

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE SAAD DAHLEB - BLIDA 1 –

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE



TYPAGE MOLECULAIRE :
METHODES ET APPLICATIONS EN
BACTERIOLOGIE

Thèse d'exercice de fin d'études

Présentée en vue de l'obtention du titre de docteur en pharmacie

Session : Juillet 2020

Présentée par :

- **BOUROUBA Saoucen**
- **BEN ADEL Amel**
- **ACHOUR Hadjer**

Devant le jury :

- **Présidente :**

Dr BEROUAKEN Samia

Maitre assistante en microbiologie

USDB

- **Examinatrice :**

Dr AZROU Siham

Maitre assistante en microbiologie

USDB

- **Promotrice :**

Dr BENAMARA Mounia

Maitre assistante en microbiologie

USDB

Remerciements

En premier lieu, on remercie **DIEU** le tout puissant de nous avoir permis de mener à bien ce modeste travail.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre chère promotrice **Dr. BENAMARA M.** pour son suivi et pour son énorme soutien, elle n'a cessé de nous orienter tout au long de ce travail, nous la remercions pour le temps qu'elle nous a consacré et pour les précieuses informations qu'elle nous a fournies avec intérêt et compréhension ;

Nous adressons aussi nos vifs remerciements aux **membres du jury, Dr. BEROUAKEN S. et Dr. AZROU S.** pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail ;

On ne laissera pas cette occasion passer, sans remercier tous les **enseignants et le personnel du département de pharmacie** de l'université de Saad Dahleb Blida 1 pour leur aide et leurs précieux conseils et pour l'intérêt qu'ils portent à notre formation ;

Nos remerciements s'adressent, également, au **Pr. ABDI**, chef de service du laboratoire centrale du **CHU BLIDA unité FRANTZ FANON**, pour son accueil ainsi que à tout le personnel du laboratoire ;

Un grand merci à nos parents et familles, pour nous avoir donné le gout de l'ambition et pour leur soutien tout au long de notre cursus étudiantin.

Enfin, nous exprimons la reconnaissance que nous devons à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à l'élaboration de ce travail et à son bon déroulement, qu'ils trouvent ici nos vifs respects et notre profonde gratitude.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

Avant tous, à mes très très chers parents,

Aucune dédicace ni aucun mot ne sauraient exprimer, mon respect, mon amour éternel et ma profonde gratitude pour les sacrifices que vous avez consenti. Vous êtes une source inépuisable d'amour et de tendresse. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance. Je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir inchallah. Que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous procure santé, bonheur et longue vie.

*A mon cher mari, **Sohaib,***

Que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle. Que Dieu, le tout puissant, te protège et te procure santé, bonheur, réussite et longue vie.

*A mes chers frères, **Riad et Akram,***

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Merci de m'avoir accompagné pendant toute ma vie, d'être toujours là pour moi et de m'avoir supporté. Puisse Dieu vous préserver de tout mal, et vous procurer santé, bonheur, réussite et longue vie.

*A mes beaux-parents, belle-sœur, beaux-frères et toute la famille **BENACHOUR,***

*A tous les membres de ma famille, **BOUROUBA** et **BELMEKKI,** mes chers tantes et oncles, mes chers cousines et cousins, grands et petits, veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de ma grande affection.*

A toutes mes amies : Rayhene, Aziza, Meriem, Ibtissem, Kaouther, Manel, Nabila, Hadjer ...

A mes camarades de la promotion de pharmacie.

A toute personne qui a contribué à la réalisation de ce travail auquel j'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements.

A tous ceux que je n'ai pas mentionnés.

À tous les gens que j'aime sans exception.

Saoucen

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

A la mémoire de ma grande mère, "Yama Fatma"

*A celle qui m'arrosé de tendresse et d'espoir ; à ma très chère mère ;
pour ses prières et son sacrifice.*

A vous également :

Ma moitié Ferial ,

Mon père,

Mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines

C'est un moment de plaisir de dédier ce travail, à des personnes que je considère comme des exemples à suivre : M^{me} DAHANE, Mr YAHYAOUI et Mr BOUDKHILA en signe de reconnaissance et de gratitude pour le dévouement l'aide et l'encouragement dont vous avez fait toujours preuve à mon égard. Ainsi aux membres de l'équipe de la pharmacie "HABES ", la pharmacie "BERKLA " et le club OXYJEUNES BLIDA.

A tous mes collègues de promotion.

A mes amies : Fatima , Ahlem , Asma , Karima , Hafsa , Hdjila , Hadjer , Djamilâ, Meriem, Salma et Imène qui n'ont jamais cessées de me soutenir.

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

Amel

Dédicaces

Arrivé au terme de ce modeste travail, grâce à dieu

Il m'est très agréable de le dédier à

A mes très chers parents,

ACHOUR Foudil et BESSAKHI Fatma-Zohra,

pour leur encouragement, patience, amour et soutien tout au long de mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et le respect que j'ai toujours pour vous. J'ai tous fait pour vous rendre fière, et si je suis là en ce moment c'est grâce à vous et à vos prières.

Puisse Dieu vous accorder longue vie pleine de santé et de bonheur.

A mes chères sœurs : Amina, Samiha et Khadidja qui n'ont jamais cessé de me soutenir ainsi que leurs époux,

A mes chers frères : Mohamed et Samir pour leurs soutien sans oublier leurs épouses.

A tous mes neveux et nièces que je leur souhaite toute la réussite et le bonheur dans leurs vies.

A mes véritables amis et mes collègues de promotion.

À tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail.

Enfin à tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

Hadjer

RESUME

Les méthodes génotypiques remplacent progressivement les méthodes phénotypiques en raison de leur pouvoir discriminant, sensibilité et spécificité plus élevés. Le typage des bactéries est la caractérisation d'isolats ou des souches au-dessous de l'espèce ou de la sous-espèce.

De manière générale, les systèmes de génotypage sont utilisés pour étudier la dynamique des populations bactériennes et la propagation des bactéries et autres micro-organismes qui subissent une reproduction non sexuelle (clonale), dans la nature ou en milieu clinique, à des niveaux allant d'un seul hôte à l'écosystème de la population mondiale. Il est également utilisé pour étudier la structure des populations bactériennes, leur diversité génétique et la pathogénicité des infections.

Il peut être effectué, selon la situation : (i) localement, dans un hôpital ou un autre laboratoire primaire, pour de petites investigations ; (ii) au niveau régional ou national, dans un laboratoire de référence, pour traiter des questions plus larges de santé publique et de surveillance ; ou (iii) à l'international, à travers des réseaux collaboratifs, pour définir ou étudier la diffusion mondiale des principaux clones bactériens.

Les méthodes de génotypage actuellement utilisées peuvent être classées en trois grandes catégories : (i) les méthodes basées sur la restriction enzymatique ; (ii) les méthodes basées sur l'analyse de profils de bandes après amplification de régions cibles ; et (iii) les méthodes basées sur le séquençage d'ADN.

Bien que ces techniques ne soient pas toutes aussi efficaces pour le typage de tous les organismes, l'électrophorèse en champ pulsé est depuis longtemps considérée comme le « Gold standard » pour le typage de la plupart des agents pathogènes.

Cependant, avec l'évolution des techniques de séquençage de nouvelle génération, le séquençage du génome entier des pathogènes est devenu la norme de référence. Néanmoins, les praticiens sont souvent limités en raison des coûts ou du manque de ressources. Par conséquent, du moins dans l'avenir immédiat, l'électrophorèse en champ pulsé continuera d'être la méthode la plus fréquemment employée en matière de génotypage bactérien.

Mots clés : génome bactérien, typage moléculaire, génotypage, électrophorèse en champ pulsé, séquençage du génome entier.

ABSTRACT

Genotypic methods are gradually replacing phenotypic methods because of their higher discriminatory power, sensitivity and specificity. Bacterial typing is the characterization of isolates or strains below the species or subspecies.

In general, genotyping systems are used to study the dynamics of bacterial populations and the spread of bacteria and other micro-organisms that undergo non-sexual (clonal) reproduction, in nature or in clinical setting, at levels ranging from a single host to the global population ecosystem. It is also used to study the structure of bacterial populations, their genetic diversity and the pathogenesis of infections.

It can be carried out, depending on the situation: (i) locally, in a hospital or other primary laboratory, for small investigations; (ii) at regional or national level, in a reference laboratory, to address broader public health and surveillance issues; or (iii) internationally, through collaborative networks, to define or study the global diffusion of main bacterial clones.

The genotyping methods currently used can be classified into three major categories: (i) restriction enzyme-based methods, (ii) methods based on amplification of target regions and (iii) DNA sequencing-based methods.

While not all of these techniques are as effective at typing all organisms, the Pulsed Field Gel Electrophoresis has long been considered the “Gold standard” for typing most pathogens.

However, with the evolution of next generation sequencing techniques, whole genome sequencing of pathogens has become the reference technique. However, practitioners are often limited due to costs or lack of locally available resources and/or expertise. As a consequence, at least in the immediate future, the Pulsed Field Gel Electrophoresis will continue to be the most frequently used method for bacterial genotyping.

Keywords : bacterial genome, molecular typing, genotyping, pulsed field gel electrophoresis, whole genome sequencing .

ملخص

ان طرق التتميط الجيني تحل محل الطرق التتميط الظاهري تدريجياً بسبب ان قوتها التمييزية، حساسيتها وخصوصيتها أعلى. التتميط البكتيري (Le typage des bactéries) هو تحديد خصائص العزلات أو السلالات الموجودة أسفل الأنواع أو الأنواع الفرعية .

بشكل عام، تستخدم نظم التتميط الجيني لدراسة ديناميكيات الجماعات البكتيرية وانتشار البكتيريا وغيرها من الكائنات الدقيقة التي تتعرض للتكاثر غير الجنسي، في الطبيعة أو في البيئة السريرية، على مستويات تتراوح بين مضيف واحد الى نظام بيئي لسكان العالم، كما أنه يستخدم ايضا لدراسة بنية الجماعات البكتيرية وتنوعها الجيني وطرق تطور العدوى.

يمكن القيام بذلك، حسب الحالة: (1) محليا، في مستشفى او مختبر ابتدائي آخر، لإجراء تحقيقات صغيرة، (2) على الصعيد الاقليمي أو الوطني، في مختبر مرجعي، لمعالجة مسائل أوسع نطاقا في مجال الصحة العامة والمراقبة، (3) أو على الصعيد الدولي، من خلال شبكات تعاونية، لتحديد أو دراسة الانتشار العالمي للسلالات البكتيرية الرئيسية.

يمكن تصنيف طرق التتميط الجيني المستخدمة حالياً إلى ثلاث فئات رئيسية: (1) الطرق القائمة على إنزيم القطع، (2) الطرق القائمة على تضخيم المناطق المستهدفة و (3) الطرق القائمة على تسلسل الحمض النووي.

رغم أن كل هذه التقنيات ليست فعّالة في تميمط كل الكائنات، فإن الرحلان الكهربائي للهلام في المجال النبضي (PFGE) يعتبر منذ فترة طويلة "المعيار الذهبي" للتتميط أغلب مسببات الأمراض.

مع ذلك، ومع تطور تقنيات الجيل التالي لتسلسل الحمض النووي، أصبح تسلسل الجينوم الكامل (WGS) لمسببات الأمراض هو التقنية المرجعية . غير أن الممارسين كثيرا ما يكونون محدودين بسبب التكاليف أو الافتقار إلى الموارد و/أو الخبرات المتاحة محليا . ونتيجة لذلك، على الأقل في المستقبل القريب، سوف يظل الرحلان الكهربائي للهلام في المجال النبضي (PFGE) أكثر الطرق استخداما في مجال التتميط الجيني البكتيري.

الكلمات المفتاحية : الجينوم البكتيري، التتميط الجيني، التتميط الجيني، الرحلان الكهربائي للهلام في المجال النبضي، تسلسل الجينوم الكامل.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	II
DEDICACES	III
RESUME	VI
ABSTRACT	VII
ملخص	VIII
TABLE DES MATIERES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES ABREVIATIONS	XVII
GLOSSAIRE	XX
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENOME ET ELEMENTS GENETIQUES : rappel sur la structure bactérienne, le génome bactérien et les éléments génétiques	5
I.1. Formes et propriétés générales des bactéries	6
I.2. Génome bactérien.....	7
I.3. Eléments génétiques	7
I.3.1. ADN chromosomique	7
I.3.2. Eléments génétiques non chromosomiques.....	9
I.3.2.1. Plasmides.....	9
I.3.2.2. Transposons.....	10
I.3.2.3. Intégrons.....	11
I.3.2.4. Cassettes de gènes	13
I.3.2.5. Phages	14
I.3.2.6. Ilots génomiques	15
CHAPITRE II : GENOTYPAGE	19
II.1. Définitions	20
II.1.1. Avantages et limites des méthodes de typage phénotypique	20
II.1.2. Avantages et limites des méthodes de génotypage	21
II.2. Caractéristiques des méthodes de typage.....	22
II.2.1. Critères de performance	22
II.2.1.1. Pouvoir discriminant.....	23
II.2.1.2. Reproductibilité	23

II.2.1.3. Typabilité	23
II.2.1.4. Portabilité.....	23
II.2.1.5. Stabilité	24
II.2.1.6. Concordance épidémiologique.....	24
II.2.1.7. Population d’essai	24
II.2.2. Critères de commodité	25
II.2.2.1. Flexibilité (ou spectre)	25
II.2.2.2. Rapidité.....	25
II.2.2.3. Accessibilité.....	25
II.2.2.4. Facilité d’utilisation	25
II.2.2.5. Coût.....	25
II.2.2.6. Analyse informatisée et intégration dans les bases de données.....	25
II.3. Classification des méthodes de génotypage.....	26
CHAPITRE III : METHODES BASEES SUR LA RESTRICTION ENZYMATIQUE	29
III.1. RFLP sans hybridation	32
III.1.1. Technique d’électrophorèse en champ pulsé ECP (Pulsed Field Gel Electrophoresis ou PFGE).....	32
III.1.1.1. Principe.....	32
III.1.1.2. Mode opératoire.....	32
III.1.1.3. Interprétation des résultats.....	34
III.1.1.4. Avantages	37
III.1.1.5. Limites	38
III.1.2. Analyse du profil plasmidique (Plasmid Profile Analysis ou PPA).....	39
III.1.2.1. Principe.....	39
III.1.2.2. Mode opératoire.....	39
III.1.2.3. Interprétation des résultats.....	40
III.1.2.4. Avantages	41
III.1.2.5. Limites	41
III.2. RFLP avec hybridation.....	42
III.2.1. Ribotypage (Ribotyping)	43
III.2.1.1. Principe.....	43
III.2.1.2. Mode opératoire.....	43
III.2.1.3. Interprétation des résultats.....	45
III.2.1.4. Avantages	45

III.2.1.5. Limites	46
III.2.1.6. Variants du ribotypage	46
CHAPITRE IV : METHODES BASEES SUR L'AMPLIFICATION	48
IV.1. Rappels sur la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR) et ses variants	50
IV.1.1. Principe.....	50
IV.1.2. Mode opératoire	51
IV.1.3. Variants de la PCR	53
IV.2. Technique de polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism ou AFLP)	55
IV.2.1. Principe.....	55
IV.2.2. Mode opératoire	56
IV.2.3. Interprétation des résultats.....	58
IV.2.4. Avantages	60
IV.2.5. Limites.....	60
IV.3. Techniques avec amplification de régions répétées	61
IV.3.1. Technique de la PCR à séquences répétitives (Repetitive elements PCR ou Rep-PCR).	62
IV.3.1.1. Principe.....	62
IV.3.1.2. Mode opératoire	63
IV.3.1.3. Interprétation des résultats	64
IV.3.1.4. Avantages	64
IV.3.1.5. Limites.....	65
IV.3.2. Analyse multilocus de répétitions en tandem à nombre variable ou (Multi-locus Variable Number of Tandem Repeats Assay ou MLVA)	66
IV.3.2.1. Principe.....	66
IV.3.2.2. Mode opératoire	66
IV.3.2.3. Interprétation des résultats	67
IV.3.2.4. Avantages	68
IV.3.2.5. Limites.....	68
IV.4. Techniques d'amplification aléatoire (Random Amplified Polymorphic DNA/Arbitrarily Primed-PCR ou RAPD/AP-PCR).....	69
IV.4.1. Principe.....	69
IV.4.2. Mode opératoire	69

IV.4.3. Interprétation des résultats.....	71
IV.4.4. Avantages	71
IV.4.5. Limites.....	72
CHAPITRE V. METHODES BASEES SUR LE SEQUENÇAGE DE L'ADN	74
V.1. Techniques de séquençage.....	76
V.1.1. Méthode de Sanger	77
V.1.2. Séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing ou NGS).....	78
V.2. Typage génomique multilocus (Multilocus Sequence Typing ou MLST).....	79
V.2.1. Principe	80
V.2.2. Mode opératoire.....	80
V.2.3. Interprétation des résultats	81
V.2.4. Avantages	81
V.2.5. Limites	82
V.3. Séquençage du génome complet (Whole Genome Sequencing ou WGS)	83
V.3.1. Principe	83
V.3.2. Mode opératoire.....	83
V.3.3. Interprétation des résultats	85
V.3.4. Avantages	86
V.3.5. Limites	87
CHAPITRE VI : GENOTYPAGE : INTERET ET APPLICATIONS.....	89
VI.1. Applications en taxonomie, phylogénétique et évolution moléculaire	90
VI.1.1. Taxonomie.....	90
VI.1.2. Phylogénétique	92
VI.1.3. Etude de la structure des populations bactériennes	92
VI.2. Applications en bactériologie clinique	95
VI.2.1. Confirmer une infection	95
VI.2.2. Distinguer les rechutes des réinfections en cas d'infections récidivantes.....	96
VI.3. Applications en épidémiologie moléculaire	97
VI.3.1. Enquêtes sur les épidémies.....	98
VI.3.2. Surveillance des maladies infectieuses	99
VI.3.3. Mieux comprendre l'épidémiologie des maladies infectieuses.....	100

CHAPITRE VII : EXEMPLE D'APPLICATION DES METHODES DE GENOTYPAGE : TYPAGE DES MRSA	103
VII.1. Typage par PFGE.....	106
VII.2. Typage des cassettes chromosomiques staphylococcique (SCCmec)	106
VII.3. Typage spa	109
VII.4. Typage génomique multilocus (MLST)	110
VII.5. Séquençage du génome entier (WGS)	112
CONCLUSION	113
BIBLIOGRAPHIE	116
ANNEXES	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les éléments obligatoires et les éléments facultatifs des bactéries.....	6
Tableau II : Caractéristiques des méthodes génotypiques.	22
Tableau III : Principales méthodes de génotypage.....	27
Tableau IV : Critères d'interprétation des profils PFGE ..	35
Tableau V : Catégories de techniques de séquençage	76
Tableau VI : Questions épidémiologiques auxquelles les méthodes de typage moléculaire devraient répondre.	100
Tableau VII : Comapraison des caractéristiques cliniques, épidémiologiques et microbiologiques du MRSA associé à la communauté (CA) et aux soins de santé (HA)	108
Tableau VIII : Caractéristiques des méthodes de typage les plus fréquemment utilisées pour le <i>Staphylococcus aureus</i>	112
Tableau IX : Résumé des principales décisions de consensus concernant l'harmonisation des méthodes de typage.	112
Tableau X : Tableau récapitulatif des méthodes de génotypage.....	115

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure générale d'une bactérie	6
Figure 2 : Les composants des acides nucléiques	8
Figure 3 : ADN bactérien : pourcentage guanine-cytosine	9
Figure 4 : Structure des transposons	11
Figure 5 : Structure de la région 5' des intégrons.	12
Figure 6 : Structure d'une cassette	13
Figure 7 : Mécanisme d'intégration des cassette	14
Figure 8 : Chronologie de la découverte de la plupart des techniques de génotypage	26
Figure 9 : Diagramme des méthodes basées sur la restriction enzymatique.	31
Figure 10 : Principe de l'électrophorèse en champ pulsée (ECP).....	33
Figure 11 : Schéma montrant les changements dans le profil PFGE d'un isolat résultant de divers événements génétiques.	34
Figure 12 : Exemple de gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour le typage de 9 souches d' <i>Enterococcus faecium</i> résistant à la vancomycine (VanA)	37
Figure 13 : Photographie d'un gel d'agarose teinté de bromure d'éthidium montrant des profils plasmidiques.	40
Figure 14 : Principe de la méthode IS6110-RFLP.	42
Figure 15 : Principe du ribotypage	44
Figure 16 : Diagramme des variants du ribotypage	46
Figure 17 : Diagramme des méthodes basées sur l'amplification.....	49
Figure 18 : Principe de la PCR	50
Figure 19 : Etapes de la PCR	51
Figure 20 : Schéma général de la PCR	52
Figure 21 : Aperçu de la RT-PCR.....	53
Figure 22 : Aperçu de la PCR imbriquée (Nested PCR)	54
Figure 23 : Aperçu de la PCR multiplex	54
Figure 24 : Principe de l'AFLP.	55
Figure 25 : Protocole de l'AFLP	56
Figure 26 : Analyse électrophorétique des fragments amplifiés	59
Figure 27 : Illustration de rep-PCR.	63
Figure 28 : Processus de la MLVA	67
Figure 29 : Etapes de la RAPD	70
Figure 30 : Evolution des méthodes de séquençage	76

Figure 31 : Etapes de la méthode de sanger .	77
Figure 32 : Représentation schématique des étapes de base du séquençage de l'ADN à l'aide de différentes plateformes NGS.	78
Figure 33 : Etapes de la MLST .	81
Figure 34 : Etapes du WGS	84
Figure 35 : Structure des populations bactériennes	93
Figure 36 : Voies de contamination des cathéters et place de typage moléculaire	95
Figure 37 : Place du typage moléculaire dans une récurrence d'angine à Streptocoque du groupe A (SGA) par analyse des profils de restriction enzymatique .	96
Figure 38 : Sélection de la méthode de génotypage appropriée pour le sous-typage des souches bactériennes	101
Figure 39 : Régulation des facteurs de virulence par le système agr .	104
Figure 40 : Typage de SCCmec	107
Figure 41 : Schéma des domaines et régions des spa	109
Figure 42 : Aperçu de la population mondiale de MRSA	111

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
Agr	Accesory gene regulator
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
attC	Site de recombinaison des cassettes
attI	Site de recombinaison de l'intégrase
C3G	Céphalosporines de troisième génération
CA-MRSA	Community-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus Aureus</i>
ccr	cassette chromosomique recombinase
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (Consensus intergénique répétitif entérobactérien)
HA-MRSA	Healthcare-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
IgG	Immunoglobuline G
intI1	Gène de l'intégrase 1
IR	Intégron de résistance
ISR	Intergenic Spacer Region (Région espaceur intergénique)
Kb	Kilobases

Kpb	Kilopaire de bases
KT	Cathéter
LA-MRSA	Livestock-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
LPV	Leucocidine de Panton et Valentine
Mb	Mégabase
MIRU-VNTR	Mycobacterial Identification Repetitive Unit-VNTR
MLST	Multilocus Sequence Typing (Typage de séquence multi-locus)
MLVA	Multiple loci VNTR analysis (Analyse MultiLocus de répétition en tandem à nombre variable)
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-Sensible <i>Staphylococcus aureus</i>
NGS	Next Generation Sequencing (Séquençage de nouvelle génération)
Pb	Paire de bases
PBP2a	Penicillin Binding Protein 2a
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PFGE/ ECP	Pulsed Field Gel Electrophoresis (électrophorèse en champ pulsé)
PLP	Protéines Liant la Pénicilline
PPA	Plasmid Profile Analysis (Analyse du profil plasmidique)
PVL	Leucocidine Panton-Valentine
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA (amplification aléatoire de l'ADN polymorphe)
REP	Repetitive Extragenic Palindromic

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur de fragments de restriction)
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome mec
SCN	Staphylocoques à coagulase négative
SGA	Streptocoque du groupe A
SI	Séquence d'insertion
SI	Super-intégrons
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (polymorphismes mononucléotidiques)
Spa	Staphylococcal protein A
SRI	Séquences répétées inversées
SSR	Simple sequence repeats
ST	Séquence type
STR	S tandem repeats
Tm	Température de fusion
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Polymorphisme de la longueur du fragment de restriction terminale
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin -1(la toxine-1 du syndrome de choc toxique)
USI	Unités de soins intensifs
UV	Ultraviolet
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat (Nombre variable de répétitions en tandem)
WGS	Whole Genome Sequencing (Séquençage du génome entire)

GLOSSAIRE

Alpha-hémolysine ou alphatoxine staphylococcique

Protéique, thermostable, antigénique, induisant la formation d'anticorps neutralisants. Toxique vis-à-vis de nombreux types de cellules de mammifères, elle est dermonécrotique et neurotoxique. Elle est particulièrement active sur les érythrocytes du lapin.

Amplicon

Fragment d'ADN ou d'ARN qui est le produit d'événements d'amplification naturels ou artificiels.

Amorce (primer)

Segment d'ADN ou d'ARN qui est complémentaire d'une séquence d'ADN donnée et qui est nécessaire pour initier la réplication par l'ADN polymérase.

Bactériocine

Substance de nature protéique, possédant des propriétés antigéniques, et élaborée par certaines souches de microbes pathogènes, ayant la capacité de tuer des germes et des souches d'espèces microbiennes différentes.

Béta-hémolysine

Substance thermolabile possédant une activité de sphingomyélinase qui altère les membranes riches en lipides. Elle est produite en grande quantité par de nombreuses souches de *Staphylococcus aureus*.

Biofilm bactérien

Agrégats de bactéries adhérant à un support inerte.

Cartographie génétique (cartographie de liaison)

Processus de détermination de l'ordre et de la distance relative entre les marqueurs génétiques (séquences spécifiques ou éléments héréditaires qui génèrent un phénotype) sur un chromosome en fonction de leur mode de transmission. La cartographie génétique des bactéries repose sur le transfert de chromosomes entre les cellules.

Chorioamniotite (infection intra-amniotique)

Inflammation aigüe du placenta et des membranes ovulaires.

Clonage

En biologie, le clonage est le processus de production de populations similaires ou d'individus génétiquement identiques. Dans le diagnostic moléculaire, le clonage est le processus utilisé pour créer des copies de fragments d'ADN (clonage moléculaire), de cellules (clonage cellulaire) ou d'organismes.

Clone

Groupe d'isolats qui sont génotypiquement identiques les uns aux autres en raison de l'ascendance commune.

Dendrogramme

Diagramme fréquemment utilisé pour illustrer l'arrangement de groupes générés par un regroupement hiérarchique ou hiérarchisant. Les dendrogrammes sont par exemple souvent utilisés en biologie pour illustrer des regroupements de gènes, ou des filiations.

Electrophérogramme

Condensé de résultats d'une analyse effectuée par séquençage automatique d'électrophorèse.

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Technique **immuno-enzymatique** de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

Empreinte digitale

Modèle spécifique (par exemple, modèle de bandes d'ADN) ou ensemble de scores de marqueur (par exemple, valeurs d'absorbance) affichés par un isolat lors de l'application d'une ou de plusieurs méthodes de typage. Ces empreintes digitales peuvent être utilisées pour évaluer le lien épidémiologique entre les isolats bactériens.

Endémie

Se définit par la présence habituelle d'une maladie, en générale infectieuse, dans une population déterminée ou une région précise, avec une incidence stable. Sa diffusion **est** durable dans le **temps** mais **limitée** dans l'espace.

Entérotoxines

Toxines produites par la moitié des souches de *Staphylococcus aureus*. Elles sont thermostables et comprennent 7 types antigéniques, associés à des manifestations cliniques variables, allant de l'intoxication alimentaire au choc toxique staphylococcique.

Epidémie

Se définit par la croissance rapide de l'incidence d'une maladie dans une région donnée et pendant une période donnée.

Episome

ADN bactérien qui est extrachromosomique et qui peut se répliquer de manière autonome en tant que plasmide ou devenir incorporé dans le chromosome et se répliquer avec lui.

Espèce

Catégorie taxonomique de base des bactéries ; un groupe nommé au-dessous du niveau du genre dont les membres présentent un degré élevé de similitude globale par rapport à d'autres souches plus apparentées.

Hémoculture

Technique de laboratoire visant à mettre en évidence la présence d'agents infectieux cultivables dans le sang.

Hybridation (d'acides nucléiques)

Formation de molécules double brin par appariement de bases complémentaires de brins simples d'ADN ou d'ARN.

Incidence

Indicateur épidémiologique mesurant la fréquence de survenue d'un événement (maladie, infection nosocomiale...) pendant une période de temps donnée.

Infection

Persistance ou multiplication d'un microorganisme pathogène à la surface ou à l'intérieur d'un hôte.

Infection croisée (ou transmission)

Infection acquise à l'hôpital d'une autre personne, soit des patients, soit du personnel. Les risques peuvent être réduits en se concentrant sur des mesures pour interrompre la transmission, par ex. lavage des mains.

Infection endogène

Agent infectieux déjà présent dans l'hôte provoque une infection endogène. L'agent infectieux fait généralement partie de la flore hôte normale. Les antibiotiques et l'exposition à l'environnement hospitalier peuvent modifier la flore normale de l'hôte et peuvent sélectionner des organismes résistants.

Infection exogène

Lorsque l'agent infectieux provient de l'extérieur de l'hôte. Ce sont soit des infections croisées transmises d'un malade à l'autre, soit des infections provoquées par les germes du personnel porteur, soit des infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier.

Inférences

Il s'agit d'émettre des conclusions à partir d'un fait.

Isolat

Groupe de cellules bactériennes qui représentent une culture pure obtenue à partir d'une seule colonie cultivée sur un milieu solide. Les isolats sont collectés à partir de sources telles que des échantillons cliniques et des échantillons environnementaux.

Kilobase (kb) / Mégabase (Mb)

Unités de mesure en biologie moléculaire représentant respectivement une longueur de 1 000 et d'un million de paires de bases d'ADN ou d'ARN.

Leucocidines de Pantón Valentine

Exotoxines bactériennes où le spectre d'activité lytique de cette toxine est restreint aux monocytes, aux macrophages, aux polynucléaires neutrophiles et aux métamyélocytes ; les érythrocytes ne sont pas lysés. Chacune de ces toxines est un dimère de deux protéines sécrétées sous forme non associées, nommées S et F pour « slow » et « fast » selon leur vitesse de migration.

Locus

Emplacement précis d'un gène particulier sur un chromosome.

Mutation

Modification de la séquence du matériel génétique. Une mutation résulte, soit du remplacement d'un nucléotide par un autre (substitution), soit de la perte (délétion) ou de l'addition d'un ou plusieurs nucléotides, soit encore du déplacement ou de l'inversion d'une séquence nucléotidique au sein du génome. On parle de mutation génique lorsque ces événements affectent la séquence du gène. Si un faible nombre de nucléotides est touché, il s'agit d'une mutation ponctuelle.

Opéron

Groupe de gènes de structure contigus, ayant des expressions phénotypiques coordonnées et situés sur le chromosome à proximité de gènes de régulation.

Pathogenèse

Étude de la naissance et du développement des états pathologiques.

Pathogénicité

Capacité d'un organisme à provoquer une maladie, tandis que la virulence est le degré de pathogénicité au sein d'un groupe d'organismes. La virulence est déterminée par plusieurs facteurs liés à l'organisme et à l'hôte, plus particulièrement l'infectiosité de la bactérie et la gravité de l'affection qu'elle produit. Pour être considérés comme pathogènes, les organismes auront des souches de différents degrés de virulence.

Phylogénie

Relations évolutives entre les membres d'un même taxon (espèces, souches...).

Polymorphisme génétique

Présence régulière et simultanée dans la même population de deux allèles ou plus à un locus génétique, avec au moins un allèle mineur ayant une fréquence supérieure à 1%.

Prévention

Ensemble des précautions à prendre par le patient, l'entourage, le personnel soignant, (hygiène des mains, isolement, formation du personnel de soins...) pour éviter la propagation des micro-organismes dans les établissements de santé et lutter contre les infections nosocomiales.

Promoteur

Séquences de gènes près du site de départ de la transcription qui attirent l'ARN polymérase.

Protéine A

Protéine antigénique, caractéristique de l'espèce *Staphylococcus aureus*. Elle est élaborée par plus de 90% des souches d'origine humaine (biotype A). Elle est absente chez les staphylocoques à coagulase négative, sauf chez certains qui possèdent une nucléase thermostable.

Pulsotype

Marqueur épidémiologique du génotype caractéristique d'une souche bactérienne, déterminé par électrophorèse en champs pulsés.

Réplicon

Élément génétique qui subit une réplication en tant qu'unité autonome.

Reproduction clonale

Mode, généralement, de reproduction asexuée dans laquelle la progéniture est essentiellement identique au parent. Chez les bactéries, la reproduction clonale procède par fission binaire.

Réservoir

Lieu dans lequel s'accumulent et prolifèrent les agents biologiques. Ces derniers pouvant croître partout, les réservoirs peuvent se trouver dans l'environnement (le sol, les eaux, les plantes) mais également sur ou dans un être humain ou un animal : peau, appareil respiratoire, salive, sang, laine...

SNP (polymorphisme mononucléotidique)

Locus nucléotidique unique avec deux allèles existants naturellement définis par une seule substitution de paires de bases. Les loci SNP sont utiles en tant que marqueurs à base d'ADN pour l'analyse des liens génétiques.

Septicémie

État infectieux généralisé, dû à la dissémination d'un germe pathogène dans tout l'organisme, par l'intermédiaire du sang.

Séquence d'ADN

Ordre relatif des paires de bases, que ce soit dans un fragment d'ADN, un gène, un chromosome ou un génome entier.

