l'absence (nu).

4.2.3. La classification des virus selon Baltimore

La classification de Baltimore, développé par David Baltimore, lauréat du prix Nobel de médecine en 1975, est un classement des virus en fonction de leur type de génome. Cette classification, utilisée aujourd'hui comme base par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). La classification proposée par Baltimore est (voir tableau 02):

Tableau 02 : Classification des virus par type de génome :

Virus à ADN	Exemples :
Groupe I : Virus à ADN double brin	<i>Adénovirus</i>
Groupe II : Virus à ADN simple brin	<i>Parvovirus</i>
Virus à ARN	Exemples
Groupe III : Virus à ARN double brin	<i>Réovirus</i>
Groupe IV : Virus à ARN simple brin à polarité positive	<i>Picornavirus</i> <i>Orthomyxovirus</i>
Groupe V : Virus à ARN simple brin à polarité négative	
Virus à ADN ou ARN à transcription inverse	Exemples
Groupe VI : Rétrovirus à ARN simple brin	<i>Rétrovirus</i>
Groupe VII : Rétrovirus à ADN double brin	<i>Hépadnavirus</i>

4.3. Infections fongiques

Ces dernières années, l'augmentation des infections fongiques montre que, c'est au sein de l'embranchement des mycètes que se trouvent les microorganismes, potentiellement, les plus adaptés à un tel comportement. Les candidoses, dues aux levures du genre *Candida*, sont les infections opportunistes les plus fréquentes, et leur fréquence a doublé entre les années 80 et 90. Du coup, elles représentent désormais plus de 80% des infections à levures. Parmi les candidoses, l'infection par *Candida albicans*, commensal du tractus digestif humain est la plus commune et représente plus de 60% des levures isolées chez l'Homme. Ainsi, *Candida albicans* est responsable d'infections qui, par leur fréquence et leur gravité, se situent au premier rang des infections fongiques.

Chez l'Homme, *C. albicans* constitue un sérieux problème de santé, notamment chez des patients immunodéprimés et ceux sous thérapie immunosuppressive. En effet, elle affecte les

cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les monocytes / macrophages, qui constituent la première et unique ligne de défense de l'hôte immunodéprimé. (youcef, 2014).

4.3.1. Morphologie de *Candida albicans* :

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes, se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore), formant ainsi des colonies et blanches crémeuses. Certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans*. Les caractéristiques qui permettent de distinguer *candida albicans* sont (Lagane., 2007) (voir figure 06) :

- La forme blastospore, ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4 μm avec parfois un bourgeon de formation.

- la forme pseudomycélium, mesurant de 500 à 600 μm de longueur et de 3 à 5 μm de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien. Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ses constituants.

- la forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte.

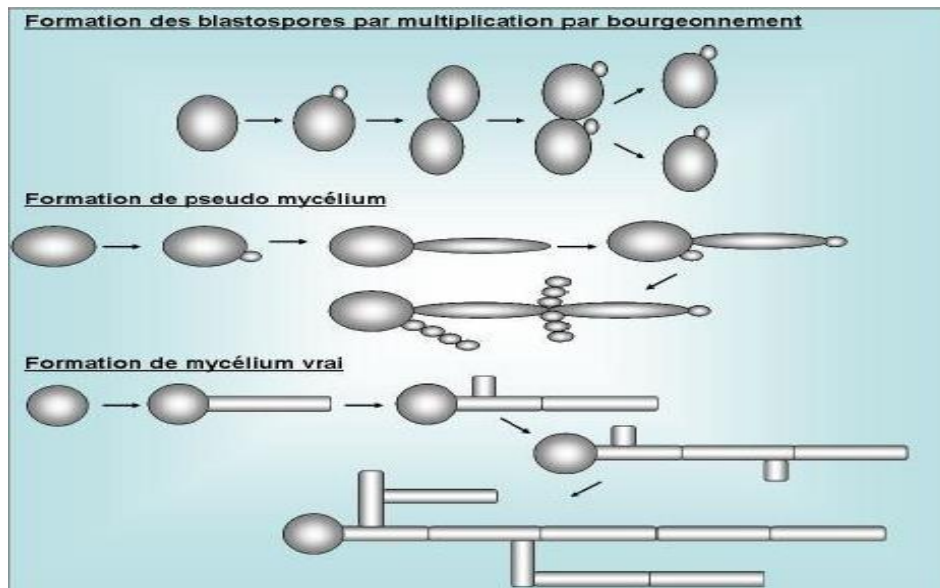


Figure 06 : Morphologie de *Candida albicans*

Au niveau clinique, les candidoses peuvent être classées en deux groupes (*Lagane et al, 2007*) :

- **les candidoses superficielles** : Les candidoses superficielles sont les manifestations les plus communes et sont très variées. Elles peuvent atteindre les surfaces épidermiques et les muqueuses telles que la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, les intestins, le système urinaire, et la muqueuse vaginale.

- **les candidoses profondes** : Les candidoses profondes, encore appelées systémiques, recouvrent les septicémies à *Candida* et les affections viscérales profondes dont le point de départ est le plus souvent une dissémination hématogène.

Les *Candida* (sauf quelques espèces) poussent bien sur milieu gélosé Sabouraud-Actidione-Chloramphénicol (voir figure 07). En cas de pousse, les levures ont été identifiées par leur caractère macroscopique et microscopique. Les tests de filamentation en sérum ou Blastèse et de chlamydo sporulation sur milieu PCB (pomme de terre, carotte, bile) ont été mis en œuvre pour l'identification de *Candida albicans*. En cas de difficulté d'identification, l'auxanogramme a été réalisé sur la galerie Auxacolor (*Angora et al., 2017*).



Figure 07 : une pure culture de *candida albicans* sur gélose sabouraud

4.4. Les infections parasitaires

Un parasite est un organisme qui se développe aux dépens d'un autre être vivant appelé (hôte). Le degré de parasitisme reflète le degré de préjudice apporté à cet hôte allant de la symbiose à la mort de celui-ci. Il déjoue les mécanismes immunitaires parfois sophistiqués de son hôte pour accomplir son cycle biologique et se maintenir aussi longtemps que possible. Certains parasites occupent un milieu stable protégé des fluctuations extérieures et des agressions des autres organismes libres en prenant comme habitat le tube digestif de l'homme et seraient à l'origine des parasitoses intestinales ; qui sont généralement provoquées par les Helminthes (voir figure 08) et les Protozoaires intestinaux et restent fréquentes surtout dans les pays à hygiène précaire pauvres et à climat tropicale.

Les Protozoaires intestinaux sont des parasites qui occupent le tube digestif chez l'homme, certaines espèces sont reconnues comme pathogènes pour l'homme, les autres sont commensales du colon et considérées comme peu ou pas pathogènes, leur présence est un indicateur de pollution fécale. Ils entraînent des infections le plus souvent localisées au tractus gastro-intestinal, à l'exception d'*Entamoeba histolytica* (Amibiase) (voir figure 09) qui peut rarement, par dissémination, occasionner une localisation extra-intestinale hépatique, pulmonaire ... ; On parlera alors de l'Amibiase extra-intestinale, cependant d'autres parasitoses peuvent occasionner des localisations extra-intestinales en cas de terrain immunitaire déprimé.

4.4.1. Caractéristiques d'identification des parasites

Pour le diagnostic des parasitoses intestinales, le but du microscopiste est d'établir avec certitude la présence de parasites dans les selles, qu'il s'agisse de minuscules kystes de protozoaires ou de gros œufs d'helminthes, et de les identifier correctement. Dans certains cas, les parasites sont présents en quantité suffisante pour être trouvés par examen direct d'une petite quantité de selles constituant l'étalement direct. L'addition d'une goutte de solution de Lugol à la préparation fait souvent ressortir d'importants aspects morphologiques des parasites, ce qui facilite leur identification (*Lawrence et al., 1994*). La classification des protozoaires et des helminthes repose sur des caractères morphologiques et biologiques :

- **Protozoaire (être unicellulaire doué de mouvement) :** selon les cas il se déplace grâce à des plasmopodes (rhizopodes), des flagelles, membrane ondulante ou des cils. Ils se présentent sous forme asexuée ou à potentiel sexué, mobile ou enkysté, intra ou extracellulaire.
- **Helminthe ou ver :** être pluricellulaire possédant des tissus différenciés.). Ils sont reconnus sous formes adultes des deux sexes sous forme larvaire, embryonnaire ou ovulaire.

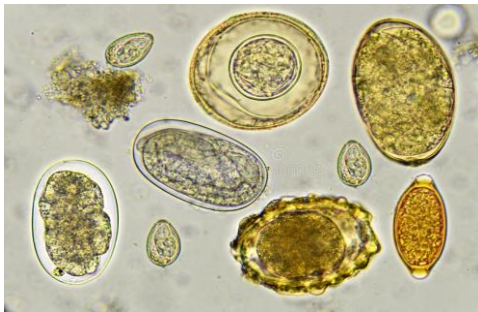


Figure 08 : œufs d'helminthes intestinaux.



Figure 09 : protozoaire intestinal
(*Entamoeba histolytica*)

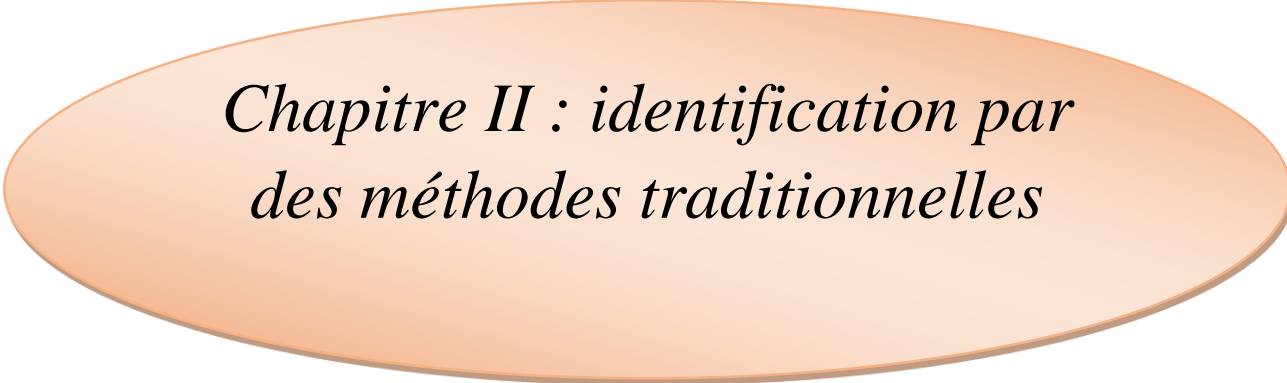
Parmi tous les agents infectieux, les bactéries sont responsables de la plupart des infections humaines en plus de présenter le très grand danger des antibiorésistances. Pour cela dans les chapitres suivant, nous nous intéresserons aux agents infectieux bactériens.

5. Les méthodes d'identification des agents infectieux bactériennes

De nombreux facteurs expliquent l'intérêt croissant accordé aux résultats des analyses microbiologiques cliniques ces dernières années. La diminution de l'efficacité des agents antimicrobiens a persuadé le clinicien d'insister sur des techniques plus sophistiquées pour une thérapie spécifique.

La détection et l'identification rapides des micro-organismes sont une caractéristique difficile et importante de l'industrie à la médecine. Les approches standards sont connues pour être très chronophages et laborieuses (par exemple, milieux de culture et tests biochimiques). À l'inverse, les techniques de dépistage exigent un regroupement rapide et peu coûteux d'isolats bactériens / fongiques et l'analyse actuelle nécessite des rapports généraux sur les micro-organismes, impliquant l'application de techniques moléculaires (par exemple, le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S basé sur la réaction en chaîne de la polymérase) (*Franco-Duarte et al., 2019*).

Le temps nécessaire à l'identification des microorganismes basée sur l'approche traditionnelle qui inclut la morphologie, la physiologie, la chimie et la caractérisation biochimique est estimé à au moins 2 à 5 jours, voire jusqu'à une douzaine de jours dans le cas des moisissures. De plus, la plupart des méthodes phénotypiques utilisées dans les laboratoires de microbiologie nécessitent le travail intensif et le matériel. De plus les méthodes phénotypiques ne sont pas toujours suffisantes pour identifier le micro-organisme (*Bochner, 2009*). L'une des stratégies pour réduire le temps d'identification microbienne est l'utilisation de techniques de biologie moléculaire qui peuvent également être complétées par de nombreuses techniques d'empreintes moléculaires (*Castro-Escarpulli et al., 2016*). Chaque méthode a ses forces et ses faiblesses, et l'approche de recherche la plus récente implique l'utilisation d'une compilation de techniques multi variées. Une telle réalisation semble avoir un grand potentiel pour l'avenir. Afin d'obtenir l'identification, la classification et la systématique les plus précises des micro-organismes, il est extrêmement important de choisir des techniques appropriées, ainsi que d'avoir une compréhension approfondie des mécanismes de leur action (*Franco-Duarte et al., 2019*).

A large, horizontally-oriented oval with a light orange gradient and a subtle drop shadow, centered on the page. It contains the chapter title in a black, italicized serif font.