Souche

Groupe d'isolats qui sont génotypiquement ou phénotypiquement identiques les uns aux autres et distincts des autres isolats de ce type.

Sporadique

Rare, se produisant à des moments et des localités irrégulières sans motif, déconnectés dans l'espace et le temps ; l'opposé d'épidémie et d'endémie.

Taxonomie

Etude théorique de la classification des organismes, qui implique les activités séquentielles et interdépendantes d'allocation des organismes aux taxons, leur nomenclature et leur identification.

Topoisomérase

Enzyme qui permet la division et la multiplication cellulaires en déroulant les doubles-brins d'ADN au niveau des noyaux cellulaires.

Transcriptase inverse

Polymérase qui catalyse la synthèse de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN, mieux connue pour son rôle dans la réplication du virus du SIDA et d'autres rétrovirus.

Toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1)

Exotoxine (protéine soluble diffusant dans le milieu environnant) produite par le *Staphylococcus aureus* et responsable du syndrome de choc toxique staphylococcique.

Vecteur

Molécule d'ADN utilisée dans le clonage. Il contient souvent une origine de réplication, un site de clonage multiple et un marqueur sélectionnable.

Virion

Particule virale complète et autonome, trouvée en extracellulaire et capable de survivre sous forme cristalline et d'infecter une cellule vivante ; il comprend le nucléoïde (matériel génétique) et la capsid.

INTRODUCTION

Introduction

Les maladies infectieuses sont causées par des agents pathogènes qui peuvent souvent évoluer et se propager rapidement, entraînant l'émergence des formes plus virulentes d'agents pathogènes existants et des organismes résistants aux molécules utilisées en thérapeutique [1]. Ces maladies représentent l'un des enjeux de santé publique les plus importants [2].

Avec l'émergence de ces nouvelles souches, nous sommes confrontés à de grands défis en matière de diagnostic, de prévention et de traitement [3]. Ceci implique une connaissance approfondie de l'épidémiologie moléculaire des maladies infectieuses [4].

Cette dernière repose sur des méthodes de typage comme moyen de caractérisation et de discrimination des isolats en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et/ou génotypiques. Cela peut ensuite être utilisé pour déterminer les relations clonales entre les souches et pour décrire la propagation topographique des clones [5].

Les systèmes de typage traditionnels basés sur des phénotypes sont utilisés depuis de nombreuses années [6]. Toutefois, il a été démontré que les méthodes de génotypage, qui reposent sur l'analyse du matériel génétique d'un micro-organisme, présentent une meilleure performance [7].

Plusieurs méthodes de typage moléculaire ont été proposées qui peuvent identifier des isolats dans le monde entier (épidémiologie mondiale) et/ou lors d'épidémies localisées de maladies infectieuses (épidémiologie locale) [8].

Actuellement, le génotypage est largement utilisé dans plusieurs grands domaines de la recherche microbiologique, comme un outil de surveillance des infections hospitalières, pour les enquêtes épidémiologiques visant à confirmer ou infirmer les relations des souches clonales, dans l'étude de la pathogenèse, les études phylogénétiques, la génétique des populations de microorganismes ou la taxonomie [9].

Notre capacité de faire une distinction précise entre les souches d'agents pathogènes infectieux est essentielle à l'efficacité de l'étude et la surveillance épidémiologique, à l'étude de la structure et de la dynamique de la population microbienne et, en fin, à l'élaboration de stratégies de contrôle de la santé publique [10, 11].

L'objectif de ce travail est la description des différentes méthodes de génotypage, et leur apport dans les enquêtes épidémiologiques à différentes échelles, temporelles et géographiques, et dans la surveillance de routine des bactéries infectieuses notamment celles présentant des multirésistances aux antibiotiques.

Ce travail s'intéresse aux différentes techniques de génotypage qui peuvent être classer en trois catégories : (i) les méthodes basées sur la restriction enzymatique ; ainsi que (ii) les méthodes basées sur l'analyse de profils de bandes après amplification de régions cibles ; et (iii) la dernière catégorie concerne les méthodes basées sur le séquençage d'ADN.

Pour chaque technique sera détaillé, le principe, le mode opératoire et l'interprétation des résultats ; avec une mise au point sur les avantages et les limites.

Par ailleurs, on traitera des différentes applications de ces méthodes dans diverses disciplines, y compris la taxonomie, la phylogénétique, l'évolution moléculaire, la bactériologie clinique et l'épidémiologie moléculaire des maladies infectieuses. Un exemple d'application des méthodes de génotypage sur une bactérie « *Staphylococcus aureus* » sera détaillé.

CHAPITRE I

**« GENOME ET ELEMENTS GENETIQUES :
rappel sur la structure bactérienne, le génome
bactérien et les éléments génétiques »**

CHAPITRE I : GENOME ET ELEMENTS GENETIQUES : rappel sur la structure bactérienne, le génome bactérien et les éléments génétiques

I.1. Formes et propriétés générales des bactéries

Les bactéries sont des êtres procaryotes unicellulaires qui possèdent les éléments essentiels à la vie cellulaire. Elles sont classées parmi les **procaryotes**, car elles sont dépourvues de membrane nucléaire (*figure 1*) [12, 13].

Les bactéries ont une taille moyenne de 0.5 à 2.0 µm de large et 2 à 6 µm de long, parfois beaucoup plus. Ils ont des formes très variées [14].

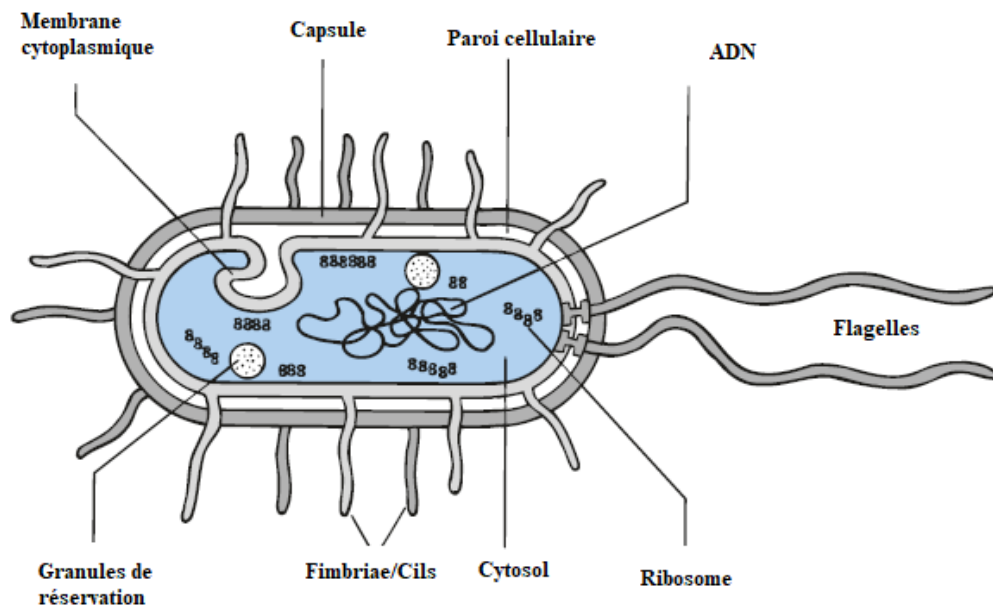


Figure 1 : Structure générale d'une bactérie [15].

Elles peuvent être désintégrées par divers procédés physiques et chimiques, ce qui permet d'étudier les constituants bactériens ainsi libérés [13].

Les bactéries sont constituées d'éléments obligatoires qui se trouvent chez toutes les bactéries ainsi que d'autres éléments qui sont facultatifs (*tableau I*).

ELEMENTS CONSTANTS	ELEMENTS FACULTATIFS
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le cytoplasme ▪ Les ribosomes ▪ La membrane cytoplasmique ▪ La paroi ▪ Le chromosome bactérien 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La capsule ▪ Les cils ou flagelles ▪ Les pili ou fimbriae ▪ Le glycocalyx ▪ L'ADN extra-chromosomique

Tableau I : Les éléments obligatoires et les éléments facultatifs des bactéries (originale).

I.2. Génome bactérien

Le **génome bactérien** correspond à l'ensemble des gènes contenus dans la cellule bactérienne (la totalité du matériel génétique de la cellule) [16].

Le génome bactérien est l'élément structurel concerné par l'étude de l'ensemble de l'information héréditaire des bactéries, qui peut être appliquée pour analyser les épidémies d'infections bactériennes et même l'évolution bactérienne.

Deux décennies après que le premier génome bactérien de *Haemophilus influenza* a été complètement séquencé, jusqu'à ce jour, plus de 30 000 génomes bactériens ont été séquencés, et leurs informations génomiques sont accessibles au public dans différentes bases de données [17].

I.3. Eléments génétiques

Les éléments génétiques sont des structures contenant du matériel génétique. Chez les bactéries, bien que le principal élément génétique soit le **chromosome**, qui est un élément obligatoire portant des gènes pour toutes les fonctions essentielles et leur régulation, d'autres éléments génétiques peuvent exister. Ces éléments sont facultatifs et ne codent pas pour des fonctions essentielles mais peuvent conférer à la cellule bactérienne des propriétés spécifiques [16].

Parmi ces éléments génétiques des bactéries autre que le chromosome on trouve : les plasmides, les transposons, les intégrons, les cassettes, les phages et les îlots génomiques [18].

I.3.1. ADN chromosomique

I.3.1.1. Molécules constitutives

L'ADN chromosomique est constitué d'une double hélice d'ADN circulaire, chaque chaîne est faite d'une succession d'unités plus simple appelées **nucléotides** (*figure 2(b)*). Le nucléotide est formé d'un assemblage de trois types de molécules :

- ✓ Une molécule d'acide phosphorique
- ✓ Une molécule du sucre (désoxyribose)
- ✓ Une molécule d'une base azotée différente selon le nucléotide

Quatre bases entrent dans la composition de l'ADN ; les bases puriques (Adénine et Guanine) et les bases pyrimidiques (Cytosine et Thymine) (*figure 2(a)*). Il existe donc quatre types possibles de nucléotides selon la base organique [16].

Lorsqu'un acide nucléique est en solution les molécules forment **des liaisons hydrogènes** associant les nucléotides deux par deux, de sorte qu'un nucléotide à adénine se lie avec un nucléotide à thymine (ou à uracile dans l'ARN) et un nucléotide à guanine avec un nucléotide à cytosine [19] ; voir la structure moléculaire en *annexe I*.



Figure 2 : Les composants des acides nucléiques [20, 21].

I.3.1.2. Caractéristiques et propriétés du chromosome bactérien

L'ADN bactérien est circulaire (nucléotide) Contient entre 1 000 000 et 4 500 000 paires de bases, entre 800 et 4300 gènes et représente environ 0.1% du génome humain ; il peut exister sous trois formes topologiques (super-enroulée, relâchée, linéaire) objectivées par plusieurs techniques telle l'ultracentrifugation, la microscopie électronique ou tout simplement l'électrophorèse en gel d'agarose (technique d'usage courant) [19].

✚ Séparation ou dénaturation : Les deux chaînes ou alpha hélices sont maintenues entre elles (A-T, C-G) par les deux ou trois liaisons "hydrogène". Le chauffage permet leur séparation en brins monocaténaire = dénaturation. Cette séparation est réversible (renaturation ou hybridation) selon le principe de la complémentarité des bases (A-T, C-G) [22].

Lors de la séparation, il y a augmentation de la densité optique à 260 nm (effet hyperchromique), et celle-ci est fonction du nombre de paires GC (l'ADN ayant un contenu en GC plus grand aura plus de liaisons hydrogènes et ses chaînes ne se sépareront qu'à des températures plus élevées). Il est possible de calculer un paramètre quantitatif (T_m : température de fusion). Ainsi la détermination du GC% est un critère taxonomique ou de classification des bactéries qui peut être calculé selon l'espèce bactérienne (*figure 3*). Il peut varier largement selon les groupes bactériens [23].

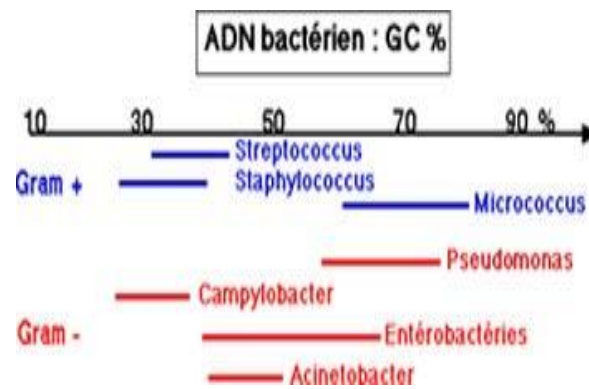


Figure 3 : ADN bactérien : pourcentage guanine-cytosine [22].

✚ **Hydrolyse ou restriction** : L'ADN double brin peut être coupé par des enzymes de restriction, dénommées « **endonucléases** » [16]. On peut donc réduire de manière reproductible, le génome bactérien à une série de fragments caractéristiques isolables et mesurables (kb=kilobases). Le mode d'action très spécifique des endonucléases permet d'établir **des profils de restriction** [22]. Les noms de quelques enzymes de restriction, les bactéries productrices de ces enzymes ainsi que leurs sites de reconnaissance sont développés dans l'*annexe II*.

✚ **Les régions répétées (les séquences inversées répétées)** : Les molécules d'ADN contiennent souvent des régions composées de courtes séquences répétées inversées avec lesquelles un grand nombre de protéines interagissent. Ces séquences impliquent souvent plusieurs suites de cinq ou six adénines (sur le même brin), chacune séparée par quatre ou cinq des autres bases. Ces séquences inversées répétées confèrent à l'ADN une double symétrie pouvant aboutir à la formation de structure tige-boucle : courte région en double hélice avec des appariements de bases normaux et des brins antiparallèles ; les séquences inversées répétées, même si elles ne conduisent pas à la formation de tige-boucle, sont souvent des sites de fixation spécifiques pour les protéines régulant la transcription [16].

I.3.2. Les autres éléments génétiques du génome bactérien

I.3.2.1. Plasmides

Molécules d'ADN double brin libres, le plus souvent circulaires mais peuvent être linéaires, à localisation extra-chromosomique (à l'exception de certains plasmides qui peuvent s'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cellule-hôte sous forme d'épisomes), à capacité de répllication autonome (des réplicons avec leur propre origine de répllication ORI), portent des caractères génétiques non essentiels à la survie de la bactérie mais souvent très utiles [16, 18, 24]. Leur transmission à la descendance est stable et sont présents chez la plupart des espèces bactériennes [24]. Les caractéristiques des plasmides, les caractères phénotypiques portés par les plasmides ainsi que le transfert des plasmides sont développés dans l'*annexes III*.

I.3.2.2. Transposons

I.3.2.2.1. Définition

Les transposons sont des séquences d'ADN variant de 700 à 40 000 paires de bases, capables de promouvoir leur propre transfert d'un réplicon (chromosome ou plasmide) à un autre. Le mouvement effectué par le transposon est appelé **transposition** et les enzymes qui en sont responsables sont nommées **transposases**. Le transposon, également surnommé jumping gene ou « gène sauteur », code pour ses propres transposases et conserve sa capacité à « sauter » d'une région à l'autre du génome lorsqu'il se déplace. Tous les transposons bactériens sont constitués au niveau de leurs extrémités, de séquences d'ADN inversées et répétées « **SRI** ». [16, 25, 18].

Les transposons sont capables de promouvoir leur translocation d'un réplicon sur un autre « **transposition intermoléculaire** » ou sur le même réplicon « **transposition intramoléculaire** » [26].

Les éléments transposables sont trouvés chez tous les micro-organismes et ont probablement un rôle majeur dans l'évolution des génomes en transportant des gènes entre les molécules d'ADN [23].

Les transposons peuvent se déplacer d'un hôte à un autre en s'insérant au sein d'éléments génétiques capables de se transférer d'une cellule à une autre, tels que les phages, les plasmides, les éléments intégratifs conjugatifs ou les éléments mobilisables, ce qui leur permet d'assurer leur propagation et maintien [27].

Ils peuvent également contenir des gènes autres que celui de la transposase telle que la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et des gènes producteurs de toxines [27].

I.3.2.2.2. Structure

Les éléments transposables les plus simples et les plus petits sont appelés séquences d'insertion ou SI, signifiant leur capacité à s'insérer au hasard dans le génome sans nécessiter une large région d'homologie avec la séquence nucléotidique cible. Une séquence d'insertion est un simple gène qui code la transposase (enzyme effectuant la transposition) ; ce gène est encadré par des séquences de nucléotides inversement répétées IR ou SRI (« inverse repeats séquences ») qui marquent les extrémités de la SI (*figure I.5(a)*).

D'autres Transposons bactériens plus complexes peuvent contenir des gènes autres que celui de la transposase telle que la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds, des toxines... Ces gènes sont situés dans la région centrale et sont flanqués de deux modules SI (séquences IS) dans le cas des transposons composites (*figure 4(b)*) ou flanqués de séquences inversement répétées SRI le cas des transposons de la famille Tn A (*figure 4(c)*) p.ex. [23].

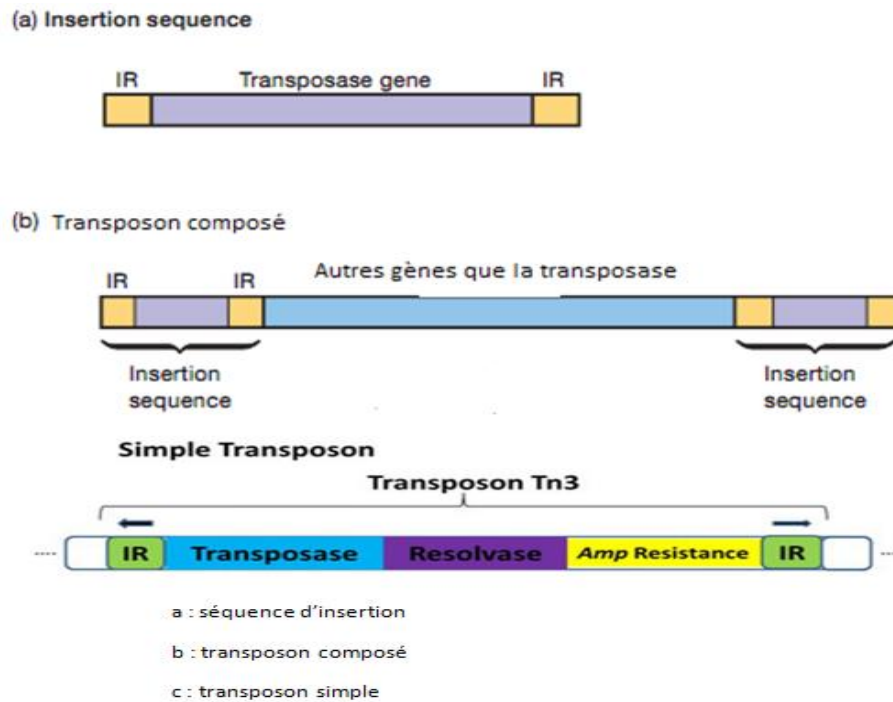


Figure 4 : Structure des transposons [19, 28].

Le phénomène de transposition ainsi que le rôle et les conséquences de la mobilité des transposons sont décrits dans l'*annexe IV*.

I.3.2.3. Intégrons

I.3.2.3.1. Définition

Les intégrons sont des éléments génétiques **non mobiles** incapable d'autoréplication et obligatoirement **portés par un réplicon** (plasmide, chromosome). Ils peuvent capturer et exprimer des gènes d'autres sources. (Système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes).

Les intégrons contiennent un gène qui code une protéine appelée *intégrase* nécessaire pour la recombinaison *site-spécifique*. Ils contiennent aussi une séquence d'ADN spécifique qui permet à l'intégrase d'insérer des groupes de gènes appelés cassettes avec un promoteur qui permet l'expression de la nouvelle cassette de gènes intégrée. Les intégrons peuvent faire partie de plasmides, de transposons ou plus rarement du chromosome bactérien [16].

I.3.2.3.2. Structure

Ils sont dotés d'une structure spécifique, composée de deux segments conservés encadrant une région centrale dans laquelle peuvent s'insérer les « cassettes » de gène. [18]. Les intégrons sont constitués d'une **région 5'** comprenant un **gène *intI*** qui code pour une intégrase, suivi d'un site d'attachement dit ***attI*** qui est un site spécifique de recombinaison et d'un promoteur Pc (**figure 5**) [18, 25].

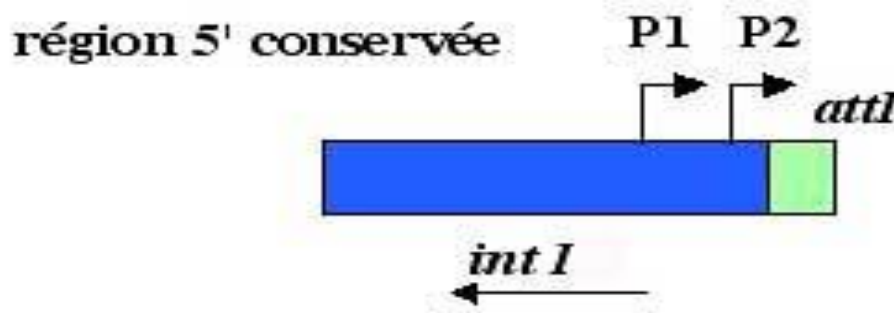


Figure 5 : Structure de la région 5' des intégrons [25].

Il existe **plusieurs classes d'intégrons** définies en fonction de la nature des gènes codant pour l'intégrase. Trois d'entre elles (classes 1, 2 et 3) ont été bien caractérisées et sont impliquées dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Le site ***attI*** est un site spécifique de **recombinaison** ; il est situé entre le début du gène ***intI*** et la première cassette. Les sites ***attI*** des différentes classes d'intégrons n'ont pas de séquence conservée entre eux à l'exception des sept dernières paires de bases constituant un élément nommé « core site », dont la séquence est **GTTRRRY** (R, purine ; Y, pyrimidine).

Le core site est un élément clé de cette région car c'est le point d'insertion des cassettes [25].

Au sein des intégrons, sont définis **deux grands groupes**, les **super-intégrons (SI)** et les **intégrons de résistance (IR)**. Les **super-intégrons SI** contiennent jusqu'à 200 cassettes et sont localisés sur le chromosome de centaines d'espèces bactériennes (17 % des génomes bactériens séquencés) isolées le plus souvent des écosystèmes marins ou telluriques (*Vibrio sp.*, *Xanthomonas sp.* . .). La plupart des gènes hébergés dans ces cassettes codent des protéines de fonctions inconnues. Les **intégrons de résistance IR** contiennent un nombre plus restreint de cassettes dont les gènes codent le plus souvent des résistances aux antibiotiques [29].

L'épidémiologie des intégrons ainsi que leur relation avec la résistance bactérienne aux antibiotiques sont développées dans l'**annexe V**.

I.3.2.4. Cassettes de gènes

I.3.2.4.1. Définition

Les cassettes forment un groupe varié de petits éléments mobiles non réplcatifs. Ce sont des unités fonctionnelles indépendantes qui peuvent être mobilisées de manière individuelle [25]. Elles existent sous forme linéaire au sein d'un intégron ou sous forme circulaire à l'état libre. La plupart des gènes de cassettes des intégrons codent pour la résistance aux antibiotiques mais il existe d'autres cassettes codant des protéines de fonction inconnue [29].

Voir l'*annexe VI* pour l'expression des cassettes et les fonctions portées par ces dernières.

I.3.2.4.2. Structure

Les cassettes ont des tailles et des fonctions très variables mais possèdent une organisation commune. Une cassette est constituée généralement d'un seul gène adjacent à un site spécifique de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase. Le site *attC* est constitué de séquences, relativement conservées, inversées répétées imparfaites dont la taille varie de 57 à 141 paires de bases. Deux séquences inversées répétées de 7 paires de bases sont constamment retrouvées aux deux extrémités de chaque site *attC* et désignées « core » et « core inverse » [25].

Le core de séquence consensus GTTRRRY est localisé à l'extrémité droite (3') du site *attC* et le core inverse de séquence complémentaire RYYAAC à l'extrémité gauche (ou 5') (*figure 6*) [25].

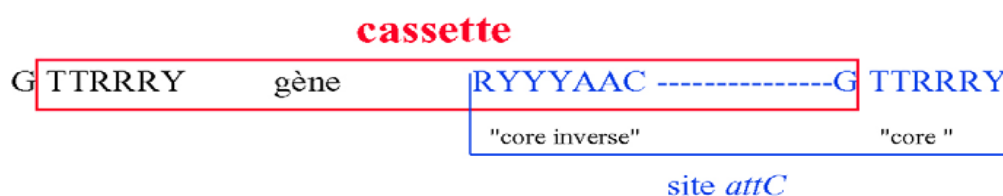


Figure 6 : Structure d'une cassette [25].

I.3.2.4.3. Intégration des cassettes dans un intégron

Le mouvement des cassettes a été principalement étudié dans les intégrons de classe 1. Les cassettes sont intégrées seules ou en tandem **en aval du site *attI*** (*figure 7*).

L'intégrase IntI1 est une protéine qui appartient à la famille des recombinases à tyrosine mais a la particularité de pouvoir recombiner des séquences qui peuvent avoir peu d'homologie entre elles du moment qu'elles contiennent le motif GTTRRRY, L'intégrase catalyse aussi bien l'intégration que l'excision des cassettes, ces mouvements s'effectuant par recombinaison entre

deux sites spécifiques reconnus par l'intégrase. Les sites *attC* et le site *attI* sont des sites reconnus par l'intégrase. L'évènement de crossing-over se produit entre le G d'un site consensus GTTRRRY et le premier T d'un deuxième site consensus. Des expériences de mutagenèse ont montré que la conservation du triplet GTT était très importante pour l'activité du site [25].

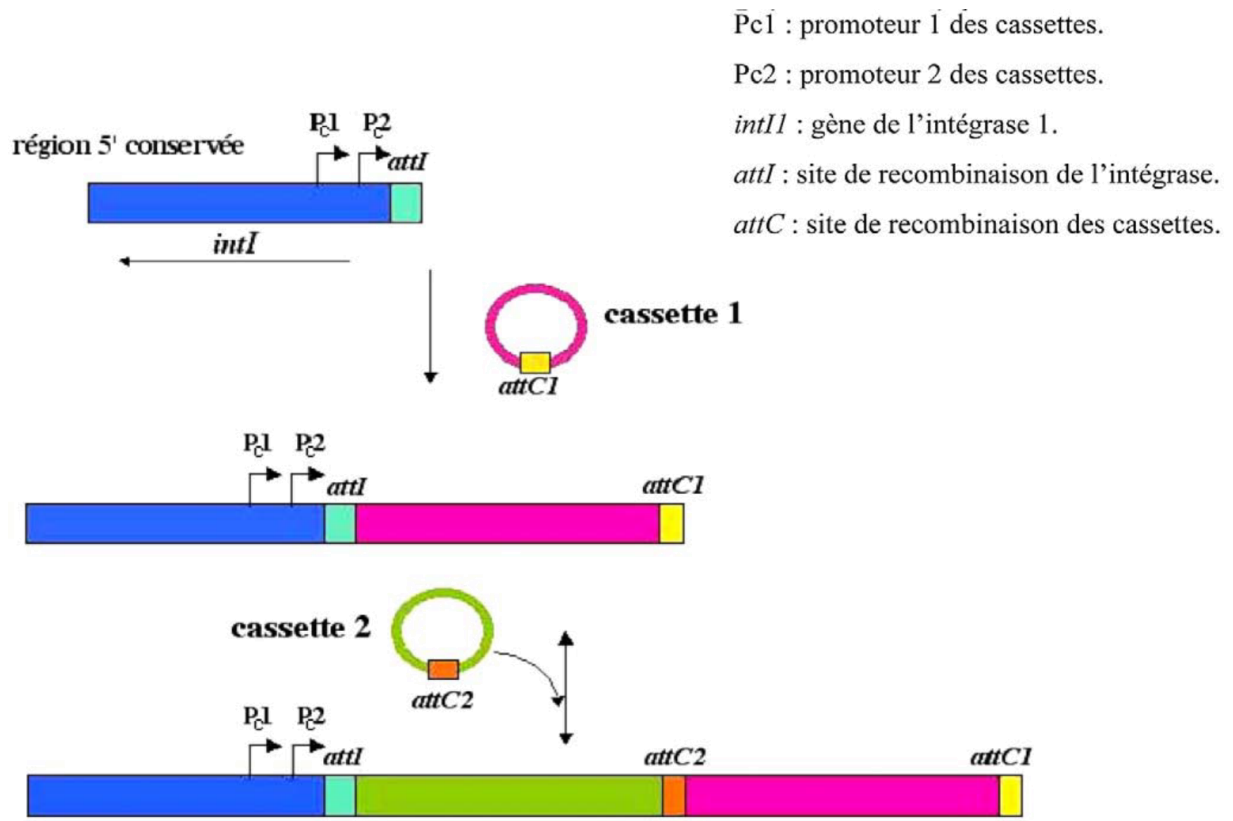


Figure 7 : Mécanisme d'intégration des cassette [25].

L'intégration des cassettes 1 et 2 se fait préférentiellement au site de recombinaison *attI* situé dans la région 5'.

I.3.2.5. Phages

Les **virus** sont des parasites intracellulaires obligatoires qui ne peuvent se propager qu'à l'intérieur des cellules-hôtes. Tout type cellulaire vivant peut théoriquement être infecté par un ou plusieurs types de virus, et **la bactérie n'est pas une exception**, le terme « bactériophage » ou tout simplement « phage » est couramment utilisé pour définir les virus qui infectent les cellules bactériennes [30, 31].

Les premiers génomes à être séquencés étaient ceux des phages [31]. La petite taille et la simplicité de l'isolement ont fait des bactériophages le choix principal pour le séquençage complet du génome [17].

I.3.2.5.1. Définition

La définition des **virus bactériens** rejoint celle de tous les autres virus, elle est résumée en 1953, selon Woff qui donna une définition, de la particule virale ou virion qui est maintenant universellement adoptés. Le virion ne procède qu'un seul type d'acide nucléique soit de l'ARN, soit de l'ADN. Il possède les propriétés suivantes :

- ✚ La production à partir de son seul acide nucléique.
- ✚ L'incapacité de croître et de subir des divisions binaires.
- ✚ L'absence d'informations génétiques concernant les enzymes du métabolisme intermédiaire (susceptibles de produire de l'énergie).
- ✚ L'utilisation des structures de la cellule hôte, et spécialement de ses ribosomes, dans leur multiplication [19].

Le cycle biologique des bactériophages est développé dans l'*annexes VII*.

I.3.2.5.2. Influence des phages sur l'évolution et la diversité de génome bactérien

La recherche sur les bactériophages a révélé leur impact sur l'évolution de la diversité microbienne, et leur influence dans la régulation de l'équilibre microbien dans l'écosystème :

✚ Les phages portent des gènes de virulence dans leurs génomes peuvent convertir une souche normale en pathogène lors de la **lysogenisation**, comme dans le cas du génome de phage filamenteux codant les gènes de la toxine choléra de *Vibrio cholerae* (la bactérie *vibrio* qui, quand elle est lysogénisée par le phage, cause le **choléra**) [17].

✚ L'ADN bactérien peut être transféré d'une cellule bactérienne à une autre par une particule de phage. Une telle particule est appelée un phage transducteur. et le processus est nommé transduction [32]. Les phages contribuent donc à la diversité de la communauté bactérienne en servant de **vecteurs pour la transduction** de différents allèles génétiques, comme les gènes de résistance aux antibiotiques [17].

I.3.2.6. Ilots génomiques

I.3.2.6.1. Définition

Un îlot génomique (IG) se définit comme une région d'ADN chromosomique de grande taille, généralement comprise entre 10 et 200 kb, identifiée par sa présence dans le génome d'une espèce mais absente du génome d'autres souches de la même espèce ou d'espèces proches [18]. Les îlots génomiques sont généralement intégrés dans un chromosome bactérien, mais on peut aussi les trouver sur des plasmides ou dans des phages [33]. On les distingue par le contenu en GC, la fréquence des séquences répétitives et l'utilisation de codons qui sont pour la plupart

différents du reste du chromosome, ce qui indique que ces îles ont pu être importées par transfert horizontal de gènes [17].

I.3.2.6.2. Caractéristiques

En règle générale un îlot génomique comprend les caractéristiques suivantes :

- ✚ C'est un large fragment d'ADN, souvent détecté par comparaison génomique entre différentes souches génétiquement proches. Lorsque la taille est inférieure à 10 kpb on les nomme « îlets génomiques » [34].

- ✚ Il peut être détecté par l'analyse de statistiques nucléotidiques (% GC, utilisation des codons), car leurs caractéristiques sont souvent distinctes du reste du chromosome.

- ✚ Un îlot génomique est souvent inséré au niveau d'un gène codant pour un ARN de transfert (ARNt) [34].

- ✚ Un îlot génomique est souvent flanqué de séquences répétées parfaites ou presque parfaites d'environ 16-20 pb. Ces séquences sont le résultat de l'insertion site-spécifique de l'îlot dans sa séquence cible et peuvent éventuellement servir à l'excision de ce dernier.

- ✚ Un îlot génomique présente généralement des gènes fonctionnels ou cryptiques codant pour des intégrases et/ou des protéines de mobilité d'origine plasmidique ou phagique et permettant parfois le transfert de l'îlot.