*Chapitre II : identification par
des méthodes traditionnelles*

1. Techniques microbiologiques

Les objectifs de la démarche de l'analyse bactériologique sont divers. Le plus fréquemment, il s'agit pour le laboratoire de mettre en évidence la ou les bactéries responsables d'une infection, d'effectuer une identification précise du ou des pathogènes et de tester sa (leurs) sensibilité(s) aux antibiotiques habituellement actifs sur cette ou ces bactérie(s). Dans certains cas, il s'agit de s'assurer que la bactérie initialement responsable de l'infection pour laquelle un traitement antibiotique a été entrepris est bien éradiquée. Dans d'autres cas, il peut s'agir de rechercher un portage bactérien.

Les moyens de diagnostiquer une infection bactérienne sont de deux ordres, les méthodes de diagnostic direct et les méthodes de diagnostic indirect. Les méthodes directes regroupent les techniques qui permettent de mettre en évidence tout ou partie de la bactérie, tandis que les méthodes de diagnostic indirect correspondent aux techniques de détection d'anticorps développés par l'organisme infecté en réponse à l'agression par la bactérie pathogène. Il s'agit dans ce cas des méthodes de sérodiagnostic. La démarche classique de l'analyse effectuée au laboratoire pour la mise en évidence d'une bactérie à partir d'un prélèvement est schématisée en figure 10 :

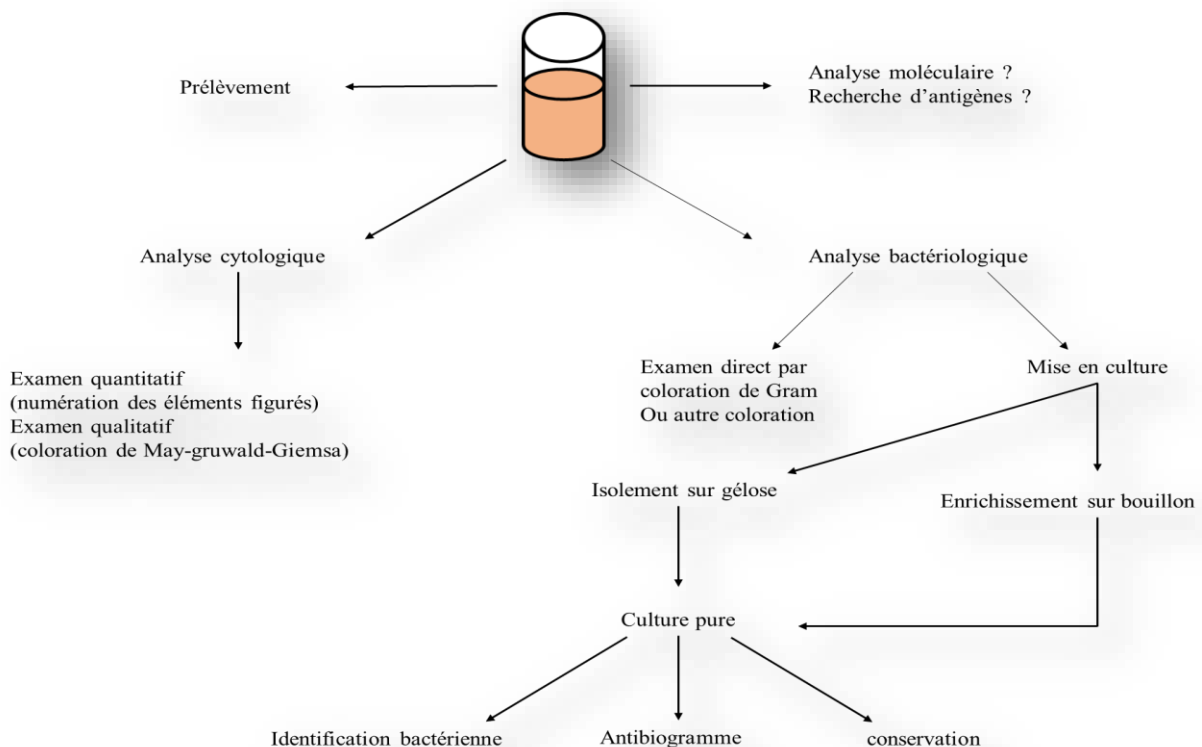


Figure 10 : schéma général de la démarche bactériologique.

L'analyse d'un prélèvement effectué dans un but diagnostique est en règle générale une analyse à la fois cytologique et bactériologique. Ainsi, l'examen microscopique est une étape clé dans la démarche diagnostique des infections bactériennes.

3.1. Examen cytologique

L'analyse cytologique consiste à examiner un échantillon au microscope. Elle peut s'agir d'une analyse quantitative qui va permettre de répondre en nombre d'éléments figurés par unité de volume (leucocytes, hématies, cellules épithéliales) et de bactéries. Cette numération est effectuée pour les prélèvements de nature liquide (liquides céphalorachidiens, urines, liquides articulaires, liquides pleuraux, pus... etc.). En cas d'infection, un processus inflammatoire se traduit par la présence de plus de 10^4 leucocytes/mL, parfois en amas, fréquemment associée à une hématurie supérieure à 10^4 hématies/mL (environ 30 %). La présence de cylindres doit être signalée.

La quantification des éléments est effectuée manuellement ou bien, plus récemment, en utilisant des systèmes automatiques de comptage, en particulier pour les prélèvements d'urine :

- ✓ **Systèmes manuels de comptage :** Ces systèmes font appel à des hémocytomètres ou hématimètres communément appelés cellules. Ces cellules sont réutilisables comme les cellules de Lemaure ou de Malassez par exemple (voir figure 11), ou bien à usage unique comme les KovaSlide® (voir figure 12) qui présentent l'avantage de regrouper sur un même support 10 cellules.
- ✓ **Utilisation de systèmes automatiques de comptage :** Ces systèmes sont fondés soit sur une coloration des éléments urinaires avec différents colorants fluorescents qui sont ensuite comptés et différenciés par cytométrie en flux, soit par cytométrie en flux avec capture d'images associée à une reconnaissance automatique des particules. Dans ce dernier cas, toutes les particules sont numérisées et mémorisées (voir figure 13). Ces systèmes sont connectables au système informatique de laboratoire.

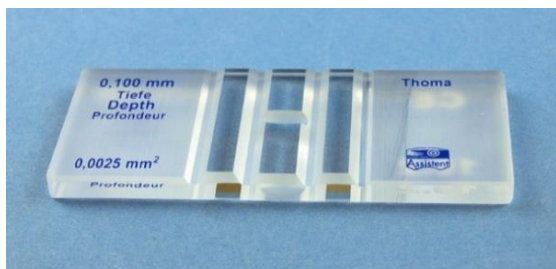


Figure 11 : cellule de Malassez.



Figure 12 : cellule de KovaSlide.



Figure 13 : Compteur de cellules automatisé.

L'examen cytologique permet aussi une analyse quantitative Afin de connaître avec précision la nature des éléments figurés observés. La coloration cytologique effectuée est la coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG). Cette coloration est principalement à visée cytologique pour une meilleure individualisation des éléments cellulaires tels polynucléaires, macrophages, lymphocytes... Les bactéries peuvent être néanmoins observées avec leur capsule comme le pneumocoque. D'autres peuvent être spécialement recherchées telle *Borrelia burgdorferi* dans la maladie de Lyme.

Principe de la coloration MGG : Il repose sur l'action combinée de deux colorants neutres :

- Le May-Grünwald, contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène.
- Le Giemsa, contenant lui aussi de l'éosine et un colorant basique, l'azur de méthylène.

Ces deux colorants sont en solution dans l'alcool méthylique sous forme inactive. Lors de l'addition d'eau, les sels précipitent (éosinate de méthylène et azur de méthylène) et se fixent sélectivement sur les constituants cellulaires.

1.1.1. Examen microscopique bactériologique

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais), ou bien après coloration de l'échantillon, ou encore après réaction d'immunofluorescence. Cet examen renseigne sur la présence de bactéries confirmant l'origine bactérienne d'une infection (morphologie, propriétés tinctoriales particulières après coloration de Gram ou coloration de Ziehl Neelsen), ce qui représente un élément majeur pour une prise en charge thérapeutique adaptée. Ainsi, cet examen permet une orientation rapide (bacilles à Gram négatif, cocci à Gram

positif et organismes acido-résistant) et permet éventuellement de cibler le choix des milieux et des conditions de culture spécifiques. Il permet également d’orienter le prescripteur pour la mise en route d’une antibiothérapie probabiliste. Il existe plusieurs méthodes d’examen microscopique (voir tableau 03).

Tableau 03 : techniques de l’examen microscopique bactériologique :

Examen direct à l’état frais	Examen microscopique après coloration		Examen microscopique après réaction d’immunofluorescence
	Coloration non différentielle	Coloration différentielle	
Etat frais	coloration au bleu de méthylène	<ul style="list-style-type: none"> - Coloration de Gram - Coloration de Ziehl-Neelsen, - coloration des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) - coloration spéciales. 	<ul style="list-style-type: none"> - Immunofluorescence direct - Immunofluorescence indirect
État frais pour mise en évidence d'une capsule par méthode à l'encre de Chine			
État frais sur un microscope à fond noir			

1.2.Culture et isolement des bactéries

Dans ces méthodes, l’identification des microorganismes basée sur la culture a pour objectif initial d’obtenir une culture pure. Une culture pure contenant un seul type de microorganismes peut être obtenue de diverses manières à partir de cultures d’enrichissement. Les bactéries d’intérêt médical les plus fréquemment responsables d’infection arrivent à se

développer sur des milieux de culture. Ces milieux de culture sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite une identification bactérienne ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure.

Les méthodes d'isolement fréquemment utilisées comprennent l'ensemencement en surface, et l'ensemencement profond dans des milieux solides. Pour les organismes qui forment des colonies dans les milieux solides, la technique d'épuisement est rapide, facile et la méthode de choix. A partir de la collecte et de l'ensemencement répété d'une colonie isolée, une culture pure peut être obtenue. En utilisant des dispositifs d'incubation appropriés, il est possible de purifier les organismes aérobies et anaérobies dans des boîtes de milieu solide en utilisant la méthode d'ensemencement par épuisement. Il est également important de souligner que grâce à la culture, le microorganisme peut être identifié à partir de la production de certains métabolites libérés dans le milieu avec de l'acide lactique et d'autres, et donc la technique est basée sur la réaction du milieu avec les métabolites libérés (*yang et al., 2019*).

Un inconvénient majeur des milieux est le temps nécessaire à la détection, qui est généralement de 16 à 48 h, car cela dépend de l'incubation produisant suffisamment de colonies bactériennes (et donc d'enzyme) pour le développement de la couleur (*Varadi et al., 2017*).

Les milieux de culture utilisés en bactériologie doivent contenir les éléments nécessaires à la survie et à la multiplication des bactéries, et doivent posséder les propriétés physicochimiques convenant à cette culture (pH en particulier). Les milieux sont de différents types. Il s'agit soit de milieux de base, permettant la croissance d'espèces non ou peu exigeantes, soit de milieux enrichis par l'addition de diverses substances (sérum, œuf, sang, vitamines, etc.) qui autorisent la croissance de bactéries plus exigeantes. Il peut s'agir également de milieux rendus sélectifs par addition d'antibiotiques, d'antiseptiques ou de colorants qui vont inhiber les bactéries sensibles à ces composés.

1.2.1. Milieux de base

Un milieu de base est représenté par le bouillon nutritif ordinaire qui est composé de trois composants principaux, les peptones, les extraits de viande et les extraits de levure. Les peptones sont des hydrolysats enzymatiques de protéines animales ou végétales riches en acides aminés et en petits peptides. En fonction des enzymes utilisées, les compositions des peptones et leurs propriétés sont différentes. Les extraits de viande apportent des sels minéraux, des vitamines, des protéines peu dégradées et des glucides. Les extraits de levure, quant à eux, représentent une source d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles.

1.2.2. Milieux d'enrichissement

Ces milieux permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir de prélèvements paucimicrobiens. Il s'agit en général de milieux liquides riches permettant le développement d'un maximum de bactéries, y compris des milieux permettant le développement de bactéries anaérobies strictes. Parmi les plus utilisés, on trouve le bouillon nutritif, le milieu de Schaedler, le milieu cœur-cerveau (brain heart infusion [BHI]), le milieu de Rosenow. Des milieux d'enrichissement peuvent également être utilisés pour favoriser le développement de certaines bactéries de façon préférentielle aux bactéries présentes dans des flores. Il s'agit dans ce cas de milieux d'enrichissement sélectifs. Ainsi, la recherche par exemple de bactéries entéropathogènes dans les coprocultures utilise ces milieux (milieu de Muller-Kauffmann, eau peptonée alcaline, etc.). Le milieu de Muller-Kauffmann ou bouillon de base au tétrathionate est un milieu d'enrichissement sélectif pour les salmonelles contenant de la bile et du vert brillant.

1.2.3. Milieux d'isolement

Les milieux d'isolement, contrairement aux précédents, sont des milieux solides qui permettent d'obtenir des colonies isolées permettant d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries d'intérêt médical. Seules les géloses les plus couramment utilisées seront abordées. Seules les géloses les plus couramment utilisées seront abordées comme suit :

- **Gélose de base**

La gélose Cystine Lactose Electrolyte Deficient (C.L.E.D.) : est un milieu permettant l'isolement, la numération et la différenciation des germes urinaires. La différenciation des bactéries est basée sur leur capacité à fermenter ou non le lactose. S'il y a fermentation cela induit une acidification qui provoque une coloration jaune des colonies en présence de bleu de bromothymol (indicateur de pH). L'aspect des colonies attendues est le suivant :

E. coli : colonies jaunes, opaque, à centre légèrement plus foncé.

Klebsiella : colonies jaunes, très muqueuses.

Proteus : colonies bleues, translucides, généralement plus petites qu'*E.coli*.

Pseudomonas aeruginosa : colonies vertes, avec surface mate et contours irréguliers.

Streptococcus faecalis : colonies jaunes.

Staphylococcus aureus : colonies jaune foncé.

Staphylocoques à coagulase négative : colonies jaune pâle presque blanches.

Lactobacilles : colonies grises très petites avec une surface rugueuse.

Il est nécessaire de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce de la souche isolée. Le milieu C.L.E.D. est un milieu non sélectif. Toutefois, du fait de la faible teneur en électrolytes, le développement des *Shigella* peut être inhibé.

La gélose de Mueller Hinton : est reconnue par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

La méthode de Kirby-Bauer est basée sur la diffusion de substances antibiotiques imprégnées sur des disques en papier préalablement séchés qui doivent être déposés à la surface de la gélose. Les disques appliqués sur l'agar absorbent une quantité d'eau suffisante pour dissoudre l'antibiotique qui diffuse ainsi progressivement dans le milieu, suivant les lois physiques de diffusion des molécules à travers un gel. Il se forme ainsi un gradient de concentration de l'antibiotique autour de chaque disque. Tandis que le mécanisme de diffusion se produit, la multiplication des germes ensemencés à la surface de l'agar intervient. Au moment où se manifeste la phase logarithmique de croissance, les bactéries se multiplient plus rapidement que la diffusion de l'antibiotique ne peut progresser et les cellules bactériennes non inhibées continuent à se multiplier jusqu'à ce que la culture puisse être visualisée.

- **Gélose enrichie :**

Les géloses au sang : sont en général fabriquées à partir de gélose de base Columbia, plus riches, additionnées de sang de mouton ou de cheval. Ce milieu enrichi de sang est un milieu qui permet l'isolement des bactéries exigeantes sans interférer avec leurs réactions d'hémolyse. L'aspect des colonies est le suivant :

Pour les *Entérobactéries et Staphylocoques* : colonies lisses. Elles sont responsables des infections urinaires.

Pour les *Streptocoques* : colonies petites. Elles sont responsables d'infection pulmonaire, de gorge...etc.

La gélose Chocolat : enrichie avec le Supplément PolyVitaminique (PVS) (Chocolat + PVS) est un milieu destiné à l'isolement des bactéries exigeantes telles que *Neisseria (gonocoque et méningocoque)* et *Haemophilus*. L'aspect des colonies est le suivant :

NeisseriaGonocoques: colonies à aspect grisâtre. Après 48h, les colonies s'agrandissent et présentent des papilles. Cette bactérie est l'agent pathogène de la gonococie

NeisseriaMéningocoques: colonies à aspect transparent grisâtre, à bords réguliers. Certaines colonies peuvent présenter un aspect muqueux. Cette bactérie est l'agent pathogène de la méningite bactérienne.

Haemophilus : Petites colonies, grisâtres, facilement muqueuses et translucides. Elle provoque une infection des voies respiratoires.

Il est nécessaire de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce de la souche isolée.

Différents milieux sélectifs permettent de favoriser la croissance et donc d'identifier des bactéries responsables d'infections humaines (Voir tableau 04) :

Tableau 04 : Milieux sélectifs de quelques agents pathogènes :

Les bactéries pathogènes	L'infection bactérienne	Géloses sélectives
<i>Bordetella pertussis</i>	coqueluche	Les milieux de Bordet-Gengou ou les géloses au charbon contenant de l'acide nicotinique, sont rendus sélectifs par addition de céfalexine
<i>Brucella</i>	brucellose	La gélose de base Columbia ou la gélose de base pour brucella additionnées de sérum de cheval décomplémenté et de de glucose sont rendues sélectives par addition d'antibiotiques (polymyxine B, bacitracine, acide nalidixique, nystatine, vancomycine).
<i>Campylobactéries</i>	Campylobactériose	Les géloses de base sont variables en fonction des milieux (Columbia éventuellement associée à du charbon activé
<i>Clostridium difficile</i>	Inflammation intestinale	La gélose de base est rendue sélective par ajout de cyclosérine, de cefoxitine.
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	La diphtérie	La gélose de Tinsdale est une gélose de base contenant de la cystine supplémentée en sérum de bœuf, en tellurite de potassium et en thiosulfate de sodium.
<i>Escherichia coli O157 :H7</i>	Syndrome hémolytique et urémique	Le milieu utilisé est le milieu de Mac Conkey au sorbitol (SMAC)

Identification par des méthodes traditionnelles

<i>Legionelles</i>	Infection respiratoire : legionellose	Le milieu de base pour la recherche des légionelles est composé de charbon activé et d'extrait de levure. Il est supplémenté avec un tampon ACES/hydroxyde de potassium, du pyrophosphate ferrique, de la L-cystéine et du cétooglutarate dans le milieu BCYE, et peut être rendu sélectif par l'ajout de glycine, vancomycine, polymyxine, cycloheximide.
<i>Neisseria pathogenes</i>	Méningite	Plusieurs associations d'antibiotiques permettent de rendre sélectives pour les gonocoques et méningocoques des géloses enrichies. Il s'agit des associations VCN (vancomycine, colistine, nystatine), VCNT (vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime), VCAT (vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime)
<i>Pseudomonas</i>	Infection urinaire	Les géloses de base sont rendues sélectives par addition de cétrimide, éventuellement associé à l'acide nalidixique.
<i>Salmonella-Shigella</i>	Infections intestinale	<ul style="list-style-type: none"> • La gélose Hektoen • Le milieu Salmonella-Shigella contient du rouge neutre comme indicateur de pH et du vert brillant comme inhibiteur supplémentaire • La gélose XLD (xylose-lysine-désoxycholate)
<i>Les staphylocoques</i>	Infection urinaire	Le milieu de Chapman
<i>Staphylococcus aureus, les streptocoques hémolytiques, les entérocoques</i>	Infection urinaire	Les géloses Columbia ANC (acide nalixidique-colistine) ou CAP (colistine-aztréonam) sont des géloses de base Columbia rendues sélectives par addition d'antibiotiques.

<i>Streptococcus agalactiae</i>	Infection urinaire	Les géloses Granada contiennent de l'amidon et du sérum qui favorisent la production du granadaène par la bactérie qui est un pigment de couleur orangée
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yersiniose	Le milieu de Schiemann CIN (cefsulodine-irgasan-novobiocine)

2. Diagnostic rapide en bactériologie par recherche d'antigènes

Les antigènes tels les protéines des flagelles, des pilis, et les protéines de surface (outer membranes [OM]) ainsi que les acides teichoïques ont donné lieu, jusqu'à maintenant, à peu de développements dans une perspective de diagnostic. Toutefois, des publications récentes font état de résultats encourageants dans la recherche de protéines OM d'*Haemophilus* et d'antigènes flagellaires de *Salmonella*. Les antigènes capsulaires polysaccharidiques des pneumocoques, *Haemophilus*, méningocoques sont les plus couramment recherchés. Des travaux ont aussi porté sur l'antigène Vi de *Salmonella Typhi*. Le polysaccharide C des streptocoques, constituant de la paroi, peut aussi être détecté (surtout *streptocoques* A et B et récemment *Streptococcus pneumoniae*). La recherche de toxines de nature protéique connaît de récents développements.

Dans la pratique, à ce jour, les techniques qui ont débouché sur des applications de routine, voire sur la commercialisation de réactifs tout prêts, utilisent l'immunofluorescence, l'immunocapture, la contre-immunoelectrophorèse, l'agglutination de particules de latex et les techniques immuno-enzymatiques. La technique la plus utilisée est l'immunocapture, cette technique a révolutionné le diagnostic rapide. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une ligne colorée. Différents antigènes peuvent être recherchés en immunocapture. Certaines recherches relèvent de la routine : antigènes des légionelles et pneumocoques sur urines, toxines de *Clostridium difficile* sur selles, antigènes de groupe A de *Streptococcus pyogenes* sur prélèvements de gorge et de groupe B de *Streptococcus agalactiae* sur prélèvements génitaux ou mère-enfant, *Helicobacter pylori* dans les selles, *Chlamydia trachomatis* sur prélèvement d'endocol. D'autres recherches, plus confidentielles, peuvent être appelées à des développements tels que la toxine diphtérique sur prélèvements de gorge, antigène F1 de *Yersinia pestis* sur prélèvements bronchiques, de *Neisseria gonorrhoeae* sur prélèvements génitaux.

Les kits commerciaux sont utilisés pour identifier une variété d'organismes à partir d'échantillons de fluides corporels. La maladie du légionnaire est diagnostiquée à partir d'un

échantillon d'urine, une méningite à méningocoque ou à pneumocoque due au liquide céphalo-rachidien et *Streptococcus pyogenes* à partir d'un prélèvement de gorge. Récemment, un kit commercial pour la détection de l'antigène *Helicobacter pylori* dans les selles a été développé, qui a une plus grande sensibilité et spécificité que la détection d'anticorps contre cet organisme. L'avantage de cette approche est sa rapidité.

3. Méthodes analytiques biochimiques pour détecter les micro-organismes

3.1.Méthodes biochimiques traditionnelles

En microbiologie, les méthodes d'identification traditionnelles reposent principalement sur des procédures de culture utilisant divers milieux pour dénombrer, isoler et identifier des micro-organismes spécifiques. Pendant de nombreuses années, ces méthodes ont été largement utilisées et elles continuent d'être utilisées de nos jours, en particulier dans certaines routines de laboratoire où un type particulier de microorganismes doit être identifié rapidement (par exemple, dans un diagnostic médical pour la détection d'un pathogène particulier). Bien qu'étant peu coûteuses et permettant des informations à la fois quantitatives et qualitatives sur la diversité des microorganismes présents dans un échantillon. Ces méthodes sont laborieuses et prennent du temps (préparation du milieu, dilution, ensemencement, incubation, comptage, isolement et caractérisation) et les résultats sont observés seulement après plusieurs jours, et fréquemment des faux positifs sont obtenus, surtout en considérant des espèces microbiennes similaires (*Buszweski et al., 2017 ; juste et al., 2008*). Un autre problème associé aux méthodes basées sur la culture est le fait qu'elles ne peuvent pas identifier les cellules non cultivables.

Les méthodes d'identification phénotypique intègrent généralement des réactions à différents produits chimiques. L'une des méthodes traditionnelles les plus utilisées est une simple détection visuelle de la croissance de l'organisme testé en présence d'un substrat par augmentation de la turbidité. Les résultats sont déterminés en comparant le microbien à l'analyse avec un test de contrôle, et une carte Wickerham est utilisée pour lire la turbidité (*Ohara, 2005*). Ce type de réaction peut être difficile à lire et implique toujours un minimum d'une nuit d'incubation. Les dosages immunologiques tels que le dosage immunoenzymatique (ELISA), bien qu'efficaces, sont coûteux et ne sont conçus que pour certaines espèces bactériennes. Pendant de nombreuses années, les chercheurs ont utilisé l'appareil de test API 20E (indice de profil analytique 20E) (Voir figure 14), qui consistait en une pièce en plastique avec 20 cupules contenant des substrats à base de pH permettant l'identification de près de 100

taxons. Jusqu'en 1992, cette méthode était considérée comme «l'étalon-or» en particulier en microbiologie clinique. Un avantage significatif de cette méthode était la disponibilité d'une base de données étendue, bien qu'elle présente un inconvénient majeur lié au fait qu'elle prenait du temps. D'autres méthodes automatiques ont commencé à apparaître au cours de cette décennie, notamment des améliorations du système API 20E (*Franco-Duarte et al., 2019*). Dans une tentative de réduire le temps nécessaire à la procédure en utilisant des automatisations récurrentes. The BBL Crystal (*varettas et al., 1995*) est également une variante du système API. Une version automatisée de l'API est le système Vitek® (voir figure 15), développé pour la première fois dans les années 1970, qui a éliminé la subjectivité de la lecture des réactions de test (*Funke et al., 2004*). Le système Vitek® est utile pour l'identification bactérienne simultanée et les profils de test de sensibilité aux antimicrobiens (AST) à partir d'échantillons isolés de patients (*puttaswamy et al., 2018*). Le système utilise une technique de microdilution en bouillon totalement automatisée qui applique une atténuation de la lumière mesurée par un scanner optique pour la croissance ou aucune détection de croissance (il est crucial que les échantillons dans les cartes soient des isolats purs) (*ligozzi et al., 2002*). L'appareil surveille régulièrement la croissance sur une période de 18 à 24 h pour les bactéries. Bien qu'il soit polyvalent, il existe certains micro-organismes qui conduisent à des rapports de CMI corrects ou à un rendement non fiable (par exemple, les pseudomonas) (*puttaswamy et al., 2018 ; jorgensen et al., 2009*). Une variante du Vitek® est le système BiologOmniLog. Il s'agit d'une méthode rapide et standardisée pour déterminer l'oxydation bactérienne (colorant redox tétrazolium) de différentes sources de carbone simultanées (sucres, acides carboxyliques, acides aminés et peptides, où 71 sont des sources de carbone et 23 sont des dosages chimiques comptant le pH, la tolérance au sel et tests de sensibilité chimique). Les résultats obtenus sont comparés à une base de données (*Kingler et al., 1992*). Il est disponible pour l'identification phénotypique des bactéries et champignons (filamenteux et levures). Avec l'avancement des connaissances en biochimie et l'apparition d'une instrumentation plus robuste, ces méthodes ont commencé à être utilisées de moins en moins en plus des méthodes biochimiques modernes ont été développées, avec de nombreux avantages par rapport aux méthodes conventionnelles basées sur la culture, tels que des temps d'analyse courts et la capacité de déterminer simultanément de nombreux micro-organismes, tout en conservant la précision des résultats.