- ✚ Un îlot génomique possède souvent des séquences d'insertion (IS) ou des transposons, qui peuvent avoir été impliqués dans la mobilisation de matériel génétique à partir de l'îlot ou vers celui-ci

- ✚ Généralement un îlot génomique possède des gènes qui confèrent un avantage sélectif pour la bactérie qui le possède. En fonction du type d'avantage conféré, l'îlot peut prendre le nom d'îlot de pathogénicité, de symbiose, de métabolisme, de fitness ou de résistance [34].

I.3.2.6.3. Types ou Fonctions

L'introduction d'un nouvel IG peut entraîner un changement total du phénotype, du comportement ou du mode de vie de l'organisme récepteur [33]. En outre, la présence des îlots génomiques similaires dans différentes bactéries peut montrer des fonctions distinctes dans des conditions écologiques spécifiques. Une bactérie peut contenir plusieurs îlots génomiques dans son génome responsables de différentes fonctions [17].

Selon les avantages phénotypiques fournis, un IG peut être :

a) Îlot de pathogénicité

Lorsque les îlots génomiques contiennent des gènes qui causent des maladies, on les appelle des îlots de pathogénicité [32]. Ils sont l'un des sous-ensembles d'îlots génomiques d'abord décrites dans *Escherichia coli*, mais ont maintenant été identifiées dans les génomes de plusieurs bactéries pathogènes. Les îlots de pathogénicité sont caractérisés par de grands clones de caractères de virulence et sont donc parmi les principaux contributeurs à la pathogénèse de certaines bactéries, comme par exemple l'îlot pathogène présent dans la souche O157:H7 d'*Escherichia coli*. Ce dernier code des facteurs qui permettent aux cellules de coller à la paroi intestinale et de sécréter des protéines spécifiques dans les cellules hôtes [17, 32].

b) Îlot de résistance

Sont des îlots génomiques contenant des marqueurs de résistance comme la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. Les îlots de résistance ont été principalement décrits dans les Protéobactéries, y compris *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, et plus récemment, dans *Acinetobacter baumannii* [35].

c) Îlot de symbiose

Lorsqu'un îlot génomique permet à la bactérie hôte de s'établir en symbiose avec un autre organisme on le nomme îlot de symbiose. C'est le cas de l'îlot de symbiose retrouvé chez *Mesorhizobium loti* R7A. Cet îlot de 502 kpb permet la symbiose de *Mesorhizobium loti* avec plusieurs espèces de *Lotus*, dont *Lotus corniculatus* et *Lotus japonicus* [36].

d) Îlot de métabolisme

Comme son nom l'indique, un îlot de métabolisme permet à son hôte d'emprunter une nouvelle voie métabolique menant à la synthèse ou la dégradation d'un composé. , comme par exemple la capacité d'utiliser de nouvelles sources de carbone et d'azote [37], la dégradation du chlorobiphényle ou du chlorobenzène par la souche B13 de *Pseudomonas sp* et les îles de production de *Xanthomonas xanthangum* [34, 17].

e) Autres fonctions :

✚ **Île de fitness** : confère de nouvelles propriétés qui améliorent la capacité d'adaptation de leur hôte bactérien, comme l'île de fitness acide d'*Escherichia coli* [AFI] [38].

✚ **Île saprophytique** : comme l'île codant des adhésions dans certaines souches d'*Escherichia coli*.

✚ **Île écologique** : comme une île permettant la dégradation phénolique dans *Pseudomonas putida*.

✚ **Île de défense** : comme la souche ANA-3 de *Shewanella sp* [33].

CHAPITRE II
« GENOTYPAGE »

CHAPITRE II : GENOTYPAGE

II.1. Définitions

Le typage est la caractérisation des isolats ou des souches sous le niveau des espèces ou des sous-espèces [2], en effet il s'agit de l'analyse phénotypique et / ou génétique des isolats bactériens, au-dessous du niveau des espèces / sous-espèces, effectuée afin de générer des empreintes digitales spécifiques à la souche / clone. Le « sous-typage », terme couramment utilisé dans la littérature américaine « subtyping », est souvent utilisé comme synonyme de typage [39].

Le génotypage mesure la différence génétique entre les souches dans une population.

Les outils de typage des souches sont des techniques de laboratoire utilisées pour évaluer la variation des génotypes et phénotypes bactériens. Les marqueurs font référence aux gènes et produits d'expression spécifiques qui sont évalués par le typage des souches.

Les méthodes phénotypiques de typage sont celles qui détectent les caractéristiques exprimées par les micro-organismes.

Les méthodes de génotypage sont définies comme des méthodes utilisées pour différencier les bactéries, sur la base de la composition des acides nucléiques [40, 41]. Ces méthodes sont donc des techniques de laboratoire qui évaluent les variations des génomes des isolats bactériens en fonction de la composition, de la structure globale ou de la séquence nucléotidique précise afin d'identifier les souches appartenant à un clone épidémique ou endémique sur la base de la présence de caractéristiques spécifiques à ce clone différentes de celles de souches appartenant à la même espèce et sans lien épidémiologique [42, 43]

II.1.1. Avantages et limites des méthodes de typage phénotypique

Les premières méthodes utilisées pour identifier et typer les organismes étaient basées sur leurs caractéristiques phénotypiques [44]. La parenté des isolats bactériens était déterminée uniquement en testant un ou plusieurs marqueurs phénotypiques [40]. Ces marqueurs phénotypiques sont nombreux : biotypes (caractères biochimiques), antibiotypes (profils de résistance aux antibiotiques), sérotypes (antigènes de surface), lysotypes (profil de sensibilité à une série de bactériophages), bactériocinotypes (profil de sensibilité d'une collection de souches aux bactériocines produites par la souche à typer) ou encore profil protéique (extraction des protéines bactériennes puis séparation par électrophorèse) [45, 46].

Les limites du sérotypage incluent un manque de disponibilité de certains antisérums et problèmes de standardisation de différentes méthodes. Le biotypage manque souvent de pouvoir discriminant en raison des variations de l'expression des gènes et des mutations aléatoires qui peuvent altérer les propriétés biologiques des micro-organismes. Le biotypage ne peut pas différencier les souches où la diversité biochimique est rare, comme les Entérocoques, et donc l'utilité du biotypage dans les études épidémiologiques est assez limitée.

Le typage par des bactériophages demande beaucoup de travail et la méthode démontre souvent une mauvaise reproductibilité et standardisation.

Pour ce qui est de l'antibiotype, dans la plupart des études épidémiologiques, l'antibiogramme a une valeur limitée car les isolats qui ne sont pas génétiquement et épidémiologiquement liés peuvent avoir le même profil de sensibilité aux antibiotiques [44, 47].

Malgré ces limites, la caractérisation phénotypique continue de jouer un rôle vital dans la gestion globale des maladies infectieuses, certaines d'entre elles sont encore couramment utilisées en raison de leur facilité d'utilisation et de leur faible coût.

Par exemple, les tests de sensibilité aux antimicrobiens de routine par le laboratoire de microbiologie clinique peuvent révéler un modèle unique de résistance aux antimicrobiens, qui sert fréquemment d'alerte précoce de cas groupés d'infections nosocomiales [44, 47].

L'utilisation de ces marqueurs phénotypiques pour la caractérisation des agents pathogènes a été utile pour notre compréhension des agents pathogènes ; cependant, ils présentent des inconvénients qui limitent leur utilité pour un typage hautement discriminant des micro-organismes, et ce du fait de la non-répétabilité et le manque de reproductibilité intra et inter laboratoires. Mais aussi à cause de leur faible pouvoir discriminant [40, 44, 45].

II.1.2. Avantages et limites des méthodes de génotypage

La plupart des méthodes moléculaires nécessitent un matériel et un équipement coûteux, mais sont relativement faciles à apprendre et s'appliquent à une large variété d'espèces.

Les méthodes génotypiques ont largement supplanté les méthodes phénotypiques [47], Ils offrent généralement une meilleure sensibilité et spécificité et par conséquent, fournissent des données plus précises que les méthodes phénotypiques [2].

Les avantages du génotypage résident également dans le fait qu'ils soient moins susceptibles d'être affectés par les conditions de croissance ou les manipulations de laboratoire auxquelles les organismes sont soumis. Par rapport aux techniques phénotypiques, les techniques génotypiques présentent une applicabilité générale et un pouvoir discriminant élevé [48].

En outre, la caractérisation génotypique des agents pathogènes facilite la normalisation du stockage des informations et des analyses, de l'interprétation et de la communication des données, qui se prêtent toutes à des manipulations assistées par ordinateur [48].

II.2. Caractéristiques des méthodes de typage

Le choix d'une ou de plusieurs méthodes de typage moléculaire appropriées dépend de façon significative du but et du contexte épidémiologique dans lequel la méthode sera utilisée, ainsi que des outils disponibles, du délai requis pour la réponse, de l'échelle géographique et temporelle de son utilisation et surtout de l'espèce bactérienne concernée [49, 43].

Bien que de nombreuses techniques soient disponibles, chacune d'elles a ses avantages et ses limites qui la rendent utile dans certaines études et restrictive dans d'autres [49]. L'efficacité ou la pertinence d'une méthode de typage peut être évaluée en fonction d'un certain nombre de critères qui doivent être pris en compte lors de l'évaluation, de la validation et de la comparaison des méthodes. Il s'agit notamment des critères de performance ainsi que des critères de commodité ou de faisabilité (*tableau II*) [49, 42, 39].

Critères de performance

1. Pouvoir discriminant
2. Reproductibilité
3. Typabilité
4. Portabilité
5. Stabilité
6. Concordance épidémiologique
7. Population d'essai

Critères de Commodité (faisabilité)

1. Flexibilité
2. Rapidité
3. Accessibilité
4. Facilité d'utilisation
5. Coût
6. Analyses automatisées et l'intégration dans les bases de données

Tableau II : Caractéristiques des méthodes génotypiques (originale).

II.2.1. Critères de performance

II.2.1.1. Pouvoir discriminant

Le marqueur idéal correspond à une caractéristique stable au sein des souches du clone épidémique et suffisamment diversifiée à l'intérieur de la population de l'espèce concernée [43].

Cette capacité d'un marqueur ou d'une technique à différencier deux souches n'ayant aucun lien épidémiologique porte le nom de « pouvoir discriminant » et est la caractéristique clé des systèmes de typage, car il conditionne la probabilité que les isolats qui partageant des types identiques ou qui sont étroitement liés soient vraiment clonaux et fassent partie de la même chaîne de transmission [43, 49].

II.2.1.2. Reproductibilité

La reproductibilité fait référence à la capacité d'une technique à produire le même résultat. Les résultats d'une bonne méthode de typage devraient être reproductibles, indépendamment de l'opérateur, du lieu et du temps [39].

II.2.1.3. Typabilité

Les caractéristiques utilisées pour le typage doivent aussi être obtenues dans presque tous les isolats au sein d'une espèce donnée afin de garantir un degré élevé de « typabilité » qui définit la capacité de typage : possibilité d'appliquer la technique et d'obtenir un résultat pour le caractère testé pour toutes les souches d'une espèce [43].

La typabilité fait référence à la proportion d'isolats qui peuvent être notés dans le système de typage et auxquels un type est attribué, idéalement pour tous les isolats [49]. Il peut être exprimé en pourcentage d'isolats typables par rapport au nombre total d'isolats typés (typables et non typables). La plupart des méthodes de génotypage peuvent caractériser tous les isolats d'une population (typabilité à 100 %) [39].

II.2.1.4. Portabilité

L'un des éléments importants permettant de pouvoir tracer les liens épidémiologiques et d'assurer éventuellement la traçabilité des phénomènes épidémiques à une échelle large aussi bien géographique que temporelle est la capacité pour les données de typage de pouvoir être comparées d'une série d'analyses à une autre et d'un laboratoire à un autre, l'ensemble étant regroupé sous le terme de « portabilité » de la technique [43]. Elle est évaluée par le coefficient de Wallace (une valeur indiquant la probabilité que deux souches classées comme étant du même type par une méthode soient également classées comme étant du même type par une autre méthode) [42].

II.2.1.5. Stabilité

La stabilité est la caractéristique biologique des isolats dérivés de clones pour exprimer des marqueurs constants au fil du temps et des générations : le score d'une souche ne doit pas changer rapidement et doit correspondre à la position de la souche dans le contexte épidémiologique [49, 39]. Étant donné que les mutations et les recombinaisons se produisent à des fréquences dépendant des espèces, de la souche et des conditions environnementales, la stabilité des marqueurs testés par chaque méthode devrait être évaluée pour chaque espèce bactérienne étudiée [39].

II.2.1.6. Concordance épidémiologique

Dans une phase initiale de validation, une technique donnée doit permettre d'assurer une concordance épidémiologique, c'est-à-dire permettre de relier/grouper clairement des souches dont les liens épidémiologiques sont établis et, à l'inverse, permettre de distinguer des souches dont on est certain de l'absence de lien épidémiologique [43]. Donc c'est la capacité d'un système de typage de classer correctement tous les isolats liés à une épidémie bien décrite [49].

II.2.1.7. Population d'essai

Une population d'essai appropriée/bien définie est une condition préalable à l'évaluation de la typabilité, du pouvoir discriminant et de la concordance épidémiologique des méthodes de typage.

Notez que la nature d'une telle population est, bien sûr, définie par le contexte épidémiologique, l'espèce en cause, si les études sont locales, régionales ou mondiales, et si une surveillance à long terme est nécessaire.

Une grande population expérimentale d'isolats correctement identifiés au niveau de l'espèce (de préférence $n > 100$) devrait être assemblée pour refléter autant que possible la diversité attendue dans l'espèce dans son ensemble, ou au moins dans la sous-population à laquelle la méthode de typage sera appliquée.

La population d'essai devrait inclure des souches qui ne sont probablement pas liées sur le plan épidémiologique, sur la base de données cliniques et épidémiologiques détaillées, ainsi que des isolats liés à l'épidémie [39].

II.2.2. Critères de commodité

Ce sont les critères liés à la faisabilité :

II.2.2.1. Flexibilité (ou spectre)

Cela reflète l'éventail des espèces qui peuvent être typées avec une méthode donnée [39].

II.2.2.2. Rapidité

Il s'agit du temps total requis pour passer des isolats bactériens aux résultats finales [39].

II.2.2.3. Accessibilité

Cela dépend de la disponibilité des réactifs et de l'équipement, ainsi que des compétences requises pour une méthode donnée dans un laboratoire donné [39].

II.2.2.4. Facilité d'utilisation

La capacité de la méthode à être manipulée dans des laboratoires non spécialisés, cela dépend de la simplicité technique, l'aptitude à traiter un grand nombre d'isolats et la facilité d'évaluation et d'interprétation des résultats [7, 39].

II.2.2.5. Coût

Cela dépend de nombreux facteurs, essentiellement liés à l'équipement et à l'acquisition des réactifs [39].

II.2.2.6. Analyse informatisée et intégration dans les bases de données

Ces deux facteurs sont particulièrement importants pour la comparaison longitudinale d'un grand nombre d'isolats. Au niveau local (hôpital), les données obtenues par des méthodes de typage robustes peuvent être analysées électroniquement ou évaluées visuellement. L'interprétation visuelle exige elle aussi la normalisation des données avant l'inspection. Néanmoins, comme les clones se répandent dans les hôpitaux ou dans la communauté, tant au niveau régional que mondial, il est important de créer des bases de données électroniques, permettre aux microbiologistes et aux instituts de santé publique de surveiller la propagation de ces souches ou clones au-delà du niveau hospitalier [39].

II.3. Classification des méthodes de génotypage

Plusieurs méthodes de génotypage sont disponibles, et n'ont cessé d'évoluer depuis la découverte de l'ADN génomique en 1869 jusqu'à maintenant, avec tout d'abord l'avènement de la migration électrophorétique classique ou en champ pulsé, la restriction enzymatique de l'ADN puis les techniques basées sur l'amplification et récemment les techniques de séquençage entier du génome [50]. La *figure 8* présente la chronologie de la découverte de la plupart de ces techniques.

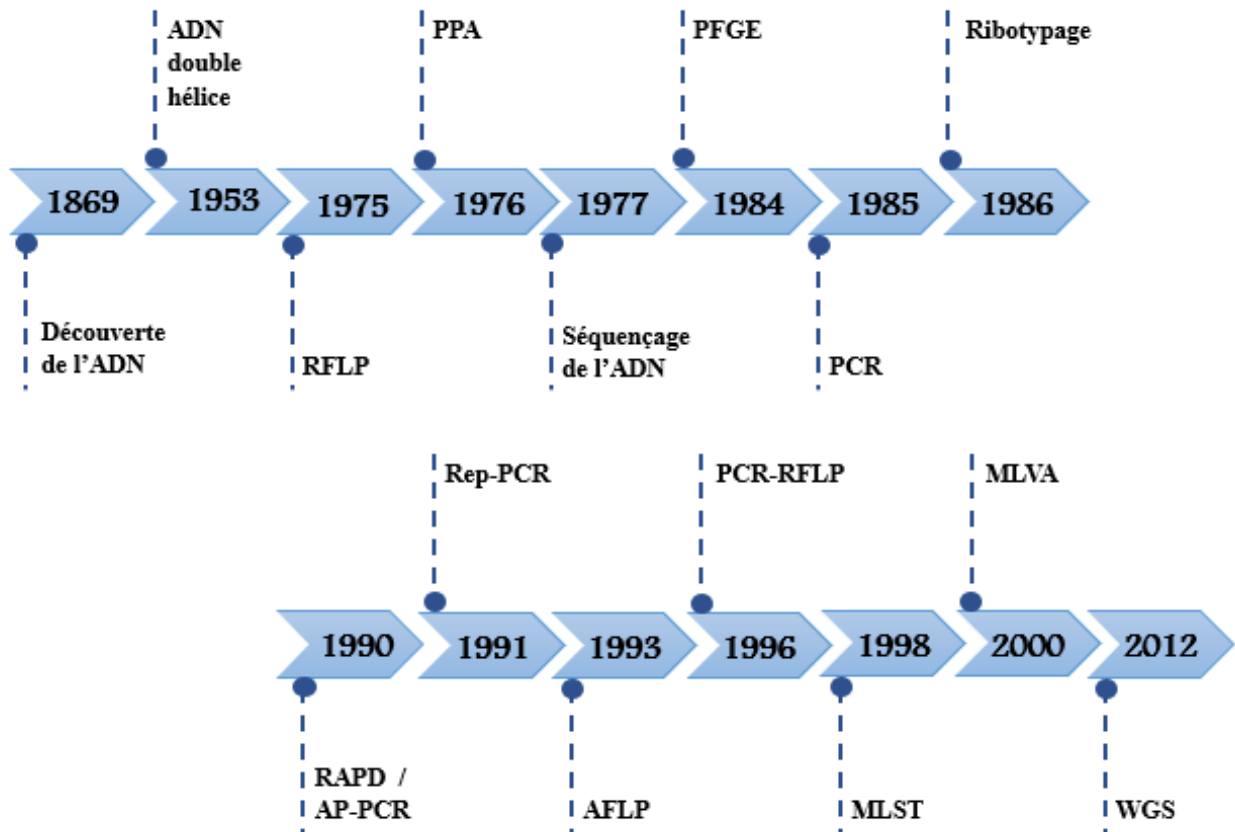


Figure 8 : Chronologie de la découverte de la plupart des techniques de génotypage (originale)
 (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism ;PPA: Plasmid Profile Analysis ;PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis ;PCR : Polymerase Chain Reaction ;RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA ;AP-PCR: Arbitrarily Primed PCR ;Rep-PCR :Repetitive elements PCR ;AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism;;MLST: MultiLocus Sequence Typing ;MLVA: MultiLocus Variable number tandem repeat Analysis ;WGS: Whole Genome Sequencing.

À ce jour, de nombreuses méthodes moléculaires différentes de caractérisation épidémiologique des isolats bactériens ont été mises au point. Cependant, aucune d'entre elles n'est optimale pour toutes les formes d'enquête. Par conséquent, une compréhension approfondie des avantages et des limites des méthodes de typage disponibles est d'une importance cruciale pour choisir les approches appropriées pour définir sans ambiguïté les souches épidémiques [49].

Les différentes méthodes de génotypage peuvent être classées en trois catégories principales détaillées dans le *tableau III* et qui sont [43]:

(i) **Les méthodes basées sur la restriction enzymatique** dont la principale technique est l'électrophorèse en champ pulsé ou ECP (Pulsed Field Gel Electrophoresis ou PFGE) qui est considérée comme le « Gold standard » en matière de typage moléculaire.

(ii) **Les méthodes basées sur l'analyse de profils de bandes après amplification de régions cibles** tel que la technique de polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism ou AFLP), les techniques avec amplification des régions répétées ainsi que les techniques d'amplification aléatoire (RAPD, AP-PCR).

(iii) **Les méthodes basées sur le séquençage d'ADN** dont le séquençage génomique multilocus (Multilocus Sequence Typing ou MLST) et le séquençage du génome entier (Whole Genome Sequencing ou WGS).

Méthodes basées sur la restriction enzymatique

- a. **RFLP sans hybridation**
 - Technique d'électrophorèse en champ pulsé (**PFGE**)
 - Analyse des profils plasmidiques (**PPA**)
- b. **RFLP avec hybridation**
 - Ribotyping (**Ribotyping**)

Méthodes basées sur l'amplification

- a. Technique de polymorphisme de longueur de fragments d'amplification (**AFLP**)
- b. Techniques d'amplification aléatoire (**RAPD/AP-PCR**)
- c. Techniques avec amplification de régions répétées (**Rep-PCR, MLVA**)

Méthodes basées sur le séquençage de l'ADN

- a. Typage génomique multilocus (**MLST**)
- b. Séquençage du génome complet (**WGS**)

Tableau III : Principales méthodes de génotypage [43, 51].

CHAPITRE III
**« METHODES BASEES SUR LA
RESTRICTION ENZYMATIQUE »**

CHAPITRE III : METHODES BASEES SUR LA RESTRICTION ENZYMATIQUE

Les méthodes de génotypage les plus courantes s'appuient sur l'étude électrophorétique de **polymorphisme de longueur de fragments de restriction** (Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP) après la restriction enzymatique de l'ADN chromosomique ou extra-chromosomique (plasmides) [7].

Ces méthodes reposent sur l'utilisation d'enzymes de restriction capables de couper l'ADN double brin au niveau d'enchainements spécifiques d'acides nucléiques, pour une souche bactérienne donnée. Le nombre de coupures après la digestion enzymatique varie donc selon les enzymes et les souches, et dépend de la fréquence avec laquelle le site reconnu est présent dans le génome [43].

La taille et le nombre de fragments d'ADN générés après digestion, généralement visualisés à l'aide d'un intercalant d'ADN fluorescent après migration et séparation dans un gel d'agarose, sont un reflet de la séquence globale du génome digéré, on obtient un profil de bandes spécifiques de la souche testée semblable à un code-barres [43].

Toute espèce bactérienne peut être typer par ces méthodes dont la principale limitation réside dans la difficulté d'interpréter les profils électrophorétiques complexes, puisque les modèles avec un très grand nombre de fragments d'ADN sont difficiles à lire, visuellement et instrumentalement, en électrophorèse de gel standard. De ce fait, de nombreuses méthodes ont été développées pour simplifier les modèles et leur comparaison, réduisant ainsi le nombre de bandes générées [7].

L'analyse des profils de bandes permet d'établir les liens et les communautés entre les souches testées [43].

Les différents profils peuvent être comparés deux à deux et l'identité de profil entre deux souches bactériennes permet de conclure à l'identité (ou à la très forte similitude) de leurs génomes et donc à un lien génétique entre les deux souches [43].

Ces méthodes peuvent être classées en 2 catégories principales (*figure 9*) :

1- Analyse RFLP sans hybridation : elle englobe différentes méthodes dont les principales seront détaillées et qui sont l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et l'analyse de profils plasmidiques (PPA).

2- Analyse RFLP avec hybridation : ces méthodes comprennent une étape supplémentaire d'hybridation après un transfert sur membrane, cette étape permet la sélection d'un nombre limité de fragments ce qui simplifier l'interprétation des résultats. Elles englobent principalement le ribotypage ainsi que l'analyse des séquences d'insertion [7].

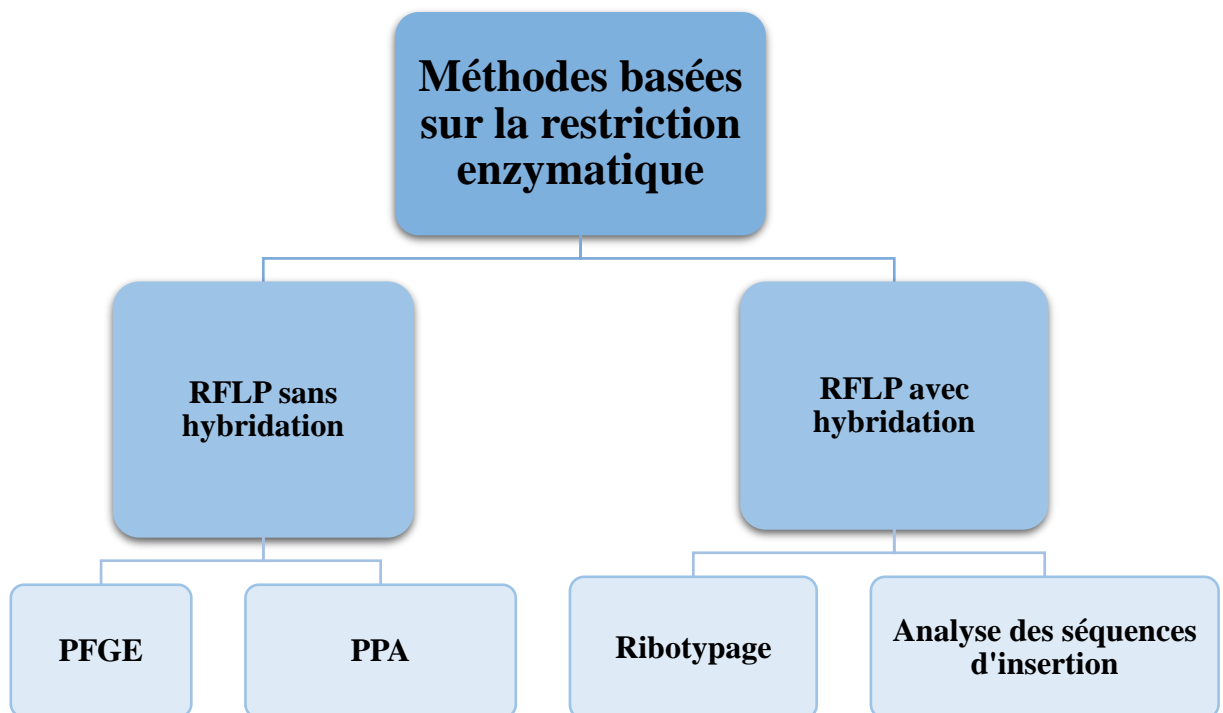


Figure 9 : Diagramme des méthodes basées sur la restriction enzymatique (originale).

III.1. RFLP sans hybridation

III.1.1. Technique d'électrophorèse en champ pulsé ECP (Pulsed Field Gel Electrophoresis ou PFGE)

La technique d'électrophorèse en champ pulsé est considérée comme le Gold standard en matière de géotypage bactérien donc une méthode de référence pour les enquêtes épidémiologiques sur les organismes pathogènes [43, 52, 53]. La PFGE est un type de test de géotypage par macro-diversité qui ne nécessite pas des connaissances préalables des séquences d'acides nucléiques cibles [54]. C'est une méthode d'empreinte génétique qui discrimine les souches bactériennes en fonction de leurs profils génétiques générés par la digestion à l'aide d'une enzyme de restriction [55]. Les différents types de la PFGE se trouve dans l'*annexe VIII*.

III.1.1.1. Principe

La PFGE consiste à digérer l'ADN génomique à l'aide d'une endonucléase de restriction spécifique et à fractionner les fragments d'ADN résultants à l'aide de champs électriques alternés [55].

III.1.1.2. Mode opératoire

L'électrophorèse en champ pulsé (ECP) suit cinq étapes illustrées à la *figure 10*.

1) **Immobilisation** : comme l'extraction de l'ADN est délicate, cette technique commence par l'immobilisation des bactéries dans un gel d'agarose pour protéger l'ADN chromosomique de dommages mécaniques [43, 52].

2) **Lyse bactérienne** : ensuite, les blocs de gel contenant les cellules bactériennes sont incubés dans des enzymes et des détergents spécifiques pour lyser les cellules in situ afin de libérer l'ADN et former une suspension d'agarose-ADN qui est également connue sous le nom de "**moule**"; et les blocs sont lavés plusieurs fois pour éliminer les débris cellulaires résiduels [3, 52].

3) **Digestion enzymatique** : l'ADN bactérien est traité avec des **endonucléases de restriction de coupe rare** [52]. Ces enzymes reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques de 6 à 8 bases et coupent l'ADN en très peu de sites d'où un nombre relativement faible de grands fragments de différentes tailles en raison de la longueur et/ou de la composition de bases d'ADN de leurs séquences de reconnaissance [55, 42, 43, 56].

4) **Électrophorèse** : après la digestion de l'ADN, des fragments (quelques dizaines) de grande taille (centaines de kilobases) sont ainsi obtenus. Afin de les séparer, on fait appel à des cuves et des générateurs de migration spécifiques avec un champ électrique changeant régulièrement d'orientation au cours du temps selon des pulses produits par un générateur programmable qui va permettre de séparer les fragments d'ADN sur une large gamme de tailles de kb à Mb permettant ainsi une comparaison plus gérable des modèles d'isolats. (Contrairement à l'électrophorèse classique du gel d'agarose effectuée pour séparer les plus petits fragments où le courant est appliqué dans une seule direction) [43, 52, 56, 52].

5) **Analyse** : les fragments générés par la PFGE de diverses souches obtenues au cours d'une épidémie peuvent être visualisés sur le gel sous forme de bandes, créant un motif PFGE unique hautement discriminant appelé « **empreinte génétique** » ou « **profil de PFGE** » qui va être comparer manuellement ou par le logiciel "**BioNumerics**" [52, 55, 49].

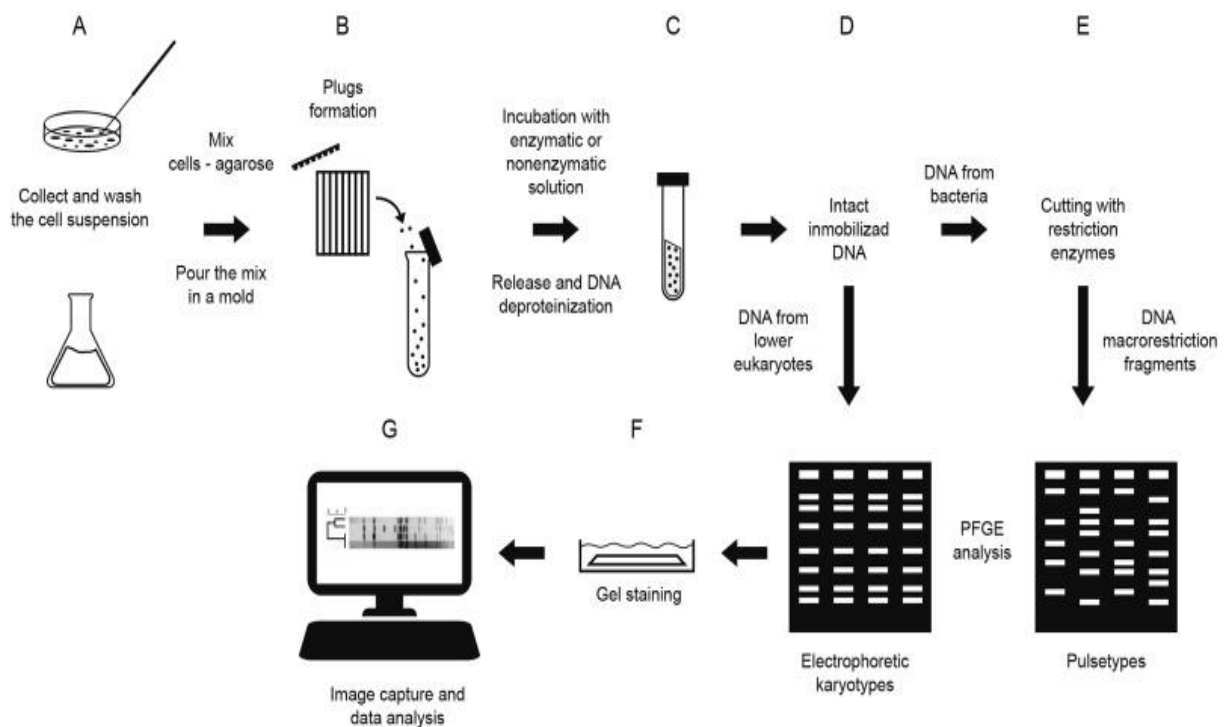


Figure 10 : Schéma général du processus de préparation de l'ADN immobilisé de taille chromosomique dans les bouchons d'agarose, suivi d'une analyse PFGE. Le processus général comprend la culture *in vitro* de spécimens (A), la préparation de bouchons d'agarose avec des cellules d'échantillons immobilisées (B), la libération et la déprotéinisation *in situ* de l'ADN (C), la séparation de l'ADN par PFGE de l'ADN linéaire intact des eucaryotes inférieurs (D), ou des fragments d'ADN de macrorestriction provenant de bactéries (E), la coloration de gel avec un agent intercalant fluorescent (F), la capture d'images numériques et l'analyse de données (G) [57].

III.1.1.3. Interprétation des résultats

Les différences dans les empreintes digitales résultent des changements qui se produisent aux sites de reconnaissance de l'endonucléase, comme une mutation ponctuelle, les délétions, les insertions et la perte ou l'acquisition de plasmides [54, 42]. Bien que cela rend l'interprétation des modèles un peu plus difficile, la connaissance de la façon dont ces événements génétiques affectent les modèles permet au microbiologiste de déduire les liens entre les souches [58, 54]. Les diverses modifications du profil de restriction sont illustrées à la *figure 11* [58].