Figure 14 : Résultats positif et négatif d'une galerie API 20E.



Figure 15 : Le système Vitek® pour l'identification bactérienne.

Récemment, la spectrométrie de masse (Sm) est devenue une partie du laboratoire de microbiologie offrant une alternative rapide et fiable pour l'identification des micro-organismes, y compris l'un des groupes bactériens identifiables les plus difficiles, les mycobactéries.

3.2.Méthodes basées sur la spectrométrie de masse

La recherche sur l'identification des microorganismes a évolué principalement en suivant la stratégie de réduction du temps nécessaire pour l'identification des microorganismes dans les diagnostics de routine. Pour cela, l'utilisation de systèmes semi-automatiques et automatiques basés sur des méthodes biochimiques a constitué une avancée majeure dans ce domaine. Les méthodes basées sur la spectrométrie de masse (Sm) ont gagné en popularité en tant qu'outil de typage microbien en raison de leur rapidité, de leurs coûts réduits, de leur simplicité et de leur applicabilité à un large éventail de micro-organismes notamment les bactéries (*Franco-Duarte et al., 2019*).

- **Principe de la spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés organiques et des biomolécules analysées ainsi que leur identification et leur quantification. Le premier spectromètre de masse a été conçu par Francis William Aston en 1919. L'ensemble était constitué de l'association d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur (voir figure 16) (*Gravet et al., 2013 ; Gravet et al., 2011*).

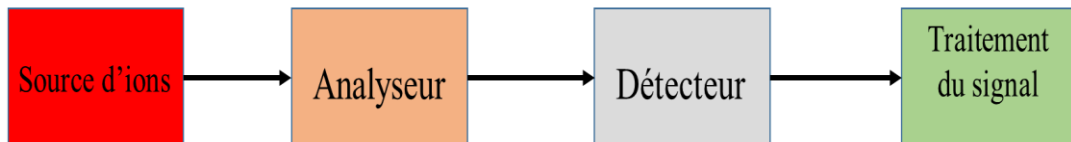


Figure 16 : Etapes du déroulement de la spectrométrie de masse.

Tous les spectromètres de masse répondent à ce schéma de base. La source produit des ions, puis l'analyseur de masse permet une séparation des ions formés en fonction du rapport m/z (masse sur charge). Cette séparation se fait grâce à l'utilisation de champs électriques et/ou magnétiques. Enfin, l'analyseur permet la détection des ions, un traitement informatique permettant d'obtenir un spectre.

Pour l'identification des microorganismes la contrainte était d'étudier des protéines ribosomiques et membranaires composant une cellule bactérienne, donc d'extraire les protéines sans trop les dénaturer afin de pouvoir les séparer ensuite en fonction de leur taille (*Gravet et al., 2013*). Les principales techniques d'ionisation douce utilisées dans l'identification des micro-organismes sont l'électrospray ionization (ESI) et le MALDI, basées sur l'analyse des spectres protéiques (*Franco-Duarte et al., 2019*).

3.2.1. Désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI) -Temps de vol (TOF)

MALDI-TOF MS est le dernier outil de nouvelle génération utilisé pour l'identification et la classification rapides des micro-organismes. La source d'ionisation MALDI (Matrix assisted laser desorption ionization) permettant une désorption-ionisation douce des macromolécules biologiques (peptides, protéines) pour une analyse sur cellules entières à l'aide d'une matrice (*Gravet et al., 2011*). Il est basé sur l'ionisation des cellules microbiennes avec de courtes impulsions laser puis sur l'accélération des particules dans un système de vide à l'aide d'un champ électrique (*Sandrin et al., 2018 ; Dierig et al., 2015*). Après l'ionisation, une

empreinte moléculaire sous la forme d'un profil spectral est obtenue, qui est spécifique à chaque microorganisme. Ce spectre est ensuite comparé à une base de données existante, aboutissant à son identification par un programme automatisé. La préparation d'échantillons pour MALDI-TOF MS implique une cristallisation avec un grand excès molaire de matrice (généralement un acide organique absorbant les UV) sur des plaques cibles (voir Figure 17) (Schauer *et al.*, 2005).

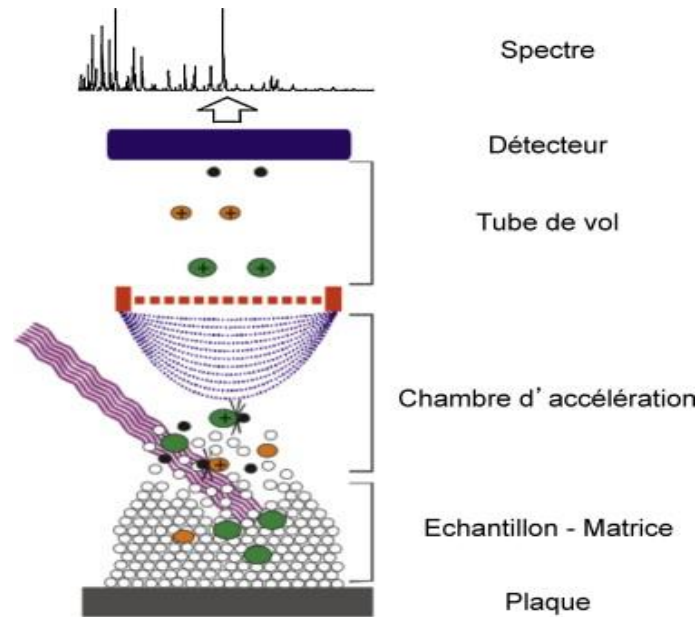


Figure 17 : Schéma du spectromètre de masse et principe de la technique MALDI-TOF.

La technologie MALDI-TOF MS en microbiologie peut identifier les microorganismes jusqu'au niveau de l'espèce, voire dans certains cas à la sous-espèce. A partir d'une base de données de spectres, le logiciel associé recherche la correspondance à l'espèce de la bactérie selon un indice de fiabilité entre les deux spectres. Le MALDI-TOF MS ne donne toutefois pas d'information sur le sérotype ni sur la pathogénicité de l'espèce (ex : *Vibrio parahaemolyticus*) (Polet *et al.*, 2013). Actuellement, la banque de spectres de la firme Bruker permet l'identification de 3.476 organismes cellulaires: 3.216 bactéries (entérobactéries, bacilles Gram négatif non fermentants, staphylocoques, streptocoques, mycobactéries, bactéries anaérobies, ...) (Descy *et al.*, 2010).

3.2.2. Ionisation par électronébulisation

Une alternative au MALDI-TOF qui entraîne parfois des problèmes liés à l'utilisation d'une matrice chimique (mélangée à l'échantillon) et du laser (utilisé pour effectuer la désorption et l'ionisation de l'analyte), est une technique appelée ionisation électrospray (ESI)-MS qui analyse les échantillons à l'état liquide et l'ionisation est réalisée à pression atmosphérique, sans avoir recours aux mêmes lasers que dans MALDI-TOF-MS. En raison de cet aspect particulier, ESI-MS a un large spectre d'applications concernant l'identification microbienne (*Franco-Duarte et al., 2019*). L'avantage de cette méthode d'ionisation douce est l'obtention majoritaire d'ions multichargés, favorisant l'analyse des *macromolécules* (*Suarez, 2013*).

Les spectromètres de masse sont des appareils sensibles aux variations de température, aux vibrations, à l'empoussièrement. Les fabricants indiquent, le plus souvent des limites de température d'utilisation ainsi que des variations sur un temps donné. Une maintenance ou un suivi insuffisant du spectromètre peuvent être responsable d'une moindre performance de l'identification.

La spectrométrie de masse connaît ses propres limites actuellement, notamment dans l'identification des microorganismes non cultivables et les analyses des échantillons plurimicrobiens surtout si une espèce est prédominante par rapport aux autres présentes. Certaines limites pourront probablement être surmontées grâce à de nouvelles avancées dans la technologie de préparation de l'échantillon.

3.2.3. Méthodes spectroscopiques

Un certain nombre de méthodes d'identification rapides ont été développées pour améliorer la précision du diagnostic de la tuberculose et pour accélérer l'identification présomptive des espèces de *Mycobacterium*. La plupart de ces méthodes ont été validées pour un groupe limité de micro-organismes uniquement. Ici, la spectroscopie Raman a été comparée au séquençage de l'ARNr 16S pour l'identification des souches complexes de *Mycobacterium tuberculosis*. Dans une étude, la sensibilité de la spectroscopie Raman pour l'identification des espèces de *Mycobacterium* était de 95,2% et toutes les souches de *M. tuberculosis* ont été correctement identifiées (7 sur 7; 100%). La spectroscopie Raman apporte une nouvelle réponse au besoin d'identification rapide des espèces de mycobactéries cultivées dans un contexte de diagnostic clinique (*Buijts et al., 2008*).

Les méthodes qui se basent sur l'analyse de protéines reposent en réalité sur l'expression de certains gènes et donc une absence d'activité peut conduire à des erreurs d'identification. Pour cela différentes techniques moléculaires se basant sur la présence ou pas de gènes sont utilisées pour des identifications précises.

*Chapitre III : identification
par des méthodes moléculaires*

1. Méthodes moléculaires utilisées pour détecter les bactéries

Ces dernières années et avec l'avènement de nouvelles méthodologies basées sur des méthodes moléculaires, de grands progrès ont été réalisés dans le diagnostic des bactéries cliniquement pertinentes. Parmi eux, se démarquent la détection de l'ARN ribosomal par hybridation avec une sonde ADN et celle de l'amplification d'acides nucléiques à partir d'échantillons cliniques. Ces techniques améliorent la sensibilité et la spécificité diagnostique par rapport à d'autres techniques de détection, y compris la culture, et, dans certains cas, ont permis la détection simultanée de plusieurs agents microbiens à partir du même échantillon (*Castro- Escarpulli et al., 2016*)

1.1.Détection d'un pathogène bactérien spécifique

Les techniques d'amplification des acides nucléiques, sont de plus en plus utilisées en microbiologie pour le diagnostic étiologique des maladies infectieuses. Les techniques d'amplification basées sur la détection d'ADN à l'aide de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et de la réaction en chaîne par ligase (LCR) sont déjà disponibles pour être réalisées ou obtenues dans le commerce. Ces techniques fournissent des résultats plus rapides avec une meilleure sensibilité et spécificité que les techniques conventionnelles. Selon le type d'échantillon, ces techniques détectent de 15 à 20% plus d'agents infectieux que les conventionnels (*Castro- Escarpulli et al., 2016*).

1.1.1. Amplifications par cycles thermiques

De manière générale, après l'extraction des acides nucléiques, ces derniers doivent être amplifiés avant d'être analysés (voir figure 18) :

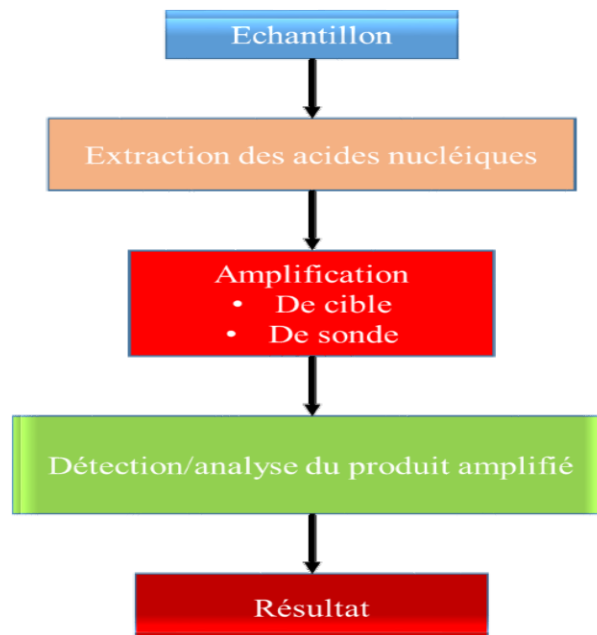


Figure 18 : Principales étapes d'analyse d'un échantillon en biologie moléculaire.

• PCR, RT-PCR et la PCR en temps réel

L'amplification d'une séquence cible par PCR conventionnelle à l'aide de deux amorces est généralement détectée et visualisée par électrophorèse sur gel à l'aide de colorants fluorescents se liant à l'ADN. La PCR en temps réel offre de nombreux avantages par rapport à la PCR conventionnelle, tels qu'une sensibilité et une rapidité accrues, la possibilité de la quantification de l'échantillon de départ, un spectre dynamique plus large, l'élimination des étapes de traitement post-amplification et un débit plus élevé propice à l'automatisation. Les sensibilités et spécificités de ces tests peuvent toutefois être affectées par le type d'échantillon utilisé, la méthode d'extraction des acides nucléiques et la qualité des amorces et des sondes fluorescentes utilisées dans les tests.

Bien que la PCR en temps réel soit largement utilisée en raison de sa sensibilité accrue, la principale limitation de cette technologie est le coût élevé des réactifs et des instruments spéciaux par rapport à la PCR conventionnelle. La conception d'amorce et de sonde de PCR en temps réel peut être source de confusion car un petit amplicon (<500 paires de bases) est préférable. La manipulation post amplification de l'amplicon, telle que le clonage ou le séquençage, peut également être difficile. Enfin, l'incapacité à déterminer la taille de l'amplicon pourrait être considérée comme un inconvénient par certains chercheurs.

Les PCR se sont révélées particulièrement utiles pour détecter l'ADN de micro-organismes difficiles à cultiver (*Mycoplasma* et *Chlamydia*), poussant lentement

(*Mycobacterium tuberculosis*), ne supportant que très mal la dessiccation (*Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella*) ou présents en faible quantité dans l'échantillon clinique (*Listeria monocytogenes* dans le liquide céphalorachidien). De plus, contrairement à la culture, la détection de l'agent infectieux par PCR n'est que peu influencée par quelques doses d'antibiotiques (*Jaton et al., 2007*).

- **Nested PCR**

Nested PCR est une méthode de PCR conventionnelle qui amplifie une région cible de l'ADN avec une paire d'amorces externe dans une réaction initiale, suivie d'une seconde amplification à l'aide d'une paire d'amorces interne. Il est utile pour la détection d'agents pathogènes dans les échantillons cliniques en raison de sa sensibilité accrue sur une seule amplification, mais peut être problématique en raison de la contamination par transfert de la première réaction à la seconde. Elle a également été utilisée pour la détection des gènes ARNr 16S et 23S à partir d'une variété de bactéries et fournit plusieurs amplicons se chevauchant pour un séquençage précis de ces gènes (*Mothershed et al., 2006*).

- **PCR Elisa**

La PCR Elisa est une alternative viable aux méthodes de PCR en temps réel. Les produits de PCR sont marqués (par exemple, par la digoxigénine) pendant l'amplification et une sonde de capture spécifique de l'amplicon PCR est utilisée pour immobiliser l'amplicon dans un puits d'une plaque de microtitrage. Un anticorps lié à une enzyme ciblant le marqueur (par exemple, anti-digoxigénine) est ensuite utilisé pour quantifier les produits de PCR. Yam et al. 2004, démontrent qu'une PCR-ELISA biotinylé pour la détection directe de *M. tuberculosis* à l'aide d'une méthode de Nested PCR à tube unique fournit un test simple, précis et à haut débit avec une grande sensibilité et spécificité (*Mothershed et al., 2006*).

- **LCR (ligase chain reaction)**

Il s'agit d'une technique d'amplification de sondes. Après hybridation de quatre sondes adjacentes (deux sondes spécifiques du brin sens et deux spécifiques du brin antisens), les sondes sont collées à l'aide d'une ligase à condition que la complémentarité soit absolue

(absence de mésappariement). Plusieurs cycles permettent ainsi l'amplification des sondes « collées ». Ses performances sont similaires à celles de la PCR (*Lamoril et al., 2007*).

La méthode LCR présente, comme grand avantage, la rapidité d'analyse (analyse faite dans la journée). Le gain de temps est en faveur de la LCR réalisable en 4-5 heures avec très peu de manipulations. L'automatisation de la méthode LCR permet une bonne reproductibilité des résultats contrairement à la méthode PCR où certaines valeurs douteuses doivent être confirmées (*Ninet et al., 1998*). La méthode LCR est une technique de détection de *C. trachomatis* extrêmement prometteuse, très sensible et facile à réaliser. Le risque de contamination est réduit du fait de la non-ouverture des tubes entre l'amplification et la détection. Cependant, l'existence de faux négatifs justifierait l'utilisation d'un contrôle interne permettant de distinguer les prélèvements vraiment négatifs de ceux négatifs par présence d'inhibiteurs (*Barbeyrac et al., 1995*).

Toute contamination de l'échantillon par de l'ADN bactérien peut entraîner des réactions faussement positives. Ces contaminations peuvent survenir lors du prélèvement au lit du malade, lors de la préparation de l'échantillon, lors de l'extraction de l'ADN ou lors de la PCR. Elles peuvent être dues à un autre échantillon positif dans la même série de PCR, à des amplicons d'une série précédente ou une contamination des réactifs (eau par exemple). Le *Pseudomonas*, l'*Aeromonas* et le *Sphingomonas* sont de fréquents contaminants des réactifs. De ce fait, lors de chaque extraction, un témoin négatif d'extraction subit les mêmes procédures que le prélèvement (*Jaton et al., 2007*).

Le gène de l'ARNr 16S est hautement spécifique à chaque espèce bactérienne, ce qui en fait une cible idéale pour l'identification. La méthode standard implique l'amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S, suivie d'un séquençage et d'une comparaison avec des bases de données connues pour l'identification (*Franco-Duarte et al., 2019*).

Différents gènes cibles sont utilisés pour la détection de micro-organismes, par exemple ceux provoquant des infections à transmission sexuelle (IST), qui ont été utilisés dans des tests PCR; parmi eux, les gènes *omp1* et *omp2* des principales protéines membranaires (MOMP) pour étudier les principaux agents étiologiques; le plasmide cryptique *pCT* et les gènes ARNr 16S et ARNr 23S, pour des tests visant à identifier *C. trachomatis*. Se concentrer sur les gènes ARNr 16S et ARNr 23S augmente la sensibilité du test, car normalement il y a plusieurs copies dans les micro-organismes. Cependant, certains auteurs suggèrent que les réactions croisées avec d'autres bactéries pourraient poser un problème; tandis que d'autres ont démontré que l'utilisation de régions conservées de l'ARNr du gène 16S dans les réactions d'amplification

permet une différenciation spécifique à l'espèce. L'utilisation de gènes et de régions cibles pour la détection des mycobactéries est un domaine bien étudié, notamment en raison de la difficulté posée pour l'isolement de ces microorganismes à partir d'échantillons biologiques et de plus en raison des difficultés actuelles de manipulation de ces microorganismes très virulents. Plusieurs séquences, gènes et régions intergéniques ont été utilisés pour l'identification de ce genre bactérien, parmi lesquels la région ARNr 16-23S, les gènes ARNr 16S, *gyrB* et *rpoB*, l'élément d'insertion IS6110 et les régions d'élimination de différenciation RD1 et RD4. L'étude de ces gènes ou séquences géniques par PCR permettra à terme une analyse comparative des séquences du produit obtenu avec les séquences des isolats de référence. Plusieurs sondes commerciales pour le diagnostic de maladies infectieuses ont été conçues, mais la capacité de détecter un petit nombre d'organismes ou quelques copies du gène dans l'échantillon clinique reste un facteur limitant de cette technique. Cependant, la combinaison de la PCR avec l'hybridation des sondes peut devenir la méthode de choix, en particulier, pour les microorganismes dont la culture en laboratoire est lente et difficile (*Castro-Escarpulli et al., 2016*).

1.1.2. Technologies d'amplification isotherme et autres

D'autres techniques d'amplification ont été décrites pour la recherche d'agents infectieux :

- **Amplification basée sur la séquence d'acide nucléique**

L'amplification basée sur la séquence d'acide nucléique (NASBA) est une méthode d'amplification isotherme basée sur la transcription qui amplifie l'ARN à partir d'une cible ARN ou ADN et utilise la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire, la RNase H et l'ARN polymérase T7. La NASBA a été utilisée pour détecter divers agents pathogènes bactériens, notamment *Escherichia coli* et *Mycoplasma pneumoniae* (*Loens et al., 2003*). La NASBA a démontré une sensibilité équivalente ou améliorée aux méthodes basées sur la PCR et a l'avantage potentiel d'être plus facile à optimiser que la PCR conventionnelle (*Mahony et al., 2001*).

- **Amplification médiée par la transcription (TMA)**

La TMA est une autre méthode d'amplification isotherme qui peut être utilisée pour cibler l'ADN ou l'ARN. La TMA utilise la transcription d'ARN (ARN polymérase) et la synthèse d'ADN (transcriptase inverse) pour produire un amplicon d'ARN à partir d'un acide nucléique cible. Étant donné que l'ARN est plus labile que l'ADN dans l'environnement de laboratoire, cette caractéristique diminue la possibilité de contamination par transfert. La TMA produit de 100 à 1000 copies par cycle par rapport à la PCR et à la LCR qui ne produisent que 2 copies par cycle. Il en résulte une multiplication par 10 du nombre de copies en 15 à 30 minutes environ. La TMA a gagné en popularité dans le laboratoire clinique avec le développement de tests commerciaux, y compris les tests APTIMA pour la détection de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* (Hill, 2001).

- **SDA (Amplification par déplacement de brin) :**

Cette technique est réalisée à l'aide de deux enzymes thermorésistantes, une enzyme de restriction et une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléasique. Le principe est complexe. Il est basé sur la coupure partielle de l'ADN par l'enzyme de restriction puis le déplacement du brin ainsi formé par l'ADN polymérase. La fin de la réaction, environ 10^9 copies sont obtenues après amplification de l'ADN cible. Les résultats sont équivalents à ceux obtenus avec la PCR. La SDA est à la base de certains tests de détection commerciaux tels que BDProbeTec et a été récemment évaluée pour l'identification de *M. tuberculosis* directement à partir d'échantillons cliniques (McHugh et al., 2004). Une étude du test BDProbeTec pour *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* sur des échantillons vaginaux sur écouvillon a montré une sensibilité et une spécificité équivalentes à celles de la PCR pour la détection de *C. trachomatis* et supérieures à celles de cultures pour la détection de *N. gonorrhoeae* (Casentino et al., 2003).

- **Amplification en cercle roulant (RCA):**

Dans l'amplification en cercle roulant (RCA), une seule amorce avant est étendue par l'ADN polymérase le long d'une matrice circulaire pendant de nombreux tours, déplaçant les séquences en amont et produisant un long ADN simple brin de multiples répétitions. La réaction linéaire RCA peut durer plusieurs heures ou jours, produisant des millions de copies de la séquence de petits cercles. Dans RCA exponentiel, une paire d'amorces est utilisée. La

deuxième amorce cible le produit d'ADN simple brin de la première amorce et initie une hyper-ramification dans la réplication de l'ADN, créant jusqu'à 10^{12} copies / h. Comme c'est le cas pour toutes les technologies isothermes, il n'y a pas besoin d'instrumentation spéciale, car le cycle de température n'est pas nécessaire. Un avantage majeur du RCA est que, contrairement à la PCR, cette technologie est résistante à la contamination et, contrairement à certaines autres technologies isothermes, nécessite peu ou pas d'optimisation du dosage (*Demidov, 2002*).

- **Technologie de sonde cyclique (CPT)**

Il s'agit d'une technique d'amplification de signal. Dans son principe, elle amplifie l'ADN cible à partir d'une sonde chimérique ARN-ADN (une séquence ARN limitée de chaque côté par une séquence ADN). Le test VelogeneRapid MRSA Identification Assay (ID Biomédical, basé sur une sonde, a déjà été utilisé pour la détection de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), (*Louie et al., 2000*).

- **ADNbranché**

Cette technique est basée sur l'hybridation spécifique à partir de l'ADN ou de l'ARN cible d'un certain nombre de sondes dont certaines sont chimiquement branchées (elles n'existent pas à l'état naturel). Le signal est révélé à l'aide de sondes marquées à la phosphatase alcaline. L'ADNb a été utilisé pour détecter le gène *mecA* dans le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (*Zheng et al., 1999*).

- **Système de capture d'hybrides (Hybrid Capture)**

Dans cette technique d'amplification de signal, l'ADN cible est hybridé à une sonde ARN spécifique. L'hybride ADN-ARN ainsi constitué est capturé par des anticorps spécifiques sur un support solide. L'hybride est détecté par un deuxième anticorps marqué à la phosphatase alcaline. Des systèmes de capture hybrides sont disponibles pour détecter *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*. Un avantage à utiliser un test d'amplification de signal par rapport à un test d'amplification cible (par exemple PCR) est que les amplicons ne sont pas produits en laboratoire; par conséquent, le risque de contamination croisée des réactions ultérieures est réduit. Apparemment, la sensibilité n'est pas perdue avec les tests d'amplification du signal. Des

études indépendantes ont montré que le kit DigeneHybrid Capture II était un test hautement sensible et spécifique pour la détection de *C. trachomatis* (*Van De Pol et al., 2002*)

1.2.Détection des bactéries pathogènes par des cibles multiples ou des cibles universelles

L'inconvénient majeur des dosages spécifiques à un organisme est qu'ils ont une portée limitée et ne sont utiles que lorsqu'un agent particulier est suspecté. Pour cette raison, des technologies telles que la PCR multiplexe, Microarray et les dosages PCR à large spectres ont été développés dans le but de tester simultanément plusieurs organismes ou comme moyen de cribler des échantillons cliniques pour des agents étiologiques bactériens (*Mothershed et al., 2006*).