Avant l'interprétation des profils PFGE, on commence par l'identification du profil commun ou le profil de l'épidémie qui est présumé représenter le profil de la souche de l'épidémie. Ensuite, on compare la taille et le nombre de fragments dans le motif de l'épidémie avec les fragments qui constituent les motifs des autres isolats. Sur la base de comparaisons par paires, fragment par fragment, le profil de chaque isolat est ensuite classé en fonction de son lien avec le profil de l'épidémie [58].

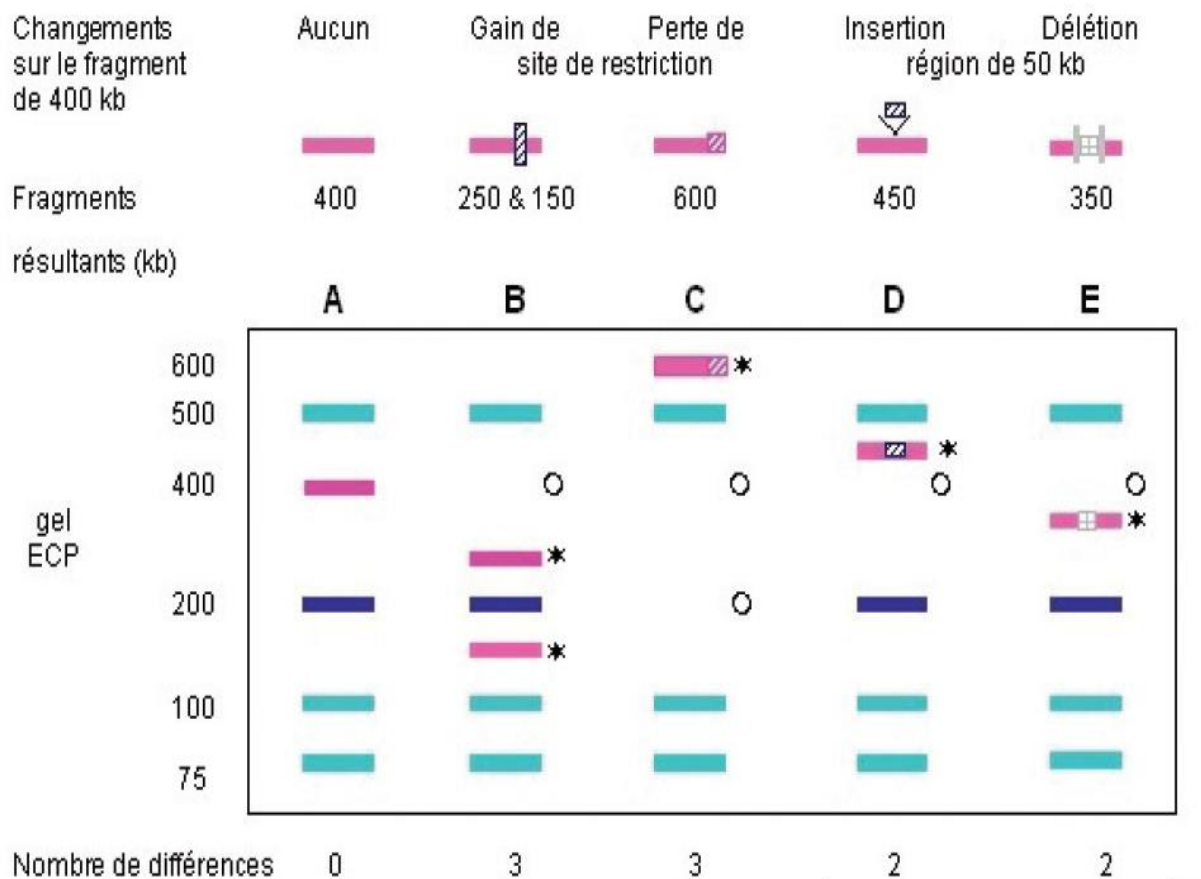


Figure 11 : Schéma montrant les changements dans le profil PFGE d'un isolat résultant de divers événements génétiques. **A**: modèle d'épidémie; **B**: gain d'un site de restriction; **C**: perte d'un site de restriction; **D**: insertion de l'ADN dans un fragment existant; **E**: suppression de l'ADN d'un fragment existant (délétion). **Les cercles** ouverts indiquent des fragments présents dans le modèle d'épidémie et absents de l'isolat du test après un événement génétique ; **les astérisques** indiquent un fragment présent après un événement génétique, mais absent du modèle d'épidémie [45].

a) Critères de Tenover :

Les premiers critères normalisés de comparaison et d’analyse des profils de PFGE dans une épidémie ont été donnés par Tenover et *al.* (1995) et ont été mis à jour par Barrett et *al.* (2006). Ces critères ont été adoptés jusqu'aujourd'hui et il est fortement recommandé de les suivre [57, 54]. Ces lignes classent les profils PFGE en 4 catégories résumées dans le *tableau IV*.

✚ Les souches sont considérées comme génétiquement « **indistinctes** » si leurs motifs de restriction ont le même nombre de bandes et que les bandes correspondantes ont la même taille apparente de fragments d’ADN [54, 58]. L’interprétation épidémiologique de ces résultats est que les isolats sont tous considérés comme représentant la même souche c’est à dire les isolats qui montrent le profil commun de l’épidémie représentent la souche de l’épidémie [58].

✚ Les souches sont considérées comme « **étroitement liées** » si leurs profils de PFGE diffèrent de la souche de référence (souche d’épidémie) par des changements correspondants à un seul événement génétique (mutation ponctuelle, insertion ou suppression) [54]. Elles sont considérées comme des sous-types du modèle d’épidémie. Ces motifs diffèrent du motif de souche de référence par 2 à 3 bandes [58, 54].

✚ Les souches sont considérées comme « **possiblement liées** » ou « **éventuellement liées** » si leurs profils diffèrent de celui de l’épidémie par des changements compatibles avec deux événements génétiques indépendants qui se traduisent par des différences de 4 à 6 bandes [54, 58].

✚ Les souches sont considérées comme « **différentes** » ou « **génétiquement non liées** » ou encore « sans rapport » si leurs profils de PFGE diffèrent de celui de l’épidémie par des changements compatibles avec trois événements génétiques indépendants ou plus qui correspondent généralement à 7 différences de bande ou plus [54, 58]. En général, cela implique que, 50% des fragments bien résolus présents dans le modèle d’un tel isolat seront présents dans le modèle d’épidémie [58].

Catégories	Nombre de différences génétiques par rapport à la souche de l'épidémie	Nombre typique de différences de fragments par rapport au modèle l'épidémie	Interprétation épidémiologique
Indistinctes	0	0	L'isolat fait partie de l'épidémie
Étroitement liées	1	2-3	L'isolat fait probablement partie de l'épidémie
Possiblement liées	2	4-6	L'isolat fait possiblement partie de l'épidémie
Différentes	≥3	≥7	L'isolat ne fait pas partie de l'épidémie

Tableau IV : Critères d'interprétation des profils PFGE [58].

b) Méthode de déclaration des résultats :

Selon Tenover et *al* (1995), les résultats de l'interprétation des profils PFGE se déclarent comme suit :

✚ Le profil de restriction de l'ADN qui est désigné comme le profil de l'épidémie est habituellement signalé comme étant de "type A" ; les isolats dont les profils de restriction ne peuvent être distingués de ce profil sont signalés comme représentant la souche de l'épidémie.

✚ Les profils qui sont étroitement ou possiblement liés au profil de l'épidémie sont considérés comme des sous-types de A et sont désignés de "type A1, type A2 etc...".

✚ Les profils qui diffèrent considérablement du profil de l'épidémie et qui sont classés comme non apparentés sont désignés de "type B, type C, etc...". Les isolats dont les profils ne sont pas apparentés sont considérés comme n'ayant aucun lien épidémiologique.

c) Recommandations pour l'interprétation des résultats

Afin d'interpréter correctement les profils PFGE générés avec les critères de Tenover, il faut suivre les recommandations suivantes :

✚ Les données PFGE doivent toujours être interprétées dans le contexte épidémiologique approprié et elles ne peuvent pas seules prouver un lien épidémiologique [59].

✚ Ces critères ont été proposés par Tenover pour analyser un ensemble d'isolats inférieur à 30 dans le contexte d'épidémies à court terme [57].

✚ Ces lignes directrices s'appliquent uniquement aux bandes électrophorétiques générées par PFGE et non aux autres modèles d'électrophorèse générés par les autres tests de géotypage [54].

✚ Les modèles PFGE nouvellement générés doivent être comparés à un modèle de souche de référence (souche de l'épidémie) [54].

✚ La technique de PFGE doit être validée [58].

✚ Le PFGE doit résoudre au moins 10 fragments distincts [58].

✚ Le gel doit être de qualité suffisante [59].

✚ La variabilité de l'organisme sous-typé doit être prise en compte [59].

✚ Les critères de Tenover ne s'appliquent généralement pas à l'interprétation des données de sous-typage de PFGE sur les pathogènes d'origine alimentaire [57].

III.1.1.4. Avantages

Cette technique comporte de grands avantages :

✚ Elle se caractérise par un **pouvoir discriminant élevé** qui dépend du choix des enzymes de restriction et également l'utilisation d'enzyme secondaire ou même tertiaire lorsque l'application du primaire ne parvient pas à fournir des profils indiscernables des isolats [60, 49]. L'utilisation d'une seule enzyme de restriction peut ne pas séparer les isolats non apparentés, ce qui peut entraîner la création de clones trompeuses. Par conséquent, l'application d'enzymes secondaires et tertiaires est nécessaire avant de tirer des conclusions concernant la relation génétique et épidémiologique concomitante [60].

✚ Les profils obtenus sont bien lisibles, parfaitement **reproductibles (figure 12)** [52]. On la qualifie très souvent de "**gold standard**" en raison de cette reproductibilité et de sa **concordance épidémiologique notable**. Toutefois, cette dernière dépend de la clonalité du microorganisme étudié, c'est à dire qu'une bonne concordance peut être obtenue dans des études à court terme, à condition que la population de l'agent pathogène soit caractérisée par une clonalité élevée. Au contraire, un ajustement du seuil de similitude utilisé pour déduire que des relations épidémiologiques peuvent être nécessaires lorsque la population de l'agent pathogène est caractérisée par une faible clonalité [60].

✚ De plus, la PFGE est une approche qui offre une **excellente typabilité**, une **grande sensibilité**, et une **interprétation facile** [61].

✚ Ainsi, elle peut être appliqué à une grande variété de microbes avec un grand génome, et le nombre de bandes suffisamment important pour offrir un **bon reflet de l'ensemble du génome de la bactérie analysée** [54, 52].

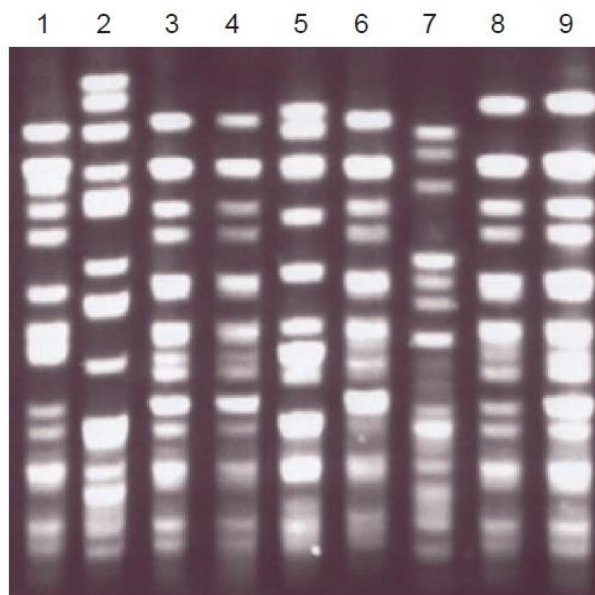


Figure 12 : Exemple de gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour le typage de 9 souches d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (VanA). Les souches 3, 4 et 6 sont clonalement reliées ainsi que les souches 8 et 9 [52].

III.1.1.5. Limites

Cette approche se caractérise également par des inconvénients [60].

✚ L'inconvénient majeur de la PFGE est la **non-portabilité** des données d'électrophorèse qu'elle génère [54].

✚ La PFGE est **techniquement exigeante**. Elle exige un personnel qualifié à la fois pour les manipulations techniques ainsi que pour l'interprétation des profils de bandes ce qui rend l'analyse des résultats subjective et dépend de l'opérateur [42, 60, 55]. Elle exige aussi une analyse des modèles de bandes assistée par ordinateur en utilisant des logiciels coûteux [53, 62]. La PFGE nécessite également un matériel (équipement et consommables) très spécialisé et onéreux [43, 60]. Donc c'est une méthode **laborieuse et coûteuse** [62].

✚ En outre, c'est une technique **longue** qui prend plus de **cinq jours** pour produire des résultats [43, 62].

✚ La PFGE est limitée également par le **manque de résolution** pour distinguer les bandes de taille presque identique c-à-d elle est moins efficace pour discriminer les souches étroitement apparentées [55, 49].

III.1.2. Analyse du profil plasmidique (Plasmid Profile Analysis ou PPA)

L'analyse du profil plasmidique fut une des premières méthodes de génotypage utilisées pour les études épidémiologiques [43, 49]. Elle est importante en microbiologie médicale parce que les plasmides, qui sont des éléments génétiques extra-chromosomiques et autoreproducteurs, peuvent coder des gènes pour la résistance aux antibiotiques ou de virulence [42, 43].

Comme de nombreuses espèces de bactéries contiennent des plasmides, le typage du profil plasmidique a été utilisé pour enquêter sur les épidémies de nombreuses infections bactériennes et pour suivre et caractériser la diffusion intra- et inter-espèces de plasmides porteurs de mécanisme de résistance aux antibiotiques [42, 43].

C'est une méthode qui permet la détermination de la présence/absence, la taille et la restriction des modèles de digestion de l'ADN plasmidique présent dans les isolats bactériens [55, 53]. Les profils résultants des diverses souches lors d'une épidémie seront comparés [53].

III.1.2.1. Principe

Cette technique est fondée sur l'analyse des profils des bandes électrophorétiques résultants de la migration sur gel d'agarose des fragments d'ADN plasmidique digéré par l'endonucléase de restriction [43, 63, 42].

III.1.2.2. Mode opératoire

Le PPA est procédé comme suit :

1- Isolement de l'ADN plasmidique : la lyse alcaline et la dénaturation de l'acide nucléique constituent la base de nombreux protocoles d'isolement plasmidique. Après traitements spécifiques, les cellules sont lysées et les acides nucléiques sont dénaturés à pH alcalin. Il s'en suit une neutralisation, l'ADN plasmidique se transforme rapidement en ADN double brin par contre les simples brins des fragments chromosomiques ne peuvent pas renaître dans ces conditions et sont précipités [63].

2- Digestion enzymatique : certaines bactéries ont de gros plasmides de l'ordre de 100 à 150 kb, ce qui rend leur séparation directe difficile ; pour ces souches, l'ajout de cette étape de digestion à l'aide d'endonucléase de restriction après l'isolement plasmidique aidera souvent à typer parce que de multiples fragments sont générés, ce qui rend l'interprétation de la relation entre les souches plus possible [44].

3- Électrophorèse : la digestion enzymatique est suivie par la migration des fragments générée sur gel d'agarose en fonction du poids moléculaire [43, 42, 53].

4- **Analyse des profils plasmidiques** : après l'électrophorèse, les bandes d'ADN plasmidique seront visualisées par fluorescence (*figure 13*) [64]. Le nombre et la taille des bandes électrophorétiques résultantes peuvent être utilisés pour définir les profils plasmidiques. Ces derniers vont être comparés avec les profils des autres souches afin de détecter les différences génétiques [63].

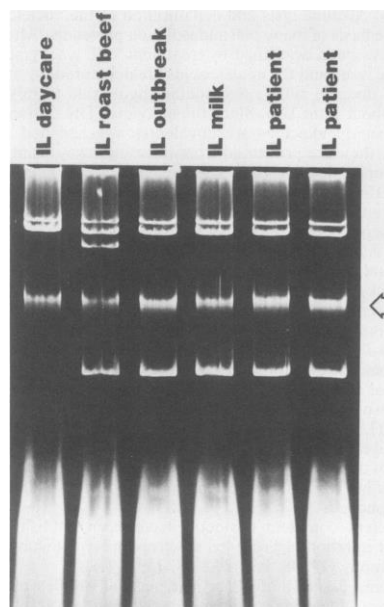


Figure 13 : Photographie d'un gel d'agarose teinté de bromure d'éthidium montrant des profils plasmidiques. Les bandes d'ADN chromosomique (flèche), deux à quatre bandes d'ADN plasmidique, et les frottis d'ARN (près du bas) apparaissent dans chaque voie. Les isolats de l'Illinois (IL) et du lait sont tous identiques à la souche de l'épidémie, mais il manque une bande plasmidique à l'isolat de la garderie et une bande supplémentaire à l'isolat de rôti de bœuf [65].

III.1.2.3. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats générés par les empreintes digitales plasmidiques comprennent deux zones, « indistinctes » (résultats de typage identiques) et « sans rapport » (résultats clairement différents) [66]:

✚ **Indistinctes** : si deux plasmides génèrent des fragments de restriction identiques, à partir de deux enzymes ou plus, ils peuvent être considérés comme des plasmides identiques. Et puis, lorsque les isolats d'une épidémie présumée ont trois plasmides ou plus en commun, on peut généralement dire avec confiance qu'ils sont indistincts (interprétation génétique) et donc probablement liés épidémiologiquement (interprétation épidémiologique) sans autres tests [67, 66].

✚ **Sans rapport** : à l'inverse, les plasmides de la même taille qui produisent des modèles de fragmentation entièrement différents sont essentiellement des plasmides sans rapport. De ce fait, si plusieurs bandes ne correspondent pas entre les isolats, on présume qu'elles représentent des souches différentes et sans rapport [67, 64].

III.1.2.4. Avantages

Comme les autres techniques de génotypage, l'analyse du profil plasmidique présente aussi un certain nombre d'avantages.

✚ Il est **facile d'exécuter** cette technique et **d'interpréter** les profils plasmidiques résultants [64, 7].

✚ C'est une méthode **rapide** (résultats en 1 jour) et à **faible coût** [7].

III.1.2.5. Limites

✚ Bien qu'utile, cette technique n'est pas sans inconvénients, principalement la grande **instabilité des plasmides** [43]:

✚ Les plasmides sont transférables par conjugaison, peuvent être spontanément perdus ou facilement acquis par les bactéries et, sous pression sélective, ils peuvent se propager rapidement d'une souche à l'autre. Le gain ou la perte de plasmides peut causer des confusions tout en déterminant la relation génétique entre les isolats donc ceux qui sont liés épidémiologiquement peuvent facilement afficher différents profils plasmidiques [49, 64].

✚ De plus, les plasmides peuvent présenter des anomalies au fil du temps et porter ou perdre des séquences génétiques comme les transposons [49].

✚ Les plasmides existent dans une variété de conformations spatiales (linéaires, circulaires et superenroulées) qui entraînent des vitesses de migration différentes lorsqu'ils sont soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose, ce qui **affecte la reproductibilité** de cette technique [64].

✚ Cette méthode a un **faible pouvoir discriminant** comparée à de nombreuses méthodes de typage [64].

III.2. RFLP avec hybridation

Dans ces méthodes, l'ADN d'une souche bactérienne est digéré avec des enzymes de restriction. Les fragments sont séparés par électrophorèse et transférés dans une membrane à filtre. La membrane est ensuite incubée avec une sonde qui s'hybride à un gène spécifique. Selon l'enzyme de restriction choisie, le modèle de bandes d'hybridation peut être spécifique à une espèce ou à une souche. Deux enzymes de restriction différentes ou plus dans des digestions séparées peuvent être utilisées pour générer des profils différents à partir des mêmes isolats et obtenir une plus grande fiabilité lorsque les souches sont suivies pendant les enquêtes épidémiologiques [7].

Ces dernières se sont révélées très reproductibles. Leur pouvoir discriminant est toutefois en fonction du nombre de copies dans le chromosome des séquences bactériennes contenues dans la sonde sélectionnée [68].

Parmi les sondes d'acides nucléiques utilisées pour le génotypage, celles contenant les séquences d'ADN ribosomal (ADNr) sont utilisées dans une technique appelée "ribotypage" ainsi que les sondes contenant des séquences d'insertion dont la principale technique qui les utilise est appelée "IS6110-RFLP" en se référant à la séquence d'insertion IS6110 présente dans le génome du *Mycobacterium tuberculosis* en nombre et en positions variables (**figure 14**) [68, 43]. Cette méthode est considérée comme une méthode de référence pour le typage de cette bactérie [43].

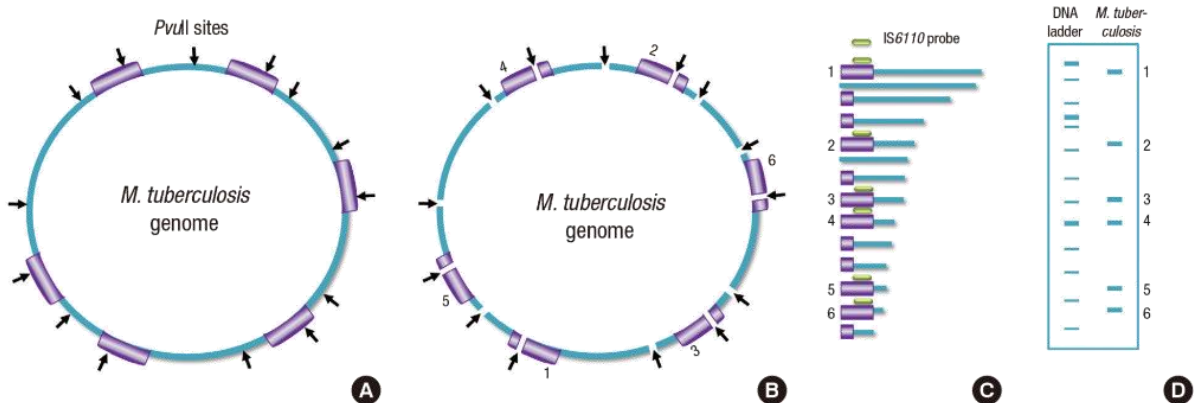


Figure 14 : Principe de la méthode IS6110-RFLP. (A) Génome de *M. tuberculosis* avec segment d'insertion IS6110 montrant les sites de clivage PvuII (enzyme de restriction). (B) Digestion du génome entier avec PvuII. (C) Les segments d'ADN de différentes tailles après analyse dans le gel sont transférés sur une membrane suivie d'une hybridation. (D) Fragments visualisés, qui représentent une seule copie d'IS6110 entourée d'ADN de différentes longueurs [69].

III.2.1. Ribotypage (Ribotyping)

Le ribotypage est un type d'analyse RFLP qui utilise des sondes d'acides nucléiques pour détecter le polymorphisme génétique présent au sein des séquences génomiques codantes pour les gènes 16S et 23S de l'ARNr et dans les régions d'ADN flanquantes ces gènes [53, 40, 70, 68]. Les gènes de l'ARN ribosomal (ARNr) sont organisés en une unité de transcription polycistronique, appelée l'opéron de *rrn*, qui est généralement présent en plusieurs copies dans le génome bactérien. La conservation évolutive des gènes codant pour les acides nucléiques ribosomaux permet d'analyser n'importe quel génome bactérien à l'aide d'une sonde unique (par exemple, un dérivé d'*Escherichia coli*). De plus, l'hétérogénéité des séquences de flanc est à la base de la variation des motifs du ribotype, rendant le ribotypage l'une des stratégies les plus polyvalentes pour le typage des pathogènes [68]. Il a commencé dans les années 1980s et a évolué sous diverses formes. Considéré comme un système relativement stable et fiable pour la taxonomie moléculaire, il est largement accepté par les organismes internationaux [71].

III.2.1.1. Principe

Cette technique est basée sur l'analyse électrophorétique des fragments de restriction générés par la digestion enzymatique de l'ADN chromosomique codant pour l'ARN ribosomal (ARN) ; suivie d'un transfert sur une membrane et une hybridation avec une sonde marquée spécifique [49, 70].

III.2.1.2. Mode opératoire

Le ribotypage comprend les étapes suivantes (*figure 15*):

1- Lyse cellulaire et extraction d'ADN : plusieurs protocoles pour l'extraction de l'ADN de poids moléculaire élevé ont été décrits. La membrane cellulaire bactérienne peut être facilement détruite par des détergents. Les protéines sont également éliminées par extraction phénol/chloroforme et l'ADN est précipité avec du NaCl et de l'éthanol ou de l'isopropanol. Des kits commerciaux sont également disponibles pour l'extraction et la purification de l'ADN, avec des résultats qui varient selon les espèces bactériennes analysées [68].

2- Digestion de l'ADN : les endonucléases de restriction coupent l'ADN à double brin à des sites de reconnaissance spécifiques. Selon les espèces analysées et l'enzyme de restriction utilisée, le ribotypage peut générer un nombre variable d'empreintes digitales distinctes, appelées "ribotypes". Ceci est lié à l'abondance des sites de reconnaissance disponibles pour l'enzyme de restriction et le nombre de copie de la séquence de la sonde dans le génome [68].

3- Électrophorèse sur gel et transfert de Southern Blot : les produits de digestion sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Le choix de l'équipement et des conditions

électrophorétiques a une forte influence sur la qualité des résultats, et surtout sur la question de savoir si la numérisation des motifs sera facile ou difficile. Il est recommandé de maintenir les mêmes conditions de fonctionnement pour chaque expérience afin d’optimiser la reproductibilité. Ensuite, les fragments d’ADN générés seront transférés aux membranes de nylon par transfert capillaire vers le haut. Les acides nucléiques transférés aux membranes de nylon peuvent être hybridés et déshybridés plusieurs fois. Cependant, le choix de la membrane dépend de la sonde utilisée [68].

4- Hybridation et détection des sondes : le ribotypage utilise des sondes étiquetées contenant des séquences d’ARNr 23S, 16S et 5S. À l’origine, des sondes d’ARN provenant du 16S+23S ou du ARNr total étaient utilisées. Actuellement, les sondes d’ADN sont beaucoup plus courantes. Étant donné que les résultats de l’hybridation dépendent des sondes choisies, la comparaison entre les études doit tenir compte de la sonde utilisée. Diverses techniques d’étiquetage sont disponibles pour la détection de l’ADN immobilisé sur les membranes en nylon.

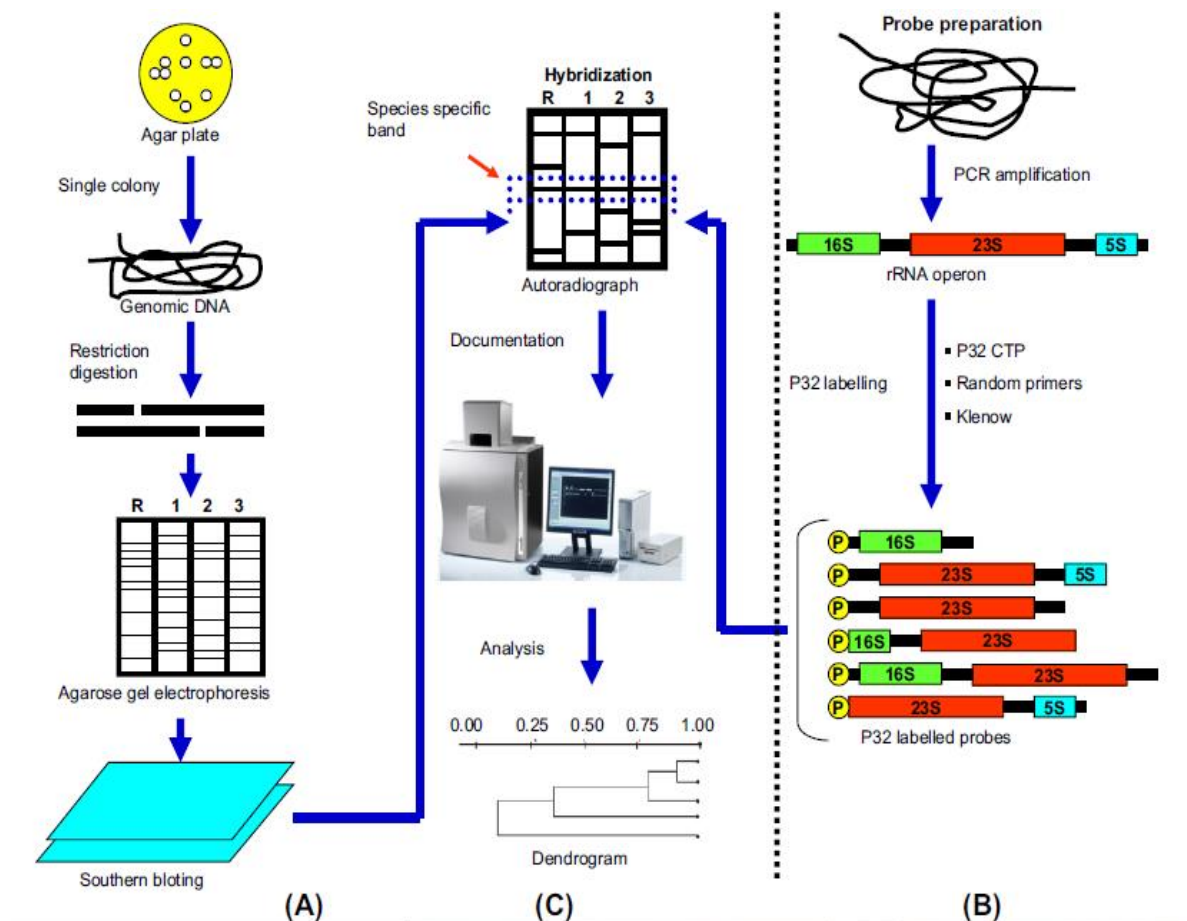


Figure 15 : Principe du ribotypage [71]

III.2.1.3. Interprétation des résultats

Les modèles générés par le ribotypage doivent être comparés entre eux afin de représenter des données précieuses.

En général, les modèles sont considérés comme identiques lorsqu'ils partagent exactement la même quantité de bandes et qu'ils sont tous de tailles identiques (dans les limites de tolérance des données). Les marqueurs de taille moléculaire sont importants pour l'appréciation correcte de ces tailles. Actuellement, l'accessibilité de plusieurs logiciels pour la normalisation des données tend à rendre cette analyse plus objective et reproductible. L'interprétation des résultats commence toujours par la digitalisation des images obtenues après l'hybridation de la sonde, suivie de la détection de bande et de la comparaison de motifs par un système automatique. Des logiciels tels que le Bionumerics® et le Taxotron® offrent un large éventail de possibilités pour l'analyse de modèles [68].

III.2.1.4. Avantages

✚ L'un des principaux avantages du ribotypage est qu'en raison de la similarité des gènes ribosomiaux, des **sondes universelles peuvent être utilisées**.

✚ La **reproductibilité**, l'**automatisation** et la **portabilité** des résultats sont également d'autres avantages de cette méthode de génotypage [40, 70].

✚ En plus, le ribotypage est comparativement **plus rapide** (il faut 24 heures pour obtenir le résultat), et fonctionne pour un **large éventail d'espèces bactériennes** [49].

✚ La **simplicité de l'exécution** et de l'automatisation du séquençage de l'ARNr 16S et la **disponibilité de plusieurs grandes bases de données** de séquences de référence et de taxonomies ont fait de la ribotypie l'une des techniques les plus prisées dans les laboratoires de diagnostic pour l'identification et les études épidémiologiques. Sa contribution à la systématique a également été immense [71].

III.2.1.5. Limites

Comme toutes les autres techniques, le ribotypage a également ses propres limites [71].

✚ Le niveau plus élevé de séquences conservées dans les opérons d'ARNr entraîne une **diminution du pouvoir discriminant**. La similarité élevée peut être trouvée dans les séquences de gènes de l'ARNr 16S parmi certains micro-organismes étroitement liés qui manquent de résolution [71]. Autrement dit le ribotypage a un pouvoir discriminant plus élevé aux niveaux des espèces et des sous-espèces par rapport au niveau de la souche ce qui rend cette technique plus adaptée pour étudier les structures des populations plutôt que l'épidémiologie locale [49, 70].

✚ En outre, elle est **plus laborieuse** (relativement **coûteuse** en terme d'équipement, si le système automatisé doit être utilisé) et a une **capacité de résolution moins élevée** que d'autres techniques de typage comme la PFGE [70, 49].

✚ De plus, le processus dépend de l'efficacité de la méthode d'extraction de l'ADN [71].

III.2.1.6. Variants du ribotypage

Bien que le ribotypage soit une méthode puissante pour déterminer l'épidémiologie moléculaire des pathogènes bactériens, des difficultés techniques limitent son application [49]. De ce fait, d'autres méthodes alternatives ont été développées. Ces méthodes sont présentées dans le diagramme ci-dessous (*figure 16*). Le principe de l'ensemble de ces méthodes est présenté au niveau de l'*annexe IX*.