- **PCR multiplex**

La PCR multiplex utilise plus d'un ensemble d'amorces dans une réaction et peut être utilisée pour la détection simultanée de plusieurs bactéries pathogènes. La PCR multiplex est également utile pour détecter une cible spécifique à une espèce et une cible spécifique à un sérotype en une seule réaction. Par exemple, Tahaa développé une PCR multiplex pour la détection de *Neisseriameningitidis* dans laquelle 6 paires d'amorces spécifiques du sérotype sont ajoutées en une seule réaction. Comme pour toute méthode, la PCR multiplex n'est pas sans inconvénients. Des problèmes tels qu'une faible sensibilité, une réactivité croisée et une liaison préférentielle de SYBR \ Green I à des produits d'amplification G + C% plus longs et plus élevés ont été rapportés pour les réactions multiplex (*Mothershed et al., 2006*).

- **Identification basée sur le séquençage**

Si un test pour un pathogène bactérien spécifique n'est pas disponible ou lorsque plusieurs agents peuvent être impliqués comme la cause de la maladie, une approche de détection à large spectre peut être utile. Des cibles universelles telles que les gènes de l'ARNr 16S ou la région inter-espaceur du gène de l'ARNr 16S - 23S ont été largement utilisées pour l'identification bactérienne, en particulier si les bactéries sont difficiles à isoler par des méthodes conventionnelles (*Patel, 2001*). Le séquençage du gène de l'ARNr 16S a également été utilisé avec succès pour détecter les agents pathogènes à partir de la culture- échantillons négatifs. En

outre, des travaux récents ont indiqué que les séquences génétiques de l'ARNr 16S peuvent constituer la base de schémas de sous-typage pour certains pathogènes (*Nilsson et al., 2003*).

L'identification bactérienne par séquençage du gène de l'ARNr 16S est devenue de plus en plus populaire auprès des laboratoires cliniques, car les coûts ont diminué et un débit amélioré est devenu disponible ces dernières années (*Patel, 2001*). Une étude récente indique même que le coût du séquençage du gène de l'ARNr 16S peut être aussi bas qu'un tiers du coût des méthodes d'identification conventionnelles (*Cook et al., 2003*).

La rapidité avec laquelle l'identification peut être faite par séquençage du gène de l'ARNr 16S par rapport aux méthodes biochimiques traditionnelles est également un avantage (*Patel, 2001*) en particulier dans les cas où les méthodes conventionnelles étaient inadéquates, par exemple, des organismes exigeants, tels que *Mycobacteria* spp., peuvent être identifiés en 24 h par séquençage du gène de l'ARNr 16S (*Clarridge, 2004*). En fait, pour certains pathogènes, le séquençage du gène de l'ARNr 16S peut être le seul test rapide disponible car les tests basés sur la PCR n'ont pas encore été développés (*Cook et al., 2003*). Comme pour toute méthode de diagnostic, l'utilisation d'une cible génique universelle telle que l'ARNr 16S présente certains pièges. Certaines des séquences des bases de données publiques sont connues pour contenir des erreurs (*Harmsen et al., 2002*), en particulier celles soumises avant le développement de systèmes de séquençage automatisés haute-fidélité (*Gee et al., 2004*). Parce que les amorces du gène de l'ARNr 16S ciblent des séquences conservées et que le gène de l'ARNr 16S est omniprésent parmi toutes les bactéries, une séquence peut être amplifiée à partir d'une bactérie contaminante au lieu du pathogène étiologique. D'autres cibles universelles telles que les protéines de choc thermique, comme la hsp65 ou les protéines de choc à froid ont également été utilisées pour identifier les bactéries à partir d'échantillons cliniques (*Mothershed et al., 2006*).

Le pyroséquençage est une technologie par laquelle une matrice d'ADN simple brin est préparée, une amorce de séquençage est hybridée à une séquence complémentaire sur la matrice et des enzymes catalysent une réaction légère lorsque chaque nucléotide est incorporé dans le brin l'ADN en croissance. Le pyroséquençage a été utilisé pour identifier et caractériser des pathogènes bactériens tels que *Helicobacter pylori*, *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*, et distinguent rapidement les bactéries pathogènes des bactéries non pathogènes dans des échantillons complexes. Le principal avantage de cette technologie est que le prix par réaction d'échantillon peut coûter 10 fois moins cher que le séquençage fluorescent (*Mothershed et al., 2006*).

- **Microarray**

Parmi les variétés de puces d'ADN se trouvent les microarrays, matrice (en verre ou en silice) en deux dimensions sur laquelle sont fixées selon différents protocoles des sondes d'ADN de plus ou moins grande taille dans un ordre spécifique. Certaines puces peuvent aussi être dessinées à façon et commandées. Les ADN cibles marqués sont hybridés à la puce puis révélés par un automate dédié et analysés par un logiciel adapté. Les microarrays ne sont pas encore passés dans le domaine de la routine de biologie moléculaire. Le coût élevé de fabrication des puces, des appareils et logiciels, l'interprétation délicate, l'absence de contrôle de qualité rendent le passage à la routine encore difficile. Cette instrumentation est cependant promise à un bel avenir dans les laboratoires de microbiologie spécialisée (**Lamoril et al., 2007**).

1.3.Détection des bactéries pathogènes par hybridation d'acide nucléique ou spectrométrie de masse

La découverte de la PCR a révolutionné le diagnostic moléculaire au cours de la dernière décennie, et il semble que le nombre de test basés sur la PCR en cours de développement imite l'amplification exponentielle des molécules cibles! Cependant, des méthodes de détection de bactéries sans amplification sont également disponibles dans le commerce ou évoluent au point de pouvoir être facilement mises en œuvre dans un laboratoire clinique. La plupart des tests moléculaires sans amplification disponibles dans le commerce reposent sur la détection d'une cible spécifique par des signaux de chimioluminescence, colorimétrique ou fluorescents

- **Hybridation in situ par fluorescence**

Les tests d'hybridation in situ par fluorescence (FISH) utilisent des sondes ARNr 16S ou ARNr 23S marquées par fluorescence et une microscopie par fluorescence pour détecter les bactéries intactes directement dans les échantillons cliniques, tels que le sang ou les tissus, ou après une culture d'enrichissement. FISH est une méthode utile pour la détection d'organismes exigeants tels que *Bartonellas pp.* Et *Yersinia pestis*. En fait, plusieurs espèces peuvent être détectées simultanément à l'aide de deux sondes spécifiques ou plus marquées avec des colorants fluorescents uniques. La procédure prend entre 1 et 2 h et consiste à fixer le spécimen, préparer un frottis ou une coupe sur une lame de microscope, perméabiliser les cellules,

hybrider l'échantillon cible avec la sonde et détecter l'hybridation par microscopie à fluorescence (*Mothershed et al., 2006*).

Des sondes FISH spécifiques à la famille, au genre et à l'espèce ont été développées et publiées pour la détection de *Chlamydia spp.*, *Brachyspira spp.*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Yersinia spp.* Et autres. Bon nombre de ces études visaient à identifier les bactéries dans des flacons d'hémoculture positifs, évitant ainsi le besoin de repiquer (*Mothershed et al., 2006*).

- **Acide nucléique peptidique-FISH**

En 1991, Nielson et al. ont découvert un analogue d'ADN appelé acide nucléique peptidique (PNA) (*Nielson et al., 1991*). Les PNA marqués par fluorescence ont été utilisés avec succès comme sondes d'hybridation dans les dosages FISH. Les sondes PNA présentent des avantages distincts par rapport aux sondes ADN, notamment la stabilité de l'hybride PNA / ARN en raison du PNA non chargé (*Egholm et al., 1993*). En outre, les PNA pénètrent plus facilement dans une cellule bactérienne en raison de leur hydrophobicité relative (*Stender, 2003*).

Les tests AdvanDx PNA-FISH pour l'identification définitive de *S. aureus*, *Candida albicans* et *Enterococcus faecalis* directement à partir de flacons d'hémoculture positifs sont actuellement utilisés dans certains centres médicaux américains (*Mothershed et al., 2006*). Dans une évaluation indépendante du test AdvanDX *S. aureus* PNA-FISH, Gonzalez et al. en 2004. ont constaté que le test était 100% sensible, 99% spécifique et donnait respectivement 99% et 100%, des valeurs prédictives positives et négatives, par rapport à trois tests de confirmation (*Gonzalez et al., 2004*).

- **Line probe assay**

Line probe assay (LiPA) consiste en une bande de nitrocellulose avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques fixées sous forme de lignes parallèles discrètes le long de la bande. L'hybridation entraîne un changement de couleur qui peut être détecté visuellement ou par un lecteur automatisé. Innogenetics produit plusieurs tests de sonde de lignée pour la détection bactérienne, y compris ceux pour *M. tuberculosis* et *Mycobacterium spp.* Le test INNO-LiPARif.TB détecte le complexe *M. tuberculosis*, plus précisément cinq génotypes correspondant à la sensibilité à la rifampicine et quatre génotypes résistants. Les résultats des

tests concordaient à 100% avec les résultats des antibiogrammes. L'INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 différencie 16 espèces mycobactériennes à l'aide de sondes spécifiques de la région d'espacement de l'ARNr 16S - 23S. La première version de ce test a été évaluée en 2000 et a correctement identifié 50 des 53 isolats au niveau de l'espèce. Le test a été récemment amélioré et évalué avec 642 *Mycobacterium spp.* Isolats et 27 isolats non mycobactériens et ont démontré une sensibilité et une spécificité de 100% et une précision de 99,2% (**Mothershed et al., 2006**).

- **Test de protection d'hybridation (HPA)**

Les tests de protection d'hybridation (HPA) utilisent une molécule de détection d'ester d'acridinium chimio-luminescent sur une sonde d'ADN qui cible l'ARNr bactérien spécifique. L'hybride ARN / ADN est détecté dans un luminomètre. Des tests HPA AccuProbe sont disponibles pour la détection de *M. avium*, *M. avium complexe*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. tuberculosiscomplexe*, *Campylobacterspp.*, *Enterococcuspp.*, *Streptococcus* du groupe A (*S. pyogenes*), *streptocoque* du groupe B (*S. agalactia*), *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* et *L. monocytogenes*. Après que les enquêteurs ont ajusté les seuils pour un résultat positif afin d'augmenter la sensibilité des tests *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterococcuspp.*, *Streptocoque* du groupe A et *streptocoque* du groupe B, quatre avaient une sensibilité > 90%, une spécificité > 98%, > 94 % de valeur prédictive positive et > 95% de valeur prédictive négative. Le test *S. aureus* a cependant démontré une sensibilité plus faible (81%) (**Lindholm et al., 2004**).

- **Spectrométrie de masse (Sm)**

La spectrométrie de masse (Sm) provoque l'ionisation et la désintégration d'une molécule cible en la bombardant d'électrons. Le rapport masse / charge des fragments moléculaires résultants est ensuite analysé pour produire une signature moléculaire. La Sm a souvent été utilisée pour identifier les bactéries par signature protéique mais n'a pas été considérée comme un outil utile pour les études ADN. Cependant, au cours des 15 dernières années, les difficultés d'analyse de l'ADN ont été largement surmontées (**Gut, 2004**), et l'utilisation de la Sm pour l'analyse des acides nucléiques s'est développée rapidement. Le (MALDI-TOF)-MS génère des échantillons de données en quelques secondes. En raison de sa rapidité et de sa capacité à analyser des milliers d'échantillons par jour, de nombreux chercheurs étudient maintenant

l'utilisation de la Sm comme outil de diagnostic pour la détection bactérienne. MALDI-TOF-MS s'est avéré utile pour la détection de SNP (single nucleotide polymorphism) dans l'ADN humain et a été récemment utilisé pour différencier les clones virulents de *N. meningitidis* (Lowe et al., 2004). Lefmann et coll. ont pu génotyper 12 souches de type et 24 isolats cliniques de *mycobactéries* à l'aide de transcrits d'ARN de gènes d'ARNr 16S (Lefmann et al., 2004).

1.4. Autres techniques d'identification moléculaires

- **Amplification aléatoire d'ADN polymorphe RAPD-PCR**

Contrairement aux méthodes basées sur la PCR décrites précédemment, l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD)-PCR utilise des amorces courtes (de 8 à 12 nucléotides de long) avec des séquences arbitraires qui se lient de manière non spécifique à l'ADN bactérien matrice. Il en résulte une amplification de régions aléatoires et répétitives de l'ADN matrice, fournissant ainsi un profil unique pour l'identification bactérienne. Les produits amplifiés sont ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose standard pour générer des empreintes digitales RAPD uniques. RAPD-PCR ne nécessite aucune connaissance préalable de la séquence du génome cible, car les amorces sont conçues pour se lier au hasard à l'ADN matrice. Cela signifie qu'il peut être utilisé pour identifier une gamme diversifiée d'espèces bactériennes qui n'ont pas été identifiées ou pour lesquelles aucune donnée de séquence antérieure n'est disponible. De plus, il peut être réalisé à partir de bactéries entières directement, sans avoir besoin d'isoler l'ADN, et peut être appliqué sur des espèces Gram-positives et Gram-négatives (Baker et al., 2016). Cette technique permet la classification des isolats en groupes distincts basés sur la production de protéase alcaline (Ricardo, 2019). Cela souligne que le typage RAPD utilisant des amorces aléatoires universelles est une alternative viable à l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques d'un gène, en particulier lors de l'analyse d'un grand nombre d'échantillons d'espèces diverses et sans aucune information génétique préalable. Enfin, RAPD-PCR a également été utilisée comme outil pour identifier la variabilité génétique des microorganismes (Reale et al., 2013).

- **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) est une méthode d'identification des souches bactériennes à l'aide d'empreintes digitales uniques qui repose sur

la présence de variations (polymorphismes) dans des séquences d'ADN homologues. Cette méthode basée sur la PCR utilise des enzymes de restriction, qui peuvent reconnaître et couper l'ADN amplifié (produit de PCR) en fragments d'ADN de différentes longueurs. Comme dans RAPD, ces différents fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose pour générer une seule bande pour chaque souche bactérienne. Si deux souches sont étroitement liées, leurs bandes seront identiques ou très similaires. D'autre part, des différences dans les schémas de bandes indiquent une diversité de souches bactériennes. Comme évident, cette technique est très pertinente pour enquêter sur l'épidémiologie moléculaire des flambées infectieuses, où il est important d'établir si plusieurs cas ou patients appartiennent à la même flambée, pour suivre la source de l'épidémie et pour déterminer une ou plusieurs souches bactériennes impliquées dans l'épidémie. Dans une épidémie nosocomiale suspectée de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), la PCR-RFLP a identifié trois nouveaux isolats de SARM basés sur de nouveaux profils RFLP. De plus, dans un plus petit groupe de patients, la nature hautement discriminatoire de l'analyse PCR-RFLP a permis d'identifier correctement les différences dans un groupe de souches de SARM, excluant ainsi la possibilité d'une épidémie (*Franco-Duarte et al., 2019*).

- **Polymorphisme de longueur de fragment amplifié – AFLP**

Le polymorphisme de longueur de fragment amplifié (AFLP) est similaire au RFLP, en ce qu'il utilise des enzymes de restriction (généralement une paire) pour fragmenter l'ADN génomique, mais amplifie ensuite un sous-ensemble de fragments de restriction à l'aide d'adaptateurs ligaturés. Cette amplification est réalisée en utilisant des amorces qui sont complémentaires des séquences adaptatrices mais qui possèdent également certains nucléotides uniques. Par conséquent, seul un petit nombre de fragments de restriction est sélectivement amplifié. Les empreintes AFLP sont ensuite analysées par électrophorèse sur gel, donnant un ensemble de fragments d'ADN distincts à partir d'un seul ADN génomique bactérien. Comme évident, l'AFLP offre une spécificité élevée et un potentiel discriminatoire en l'absence de toute connaissance préalable de la séquence du génome. Les avantages de l'AFLP en tant qu'outil de prise d'empreintes ADN ont été mis à profit dans une enquête sur l'épidémie de *Pseudomonas aeruginosa* dans une unité de soins intensifs. Pendant une période d'un an, 23 souches de *P. aeruginosa* provenant de patients infectés en USI (Unité des soins intensifs) ont été isolées et caractérisées par AFLP. Après digestion par restriction, l'AFLP PCR a été réalisée en utilisant des amorces PCR marquées par fluorescence. Les fragments PCR amplifiés fluorescents ont été

séparés par électrophorèse sur gel et analysés. Sur la base des résultats de l'AFLP, un cluster épidémique a été identifié avec plus de 90% de similitude. Notamment, cette souche d'épidémie a également été isolée du lavabo, du robinet d'eau et des pièces de raccordement des tubes d'aspiration, indiquant la source possible de l'épidémie. L'élimination complète de l'épidémie a été obtenue après la stérilisation du matériel de soins intensifs (**Bukholm et al., 2002**).

- **Électrophorèse sur gel à champ pulsé – PFGE**

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) est une méthode de séparation de grands fragments d'ADN et est particulièrement utile pour caractériser et typer les bactéries pour les études épidémiologiques. Dans la PFGE, les souches bactériennes pures dans des gels d'agarose sont traitées avec des enzymes et des détergents (protéases et SDS) qui libèrent de l'ADN chromosomique. Les gels d'agarose sont ensuite incubés avec des enzymes de restriction, qui coupent à des sites spécifiques pour générer un nombre limité de fragments d'ADN. Les tampons sont ensuite soumis à un courant électrique et des rotations alternées dans un champ magnétique (ce qui améliore le mouvement de grands fragments d'ADN), conduisant à la séparation de taille des fragments d'ADN et à l'émergence d'une bande (**Parizad et al., 2016**). Lors d'une enquête sur une épidémie de choléra sur sept ans, cinquante isolats de *Vibrio cholerae* ont été soumis à un typage moléculaire par PFGE. L'analyse a révélé qu'au fil des ans, l'épidémie impliquait 15 pulsotypes différents de *V. cholerae*, quatre pulsotypes correspondaient aux pulsotypes publiés et il y avait 11 nouveaux types. Notamment, le typage PFGE a révélé l'émergence chronologique de nouveaux types, qui ont remplacé par la suite le pulsotype antérieur (**Franco-Duarte et al., 2019**).

- **Le Ribotypage**

Le ribotypage est une méthode d'identification et de caractérisation bactérienne qui, contrairement à certaines méthodes de typage moléculaire décrites précédemment, utilise une analyse phylogénétique basée sur l'ARNr. Étant donné que les gènes de l'ARNr (comme l'ARNr 16S) sont hautement conservés au sein d'une espèce bactérienne, l'identification des polymorphismes du gène de l'ARNr 16S est le reflet de la lignée évolutive de l'espèce bactérienne et peut éclairer sur la classification bactérienne, la taxonomie, l'enquête

épidémiologique et la biologie des populations (**Bouchet et al., 2008**). Le ribotypage implique généralement un processus en plusieurs étapes commençant par des enzymes de restriction qui ciblent la séquence génomique d'intérêt, suivi d'un transfert de Southern blot et d'une hybridation avec des sondes, et d'une analyse des bandes de ribotype RFLP. Cependant, avec les progrès des outils moléculaires et la connaissance des séquences génomiques, plusieurs modifications de cette technique ont été publiées (**Bouchet et al., 2008**). Il est important de noter qu'aux fins de la conception de l'amorce et de la sonde, le ribotypage nécessite une certaine connaissance préalable de la séquence du génome à l'étude. Dans une étude, le ribotypage par PCR a été utilisé pour caractériser 99 souches de *Clostridium difficile* isolées de patients atteints de diarrhée nosocomiale. Après l'extraction d'ADN et l'amplification par PCR de régions sélectionnées des gènes ARNr 16S et ARNr 23S, les produits amplifiés ont été fractionnés par électrophorèse. Les bandes ont révélé 41 différents ribotypes PCR avec une reproductibilité élevée et un pouvoir discriminant. Dans une modification de cette méthode, le ribotypage par PCR a été directement utilisé sur des échantillons de selles pour la détection et le typage des souches de *C. difficile* (**Janezic et al., 2011**). Les modifications d'amorce ciblant à la fois la région intergénique de l'ARNr 16S-23S et les gènes 16S et 23S eux-mêmes, ont entraîné une spécificité accrue pour le typage direct. Avec ces nouvelles amorces, le ribotype PCR a pu être détecté directement à partir d'échantillons de selles dans 86 cas sur 99, avec un degré élevé de concordance avec le ribotype PCR réalisé à partir de colonies isolées.

- **Séquencage de génome complet (WGS)**

Le séquençage du génome entier (WGS : Whole Genome Shotgun) est récemment devenu un outil très accessible et abordable pour le génotypage bactérien. L'analyse de l'ensemble du génome bactérien fournit non seulement des informations sans précédent sur le typage bactérien et les lignées évolutives, mais a également révolutionné notre approche pour comprendre la résistance aux antimicrobiens et les enquêtes sur les épidémies. Les progrès des technologies WGS et des pipelines d'analyse ont rapidement augmenté la vitesse de production et d'analyse, tout en réduisant les coûts globaux (**Quainoo et al., 2017**). Malgré les réserves des cliniciens concernant les protocoles expérimentaux et les facteurs de coût, les approches basées sur le WGS sont en cours d'évaluation pour l'identification des pathogènes et le typage de la résistance aux antimicrobiens. Dans une étude, WGS a été utilisé pour enquêter sur une épidémie mortelle d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine impliquant trois patients dans une unité de

soins intensifs (McGann et al., 2016). À l'aide d'un séquenceur de paillasse Illumina Miseq, WGS a établi que les isolats des patients deux et trois ne différaient de celui du patient un que par un seul polymorphisme non synonyme, chacun indiquant une transmission en soins intensifs. De plus, les SNP distincts dans les isolats du patient 2 et 3 ont également indiqué deux événements de transmission directe séparés du patient un, plutôt qu'une transmission linéaire du patient un au patient 2 au patient 3. Comme prévu, les isolats se sont révélés porteurs de gènes (*vanA*) conférant une résistance à la vancomycine. Par conséquent, l'analyse approfondie offerte par WGS a non seulement permis d'établir une résistance aux antibiotiques, mais pourrait également en déduire la dynamique de transmission et la lignée évolutive des souches épidémiques (Franco-Duarte, et al., 2019).

2. Comment choisir le test le mieux adapté ?

Avec l'abondance de tests et de technologies disponibles, un laboratoire doit considérer les facteurs les plus importants pour obtenir les résultats souhaités avant de choisir un test basé sur les acides nucléiques. La première question devrait être: existe-t-il un besoin d'un test des acides nucléiques ou les méthodes traditionnelles sont-elles adéquates pour produire des résultats fiables et en temps opportun?

Bien que de nombreux facteurs doivent être pris en compte avant de mettre en œuvre les tests des acides nucléiques, y compris l'évaluation des coûts, certains points importants doivent être pris en compte.

3. Tendances futures des tests basés sur les acides nucléiques

Certes, un test simple et rapide qui fournit un diagnostic précis est la «perle rare» de tout laboratoire clinique ou clinicien. Bien que la technologie ne permette pas encore une telle réalité, il est intéressant de considérer les progrès réalisés dans le domaine du diagnostic moléculaire et peut-être d'entrevoir qu'un tel objectif n'est pas loin d'être atteint. Certaines technologies innovantes et applications futures sont actuellement en cours de développement et d'évaluation.

Notamment, des dispositifs miniatures, connus sous le nom de biocapteurs, sont en cours de développement pour la détection de produits chimiques et de micro-organismes. En termes généraux, un biocapteur est un instrument qui détecte une cible (analyte) en capturant la cible

(hybridation ou liaison à un anticorps) et en traduisant l'événement de capture en un signal détectable. De nombreux capteurs en développement utilisent de l'ADN ou des protéines comme capteur et un signal de sortie optique, acoustique, à résonance plasmonique de surface (SPR), micro-gravimétrique, chimio-luminescent, fluorescent ou électrochimique. Ces dispositifs ont été d'un grand intérêt scientifique pour la détection des bactéries car ils ont le potentiel d'être rapides, fiables, sensibles et produits en masse. En particulier, les biocapteurs ont été une priorité pour les centres de collecte de sang pour détecter la contamination des produits sanguins et pour les agences de sécurité nationale pour détecter les agents de guerre biologique dans l'air, les aliments et l'eau. Beaucoup de ces instruments pourraient potentiellement faire partie d'un laboratoire clinique ou même être utilisés comme dispositifs portables à des fins de diagnostic au chevet du patient.

Conclusion

Les micro-organismes qui comportent les bactéries, les virus, les parasites, les champignons et les levures sont responsables d'un grand nombre de maladies humaines. Cependant le groupe des bactéries représente les agents infectieux les plus fréquents et les plus dangereux.

Face à des pathologies dangereuses le plus important est d'identifier le plus rapidement et avec précision l'agent causant. Différentes techniques d'identification peuvent être utilisées. Il existe des techniques traditionnelles et des techniques moléculaires qui sont plus sophistiquées

Concernant les techniques traditionnelles qui sont du type microbiologique ou biochimique l'exigence est d'isoler et de purifier l'agent pathogène, ce qui impose sa cultivabilité ce qui n'est pas toujours possible. De plus ces techniques ne sont pas fiables c'est-à-dire qu'elles ne permettent de faire une identification précise (détermination du genre et de l'espèce) et elles sont chronophages (ceci est surtout vrai pour les mycobactéries).

Pour les techniques immunologiques qui peuvent être pratiquées directement sur des tissus humains l'avantage est la rapidité.

Les techniques d'identification moléculaires et qui sont en même temps très rapides (identifications directes sur des échantillons humains comme les selles ou certains prélèvements biologiques) permettent de faire des identifications précise par analyse des génomes ou des protéomes. Cependant elles sont couteuses par leur matériel et leurs produits ce qui rend difficile dans certains cas leur démocratisation. Elles exigent aussi un personnel qualifié et ne peuvent identifier que ce qui est déjà décrit dans les banques de données.

Dans certains cas on doit avoir recours aux techniques traditionnelles et moléculaires en même temps pour obtenir une identification précise d'un agent pathogène. D'où la nécessité de développer tous les types de techniques.