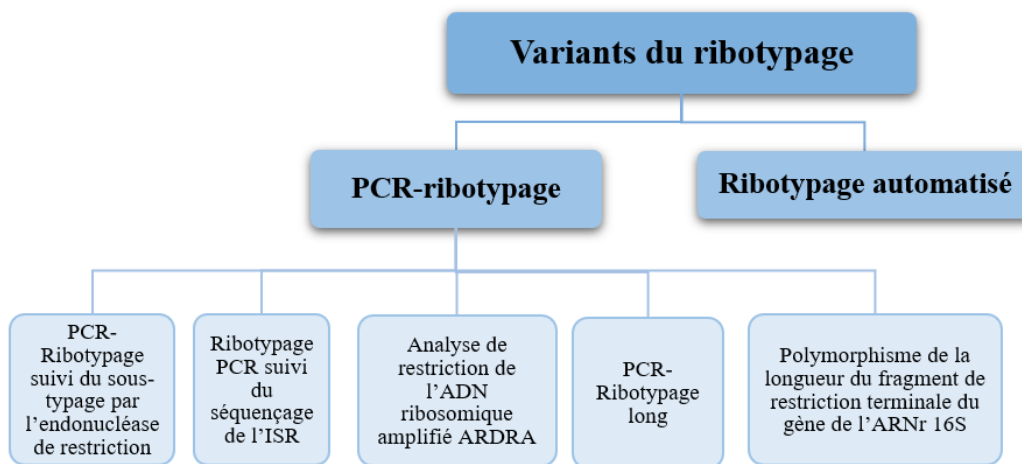


Figure 16 : Diagramme des variants du ribotypage (originale).

CHAPITRE IV
« METHODES BASEES SUR
L'AMPLIFICATION »

CHAPITRE IV : METHODES BASEES SUR L'AMPLIFICATION

Ces méthodes sont basées sur l'analyse de profils de bandes après amplification de régions cibles. Elles sont identifiées comme des méthodes basées sur la PCR (Polymerase Chain Reaction ou PCR).

La méthode PCR, qui est largement connue comme la méthode la plus courante utilisée dans l'épidémiologie moléculaire des pathogènes microbiens, a eu un impact important sur le diagnostic et l'investigation épidémiologique des maladies infectieuses. La capacité de cette méthode à amplifier des quantités infimes de séquences d'ADN microbiennes spécifiques en a fait un outil moléculaire puissant.

La PCR a donné lieu à une variété de méthodes avec de nombreuses applications diagnostiques et épidémiologiques telles que l'AFLP, la rep-PCR (Repetitive elements PCR), la MLVA (Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeat Analysis) et la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ou AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) ainsi que d'autres techniques telles que la PCR-RFLP et la PCR-ribotypage [72] (*figure 17*).

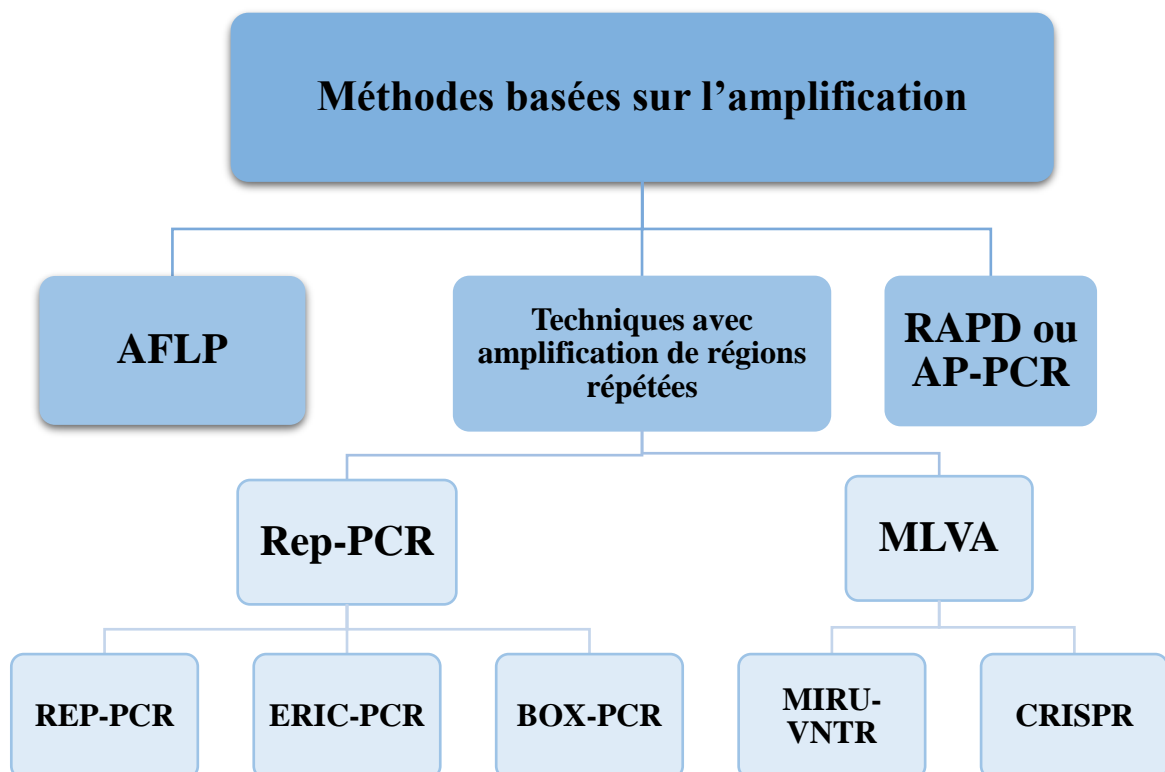


Figure 17 : Diagramme des méthodes basées sur l'amplification (originale).

IV.1. Rappels sur la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR) et ses variants

La PCR est une technologie de biologie moléculaire qui applique l'amplification enzymatique par amorces oligo-nucléotidiques (ADN) dépendante de la température afin de synthétiser de grandes quantités d'une séquence d'acide nucléique cible [53, 61, 43, 42]. L'avantage de cette technique est que la plupart des laboratoires de microbiologie sont équipés du matériel nécessaire à sa réalisation [52].

IV.1.1. Principe

La PCR consiste à réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice d'ADN double brin [73]. Son principe est assez simple (*figure 18*) : les échantillons d'ADN sont soumis à des étapes alternées de chauffage et de refroidissement qui déclenchent et terminent cycliquement la synthèse de l'ADN. Les brins d'ADN complémentaires sont d'abord séparés par la chaleur pour permettre le recuit ultérieur d'une paire d'oligonucléotides courte désignée appelée "amorce" ou "primer". Ensuite, une enzyme "ADN polymérase " thermostable ajoute des nucléotides aux modèles d'ADN amorcés créant ainsi de nouveaux brins d'ADN identiques à la région cible [74].

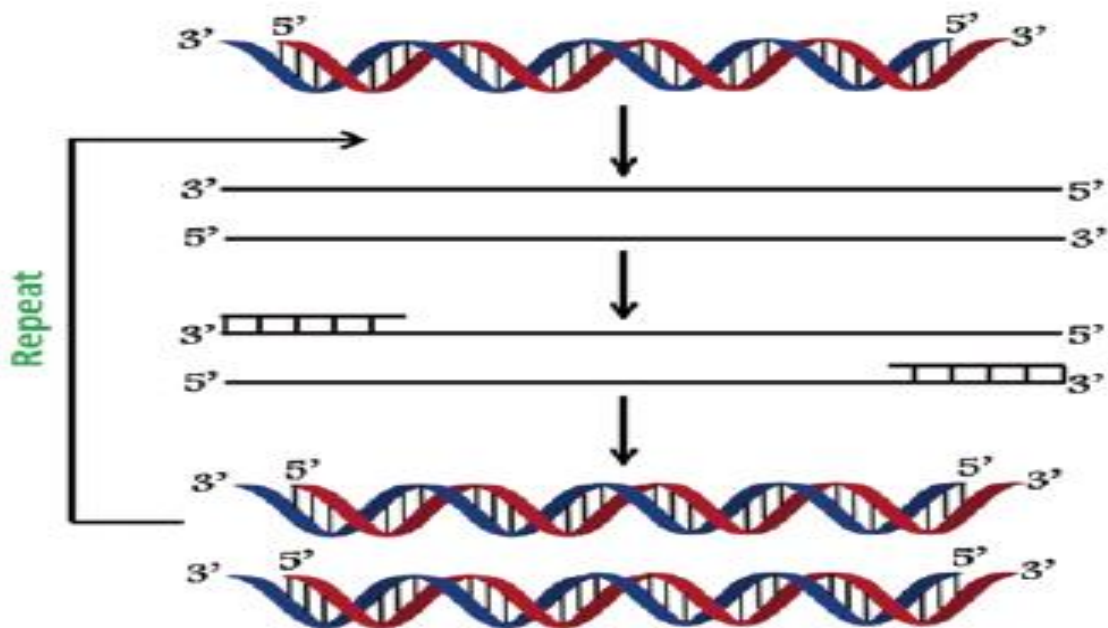


Figure 18 : Principe de la PCR [75].

Ce cycle est répété un grand nombre de fois (20-50) afin d'obtenir de multiples copies de la région cible à la fin de la réaction [73, 76, 74]. Le produit final de cette amplification, appelé également "amplicon", aura 2^n copies (avec n étant le nombre de cycles) du modèle d'ADN choisi [43].

IV.1.2. Mode opératoire

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation). Toutefois, il existe deux autres étapes essentielles dans cette technique, la première est une étape pré-éliminaire consiste à une extraction de l'ADN, l'autre présente la dernière étape d'analyse des amplicons (les produits de la PCR). Les différentes étapes sont détaillées ci-dessous [53] :

1- Extraction de l'ADN : elle implique la lyse des organismes et la libération de l'ADN qui peut être faite par diverses méthodes, telles que les cycles de congélation-décongélation et l'ajout des enzymes [53].

2- Amplification de l'ADN extrait (la PCR proprement dite) : celle-ci est effectuée dans une machine PCR spéciale appelée "thermocycle". L'ADN extrait est soumis à des cycles répétés d'amplification qui durent environ 3 à 4 heures [53]. Chaque cycle d'amplification a trois étapes (*figure 19*) :

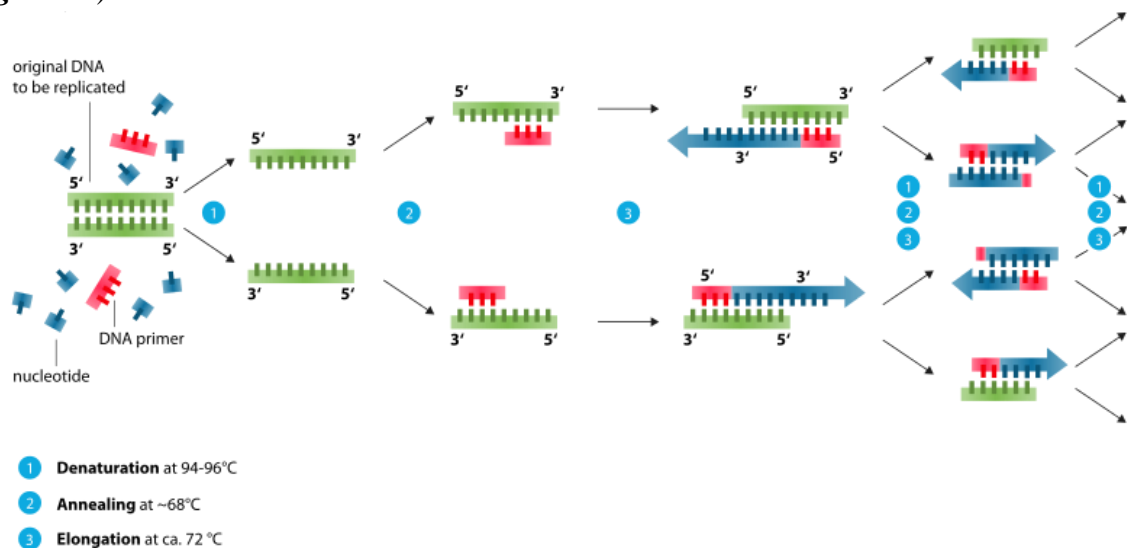


Figure 19 : Etapes de la PCR. (1) Dénaturation, (2) Hybridation, (3) Elongation [53].

- **Dénaturation à 95 °C :** celle-ci implique la séparation des deux brins complémentaires qui composent l'ADN sous l'effet de la chaleur [53, 73].

- **Hybridation à 50–60°C :** le Primer (amorce) est un oligonucléotide court complémentaire à une petite séquence de l'ADN cible. Il se fixe au site complémentaire sur l'ADN cible [53].

- **Elongation à 72°C :** cette étape est catalysée par l'ADN polymérase qui continue d'ajouter les nucléotides libres à l'extrémité croissante de l'amorce. [53]

Après élongation, deux nouvelles molécules d'ADN à double brin vont être synthétisées et un cycle sera terminé. Ensuite, le deuxième cycle commence par la dénaturation, après l'hybridation et l'élongation de l'ADN recommence. Les produits du premier cycle (les amplimers) fonctionnent également comme des modèles lors de la prochaine étape d'hybridation des amorces dans un nouveau cycle de réplication. De cette façon, de plus en plus d'amplicons de la longueur appropriée sont générés [76]. Toute cette procédure est représentée dans la *figure 20*.

3- Analyse des produits de la PCR (amplicons) : la révélation des amplicons peut se faire par trois méthodes :

- ✚ Un marquage de l'ADN par un agent intercalant : Après marquage de l'ADN par un agent intercalant, l'ADN est amplifié et est électrophorétiquement migré en fonction de sa taille moléculaire par électrophorèse en gel d'agarose. Il peut être ensuite visualisation sous la lumière ultraviolette (UV) (cette méthode est déconseillée car elle est peu spécifique et potentiellement toxique pour le manipulateur) [43, 53].
- ✚ Par utilisation de sondes spécifiques puis technique ELISA [43].
- ✚ Par hybridation sur membrane ou sur puces (microarrays) [43].

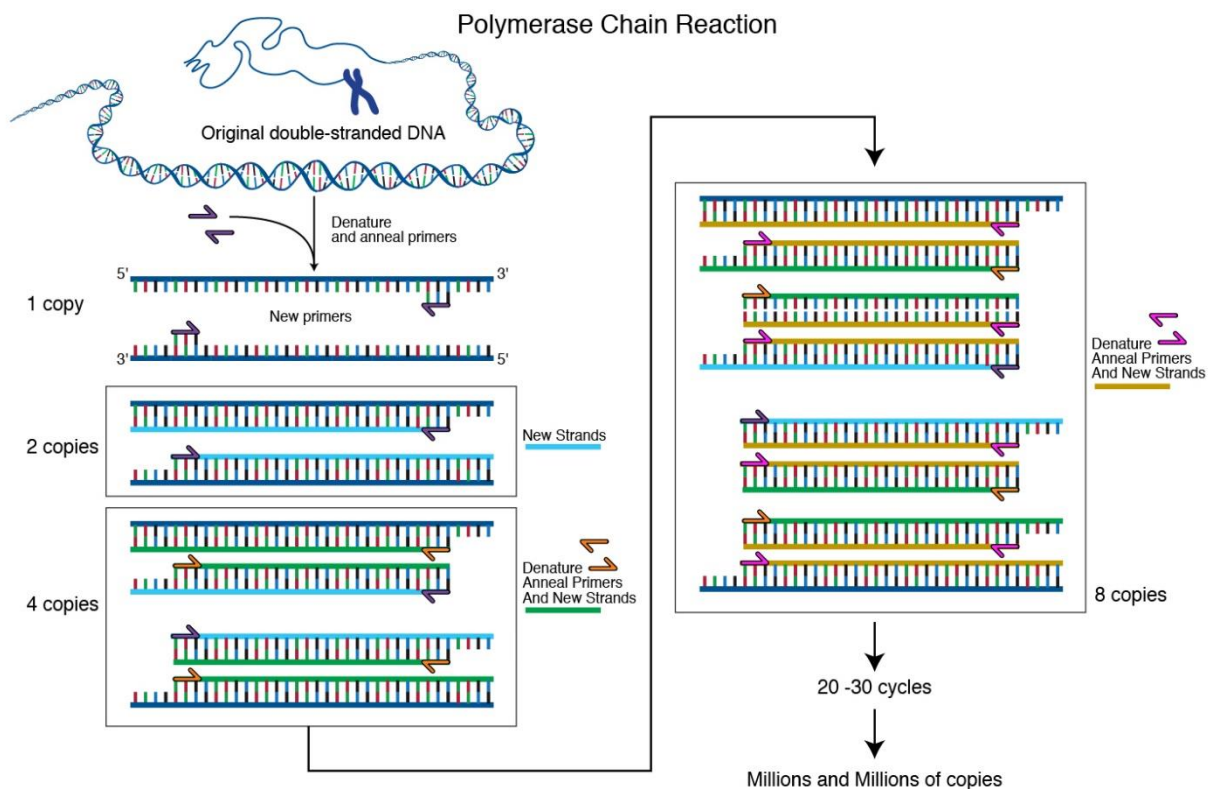


Figure 20 : Schéma général de la PCR [77].

IV.1.3. Variants de la PCR

La PCR classique possède différents avantages (sensible ; spécifique ; détection des organismes très fastidieuses et non reproductibles par les méthodes de culture conventionnelles...) ainsi que des inconvénients (détection seulement de l'ADN mais pas de l'ARN ; qualitatif et non quantitatif ; amplification faussement positive ; faux-négatifs ...) [53]. Afin de palier à ses derniers, plusieurs types de PCR ont été développés :

1) **PCR par transcriptase inverse (RT-PCR: Reverse transcription PCR)** : la PCR conventionnelle amplifie seulement l'ADN donc pour l'amplification de l'ARN, la RT-PCR sera préconisée (*figure 21*) [53].

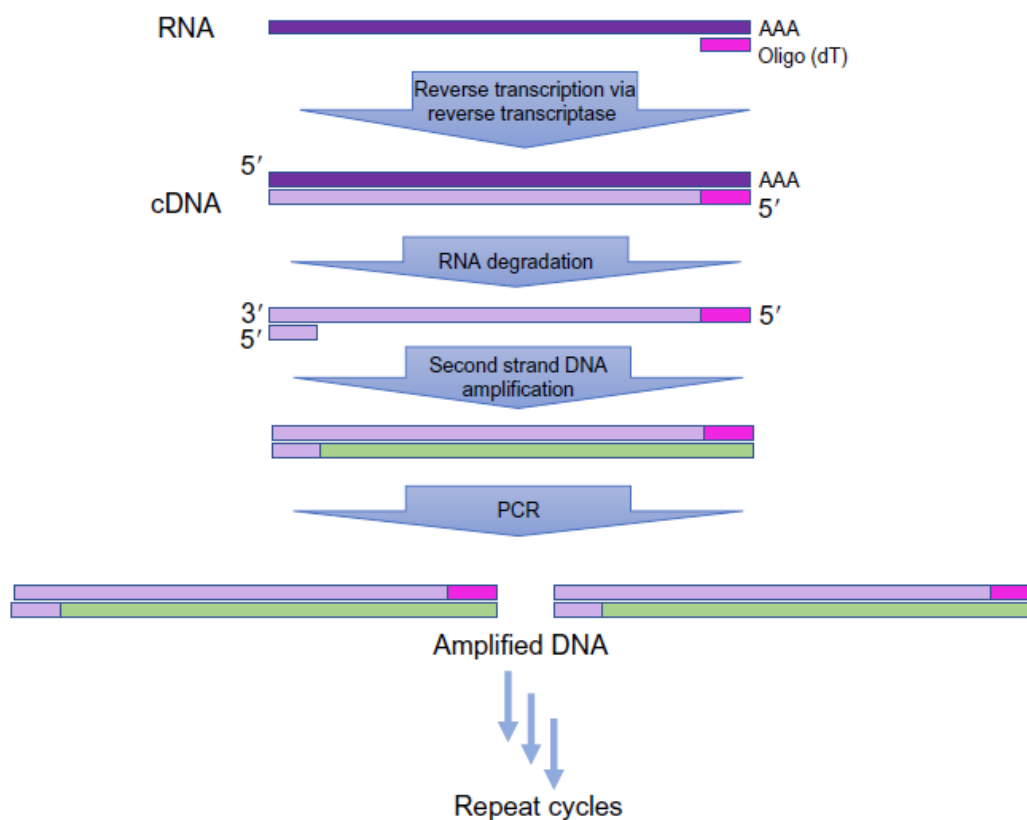


Figure 21 : Aperçu de la RT-PCR : Dans ce processus, l'ADN complémentaire (ADNc) est d'abord produit à partir de cibles d'ARN par transcription inverse, puis l'ADNc est amplifié par PCR. La transcription inverse est réalisée par l'action de la transcriptase inverse, une enzyme isolée du virus de l'ARN. La transcriptase inverse nécessite des amorces telles que des amorces oligo dT ou des hexamères aléatoires pour amorcer la synthèse du brin initial d'ADN. Ces amorces correspondront et s'hybrideront aux sites aléatoires dans l'ARN cible pour amorcer la synthèse d'ADNc. La dernière étape est l'amplification de l'ADNc par PCR [78].

2) **PCR en temps réel (q-PCR)** : elle est utilisée pour amplifier et simultanément détecter ou quantifier une molécule d'ADN ciblée en temps réel. La transcriptase inverse des formats PCR en temps réel peut détecter et quantifier les molécules d'ARN de l'organisme d'essai dans l'échantillon en temps réel [53].

3) **PCR imbriquée (Nested PCR)** : il s'agit d'une réaction PCR où deux cycles d'amplification PCR sont effectués en utilisant deux amorces qui sont ciblées contre deux séquences d'ADN différentes du même organisme (*figure 22*) [53].

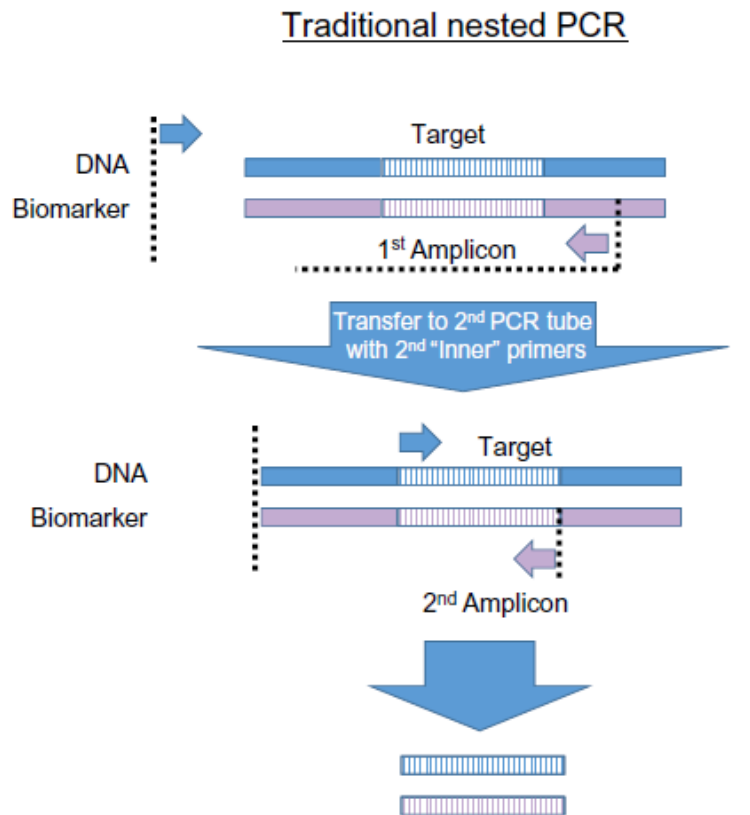


Figure 22 : Aperçu de la PCR imbriquée (Nested PCR) [78].

4) **PCR multiplex** : elle utilise plus d'une amorce qui peut détecter de nombreuses séquences d'ADN de plusieurs organismes en une seule réaction (*figure 23*) [53].

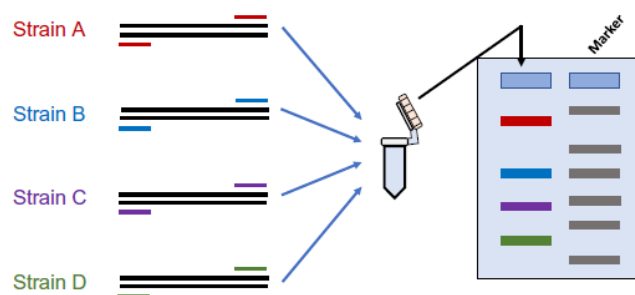


Figure 23 : Aperçu de la PCR multiplex [78].

La caractéristique principale de la PCR est sa capacité de produire littéralement des millions de copies d'un segment d'ADN particulier avec une grande fidélité dans un délai de 3 à 4 heures et ce qui fait d'elle un outil de typage [66].

IV.2. Technique de polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism ou AFLP)

Ces dernières années, certaines techniques alternatives basées sur la ligation d'adaptateurs oligonucléotidiques avant amplification de l'ADN par PCR, connues sous le nom de méthodes PCR à médiation ligaturale (LM PCR), ont été appliquées avec succès pour le typage de micro-organismes. Ils sont connus comme un groupe très polyvalent de techniques pour le typage génomique et leur polyvalence découle du fait qu'ils ne nécessitent pas de connaissance préalable de la séquence et un nombre pratiquement illimité de fragments de restriction peuvent être détectés et analysés dans les génomes. Parmi ces méthodes, on trouve la technique de polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP) [9].

L'AFLP est une technique d'empreintes génétiques rapide basée sur la PCR développée au début des années 1990 par *Keygene*® mais décrite à l'origine par Vos et *al.* (1995) [79, 80, 81].

L'AFLP est une approche intéressante qui identifie les différences génétiques entre deux génomes bactériens en combinant l'utilisation d'enzymes de restriction et la PCR pour potentiellement analyser une vaste gamme d'agents pathogènes bactériens [55, 56].

IV.2.1. Principe

L'analyse de polymorphisme de longueur de fragment amplifié (AFLP) est une technique d'empreinte ADN qui applique le principe du RFLP de l'ADN bactérien suivi de la PCR [82, 53]. Cette technique consiste à digérer l'ADN génomique avec deux enzymes de restriction, suivie d'une ligation d'adaptateurs aux fragments de restriction. Ensuite, une amplification sélective de ces fragments est réalisée avec des amorces spécifiques, puis les amplicons sont séparés et analysés par électrophorèse (*figure 24*) [82, 70].

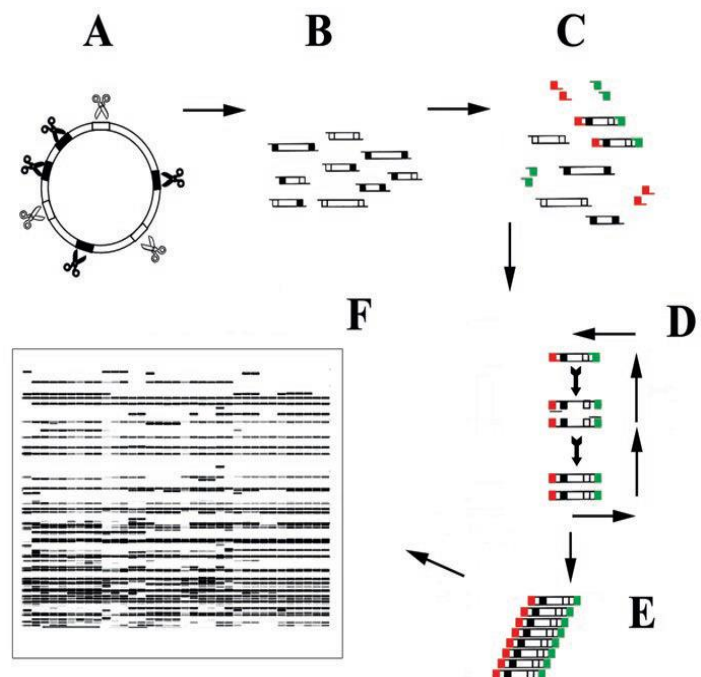


Figure 24 : Principe de l'AFLP. (A) L'ADN génomique est restreint à l'aide de deux enzymes différentes pour produire des fragments (B) avec un mélange de fins de séquence de restriction. (C) Les adaptateurs spécifiques au site de restriction sont ligaturés aux extrémités du fragment. (D) Les amorces PCR complémentaires des adaptateurs avec des bases supplémentaires à leurs 3' extrémités limitent l'amplification à un sous-ensemble de fragments (E) dont les tailles sont ensuite analysées par électrophorèse (F) [56].

IV.2.2. Mode opératoire

L'ensemble du processus d'AFLP se compose de quatre étapes principales comme le montre la *figure 25*.

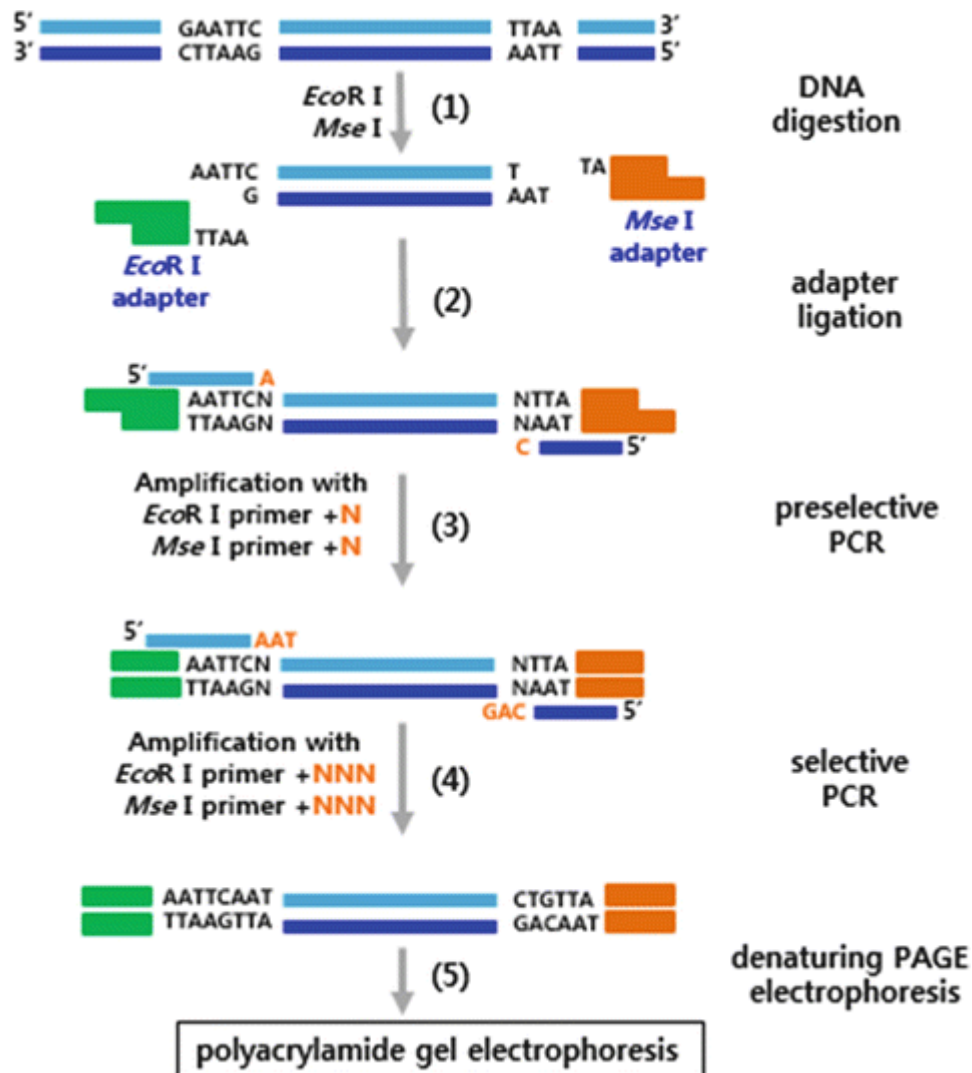


Figure 25: Protocole de l'AFLP. (1) L'échantillon d'ADN est digéré avec deux types d'enzymes de restriction. (2) Des adaptateurs sont fixés à chaque côté du fragment d'ADN. (3) Pré-amplification par PCR à l'aide d'amorces ayant la séquence de l'adaptateur et une base supplémentaire aléatoire (+1 nucléotide sélectif). (4) Amplification sélective - cation avec amorces qui ont la séquence de l'adaptateur et +2-4 nucléotides sélectifs. (5) Électrophorèse de fragments d'AFLP sur un gel d'acrylamide [83].

1) Restriction de la digestion de la molécule cible

Après l'extraction de l'ADN génomique., il est d'abord digéré avec des endonucléases de restriction. Dans la configuration la plus courante, l'ADN entier est digéré avec une ou plusieurs enzymes, De façon classique, dans l'AFLP, deux enzymes de restriction sont combinées et habituellement choisies de façon à ce que l'une coupe plus souvent que l'autre c'est à dire une

enzyme avec une fréquence de coupe élevée « cutter fréquent » et une autre avec une fréquence de coupe rare « cutter rare » qui ont des sites de reconnaissance de 6 et 4 pb, respectivement [55, 7, 56, 81, 84]. Depuis la publication originale par Vos et *al.*, plusieurs combinaisons d'enzymes ont été utilisées, comme EcoRI, PstI, HindIII ou ApaI combinés à MseI ou TaqI [9]. Alors qu'un grand groupe de fragments de restriction sont initialement créés, seuls des sous-ensembles spécifiques sont utilisés pour la comparaison des isolats [56]. Dans cette étape, il est crucial d'assurer la digestion complète de l'ADN génomique, car une restriction incomplète entraîne un manque de reproductibilité dans les profils AFLP et par la suite une difficulté d'interprétation [81, 9].

2) Ligation des molécules adaptatrices

Ensuite, Les fragments de restriction qui en résultent sont ligaturés à des adaptateurs complémentaires aux extrémités collantes des fragments de restriction, prolongeant ainsi la longueur des séquences terminales connues et servant comme cibles pour les amorces PCR [84, 55, 4, 56, 7].

Ces adaptateurs sont des fragments d'ADN à double brin spécifiques dont la taille varie de 10 à 30 pb. Ils contiennent une séquence centrale de base connue d'environ 20 nucléotides. Ces adaptateurs contiennent également une séquence spécifique à l'enzyme de ligation [81, 7, 84, 9]. La ligation de l'adaptateur ne régénère pas le site de restriction, empêchant ainsi qu'un second événement de restriction ait lieu après la ligation. Pour cette raison, la restriction et la ligation peuvent avoir lieu en une seule réaction, ce qui accélère le processus [81].

3) Amplification par PCR

Les fragments de restriction adaptés sont ensuite amplifiés par PCR [80]. Cette étape se fait sur deux temps : une amplification pré-sélective suivie par une amplification sélective.

a) Amplification pré-sélective

Dans l'amplification pré-sélective, un sous-ensemble de tous les fragments de restriction est amplifié à l'aide d'amorces qui complètent les séquences des adaptateurs ligaturés avec l'ajout d'un nucléotide (A, G, C ou T) à l'extrémité 3' de l'amorce. Cette étape réduit ainsi le nombre de fragments à environ 1/16 de la quantité initiale. Cependant, elle reste une grande quantité [81, 9].

b) Amplification sélective

Le nombre de fragments devrait encore être réduit à un nombre approprié pour être visualisé par électrophorèse, de ce fait un deuxième cycle de PCR a lieu présentant l'amplification sélective du produit PCR pré-sélectif [9, 81]. Les amorces utilisées à cet effet contiennent de 1 à 3 nucléotides supplémentaires à l'extrémité 3' qui reconnaissent les séquences dans l'adaptateur. En utilisant une combinaison de plusieurs amorces (par ex. trois amorces pour les petits génomes et quatre amorces pour les grands génomes), il est possible de déceler même des différences uniques entre des organismes étroitement apparentés [81, 7, 9]. Pour visualiser les motifs, l'un des amorces de PCR contient soit une étiquette radioactive soit une étiquette fluorescente [9].

4) Analyse électrophorétique

Les fragments amplifiés sont séparés et visualisés sur électrophorèse en gel polyacrylamide (PAGE), sur électrophorèse capillaire (CE) ou sur électrophorèse sur gel d'agarose [53, 9, 55] (*figure 26*).

Pour la détection de PAGE, les fragments peuvent être étiquetés à l'aide de nucléotides ou d'amorces fluorescents ou radioactifs produisant ainsi un motif de bandes, tandis que la détection par CE repose principalement sur des amorces PCR fluorescentes qui vont être visualiser sous forme de pics [81, 9]. Alors que, les produits PCR résolus par électrophorèse sur gel d'agarose sont visualisés sous la lumière UV, dans ce cas, il n'est pas nécessaire d'étiqueter les amorces [55, 9].

Après séparation sur la base de la taille, les fragments sont détectés sur un séquenceur d'ADN manuel ou automatisé produisant ainsi des profils de séparation caractéristiques [4, 9, 7]. Une comparaison assistée par ordinateur des bandes à haute résolution générées pendant l'analyse AFLP permet de déterminer la relation génétique entre les isolats bactériens étudiés [55].

IV.2.3. Interprétation des résultats

À la suite de la PCR, des produits d'ADN de différentes longueurs obtenus sont traités de façon soit automatisée ou non après la séparation électrophorétique afin de générer des profils caractéristiques (un motif de bande unique ou des pics) [9, 85].

Quelque soit le type du traitement des données (automatisé ou non), le principe est le même. Les modèles d'électrophorèse obtenus sont utilisés pour la génération de fichiers d'images (p.ex. par autoradiographie, par imagerie phosphorescente...) sous un format de fichier image marqué TIFF (Tagged Image File Format). Après le traitement de ces fichiers images, des

profils de pics d'électrophorèse sont générés et sont ensuite utilisés pour l'analyse comparative [85].

L'interprétation des résultats se fait comme suit :

1. Les isolats qui diffèrent par une ou plusieurs bandes auront des génotypes différents. Donc ce sont des souches épidémiologiquement non apparentées et devraient être attribués à des types distincts [39, 66].
2. Les isolats représentant la souche de l'épidémie auront le même génotype donc des profils de bandes identiques [66].

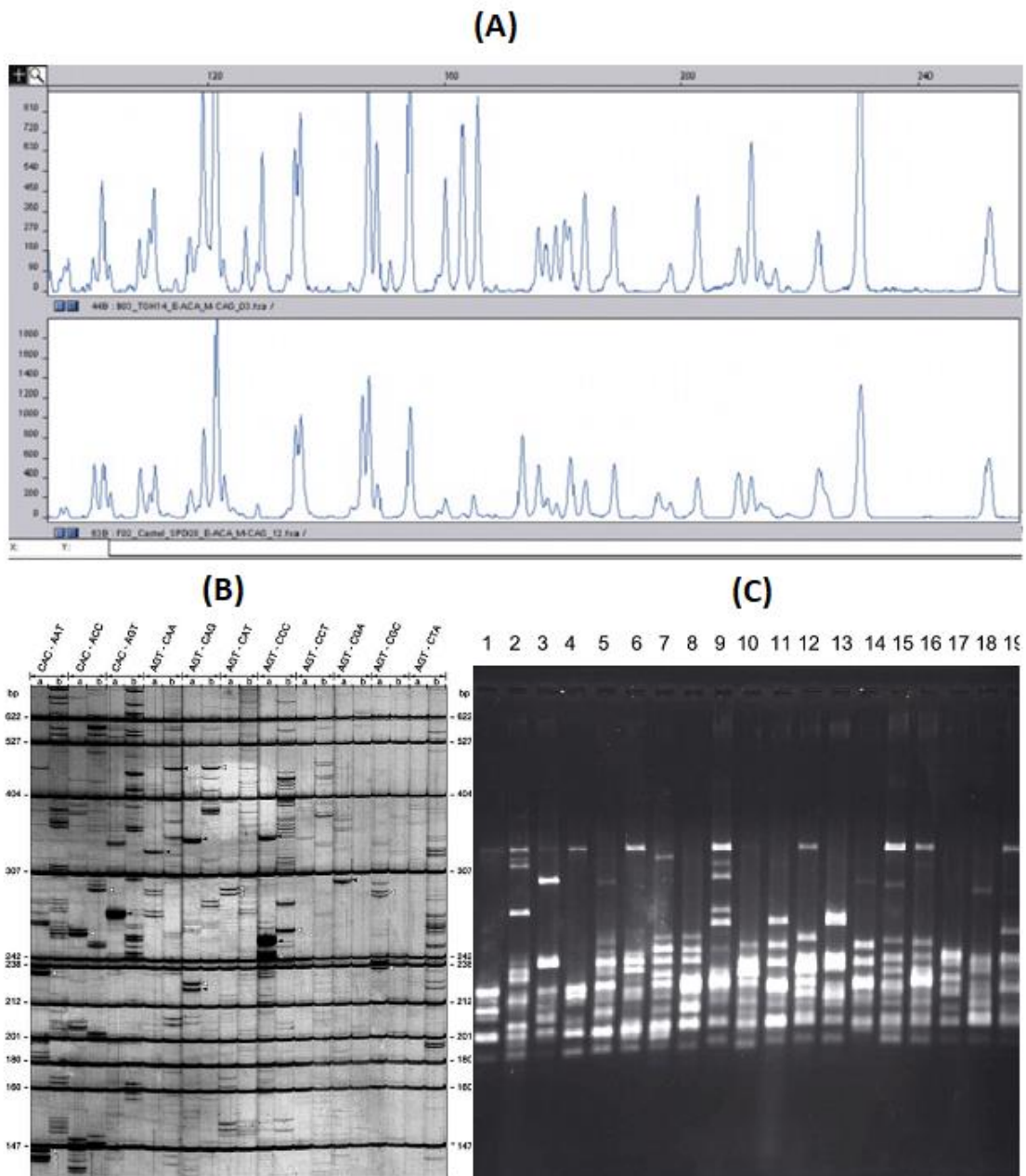


Figure 26 : Analyse électrophorétique des fragments amplifiés. (A) sur électrophorèse capillaire (B) sur électrophorèse en gel polyacrylamide (C) sur électrophorèse sur gel d'agarose [86, 87, 88].

IV.2.4. Avantages

✚ L'AFLP est une technique très puissante d'empreinte génétique pour l'ADN de toute source ou complexité, variant dans la taille et la composition de base ayant une bonne capacité de discrimination qui combine la haute résolution et le haut débit [89, 70, 7].

✚ Le **pouvoir discriminant l'AFLP est excellent**, elle présente une grande capacité de discrimination entre les espèces et au sein de celles-ci et une bonne capacité à différencier les souches [7, 9]. L'AFLP est considérée comme un outil flexible pour différentes applications telles que la caractérisation génétique et la cartographie génétique [80].

✚ En outre, l'AFLP s'est révélé **très reproductible et robuste** puisqu'elle combine la spécificité des polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP) avec la sensibilité de la réaction en chaîne de polymérase (PCR) [81].

✚ L'AFLP est une technique rapide et **automatisée**, de nombreux types de logiciels sont disponibles (**la fiabilité** est donc obtenue) ainsi que les profils obtenus sont relativement faciles à interpréter et peuvent être portables [9, 55, 44].

✚ De plus, les allèles AFLP peuvent être étiquetés par fluorescence, ce qui permet une caractérisation parallèle de plusieurs échantillons dans des analyseurs de génome automatiques [89].

IV.2.5. Limites

L'AFLP présente cependant certains problèmes qui ont limité l'utilisation de cette méthode [56]. Ce sont surtout des problèmes liés à la faisabilité.

✚ L'AFLP est une technique **complexe** qui comporte un grand nombre d'étapes et qui exige la qualité de l'ADN cible (l'ADN doit être purifié et de poids moléculaire élevé) qui est un facteur crucial pour justifier la reproductibilité [7, 80]. Elle nécessite également une standardisation rigoureuse [70].

✚ En outre, elle souffre des problèmes relatifs à l'analyse des données [56]. Les profils générés sont très complexes et l'interprétation des modèles de bandes est subjective ainsi que l'identification des fragments homologues est difficile [39, 80, 90].

✚ L'AFLP est une technique **coûteuse** et **laborieuse** [55, 9]. Elle nécessite un séquenceur d'ADN automatisé ainsi qu'un équipement spécialisé requis pour l'électrophorèse [7, 56]. Cette dernière nécessite également un ajustement et une optimisation des protocoles existants [9]. Des logiciels spécialisés sont aussi obligatoires pour l'analyse des clones [39].

✚ Malheureusement, cette technique est également à **forte intensité de main-d'œuvre** et nécessite une expertise pour effectuer des analyses [55, 82].

IV.3. Techniques avec amplification de régions répétées

L'ADN bactérien comporte toute une série de séquences répétées longues de plusieurs dizaines de paires de bases très conservées qui sont dispersées sur le génome et qui sont appelées "éléments d'ADN répétitifs" [43, 55, 54]. Ils peuvent être exploités pour le typage des souches. Des éléments répétitifs similaires peuvent être trouvés chez plusieurs espèces bactériennes, tandis que d'autres sont limités à un ensemble d'espèces [54].

Ceux qui sont partagés entre plusieurs espèces sont considérés comme des éléments d'ADN répétitifs à large spectre et les tests basés sur ces derniers sont appelés "rep-PCR" ou PCR à éléments répétitifs [54]. Certains éléments sont spécifiques d'une famille de bactéries comme les séquences ERIC (pour Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), retrouvées chez les Entérobactéries. D'autres sont ubiquitaires, comme les séquences avec répétitions palindromiques extragéniques (Repetitive Extragenic Palindromic ou REP) qui séparent les zones codantes sur le génome des bactéries et qui sont présentes en grand nombre sur le chromosome de la plupart des espèces bactériennes (~ 1 000 copies chez *E-coli*) [43].

D'autre part, on trouve les tests de génotypage spécifiques qui ciblent les éléments répétitifs spécifiques aux espèces. Par exemple, les séquences VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) exploitées par une méthode largement utilisée appelée MLVA (Multiple loci VNTR analysis) [54, 70]. En outre, des séquences groupées régulièrement entre-espacés de courts répétitions palindromiques dites "CRISPR" sont également utilisées [54].

IV.3.1. Techniques de la PCR à séquences répétitives (Repetitive elements PCR ou Rep-PCR)

PCR à séquences répétitives est une méthode de génotypage basée sur des éléments de séquence répétitifs très conservés dans les génomes bactériens [91, 92, 93]. Elle consiste à une amplification par PCR de fragments situés entre ces séquences à l'aide d'amorces complémentaires, permettant l'analyse de modèles spécifiques à la souche [42, 91, 93]. Plusieurs familles de séquences répétitives ont été utilisées avec succès comme cibles pour le génotypage rep-PCR [49, 54], y compris :

✚ **Séquence palindromique extragénique répétitive (REP) :** Les séquences REP mesurent environ 35 à 40 pb. Elles se trouvent en clones dans lesquelles des copies successives (jusqu'à six) sont disposées en orientation alternée. Ces séquences ont été identifiées et caractérisées chez de nombreuses espèces bactériennes [55, 92].

✚ **Consensus intergénique répétitif entérobactérien (ERIC) :** Elles mesurent environ 124 à 127 bp. Ces séquences sont plus fréquemment trouvées chez des espèces bactériennes entériques à Gram négatif [55, 42, 54].

✚ **Séquences BOX :** Elles mesurent environ 154 bp et elles forment des clones composés de différentes combinaisons de trois séquences répétitives de sous-unités, appelées boxA, boxB et boxC [54, 42].

Les tests de génotypage fondés sur ces éléments répétitifs sont appelés REP-PCR, ERIC-PCR et BOX-PCR, respectivement. En général, l'ERIC-PCR est utilisé pour génotyper les bactéries entériques à Gram négatif, et la BOX-PCR est utilisée pour génotyper les bactéries à Gram positif. Ils sont également utiles pour dépister une grande collection d'isolats bactériens qui doivent être génotypés rapidement [54].

IV.3.1.1. Principe

La technique rep-PCR s'appuie sur l'amplification PCR de l'ADN situé entre des motifs répétés du génome pour produire des amplicons de longueur variable [49, 7]. Les amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse pour générer des modèles de migration qui sont comparés les uns aux autres pour déterminer la relation génétique entre les isolats bactériens analysés [49, 42, 55].

IV.3.1.2. Mode opératoire

Le mode opératoire de la Rep-PCR est le suivant (*figure 27*) :

1) **Extraction de l'ADN** : c'est une étape essentielle dans toutes les méthodes y compris la rep-PCR. L'ADN est extrait par l'une des techniques d'extraction.

2) **Amplification** : la rep-PCR est basée sur l'amplification de l'ADN situé entre des séquences courtes, répétées, spécifiques d'un genre bactérien, non codantes, conservées et dispersées sur le génome (REP, ERIC...) lorsque deux séquences sont à proximité [54, 94, 62]. Les régions flanquantes de ces derniers servent de sites de fixation pour les amorces oligonucléotidiques complémentaires orientées vers l'extérieur. Ainsi, une paire identique d'amorces amplifiera les séquences dans tous les espaces situés entre ces répétitions qui généreront plusieurs produits PCR de longueur variable [54, 7, 4].

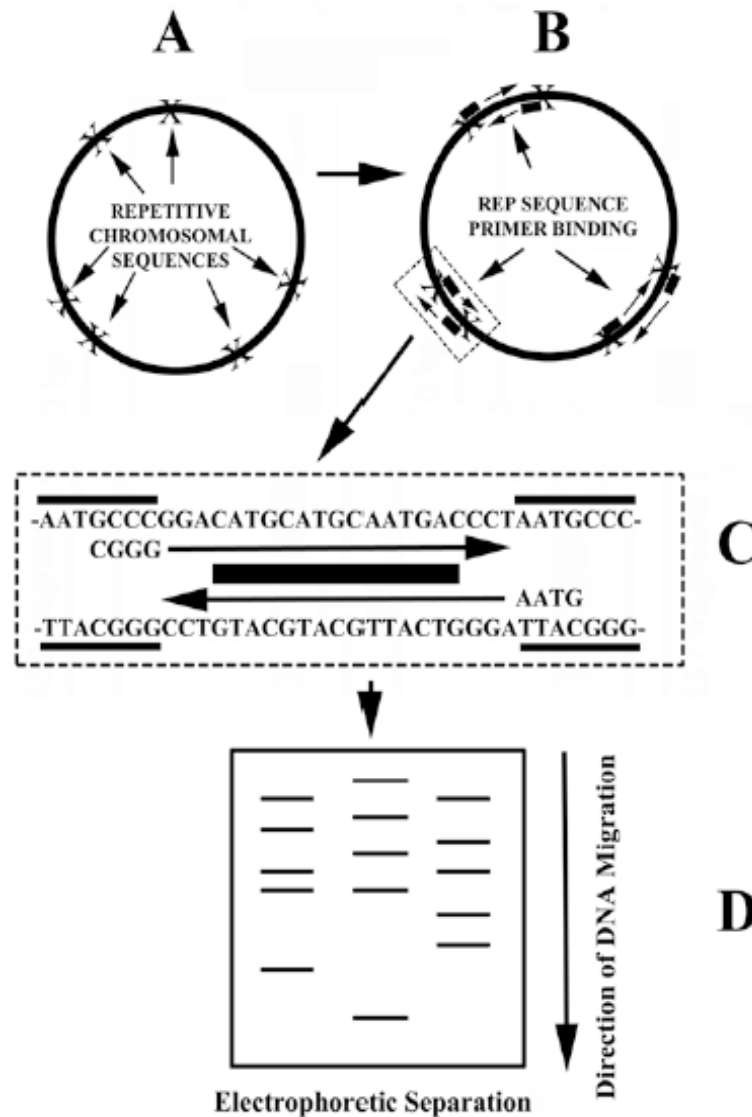


Figure 27 : Illustration de rep-PCR. (a) Les séquences répétitives dans le chromosome bactérien sont reconnues par des amorces dirigées vers l'extérieur (b) permettant l'amplification PCR des régions interrépétitives (c) qui sont ensuite analysées par électrophorèse (d) [56].

1) **Electrophorèse** : les produits amplifiés par PCR sont ensuite caractérisés par électrophorèse au gel d'agarose ou par électrophorèse capillaire, pour générer des profils de bandes d'ADN avec chaque motif représentant une seule souche bactérienne [54, 55].

2) **Analyse des profils électrophorétiques** : les empreintes digitales obtenues sont comparées les unes aux autres pour déterminer la relation génétique entre les isolats bactériens analysés. Les modèles de bandes diffèrent en raison du nombre d'éléments répétitifs et de leur position relative dans le génome bactérien [4, 49, 42, 55]. Cette comparaison peut être effectuée par des outils d'analyse d'images (par exemple, Bionumerics, Pyelph, Quantityone) [54].

IV.3.1.3. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats de la rep-PCR est très difficile. Cependant, on peut suivre ces recommandations :

1. Les isolats qui diffèrent par une ou plusieurs bandes devraient être attribués à des types différents.
2. Les isolats qui ont des profils de bandes identiques devraient être considérées indistinctes donc liées épidémiologiquement.

Toutefois, un logiciel appelé « Diversilab® » a bien facilité l'interprétation des résultats obtenues [42].

IV.3.1.4. Avantages

La rep-PCR peut être un outil précieux pour le typage des souches bactériennes grâce à ses différents avantages [42].

✚ Elle possède un **bon pouvoir discriminant** mais qui est inférieur à celui de la PFGE, car elle donne moins de bandes [94]. Ce pouvoir discriminant dépend de la méthode utilisée et du nombre de séquences répétitives présentes dans une souche [49].

La rep-PCR présente également :

✚ **Sa facilité d'utilisation** : la rep-PCR est facile à utiliser car c'est une méthode simple ne nécessitant qu'une quantité minimale d'ADN pour le typage ainsi qu'une faible intensité de main-d'œuvre [4, 92, 7, 42].

✚ **Sa flexibilité** : c'est une technique flexible c'est-à-dire qu'elle peut être utilisée pour filtrer plusieurs genres bactériens. Elle a été considérée comme un outil fiable pour classer une vaste gamme de bactéries à Gram négatif et plusieurs bactéries à Gram positif. [94, 54, 91, 4].

✚ **Sa rapidité** : la rep-PCR est de mise en œuvre rapide. Comme elle est basée sur l'amplification PCR et l'électrophorèse ADN subséquente, les résultats de la rep-PCR peuvent être obtenus dans un laps de temps relativement court [95, 49, 55].

✚ **Son coût** : cette approche est très bon marché en raison du faible coût des matériaux. Elle est peu chère par rapport à la PFGE [49, 42, 94].

✚ **Sa fiabilité** : la rep-PCR est une technique fiable ce qui la rend avantageuse [92, 91].

IV.3.1.5. Limites

Les tests Rep-PCR sont tous basés sur l'analyse de bandes électrophorétiques des produits amplifiés par PCR. Par conséquent, ces tests comportent plusieurs limites inhérentes à la PCR [54].

✚ L'un des inconvénients de la rep-PCR est la contamination de l'ADN [54].

✚ De plus, si une souche n'a pas un certain nombre de séquences répétitives suffisamment près l'une de l'autre, les amplicons générés peuvent être insuffisants pour permettre des inférences épidémiologiques ou phylogénétiques [7].

✚ En outre, les tests rep-PCR pourraient également amplifier de façon non spécifique des segments à l'extérieur de la région de répétition ciblée [54].

✚ Toutefois, la principale limite de cette technique réside dans son besoin de PCR combiné avec l'électrophorèse utilisant des gels d'agarose traditionnels, qui ne sont pas suffisamment reproductibles , ce qui peut entraîner une **reproductibilité intra-laboratoire et interlaboratoire limitée** et par la suite **un manque de standardisation** technique et d'interprétation [4, 55, 54, 94]. Ce manque de reproductibilité des profils, au type de thermocycleur utilisé, à la variabilité des réactifs et aux conditions des systèmes d'électrophorèse en gel [43, 54, 95, 7, 4].

IV.3.2. Analyse multilocus de répétitions en tandem à nombre variable (Multi-locus Variable Number of Tandem Repeats Assay ou MLVA)

La technique MVLA est une technique de génotypage largement utilisé basé sur la PCR [54].

Cette technique évalue la relation entre les isolats en se basant sur la comparaison de la taille d'un certain nombre de locus contenant un nombre variable de séquences répétées en tandem (VNTR) d'ADN [60].

Les VNTR sont des clones de séquences d'ADN répétitives en tandem, c'est à dire qu'un certain nombre de copies de chacun des motifs répétitifs sont regroupées et orientées dans la même direction (par exemple : ATT C ATT C ATT C) [54, 49, 95]. Le nombre de répétitions peut être très variable, même entre les souches de la même espèce [49]. Ceux-ci se produisent en raison d'une erreur de couplage pendant la réplication chromosomique entraînant l'insertion ou la suppression d'unités répétées [56].

IV.3.2.1. Principe

La méthode consiste à rechercher des répétitions en tandem en nombres variables (VNTR) dans le génome et après leur identification, en multipliant ces fragments par PCR. Après avoir effectué la PCR, les fragments d'ADN peuvent être séparés par électrophorèse et dimensionnés, pour déterminer le nombre de répétitions présentes dans l'amplicon, créant ainsi un profil MVLA caractéristique [96, 56, 95, 7].

IV.3.2.2. Mode opératoire

Le processus de la MLVA est représenté dans la *figure 28* et détaillé ci-dessous :

1- Isolement de l'ADN bactérien : les cellules bactériennes sont prélevées d'une gélose et sont bouillit pour libérer l'ADN [97].

2- Amplification : une amplification initiale se fait par une ou plusieurs PCR multiplexe d'une sélection spécifique d'un certain nombre de répétitions en tandem situées dans le génome bactérien. Les amorces PCR sont conçues pour se lier aux séquences non répétitives juste à l'extérieur de la région de répétition [98, 43, 99, 7].

3- Electrophorèse : d'un point de vue technique, après amplification par PCR, les amplicons sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose ou par électrophorèse capillaire; et dimensionnés pour déterminer le nombre de répétitions à chaque locus, créant ainsi un profil MVLA : la taille des produits amplifiés varie en fonction du nombre de copies de l'élément [52, 56, 55, 98, 7, 95].

4- Analyse : le profil MLVA ainsi résultant est défini par le nombre de répétitions des loci VNTR sous forme d'un code numérique ; ces profils peuvent être reliés automatiquement via certains logiciels [55, 98, 43].

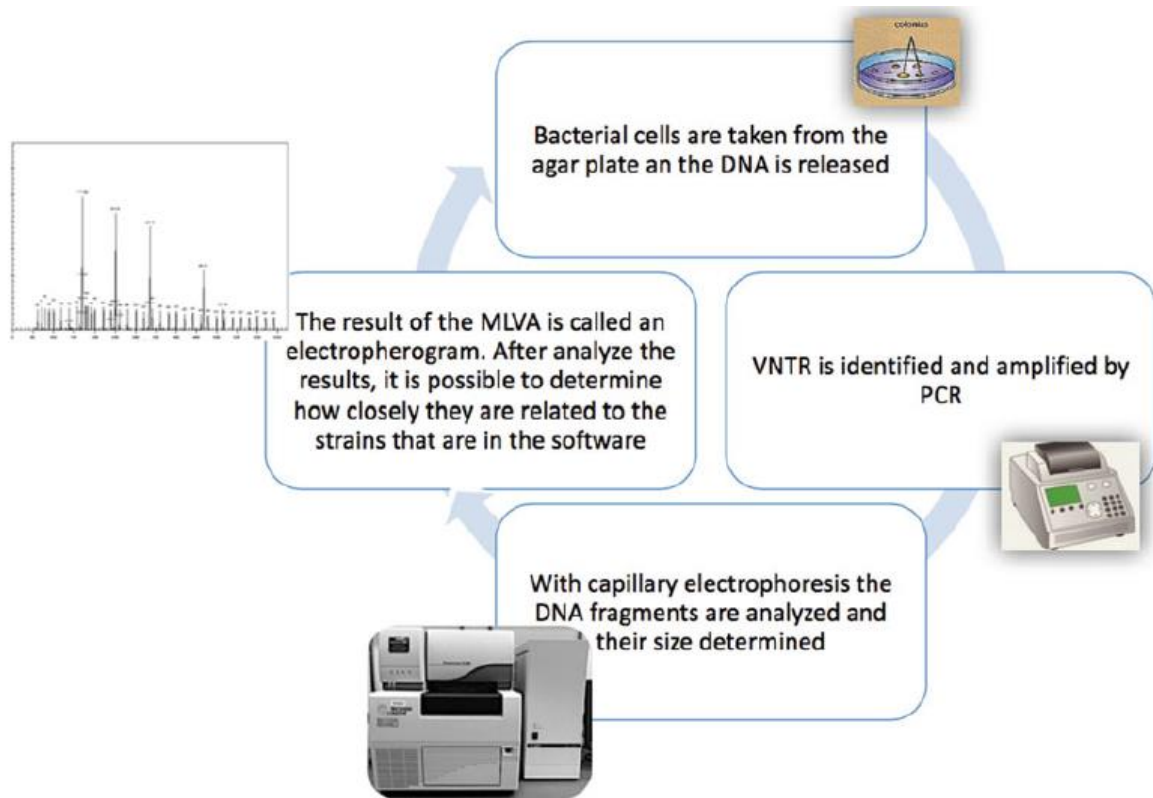


Figure 28 : *Processus de la MLVA. L'ADN est extrait des bactéries isolées. Ensuite, des répétitions en tandem dans des nombres variables (VNTR) dans le génome sont identifiées et puis amplifiées par la PCR. Après l'exécution de la PCR, par électrophorèse capillaire, les fragments d'ADN sont analysés et leurs tailles sont déterminées. Enfin, après avoir analysé les résultats, il est possible de déterminer à quel point ils sont liés à aux souches qui sont dans le logiciel [96].*

IV.3.2.3. Interprétation des résultats

Il est important de souligner que dans le typage de souche basé sur l'analyse VNTR, ce ne sont pas les bandes électrophorétiques qui sont comparées, mais c'est une comparaison de la taille des fragments d'ADN plutôt que du contenu génomique spécifique [56, 54].

L'analyse de la taille des différents VNTRs permet l'assignation d'un profil allélique MLVA [99]. Ce profil est défini par le nombre de répétitions des loci VNTR et chaque génotype reçoit donc une désignation numérique de type MLVA (par ex. MT21) [55, 54].

Les codes de profils peuvent être stockés dans une base de données pour la comparaison des souches et les études épidémiologiques ce qui facilite la portabilité et l'échange des données de génotype entre les laboratoires [55, 54].

Plusieurs bases de données et plateformes d'analyse MLVA sur le Web sont actuellement utilisées. Ces plateformes permettent de comparer les profils MLVA des souches dans le monde entier et de déterminer la distribution géographique et temporelle des types MLVA des pathogènes bactériens.

IV.3.2.4. Avantages

Puisque la rep-PCR et la MLVA sont des techniques basées sur l'analyse des régions répétées, elles partagent certains avantages.

- ✚ La MLVA, comme la rep-PCR, est une méthode rapide, relativement simple et facile à utiliser et à interpréter avec un coût relativement faible [94, 60, 50, 7, 55].

- ✚ En outre, cette technique est à haute résolution, ce qui est bénéfique pour résoudre des situations d'épidémie importantes et complexes et possède également une bonne capacité discriminante (quasiment aussi discriminante que l'électrophorèse en champ pulsé) [94, 61].

Parallèlement aux éléments communs, la MLVA présente d'autres avantages en plus :

- ✚ Elle a une reproductibilité élevée et les données produites sont transférables entre les laboratoires [54, 49]. En effet, le MLVA a montré une concordance avec d'autres techniques et parfois une capacité de discrimination plus importante que celle de la PFGE par exemple [70].

- ✚ Cette méthode convient également aux plateformes automatisées à grande échelle [61].

IV.3.2.5. Limites

- ✚ La stabilité est un inconvénient important de cette technique. Les VNTRs évoluent souvent trop rapidement (mutations) pour fournir une relation phylogénétique fiable parmi les souches étroitement liées ce qui limitent parfois l'utilisation de cette technique. Elle est plutôt adaptée aux études sur une période courte par exemple à l'échelle d'un épisode épidémique [39, 94, 70]

- ✚ La MLVA nécessite des amorces spécifiques pour chaque espèce ciblée et le développement de ces derniers implique que la séquence du génome de la bactérie à typer soit connue. Par conséquent, seuls les micro-organismes les plus courants peuvent être sous-typés ce qui rend la MLVA est une technique peu sensible [55, 94, 96, 52].

- ✚ Enfin, la MLVA exige également du personnel formé [96].

IV.4. Techniques d'amplification aléatoire (Random Amplified Polymorphic DNA/Arbitrarily Primed-PCR OU RAPD/AP-PCR)

Contrairement à d'autres méthodes basées sur la PCR, qui reposent sur la digestion de restriction du génome bactérien pour générer des profils d'amplification, le RAPD-PCR amplifie les régions d'ADN distribuées aléatoirement dans le génome bactérien en utilisant de courtes amorces arbitraires qui ne ciblent pas de séquences génomiques spécifiques dans des conditions de faible stringence (amorce courte et unique, température d'hybridation basse) [55, 94]. Du fait de la fixation peu spécifique des amorces sur une multitude de sites du génome de la bactérie, une variabilité dans les génomes des souches testées se traduit par une variabilité dans le nombre et la position d'accrochage de l'amorce et est détectée par un polymorphisme du nombre et de la longueur des fragments d'ADN amplifiés [43].

AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) est une variante de RAPD. Les différences entre les deux techniques comprennent l'amplification, qui dans AP-PCR est menée en trois parties différentes, chaque partie avec sa propre rigueur et la concentration des composants. La première partie de la PCR-AP utilise des concentrations élevées d'appât. Ces amorces sont de longueur variable (normalement 6_10 nucléotides pour RAPD-PCR et 20_34 nucléotides pour AP-PCR), et les amorces souvent conçues à d'autres fins sont également utilisées dans la AP-PCR [4, 55].

IV.4.1. Principe

Le principe de la RAPD est basé sur une amplification aléatoire. La technique consiste à utiliser une amorce courte d'une dizaine de nucléotides. L'amorce s'hybride avec une affinité suffisante aux séquences d'ADN à basse température, de sorte qu'elle peut être utilisée pour lancer l'amplification des régions du génome bactérien. Les amplicons RAPD sont ensuite séparés par électrophorèse pour générer une empreinte génétique et les modèles de bandes sont utilisés pour comparer la relation des souches bactériennes [100, 7, 55]

IV.4.2. Mode opératoire

Les étapes de l'analyse RAPD-PCR sont (*figure 29*) :

1) **Extraction de l'ADN** : la première étape consiste à extraire l'ADN de l'échantillon, qu'il s'agisse de sang, de salive, de sperme ou d'un autre échantillon biologique.

2) **Amplification** : elle utilise une seule et unique amorce courte d'environ 10-20 paires de bases et des températures basses 36°C à 45°C. Dans ces conditions de stringence faible, de nombreux appariements plus ou moins spécifiques ou mésappariements, se font si deux

amorces se fixent sur les deux brins d'ADN à une distance suffisamment courte (moins de 5000 paires de bases). Du fait de la fixation peu spécifique des amorces sur une multitude de sites du génome de la bactérie, une variabilité dans les génomes des souches testées se traduit par une variabilité dans le nombre et la position d'accrochage de l'amorce et est détectée par un polymorphisme du nombre et de la longueur des fragments d'ADN amplifiés [43].