Références bibliographiques

- **Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S.K., Khanna, M., Lal, R.** (2007). Polyphasic approach of bacterial classification—An over view of recent advances. *Indian J. Microbiol*, 47, 98-108.
- **Manafi, M.** (1996). Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification tests. *Int. J. Food Microbiol*, 31, 45-58.
- **Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G.P., Shinoda, S.** (2014). Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front. Public Heal*, 2, 103.
- **Bochner, B.R.** (2009). Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*, 33, 191-205.
- **Castro-Escarpulli, G., Alonso-Aguilar, N.M., Rivera, G., Bocanegra-Garcia, V., Guo, X., Jurez-Enrquez, S.R., Luna-Herrera, J., Martnez, C.M., Guadalupe, A.-A.M.** (2016). Identification and Typing Methods for the Study of Bacterial Infections: A Brief Review and Mycobacterial as Case of Study. *Arch. Clin. Microbiol*, 7, 1-10.
- **Brochier, C., Forterre, P., Gribaldo, S.** (2008). Origine et evolution des microorganismes. *Medecine sciences*, 21, 860-5.
- **Meyer, A., Deiana, J., Bernard, A.** (2014). *Cours de microbiologie générale*. John Libbey Eurotext.
- **Hart, T., Shears, P.** (1997). Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences Flammarion.
- **Benson, S.A.,** (1997). Principles of Medical Biology, *JAI Press Inc*, 9, 1-16.
- **Youcef-Ali, M.** (2014). Etude de l'activité anti-*Candida albicans* des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides. Thèse de doctorat, Université Constantine 1.
- **Lagane, C.** (2007). Role de l'il-13 et des ligands de ppar- γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *candida albicans*. implication de ppar- γ . thèse de doctorat, universite toulouse III.
- **Angora, K.E., Ira-Bonouman, A., Vanga-Bosson, A.H., Konaté, A , Kassi, F.K., Tuo, K., Sylla-Thanon, K., Kiki-Barro, P.C., Miezán, S., Bedia-Tanoh, A.V., Djohan, V., Yavo, W., Menan, E.H., Offianan, A.T.** (2017). Caractéristiques cliniques et myologiques

des *onychomycoses* à *Candida* à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. *Journal de microbiologie médicale*, 6, 1156-5233.

- **Lawrence, R., Thomas, C., Lorenzo, S.** (1994). Planches pour le diagnostic des parasites intestinaux. Organisation mondiale de la santé.

- **Franco-Duarte, R., Cernáková, L., Kadam.S., Kaushik, K.S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Antolak, H., Dybka-Stepie, K., Leszczewicz, M., Tintino, S.R., Alexandrino de Souza, V.C., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H.D.M., Martins, M., Rodrigues, C.F.** (2019) Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*, 7, 130.

- **Yang, F., Chen, L., Liu, Y., Li, J., Wang, L. Chen, J.** (2019). Identification of microorganisms producing lactic acid during solid-state fermentation of Maotai flavour liquor. *J. Inst. Brew*, 125, 171–177.

- **Varadi, L., Luo, J.L., Hibbs, D.E., Perry, J.D., Anderson, R.J., Orengae, S., Groundwater, P.W.** (2017). Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chem. Soc. Rev*, 46, 4818-4832.

- **Buszewski, B., Rogowska, A., Pomastowski, P., Zloch, M. Railean-Plugaru, V.** (2017). Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. *J. AOAC Int*, 100, 1607–1623.

- **Juste, A., Thomma, B. Lievens, B.** (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol*, 25, 745-761.

- **O'Hara, C.** (2005). Manual and Automated Instrumentation for Identification of *Enterobacteriaceae* and Other Aerobic Gram-Negative *Bacilli*. *Clin. Microbiol. Rev*, 18, 147-162.

- **Varettas, K., Mukerjee, C. Schmidt, M.** (1995). A comparative study of the BBL crystal enteric/nonfermenter identification system and the biomerieux API20E and API20NE identification systems after overnight incubation. *Pathology*, 27, 358-361.

- **Funke, G., Funke-Kissling, P.** (2004). Evaluation of the New VITEK 2 Card for Identification of Clinically Relevant Gram-Negative Rods. *J. Clin. Microbiol*, 42, 4067-4071.

- **Puttaswamy, S., Gupta, S.K., Regunath, H., Smith, L.P. Sengupta, S.** (2018). A Comprehensive Review of the Present and Future Antibiotic Susceptibility Testing (AST) Systems. *Arch. Clin. Microbiol*, 9, 83.

- **Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M.G., De Fatima, M., Zuliani, J. Fontana, R.** (2002). Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol*, 40, 1681-1686.
- **Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J., Jorgensen, J.H. Ferraro, M.J.** (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis*, 49, 1749-1755.
- **Klingler, J.M., Stowe, R.P., Obenhuber, D.C., Groves, T.O., Mishra, S.K. Pierson, D.L.** (1992). Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2089.
- **Gravet, A., Gessier, M.** (2013). Spectrométrie de masse et microbiologie. . *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 28, 297-308.
- **Gravet, A., Camdessouens-Miehé, G. (2011).** Application de la spectrométrie de masse à la microbiologie. *Revue Francophone Des Laboratoires*, N°437.
- **Sandrin, T.R.; Demirev, P.A.** (2018). Characterization of microbial mixtures by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev*, 37, 321–349.
- **Dierig, A., Frei, R. & Egli, A.** (2015). The fast route to microbe identification: Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Pediatr. Infect. Dis. J*, 34, 97–99.
- **Schauer, N., Steinhäuser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., Lundgren, K., Roessner-Tunali, U., Forbes, M.G., Willmitzer, L., Fernie, A.R. Kopka, J.** (2005). GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett*, 579, 1332-1337.
- **Polet, M., Botteldoorn, N., Dierick, K.** (2013). *Open.Microbiol.J*, 7, 135-41
- **Descy, J., Meex, C., Melin, P, Hayette, M.P., Huynen, P., De Mol, P.** (2010). Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. *Rev Med Liège*, 65, 29-34.
- **Suarez, S.** (2013). Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Thèse de doctorat. Université Paris Descartes.
- **Buijtel, P.C.A.M., Willemse-Erix, H.F.M., petit, P.L.C., Endtz, H.P., Puppels, G.J., verbrugh, H.A., van Belkum, A., van Soolingen, D., Maquelin, K.** (2008). Rapid Identification of *Mycobacteria* by Raman Spectroscopy. *Journal Of Clinical Microbiology*, 46, 961-965.

- **Jaton, K., Greub, G.** (2007). PCR en microbiologie : de l'amplification de l'ADN à l'interprétation du résultat. *Rev Med Suisse*, 3, 32181.
- **Mothershed, E.A., Whitney, A.M.** (2006). Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta*, 2006, 363, 206-20.
- **Lamoril, J., Bogardc, M., Ameziane, N., Deybacha, J-C., Bouizegarènea, P.** (2007). Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007 - Partie 1. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 22, 5-18
- **Ninet, B., Rohner, P., Delaspre, E., auckenthaler, R.** (1998). Techniques d'amplification génique (PCR, LCR) pour la recherche de *Chlamydia trachomatis*: intérêts et limites. *Médecine et maladies infectieuses*, 28, 24-244.
- **Barbeyrac, B., Bébéar, C.** (1995). Réaction en chaîne par ligase et détection de *Chlamydia trachomatis*. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 10, 236-239.
- **Loens, K., Ieven, M., Ursi, D., Beck, T., Overdijk, M., Sillekens, P., Goossens, H.** (2003). Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41, 4448-4450.
- **Mahony, J.B., Song, X., Chong, S., Faught, M., Salonga, T., J. Kapala, J.** (2001). Evaluation of the NucliSens Basic Kit for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Genital Tract Specimens Using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification of 16S rRNA. *Journal Of Clinical Microbiology*, 39, 1429-1435.
- **Hill, C.S.** (2001). Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Rev Mol Diagn*, 1, 445-55.
- **McHugh, T.D., Pope, C.F., Ling, C.L., Patel, S., Billington, O.J., Gosling, R.D., Lipman, M.C. Gillespie, S.H.** (2004). Prospective evaluation of BDProbeTec strand displacement amplification (SDA) system for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in non-respiratory and respiratory samples. *J Med Microbiol*, 53, 1215-9.
- **Cosentino, L.A., Landers, D.V. Hillier, S.L.** (2003). Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by strand displacement amplification and relevance of the amplification control for use with vaginal swab specimens. *J Clin Microbiol*, 41, 3592-6.
- **Demidov, V.V.** (2002). Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. *Expert Rev Mol Diagn*, 2, 542-8.

- **Louie, L., Matsumura, S.O., Choi, E., Louie, M. Simor, A.E.** (2000). Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 38, 2170-3.
- **Zheng, X., Kolbert, C.P., Varga-Delmore P., Arruda, J., Lewis, M., Kolberg, J., Cockerill, F.R. Persing, D.H.** (1999). Direct *mecA* detection from blood culture bottles by branched-DNA signal amplification. *J Clin Microbiol*, 37, 4192-3.
- **Van Der Pol, B., Williams, J.A., Smith, N.J., Batteiger, B.E., Cullen, A.P., Erdman, H., Edens, T., Davis, K., Salim-Hammad, H., Chou, V.W., Scearce, L., Blutman, J. Payne, W.J.** (2002). Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Assay with the Rapid Capture System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*, 40, 3558-64.
- **Patel, J.B.** (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn*, 6, 313 – 21.
- **Nilsson, W.B., Paranjypte, R.N., DePaola, A. Strom, M.S.** (2003). Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence. *J Clin Microbiol*, 41, 442 – 6.
- **Cook, V.J., Turenne, C.Y., Wolfe, J., Pauls, R. Kabani, A.** (2003). Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. *J Clin Microbiol*, 41, 1010 - 5.
- **Clarridge III, J.E.** (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17, 840 – 62.
- **Harmsen. D., Rothganger, J., Frosch. M. Albert, J.** (2002). RIDOM: ribosomal differentiation of medical micro-organisms database. *Nucleic Acids Res*, 30, 416 – 7.
- **Gee, J.E., D.e, B.K., Levett, P.N., Whitney, A.M., Novak, R.T. Popovic, T.** (2004). Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. *J Clin Microbiol*, 42, 3649 – 54.
- **Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H. Buchardt, O.** (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine substituted polyamide. *Science*, 254, 1497 – 500.
- **Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freler, S.M., Driver, D.A., Berg, R.H., Kim, S.K., Norden, B. Nielsen, P.E.,** (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson –Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, 365, 566 –8.

- **Stender, H.** (2003). PNA FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn*, 3, 649 – 55.
- **Gonzalez V, Padilla E, Gimenez M., Vilaplana, C., Pérez, A. Fernández, G., Quesada, M.D., Pallarés, M.A. Ausina, V.** (2004). Rapid diagnosis of Staphylococcus aureus bacteremia using S. aureus PNA FISH. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23, 396 – 8.
- **Lindholm, L., Sarkkinen, H.** (2004). Direct identification of gram-positive cocci from routine blood cultures by using AccuProbe tests. *J Clin Microbiol*. 42, 5609 – 13.
- **Gut, I.G.** (2004). DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat*. 23, 437 – 41.
- **Lefmann, M, Honisch, C, Bocker S., Storm, N., Wintzingerode, F.V., telburg, C.H., Moter, A., Boom, D. Gobel, U.B.** (2004). Novel mass spectrometry based tool for genotypic identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 42, 339 – 46.
- **Lowe, C.A., Diggle, M.A. Clarke S.C.** (2004). A single nucleotide polymorphism identification assay for the genotypic characterisation of Neisseria meningitidis using MALDI-TOF mass spectrometry. *Br J Biomed Sci*, 61, 8 – 10.
- **Baker, J.C., Crumley, R.E., Eckdahl, T.T.** (2016). Laboratory Exercises Random Amplified Polymorphic DNA PCR in the Microbiology Teaching Laboratory. *Biochem. Mol. Biol. Educ*, 8, 391-396
- **Reale, A., Di Renzo, T., Succi, M., Tremonte, P., Coppola, R., Sorrentino, E.** (2013). Microbiological and Fermentative Properties of Baker’s Yeast Starter Used in Breadmaking. *J. Food Sci*, 78, 1224-1231.
- **Bukholm, G., Tannaes, T., Kjelsberg, A.B.B., Smith-Erichsen, N.** (2002). An outbreak of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa associated with increased risk of patient death in an intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*, 23, 441-446.
- **Parizad, E.G., Parizad, E.G., Valizadeh, A.** (2016). The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies. *J. Clin. DIAGNOSTIC Res*, 10, 1-4.
- **Bouchet, V., Huot, H., Goldstein, R.** (2008). Molecular Genetic Basis of Ribotyping. *Clin. Microbiol. Rev*, 21, 262–273.
- **Janezic, S., Strumbelj, I., Rupnik, M.** (2011). Use of modified PCR ribotyping for direct detection of Clostridium difficile ribotypes in stool samples. *J. Clin. Microbiol*, 49, 3024-3025.

- **Quainoo, S., Coolen, J.P.M., van Hijum, S.A.F.T., Huynen, M.A., Melchers, W.J.G., van Schaik, W., Wertheim, H.F.L.** (2017). Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: The Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clin. Microbiol. Rev*, 30, 1015-1063.
- **McGann, P., Bunin, J.L., Snesrud, E., Singh, S., Maybank, R., Ong, A.C., Kwak, Y.I., Seronello, S., Clifford, R.J., Hinkle, M.** (2016). Real time application of whole genome sequencing for outbreak investigation—What is an achievable turnaround time? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 85, 277–282.