3) **Electrophorèse** : plusieurs amplicons de tailles différentes sont générés pendant la PCR et sont résolus par électrophorèse en gel d'agarose ou par électrophorèse capillaire et génèrent une empreinte ADN unique [4, 55].

4) **Analyse des résultats** : les gels contenant des fragments d'amplification sont visualisés et photographiés sous lumière UV produisant des empreintes digitales qui peuvent être comparées entre différentes souches bactériennes pour en déduire leur relation génétique [55].

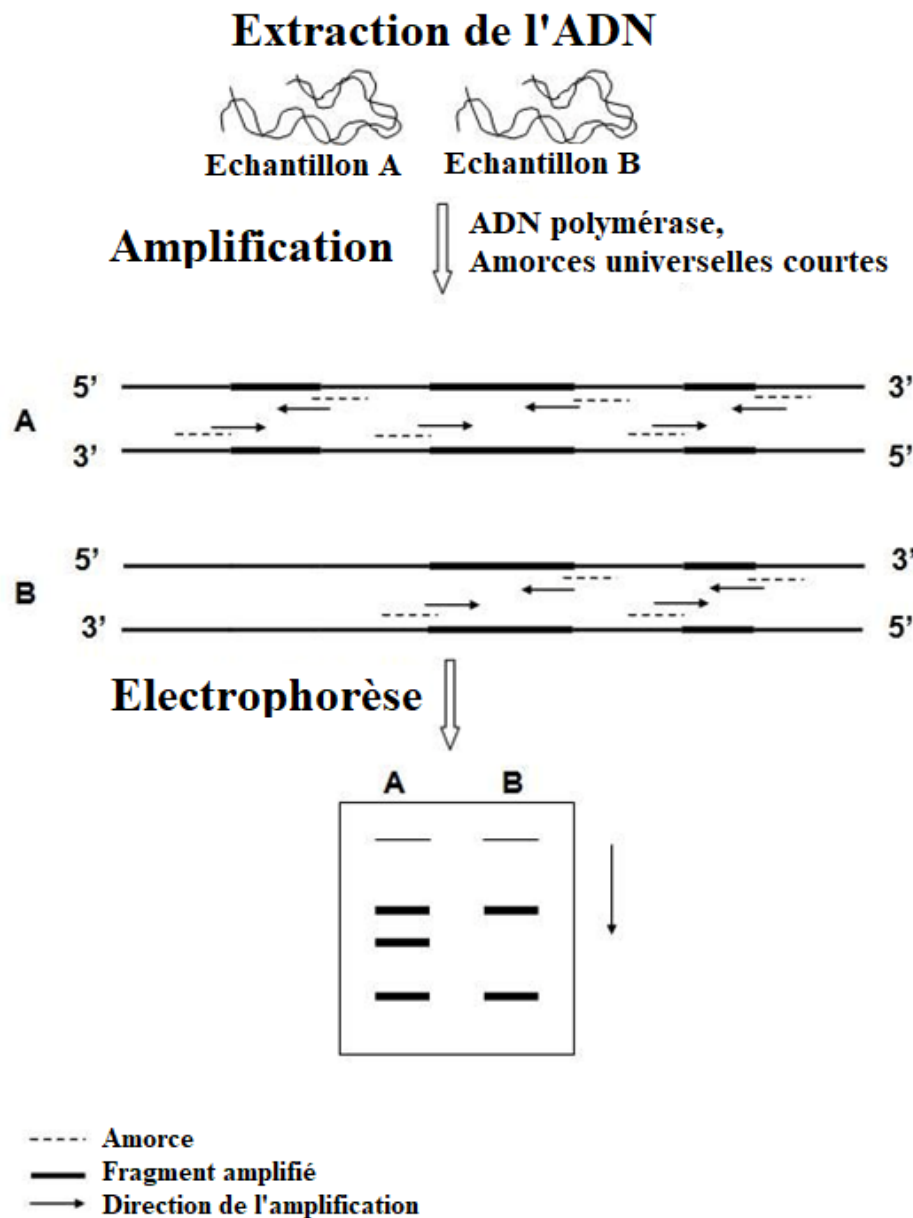


Figure 29 : Etapes de la RAPD [101].

IV.4.3. Interprétation des résultats

Pour la RAPD, l'interprétation des modèles de fragments identiques et des modèles avec trois différences de fragments ou plus (il n'y a pas de sites d'enzymes de restriction à considérer dans la RAPD) est simple.

La reproductibilité et le pouvoir discriminant de chaque amorce et protocole d'amplification doivent être validés par l'analyse d'ensembles d'isolats qui ont déjà été bien définis par des données épidémiologiques ou des études de typage indépendantes. De telles analyses sont disponibles pour relativement peu d'espèces (par exemple, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile*).

Étant donné que la variation de l'AP-PCR ne peut pas être étroitement couplée à des événements génétiques précis, les principes définis précédemment pour l'ECP ne peuvent pas être facilement appliqués aux modèles typiques de l'AP-PCR. L'élaboration de critères généralement applicables pour l'interprétation des données AP-PCR demeure un domaine d'investigation active.

Néanmoins, une récente étude multicentrique a démontré que, bien que les laboratoires participants aient obtenu des données AP différentes des produits PCR, les mêmes clones épidémiologiques ont été identifiés de manière satisfaisante. Par conséquent, lorsque la variabilité de la taille des fragments peut être démontrée parmi des isolats épidémiologiquement non apparentés, ceux qui ne présentent pas de différences ou de changements seulement dans l'intensité de la bande peuvent être considérés comme étant liés épidémiologiquement. Les changements dans deux bandes demeurent difficiles à interpréter [66].

IV.4.4. Avantages

Le RAPD présente de nombreux avantages :

✚ L'analyse des variations génétiques fondée sur le RAPD permet une bonne diversité génétique en raison de sa capacité à générer des marqueurs aléatoires à partir de l'ensemble du génome. C'est une méthode flexible (possible pour plusieurs espèces bactériennes) [49, 94].

✚ RAPD-PCR a l'avantage supplémentaire d'un court délai d'exécution (rapide) et c'est une technique simple, facile à utiliser et à faible coût [7, 43, 95, 4].

✚ La méthode ne nécessite pas une connaissance préalable spéciale des séquences cibles d'ADN spécifiques (compositions génétiques bactériennes) car une amorce s'ancre à un site non spécifique de la séquence d'ADN. Cela en fait un outil souple d'application générale [7, 55, 62].

✚ Enfin, le RAPD-PCR nécessite qu'une petite quantité d'ADN bactérien pour effectuer l'analyse, et il ne nécessite pas de transfert ou d'hybridation [7, 62].

IV.4.5. Limites

Toutefois, cette méthode souffre également de certains problèmes :

✚ Le principal inconvénient de la méthode est sa faible reproductibilité intra et inter-laboratoires [49, 95]. Ceci est dû à l'utilisation de très basses températures d'hybridation, à l'absence de réactifs et d'équipements standardisés et à des différences entre les laboratoires dans les protocoles et les conditions de PCR et par conséquent l'échange et la comparaison des profils RAPD entre laboratoires est devenu plus difficile, et il est devenu impossible de produire des résultats précis [55, 70, 62]. Ce manque de reproductibilité a limité leur large utilisation dans les enquêtes épidémiologiques [55].

✚ Cependant, l'introduction de réactifs commerciaux et normalisés a rendu la prise d'empreintes digitales RAPD plus longue à normaliser donc elle manque de standardisation (pas de critères d'interprétation véritablement définis) [62, 94].

✚ En outre, elle présente une difficulté de lecture et d'interprétation des différences de modèles en absence de règles consensuelles [94, 7].

CHAPITRE V
« METHODES BASEES SUR LE
SEQUENÇAGE DE L'ADN »

CHAPITRE V : METHODES BASEES SUR LE SEQUENÇAGE DE L'ADN

Les séquences microbiennes du génome sont sujettes à une variabilité en raison entre autres de l'accumulation des mutations. La variabilité au sein des séquences de gènes spécifiques (gènes de virulence, résistance aux antibiotiques...) peut être exploitée pour déterminer la relation des bactéries [102, 53, 42].

La séquence nucléotidique d'un gène bactérien peut être obtenue au moyen d'un équipement spécialement conçu appelé séquenceur d'où le nom des méthodes basées sur le séquençage [53].

Le séquençage de l'ADN consiste en la détermination automatisée de l'enchaînement des nucléotides ou bases d'un fragment voire de la totalité de l'ADN [50, 43, 103]. Il peut se faire par l'utilisation de marqueurs fluorescents multiples, une analyse par gels hautement résolutive ou par électrophorèse capillaire. L'analyse est rendue possible par des programmes d'alignement et de comparaison des séquences [43]. Différentes approches technologiques ont été développées au cours du temps [103].

Le génotypage des bactéries basé sur le séquençage de l'ADN a contribué de façon significative à de nombreux aspects du génotypage en identifiant les polymorphismes mononucléotidiques (SNP ou Single Nucleotide Polymorphisme), les suppressions ou les insertions de séquences (y compris les duplications de séquences, comme les VNTR) [42].

L'analyse de séquence peut être effectuée :

✚ **Analyse du polymorphisme nucléotidique unique (SNP analysis) :** Le génotypage du SNP implique la détermination de la base nucléotidique présente dans un isolat donné à des positions nucléotidiques définies qui sont variables au sein de la population. Les méthodes de génotypage SNP sont principalement utilisées pour définir les relations entre les isolats d'agents pathogènes homogènes [42]. Parmi ces méthodes on cite : le typage du gène *spa* (Staphylococcal protein A) de SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) et le typage du gène *emm* (gène de la protéine M) de *Streptococcus pyogenes* [56].

✚ **Gènes multiples ou le typage génomique multilocus (MLST).**

✚ **Le séquençage du génome entier (WGS).**

Ces approches présentent un certain nombre d'avantages supplémentaires par rapport aux méthodes de typage par électrophorèse, concernant la simplicité et la reproductibilité, le partage et le stockage des données ainsi que l'interprétation des données et détection de différences [56].

V.1. Techniques de séquençage

Depuis la description par Sanger en 1977, les techniques de séquençage de l'ADN se sont considérablement développées, elles sont devenues plus performantes et moins coûteuses (*figure 30*). Aujourd'hui, il est possible d'analyser de grandes portions d'ADN en même temps [104, 103].

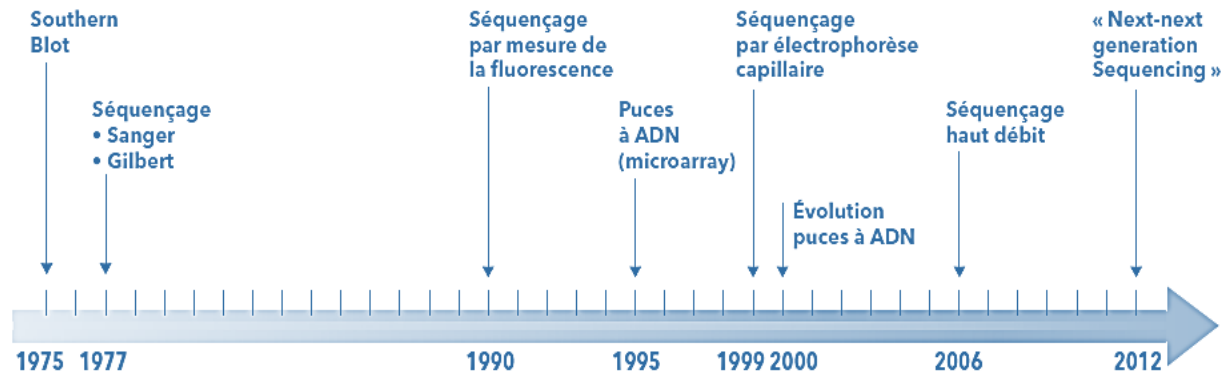


Figure 30 : Evolution des méthodes de séquençage [103].

Les techniques de séquençage peuvent être classées en plusieurs catégories présentées dans le *tableau V* :

<p>Séquençage traditionnel (Séquençage 1^{ère} génération)</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Méthode de Sanger b. Méthode de Maxam-Gilbert c. Séquençage après shotgun
<p>Séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing ou NGS)</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Séquençage massivement parallèle (Séquençage 2^{ème} génération) <ul style="list-style-type: none"> - Pyroséquençage (454 de Roche) - Séquençage avec des terminateurs réversibles (SOLiD d'Applied Biosystems) - Séquençage par ligation (Solexa d'Illumina) - Ion torrent de Thermo Fisher Scientific b. Technologies SMS : Single Molecule Sequencing (Séquençage 3^{ème} génération) <ul style="list-style-type: none"> - Séquençage en temps réel sur molécule unique (Single molecule real-time sequencing ou SMRT de Pacific Biosciences) - Technologie des nanopores (MinION d'Oxford Nanopore Technologies) - HeliScope d'Helicos

Tableau V : Catégories des techniques de séquençage (originale).

V.1.1. Méthode de Sanger

La méthode de Sanger (du nom de son inventeur en 1977) a été la première technique de séquençage de l'ADN.

Le principe de cette méthode est de lire l'ADN par petits fragments [103]. Elle utilise l'ADN polymérase capable de synthétiser un brin complémentaire à partir d'un brin matrice. Pour le séquençage, des nucléotides légèrement différents sont utilisés : les didésoxyribonucléotides (ddNTP) au lieu des désoxyribonucléotides. Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Ainsi, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête [50]. Les arrêts aléatoires de la polymérisation à différents endroits de la séquence d'ADN permettent ensuite de lire cette séquence, nucléotide par nucléotide (*figure 31*). [103].

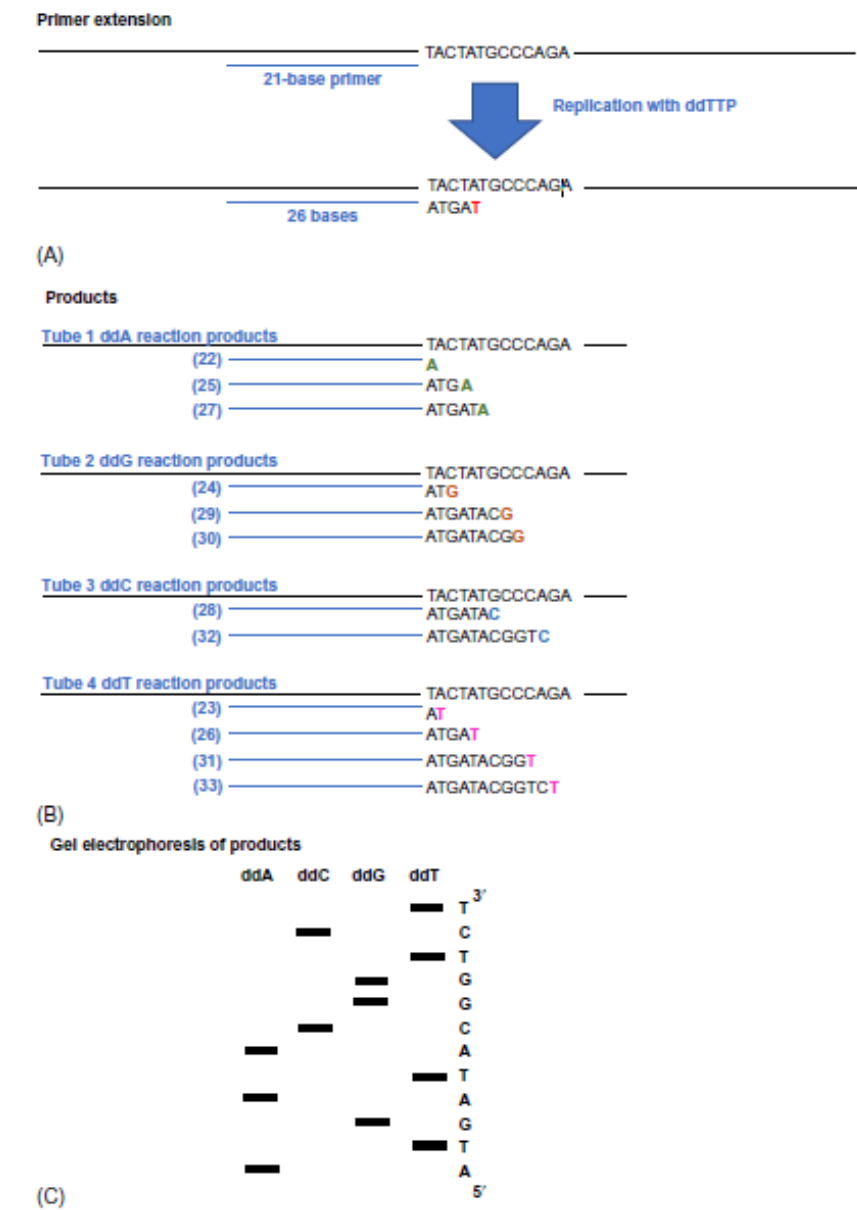


Figure 31 : Etapes de la méthode de Sanger [105]

V.1.2. Séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing ou NGS)

Le séquençage de nouvelle génération est appelé également séquençage à haut-débit parce qu'il permet d'analyser des régions génétiques de grandes tailles et beaucoup de gènes à la fois, grâce à des technologies plus puissantes, rapides et sensibles (*figure 32*) [103].

✚ **Séquençage massivement parallèle (Séquençage 2^{ème} génération) :** Ce sont des méthodes dites « massivement parallèles » qui produisent des millions de lectures de séquences d'ADN en une seule fois.

✚ **Technologies SMS : Single Molecule Sequencing (Séquençage 3^{ème} génération) :** Ces technologies réduisent davantage les coûts et le temps requis pour séquencer les génomes [106]. En outre, ils peuvent résoudre les problèmes inhérents à la lecture de séquences courtes en séquençant de longues molécules uniques en temps réel [102]. Le principe de ces technologies peut être symbolisé par le séquençage d'une molécule d'ADN sans étape de pré-amplification en conservant l'incorporation de nucléotides, par cycles ou non [107].

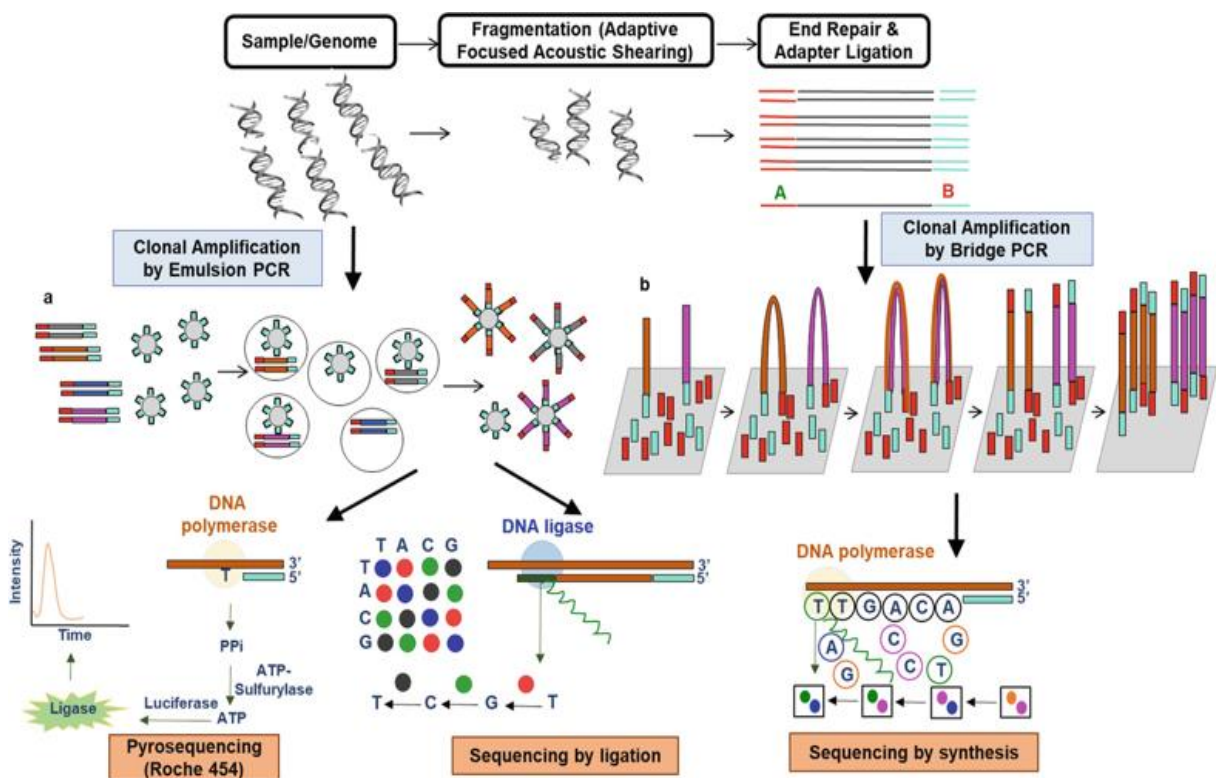


Figure 32 : Représentation schématique des étapes de base du séquençage de l'ADN à l'aide de différentes plateformes NGS [108].

V.2. Typage génomique multilocus (Multilocus Sequence Typing ou MLST)

La MLST est une méthode de typage de séquences multilocus. il s'agit d' une méthode d'empreinte moléculaire électronique portable, universelle et définitive qui caractérise les isolats d'espèces bactériennes en fonction des changements dans la séquence de nucléotides de fragments internes dont la taille est inférieure à 600 bp de sept (7)gènes de ménage, bien que le nombre de gènes puisse varier en fonction des souches, espèces et autres particularités de l'échantillon étudié [109, 110, 111, 112, 61, 63, 8].

Comme les gènes possèdent divers degrés de dérive génétique, les gènes de ménage, « house keeping genes ou HK genes» , sont le plus souvent séquencés parce qu'ils sont présents dans tous les isolats d'une espèce particulière [7, 94, 42].

Ces gènes interviennent dans le métabolisme de base de la bactérie et sont, par conséquent, très conservés au cours de l'évolution [94].

Pour que le MLST soit un outil épidémiologique efficace, la sélection des gènes et leur nombre doivent être suffisants pour distinguer les isolats présentant une divergence génétique plus récente [7].

Cette méthode permet de classer les souches en « séquence types » (ST).

Un ST est ainsi défini par une combinaison donnée de séquences (ou allèles) de chacun des gènes cibles, une seule mutation d'un des gènes suffit à classer la souche dans un ST différent. Les ST sont regroupés en complexes clonaux (CC) sur la base d'un nombre réduit d'allèles différents (généralement deux) [43].

Le premier programme MLST a été élaboré pour *Neisseria meningitidis* en 1998. Depuis son développement, il est devenu un outil très populaire pour les études épidémiologiques, et pour les études sur l'évolution moléculaire des pathogènes [55].

V.2.1. Principe

La MLST comprend l'amplification PCR et le séquençage de plusieurs loci de sept gènes de ménage [49]. L'alignement des séquences d'un locus donné permet de repérer les allèles différents et chaque variante de séquence ayant un numéro d'allèle unique [73]. Chaque combinaison unique des allèles se voit attribuer un type de séquence (ST), qui est ensuite utilisé pour indiquer un ensemble précis de séquences [49]. Les ST peuvent être regroupés en complexes clonaux (CC) [43].

V.2.2. Mode opératoire

Le typage par le MLST est réalisé en suivant les différentes étapes (*figure 33*) :

1- Sélection et extraction de l'ADN : Le point de départ est la sélection de gènes avec suffisamment de polymorphisme mononucléotidique pour différencier les isolats mais avec suffisamment de séquences communes pour concevoir des amorces capables d'amplifier chaque isolat de l'espèce étudiée. À cette fin, les gènes de ménage remplissent des conditions bien déterminées [113]. Pour *Staphylococcus aureus*, par exemple, les gènes ciblés sont arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi et yqiL [54]. Ensuite, l'ADN génomique des souches est extrait et purifié pour une utilisation ultérieure comme modèles de PCR [109].

2- Réaction de polymérisation en chaîne : ensuite, l'ADN purifié est amplifié avec des paires d'amorces oligonucléotidiques conçues à partir de séquences conservées dans les souches de séquençage du génome [109].

3- Electrophorèse des produits PCR : les amplicons obtenus sont déposés sur un gel d'agarose dans une cuve à électrophorèse et sont visualisés après migration électrophorétique [73, 109].

4- Séquençage : les produits PCR obtenus sont séquencés en utilisant la méthode de Sanger [54, 114].

5- Analyse des résultats : l'analyse des séquences est réalisée via des interfaces web spécifiques pour l'analyse MLST. Les séquences sont alignées et comparées aux séquences des bases de données. Les séquences d'ADN récupérées sont alors assignées à un numéro allélique qui, lorsqu'il est combiné avec les numéros alléliques attribués aux autres séquences de gènes HK, constitue collectivement un profil allélique ou un type de séquence (ST), un « code à barres moléculaire » de la souche [94, 73, 43, 95].

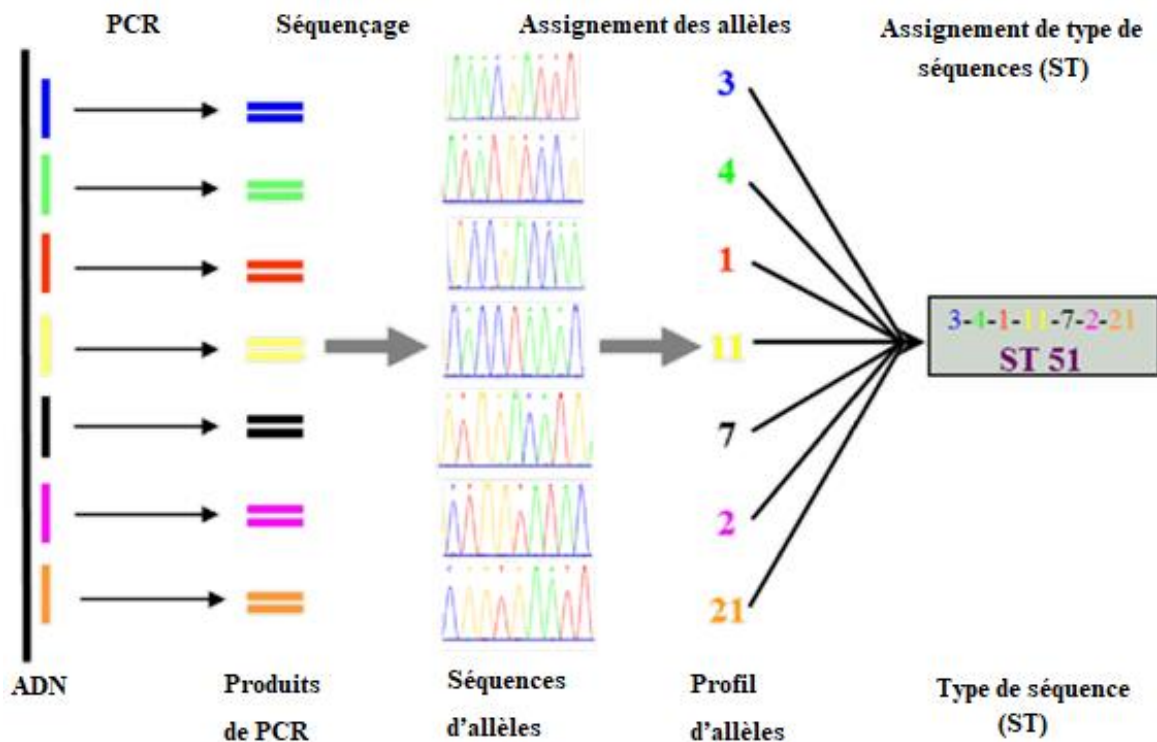


Figure 33 : Etapes de la MLST [2].

V.2.3. Interprétation des résultats

L'analyse des séquences est réalisée via une interface web spécifique [94].

Les séquences type (ST) des 7 gènes étudiés sont comparés aux séquences de la base de données [94].

La relation entre les STs peut être révélée à l'aide de différentes méthodes de regroupement [7].

V.2.4. Avantages

- ✚ L'avantage le plus important de MLST par rapport à plusieurs autres méthodes de typage est le manque d'ambiguïté [109].

- ✚ C'est une méthode universelle hautement discriminante qui fournit des données précises et définitives basées sur le séquençage de gènes pour la caractérisation des isolats bactériens [110, 61, 94, 113, 115].

- ✚ En outre, cette technique génère des données standardisées, reproductibles et facilement comparables entre les laboratoires et les pays [73, 112, 70, 64]. La portabilité électronique des données de séquence de nucléotides et l'accessibilité des bases de données de référence MLST

en ligne ont facilité le partage des résultats entre les laboratoires et ont permis à cette méthode de gagner une popularité comme outil épidémiologique pour le typage bactérien [109, 61, 7]. À l'heure actuelle, les bases de données MLST sont accessibles à <http://pubmlst.org/databases> et <http://www.mlst.net/databases/> [61]. Elle présente donc une bonne reproductibilité intra-laboratoire et surtout inter-laboratoire [94].

✚ La méthode MLST a l'avantage d'être facilement normalisée et automatisée [49]. Sa caractéristique la plus importante est qu'elle possède une nomenclature simple normalisée à l'échelle internationale, qui a une signification et une validité phylogénétiques [54, 112].

✚ Il s'agit d'une approche de typage génétique à haute résolution applicable à de nombreux pathogènes qui ont une incidence sur la santé humaine [110, 94].

✚ De plus, les résultats MLST peuvent donner un aperçu de la structure des populations d'isolats bactériens ce qui la rend excellente pour des études macroépidémiologiques (nationales, continentales et intercontinentales) [115, 94]. Ainsi, les données MLST peuvent être utilisées pour étudier les relations évolutives entre les bactéries [64]. Elle est donc adaptée à l'analyse phylogénétique permettant de suivre l'histoire clonale globale de l'espèce avec une grande précision [93].

V.2.5. Limites

Les principaux inconvénients de la technique MLST sont :

- ✚ Le coût élevé [61].
- ✚ Technique laborieuse nécessitant pour sa réalisation des chercheurs qualifiés. [64]

V.3. Séquençage du génome complet (Whole Genome Sequencing ou WGS)

Le séquençage du génome entier est une procédure de laboratoire qui détermine l'ordre des bases dans le génome d'un organisme en un seul processus [116]. Étant donné que chaque organisme possède une séquence de bases azotées qui la rend unique, le but de ce processus est de déterminer la séquence génomique du micro-organisme [96].

Le WGS peut théoriquement distinguer les souches qui diffèrent à un seul nucléotide et, dans le nombre limité d'études où des comparaisons directes avec PFGE ont été effectuées, a fourni une plus grande résolution [117].

En séquençant l'ensemble du génome (éléments génétiques chromosomiques et mobiles), WGS fournit immédiatement des informations sur la détection et l'identification des pathogènes, le typage épidémiologique et la sensibilité aux médicaments [118].

Le séquençage microbien du génome entier (WGS) est devenu un outil important pour le typage moléculaire et les enquêtes autour des épidémies [119]. Cependant, l'utilisation des techniques de WGS en routine n'est pas encore à l'ordre du jour, même s'il fait peu de doute que ces techniques supplanteront tôt ou tard toutes les autres [94].

V.3.1. Principe

En raison de la longueur du génome entier, il est initialement coupé en de petits fragments, qui seront amplifiés (par une amplification étiquetée) puis séquencés. Ce qui permet de déterminer l'ordre d'enchaînement de l'ensemble des nucléotides pour une bactérie donnée [96, 116, 43].

V.3.2. Mode opératoire

Le séquençage du génome entier s'effectue selon les étapes suivantes (*figure 34*) :

1- Extraction de l'ADN bactérien : l'ADN est extrait à partir d'échantillons microbiens homogènes, par exemple, une colonie bactérienne unique à partir d'une culture pure [120].

2- Fragmentation de l'ADN extrait : en des fragments suffisamment petits de 36 pb à 700 pb [116, 43].

3- Amplification par PCR et étiquetage : à cette fin, on utilise de petits morceaux d'étiquettes d'ADN, qui servent de « codes à barres » pour identifier quel morceau d'ADN cisaillé appartient à quelle bactérie. Cela est semblable à la façon dont un code à barres identifie un produit dans une épicerie. [96, 116].

4- **Séquençage du génome entier** : l'ADN codé en barres est combiné et placé dans le séquenceur du génome entier de nouvelle génération. Le séquenceur identifie les bases azotées, qui caractérisent chaque agent pathogène. Le séquenceur utilise le code à barres pour garder la trace des bases qui appartiennent à quelles bactéries [116, 120, 96].

5- **Assemblage** : les lectures peuvent également être assemblées de novo en séquences contiguës plus longues (contigs), et orientées et alignées [120]. La réunion de ces différentes séquences, grâce à des algorithmes, permet d'obtenir rapidement le génome complet de l'échantillon [43].

6- **Analyse des résultats** : enfin, une analyse informatisée peut comparer les séquences de chaque espèce bactérienne et identifier leurs différences [96]. Le nombre de différences peut indiquer à quel point les bactéries sont étroitement liées et à quelle probabilité elles font partie de la même épidémie [116].

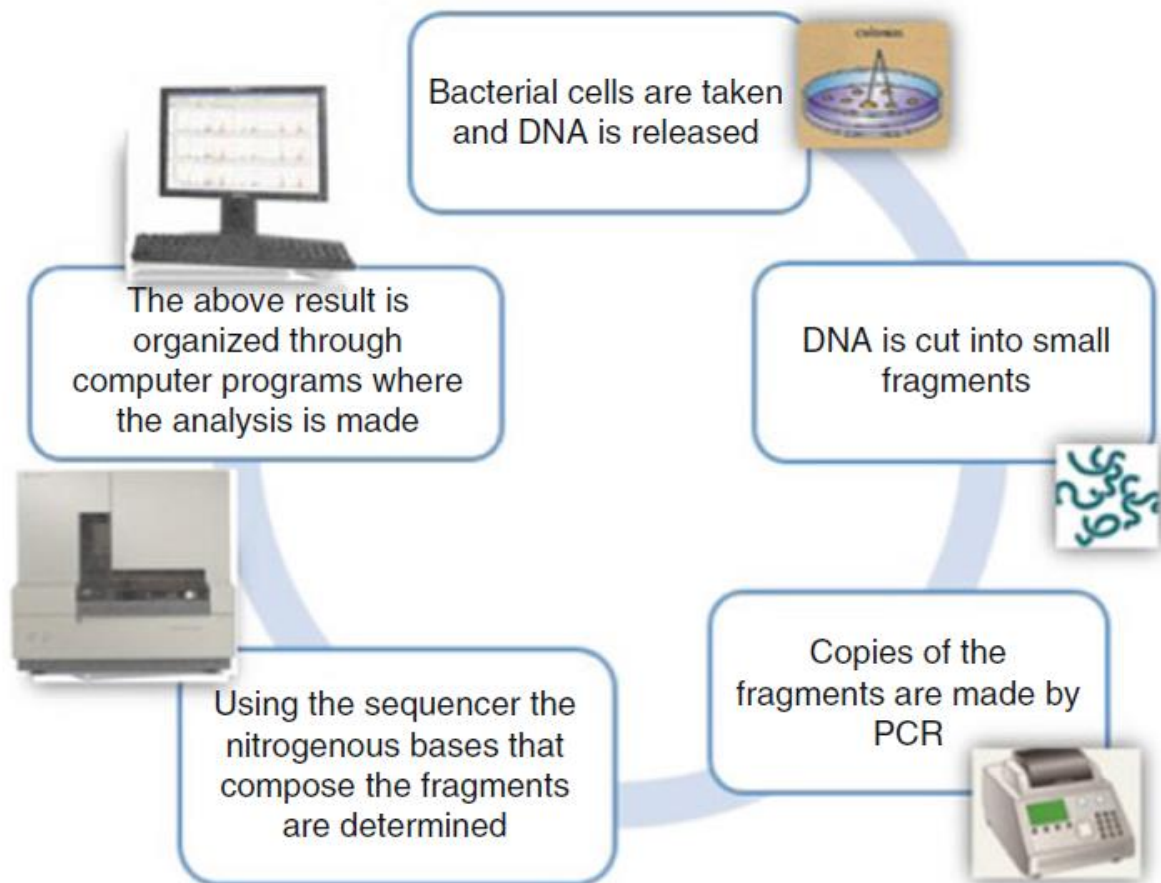


Figure 34 : Etapes du WGS [96].

V.3.3. Interprétation des résultats

L'objectif principal de l'analyse WGS est l'identification des différences génomiques entre les souches bactériennes. Étant donné que les données brutes de la technologie WGS sont des fragments de séquences génétiques bactériennes de tailles diverses (de 100 à plus de 10 000 pb), une question fondamentale est de savoir comment utiliser ces fragments pour déterminer les différences génomiques, appelées variantes génomiques [121].

Les pipelines de bioinformatique sont des outils qui identifient les variantes génomiques. Ces derniers comprennent :

- a) Les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) ou les variants mononucléotidiques (Single Nucleotide Variants ou SNV), qui indiquent une différence de substitution mononucléotidique entre les génomes,
- b) Les insertions et les suppressions de nucléotides/s (communément appelées indels),
- c) Les réarrangements génomiques.

Deux principales approches sont utilisées :

- a) La première consiste d'abord à **assembler des génomes de novo**, puis à utiliser des méthodes d'alignement du génome entier pour comparer deux souches ou plus [121].
- b) Une deuxième approche est l'approche de **cartographie de référence**. Dans cette approche, les lectures de séquençage sont alignées sur un génome de référence. Après la cartographie, les variantes sont appelées à partir de la comparaison entre les lectures. [121].

Analyse après assemblage

La plupart des analyses WGS utilisent les SNP comme mesure primaire de la distance génétique, bien que d'autres méthodes incluent le typage multilocus de séquence (MLST) de génome entier et les tables de présence/absence de gène [121].

Le nombre de différences de nucléotides (SNP) entre les isolats est la mesure courante de la relation génétique utilisée pour les enquêtes sur les épidémies.

- 1- S'il y a quelques (dizaines) SNP, les isolats sont étroitement liés, ce qui augmente la probabilité qu'ils proviennent de la même source.
- 2- La présence de nombreux SNP (centaines ou plus) indique que les isolats sont apparentés à distance, ce qui implique qu'ils ne proviennent pas de la même population du réservoir.

Il est important de noter que différentes populations de bactéries contiennent différents niveaux de diversité génétique dont les chercheurs doivent tenir compte lorsqu'ils interprètent les résultats du SGE. Les forces évolutives (p. ex., dérive génétique, sélection naturelle, effets

des fondateurs et goulots d'étranglement de la population) qui entraînent les SNP sont à l'origine de cette diversité. De ce fait, il est presque certain que les analyses WGS des isolats sous-estiment la véritable diversité génétique des populations bactériennes. Les bactéries de la même source peuvent avoir un nombre important de SNP [122].

Par conséquent, il n'est pas aussi simple de déterminer si les isolats correspondent que d'appliquer les seuils de SNP. Il est essentiel de mettre les distances génétiques en contexte avec les analyses phylogénétiques qui illustrent les relations évolutives. Ces informations supplémentaires nécessitent une interprétation plus nuancée des analyses WGS, dans laquelle les topologies arborescentes sont considérées en combinaison avec les distances SNP [122].

Les analyses WGS doivent être interprétées conjointement avec les résultats épidémiologiques [122].

V.3.4. Avantages

Le séquençage du génome entier (WGS) présente beaucoup d'avantages étant une méthode de typage moléculaire.

✚ Le WGS est **hautement reproductible** et possède un **pouvoir de discrimination plus élevé** que d'autres méthodes de typage moléculaire (p.ex. électrophorèse sur gel à champ pulsé), ce qui permet de détecter la relation génétique entre différents isolats bactériens appartenant au même clone [8, 119].

✚ C'est une méthode **rapide** et **simple** qui **nécessite moins d'ADN** pour produire des données précises et fiables dans un court laps de temps [123, 116, 61].

✚ Contrairement aux techniques de typage traditionnelles, le séquençage du génome entier **extrêmement sensible** car il permet d'analyser toutes les informations génétiques présentes dans le génome des bactéries. Par conséquent, cette approche peut détecter les différences génétiques mineures entre les souches apparentées et peut élucider les voies de transmission entre les patients [70, 94].

✚ Parmi les avantages de WGS est remarquable qu'il est **plus détaillé et précis** pour identifier les épidémies. Au lieu d'avoir seulement la capacité de comparer des génomes bactériens utilisant 15-30 bandes qui apparaissent dans un modèle de PFGE, nous avons maintenant des millions de bases pour comparer.

✚ En utilisant le séquençage du génome entier, nous avons découvert que certaines bactéries qui semblaient être différentes en utilisant PFGE proviennent en fait de la même source. [96, 116].

✚ Le WGS est parfaitement adapté à l'étude de la phylogénie bactérienne. Moyennant un traitement informatique approprié, elle permet d'établir avec la plus grande fiabilité le degré de parenté entre différentes bactéries [94].

✚ L'utilisation de l'approche WGS dans l'analyse d'épidémies facilite l'identification rapide et précise des facteurs de virulence du pathogène ainsi que la présence de gènes de résistance aux antibiotiques [52, 94].

En conclusion, le WGS est une technique prometteuse et peut devenir la méthode de référence pour le typage des souches et la surveillance des épidémies [70].

V.3.5. Limites

Cependant, le WGS possède certaines limites qui devraient être reconnues :

✚ Les coûts de cette méthode limitent son utilisation clinique courante, mais cela diminue rapidement. Il est probable que cette technologie remplacera dans un proche avenir un bon nombre des méthodes de typage détaillées précédemment [95].

✚ Une Expertise technique en bioinformatique ainsi qu'une puissance de calcul importante sont requises pour analyser et interpréter les données [61, 94].

✚ À l'heure actuelle, la majorité des analyses sont basées sur des variantes de nucléotides uniques ou des SNP identifiés à partir de comparaisons avec une séquence de génome de référence. Par conséquent, les analyses dépendent de la qualité du séquençage et de l'assemblage du génome, ainsi que de la qualité et de la sélection du génome de référence [120].

✚ D'autre part, les infrastructures informatiques et les logiciels doivent être mis à niveau afin de stocker et d'analyser les grands ensembles de données bioinformatiques. Ce sera un défi constant pour les utilisateurs, car la technologie de séquençage continue d'évoluer et d'élaborer de nouvelles stratégies de calcul [61].

CHAPITRE VI
« GENOTYPAGE : INTERET ET
APPLICATIONS »

CHAPITRE VI : GENOTYPAGE : INTERET ET APPLICATIONS

Actuellement, le génotypage des microorganismes est largement utilisé dans plusieurs grands domaines de la bactériologie, notamment la taxonomie, la phylogénétique, l'évolution moléculaire, la bactériologie clinique et l'épidémiologie moléculaire des maladies infectieuses [9, 54].

✚ **En taxonomie, en phylogénétique et évolution moléculaire :** les données du génotypage des souches bactériennes sont comparées entre elles ; le principal objectif de ces disciplines est d'inférer les relations évolutives des microbes en fonction de leurs caractéristiques génétiques.

✚ **En bactériologie clinique :** ces outils sont utilisés pour le diagnostic des maladies infectieuses, et le but de cette discipline est donc de démontrer les relations des microbes avec les états pathologiques des hôtes.

✚ **En épidémiologie moléculaire :** les bactéries génotypées sont comparées les unes aux autres ainsi qu'à un groupe d'hôtes (population) à partir duquel ces bactéries ont été isolées. Sachant que l'objectif principal de l'épidémiologie moléculaire est d'étudier les déterminants des maladies infectieuses dans les populations dans un environnement défini [54].

VI.1. Applications en taxonomie, phylogénétique et évolution moléculaire

VI.1.1. Taxonomie

La taxonomie se définit comme l'étude des relations qui existent entre les organismes. Elle consiste à classer et à arranger les organismes dans des groupes sur la base de similarités (classification), à donner des noms aux groupes trouvés (nomenclature) et enfin à identifier des organismes inconnus pour déterminer s'ils appartiennent aux groupes déjà définis [124].

La taxonomie bactérienne est un système dynamique et en constante évolution, de ce fait l'identification d'une bactérie à une espèce donnée reste un des aspects des plus importants mais aussi les plus délicats [71, 124].

Depuis plus d'une vingtaine d'années, les taxonomistes bactériens reconnaissent la nécessité de ne plus baser le système de classification des bactéries sur des similarités de fonction et d'adopter une approche nécessitant la convergence du maximum de données (phénotypiques, génotypiques, phylogénétiques) pour déterminer les groupes taxonomiques ou taxons bactériens [124].

Les méthodes moléculaires sont actuellement les méthodes dominantes de la taxonomie moderne ; elle présente plusieurs avantages :

- Cette classification ne subira pas des modifications fréquentes ou radicales [124].
- Des systèmes d'identification fiables peuvent être établis après la classification des microorganismes [124].
- Un grand avantage pratique de ses méthodes c'est qu'elles produisent souvent des clones de souches plus nettement définies que celles uniquement délimitées par des traits phénotypiques [71].
- La taxonomie moléculaire est un système de classification robuste qui permet d'améliorer notre compréhension de l'évolution bactérienne et de fournir un aperçu des relations historiques [55].

L'un des supports de la classification génotypique est le séquençage des gènes d'ARN ribosomiaux :

Certaines régions génomiques, en particulier celles codant l'ARN ribosomal (ARNr), sont fortement conservées parmi les organismes apparentés et avec l'avènement du séquençage des nucléotides, il est devenu possible de cataloguer et de comparer les séquences génétiques de l'ARNr. Ainsi le séquençage des gènes de l'ARNr 16S est devenu un outil indispensable pour la taxonomie moléculaire. Le séquençage génique complet est la méthode privilégiée pour l'identification des espèces, mais le séquençage partiel permet l'identification au niveau du genre et est suffisant pour résoudre de nombreuses espèces. L'analyse de la séquence génique de l'ARNr demeure une pierre angulaire de la taxonomie moléculaire et continue d'entraîner la reclassification des taxons bactériens. Les seuils varient d'un genre à l'autre, mais en général, les séquences d'ARNr 16S présentent une identité de 99 % pour les souches de la même espèce, de 97 % pour les espèces du même genre et de 95 % pour les genres différents [55].

VI.1.2. Phylogénétique

Sur le plan phylogénétique, les méthodes de typage moléculaire permettent différentes applications à travers l'étude de l'hétérogénéité d'une espèce bactérienne en établissant un lien entre la variation génétique et le placement phylogénétique afin d'obtenir plus d'information sur et la diversité génomique des souches en fonction de leur répartition géographique, de leur profil de résistance, de leur virulence ou encore de leur sérotype [45, 8].

Pour illustrer l'identification génomique de souches plus virulentes au sein d'une espèce, l'étude de Bidet et coll. sur la diversité génétique des Streptocoques du groupe B est particulièrement démonstrative. Dans cette étude portant sur 129 souches de Streptocoques B de sérotype III dont 92 responsables de méningites néonatales et 37 responsables de simples colonisations, la distribution des souches au sein des groupes phylogénétiques montrait que si 50 % des souches de groupe 1 étaient responsables de méningites, seulement 25 % des souches des groupes 2 et 3 étaient responsables de méningites [45].

VI.1.3. Etude de la structure des populations bactériennes

Certains systèmes de typage moléculaire peuvent être appliqués à un grand nombre d'isolats d'origines diverses afin de déterminer la structure de la population intraspécifique et d'en tirer des hypothèses phylogénétiques [39]. En comprenant les événements génétiques qui conduisent à l'émergence d'un sous-clone, les enquêteurs peuvent prévoir et éventuellement empêcher la prochaine vague épidémique de se produire [125].

La vitesse d'évolution, la diversité intra-espèce et la structure génétique des populations diffèrent largement parmi les pathogènes bactériens humains. Selon la fréquence relative de la recombinaison et des mutations ponctuelles, la structure de la population d'une espèce bactérienne peut être localisée à travers un continuum allant de la clonalité stricte (où les isolats fils sont identiques aux parents, issus de la division des cellules binaires, et la diversification se produit uniquement par mutation génétique «dérive») vers la panmixie 'libre recombinaison' (où les isolats fils varient considérablement des parents en raison du taux élevé d'échanges de gènes intergénomiques aléatoires) [126, 127], voir *figure 35*.

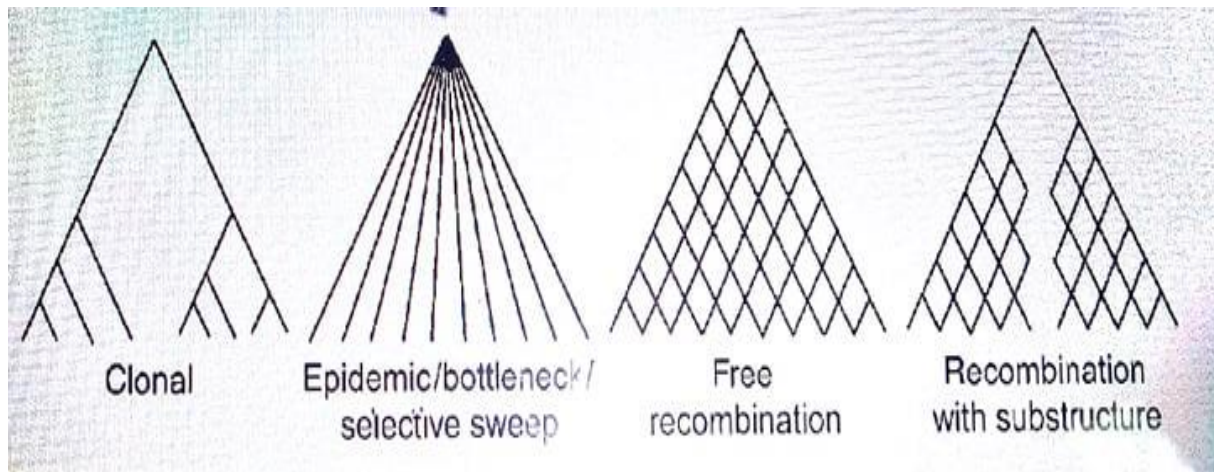


Figure 35 : Structure des populations bactériennes [127].

- 1) Une population clonale résulte de l'accumulation et de la verticale héritage de mutations par division binaire sans échange de matériel génétique.
- 2) Les populations épidémiques, ou celles qui ont subi des goulots d'étranglement, ou des balayages sélectifs se fondent dans un ancêtre commun relativement récent, de sorte que leur structure généalogique apparaît comme un rayonnement stellaire de tous les isolats d'un seul nœud ancestral.
- 3) Dans les populations qui se recombinent librement, les souches peuvent potentiellement échanger du matériel génétique avec n'importe quel autre membre de cette population, résultant en une structure généalogique semblable à un filet ou réticulée.
- 4) Les populations qui sont écologiquement ou géographiquement isolées se recombinent principalement dans leur sous-population.

À ce jour, la majorité des pathogènes bactériens étudiés présentent une structure principalement clonale, caractérisée par l'existence de lignées dominantes, montrant un fort "déséquilibre de liaison" (association non aléatoire d'allèles à différents loci) [126]. Par exemple, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* [128, 129].

Cependant, chez certaines espèces ayant une structure de population panmixte, on peut également trouver une clonalité transitoire lorsque les lignées sont isolées écologiquement ou lorsque la dissémination épidémique se produit plus rapidement que la recombinaison au sein d'une population [126]. C'est le cas de *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pyogenes* [128, 126].

D'autres agents pathogènes, tels que *Streptococcus pneumoniae*, peuvent conserver leur structure panmixte de population tout au long d'une épidémie [129].

Alternativement, les souches peuvent être panmixtes, ou se recombiner assez librement, avec très peu de preuves de clonalité ou de propagation épidémique (par exemple, *Helicobacter pylori* et également *Neisseria gonorrhoeae*) [128].

Pourquoi certains agents pathogènes sont clonaux et d'autres panmixtiques est une question ouverte, mais dépend sûrement de l'équilibre entre la recombinaison et la sélection, de la taille effective de la population et des échelles de temps considérées [128].

À l'inverse, l'évolution indépendante de lignées non apparentées sous la même pression sélective peut conduire à l'acquisition de caractères phénotypiques communs. Ce phénomène de convergence peut brouiller les données épidémiologiques basées sur le typage moléculaire ciblant ces caractères et, par conséquent, conduire à une inférence de clonalité inexacte [126].

Une bonne connaissance de la structure génétique des populations et des mécanismes moléculaires de l'évolution d'une espèce bactérienne donnée est donc une condition préalable à la sélection d'une méthode de typage moléculaire appropriée et à l'interprétation des résultats. Par exemple, la même méthode peut s'avérer très discriminante lorsqu'elle est appliquée à une espèce panmixtique, mais pas assez lorsqu'elle est appliquée à une espèce hautement clonale [126].

Ces connaissances de base peuvent être utiles pour des applications pratiques [130]. Par exemple, l'analyse PFGE du génome de *Pseudomonas aeruginosa* indique que la similitude moyenne des profils génomiques des souches non apparentées varie entre 20% et 60% avec une moyenne de 35%, alors que les souches dérivées clonalement d'un cluster hôte unique à des niveaux de similitude supérieurs à 80%. De même, les empreintes génomiques à haute résolution d'*Acinetobacter* ont révélé que les souches de la même espèce se regroupent à 50% de similitude ou plus, tandis que les niveaux de délimitation des clones et des souches sont respectivement d'environ 80% et 90% [39].

La méthode de typage de choix pour effectuer des études de génétique des populations bactériennes, et celle avec la base biologique la plus solide, est la MLST [39]. L'évaluation de la structure génétique de la population mondiale, de l'évolution génétique, de la diversité génétique et de la pathogénicité a été développée avec succès en combinant la MLST et le PFGE [48]. Actuellement, les structures génétiques des populations basées sur les données de séquence du génome entier ont une capacité beaucoup plus grande d'estimer les relations génétiques. C'est-à-dire que la génomique des populations permet aux chercheurs d'étudier la structure fine de la population des collections de souches, d'identifier les relations génétiques précédemment non reconnues et de déduire la séquence des événements évolutifs. Ces données ont des implications directes pour les enquêtes épidémiologiques, la médecine légale, la recherche sur la virulence et les vaccins [125].

VI.2. Applications en bactériologie clinique

Ces outils sont utilisés pour le diagnostic des maladies infectieuses [54]. Trois questions importantes peuvent être résolues par le typage : établir le foyer initial d’une infection disséminée ou non ou encore confirmer ou infirmer l’origine endogène d’une infection acquise à l’hôpital et faire distinguer une récurrence d’une réinfection [45].

VI.2.1. Confirmer une infection

Les Staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont fréquemment isolés à partir d’hémocultures, où ils peuvent être seulement un contaminant. Déterminer si l’isolement d’un SCN représente une vraie bactériémie est donc parfois difficile. Dans ce contexte, l’isolement répété de la même souche est un critère d’incrimination. Dans la plupart des cas, l’antibiogramme (antibiogramme) et le biotype permettent de conclure avec suffisamment de confiance. Cependant, dans certains cas difficiles à interpréter, l’utilisation de méthodes de génotypage permet de résoudre le problème en démontrant l’identité des bactéries isolées sur le plan génétique [45].

Les marqueurs moléculaires peuvent aussi, dans ce cadre, être utilisés pour distinguer entre bactériémie d’origine endogène et bactériémie liée à une contamination du cathéter central en comparant les souches des hémocultures à celles isolées au niveau du cathéter (lumière, pavillon ou point d’insertion) et dans les flores du patient (*figure 36*) [45].



Figure 36 : Voies de contamination des cathéters et place de typage moléculaire [45].

VI.2.2. Distinguer les rechutes des réinfections en cas d'infections récidivantes

Les cas d'infections récidivantes avec une même espèce bactérienne doivent être interprétés différemment selon qu'ils sont liés à la même souche ou à une autre souche non reliée sur le plan génétique [131].

L'hypothèse d'une réinfection avec un nouveau clone dans les suites d'une première infection confirmée par le typage montre une prédisposition particulière du patient à l'infection, celle-ci pouvant être liée à un déficit du système immunitaire (défaut de vaccination, immunodépression) ou une anomalie anatomique ou physiologique favorisant l'infection, comme le reflux vésico-urétéral dans les infections urinaires ou une brèche méningée dans les méningites récidivantes à Haemophilus ou Pneumocoque.

En effet, dans le second cas, la rechute, à l'inverse le typage démontre l'isoclonalité du premier isolat et du second, il faudra alors s'orienter soit vers -l'existence d'un foyer infectieux résiduel, une colonisation persistante soit vers un échec du traitement lié à la non-compliance du patient, à l'émergence d'une tolérance ou d'une résistance bactérienne ou à un schéma thérapeutique mal adapté à la situation clinique (posologie insuffisante, rythme d'administration inadapté ou mauvais choix de la/les molécule(s) [45, 131], voir la **figure 37**.

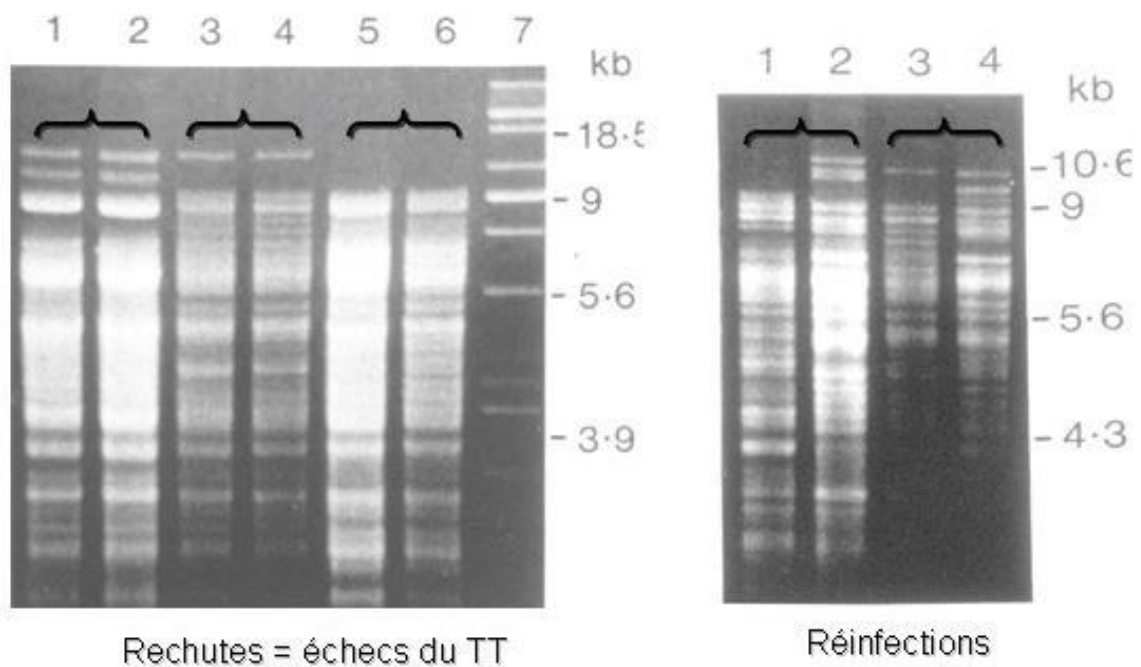


Figure 37 : Place du typage moléculaire dans une récidive d'angine à Streptocoque du groupe A(SGA) par analyse des profils de restriction enzymatique [45].

VI.3. Applications en épidémiologie moléculaire


L'épidémiologie moléculaire est basée sur le principe de la comparaison des caractéristiques génotypiques des pathogènes. Il combine les données obtenues à partir de l'analyse moléculaire des souches et des isolats avec les données épidémiologiques, obtenues à partir de la détection, de l'investigation et de l'analyse des maladies infectieuses [132].

Le terme « épidémiologie moléculaire » est habituellement défini comme « l'étude de la répartition et des déterminants des maladies et des infections dans les populations humaines à l'aide de méthodes de microbiologie moléculaire » [54].

De manière générale, les systèmes de typage épidémiologique sont utilisés pour étudier la dynamique des populations et la propagation des bactéries et autres micro-organismes qui subissent une reproduction non sexuelle (clonale), dans la nature ou en milieu clinique, à des niveaux allant d'un seul hôte à l'écosystème de la population mondiale [130].

Le typage peut être effectué, selon la situation : localement, dans un hôpital ou un autre laboratoire primaire, pour de petites investigations ; au niveau régional ou national, dans un laboratoire de référence, pour traiter des questions plus larges de santé publique et de surveillance ; ou à l'international à travers des réseaux collaboratifs, pour définir ou étudier la diffusion mondiale des principaux clones bactériens. À chacun de ces niveaux, différentes méthodes peuvent être appliquées [39].

On distingue :

 **L'épidémiologie locale** : l'épidémiologie à court terme ou locale fait référence à l'étude des chaînes de transmission qui se déploient sur des échelles spatiales et temporelles limitées. Dans ce contexte, le typage des souches a été appelé typage comparatif [133]. Il se concentre sur les variations génétiques ou les microvariations qui peuvent se produire au cours d'une épidémie ou d'un événement épidémique individuel dans un emplacement géographique particulier [41].

Des outils de typage des souches ayant une capacité discriminante élevée sont nécessaires pour l'épidémiologie locale car les isolats putatifs d'épidémie doivent être distingués des isolats sporadiques étroitement apparentés qui constituent la population bactérienne endémique. Les **techniques basées sur la PCR, le SLST et le séquençage du génome** sont des exemples d'outils de typage qui peuvent être utilisés pour l'épidémiologie locale. Ces outils permettent de classer les isolats étroitement apparentés en clones et d'étudier leurs voies de transmission et

leurs réservoirs. Ces informations peuvent contribuer au développement de pratiques de contrôle des infections au sein d'un établissement ou au sein d'une communauté [133].

✚ **Épidémiologie mondiale** : l'épidémiologie à long terme ou mondiale fait référence à l'étude des chaînes de transmission qui se déploient sur de larges échelles spatiales et temporelles. Dans ce contexte, le typage des souches a été appelé typage de bibliothèque ou définitif [133]. Il a pour objectif de mesurer l'accumulation de variation génétique au fil du temps et d'établir un lien entre la lignée de souches et la maladie à l'échelle mondiale [41]. Les applications comprennent la surveillance de la circulation et de la distribution mondiale des clones dans différentes populations hôtes. Ces données permettent de détecter l'émergence ou la réémergence de clones et de distinguer la propagation des clones de la propagation des facteurs de virulence.

Des outils de typage des souches qui présentent une reproductibilité élevée et évaluent des marqueurs relativement stables sont nécessaires pour l'épidémiologie mondiale. De plus, ces outils devraient être à haut débit, devraient avoir des protocoles standardisés et devraient fournir une nomenclature qui facilite la communication entre les laboratoires sur les clones. **PFGE, MLST et séquençage du génome** sont des exemples d'outils de typage qui peuvent être utilisés pour l'épidémiologie mondiale. Ces outils permettent de classer des isolats éloignés en lignées clonales et d'étudier leurs profils de propagation et de virulence. Ces informations peuvent contribuer à l'élaboration de stratégies de santé publique aux niveaux national et international [133].

VI.3.1. Enquêtes sur les épidémies

Le typage des souches fait partie intégrante des enquêtes épidémiologiques des infections bactériennes. Les systèmes de typage épidémiologique peuvent être utilisés pour les enquêtes sur les épidémies, pour confirmer et délimiter les modes de transmission d'un ou de plusieurs clones épidémiques, pour tester des hypothèses sur les sources et les véhicules de transmission de ces clones et pour surveiller les réservoirs d'organismes épidémiques [134]. Les mêmes méthodes de typage et d'interprétation peuvent être utilisées pour les épidémies hospitalières et pour les épidémies communautaires [45].

Exemple pratique : la survenue de six septicémies, d'une chorioamniotite et d'une infection urinaire à *Enterobacter cloacae* résistant aux céphalosporines de troisième génération (C3G) chez neuf patients de trois services contigus de l'hôpital Robert-Debré sur une période de quatre mois avait entraîné un isolement des patients en 1991. Toutes ces souches avaient le même biotype et le même antibiotype, caractérisé par l'hyperproduction d'une céphalosporinase, ce qui avait fait craindre, à l'époque, la survenue de contaminations croisées. Le ribotypage avait permis de montrer que les souches n'avaient pas de liens sur le plan génétique. En effet, de telles souches émergent naturellement, par sélection de mutants, dans la flore des patients traités par C3G [131].

VI.3.2. Surveillance des maladies infectieuses

Le typage moléculaire a grandement contribué à accroître l'efficacité des systèmes de surveillance et à fournir des indices importants sur les stratégies de contrôle de la santé publique [135]. Les méthodes de typage fournissent des analyses appropriées pour favoriser la détection rapide et précoce des clones ou épidémies dispersées, et pour la détection et l'investigation des chaînes de transmission. Il soutient également des études visant à retracer la source d'une épidémie et à identifier de nouveaux facteurs de risque car les souches peuvent être liées plus précisément aux données épidémiologiques et cliniques. Toutes ces informations peuvent être utilisées pour améliorer et mieux cibler les mesures de prévention et de contrôle des maladies infectieuses existantes et présentent ainsi un avantage clair et immense pour les politiques de santé publique [136]. Cela peut s'appliquer aux programmes de surveillance ciblant les niveaux local, régional, national ou mondial [130].

VI.3.3. Mieux comprendre l'épidémiologie des maladies infectieuses

Les outils moléculaires permettent de retracer la dissémination d'un sous-type particulier dans le temps et l'espace et donc de développer des théories de transmission et de dissémination; de déterminer l'origine d'une épidémie et de tester des théories sur les réservoirs et l'évolution d'un pathogène particulier ; suivre l'émergence de nouvelles infections au fur et à mesure qu'elles se croisent, suivre les éléments génétiques mobiles conférant une résistance antimicrobienne ou une virulence entre les souches au sein d'une espèce ou entre espèces, et étudier la pathogénèse et l'évolution de l'infection [112], voir le *tableau VI* et la *figure 38*.

Contexte	Objectifs
1-Epidémie	-Suivre la source commune et identifier les véhicules spécifiques et les facteurs de risque
	-Affiner la conception de l'enquête épidémiologique
	-Identifier les facteurs de risque même lorsque la taille de l'échantillon est petite ou inadéquate pour une enquête épidémiologique conventionnelle
2-Endémicité	- Etudier la dynamique de la transmission des maladies sur une zone locale, régionale, nationale ou géographiquement plus étendue
	-Détecter les épidémies ou épidémies non reconnues
	-Évaluer les fractions de risque attribuables dans les cas de maladies sporadiques ou endémiques
	-Identifier et évaluer les variables contribuant à la persistance et à la propagation de souches / clones spécifiques
3-Surveillance	- Obtenir des informations de base
	-Identifier et analyser les tendances et les tendances changeantes
	-Détecter l'introduction et la propagation de souches / clones spécifiques dans les établissements de santé et la communauté
	-Identifier les changements dans la prévalence des infections résistantes aux médicaments et générer des hypothèses sur leurs causes et leurs voies de transmission
	-Soutenir la mise en œuvre des actions correctives et évaluer leur efficacité
	-Études d'attribution des sources dans certaines maladies courantes, telles que les zoonoses et les infections d'origine alimentaire et hydrique

Tableau VI : Questions épidémiologiques auxquelles les méthodes de typage moléculaire devraient répondre [7].

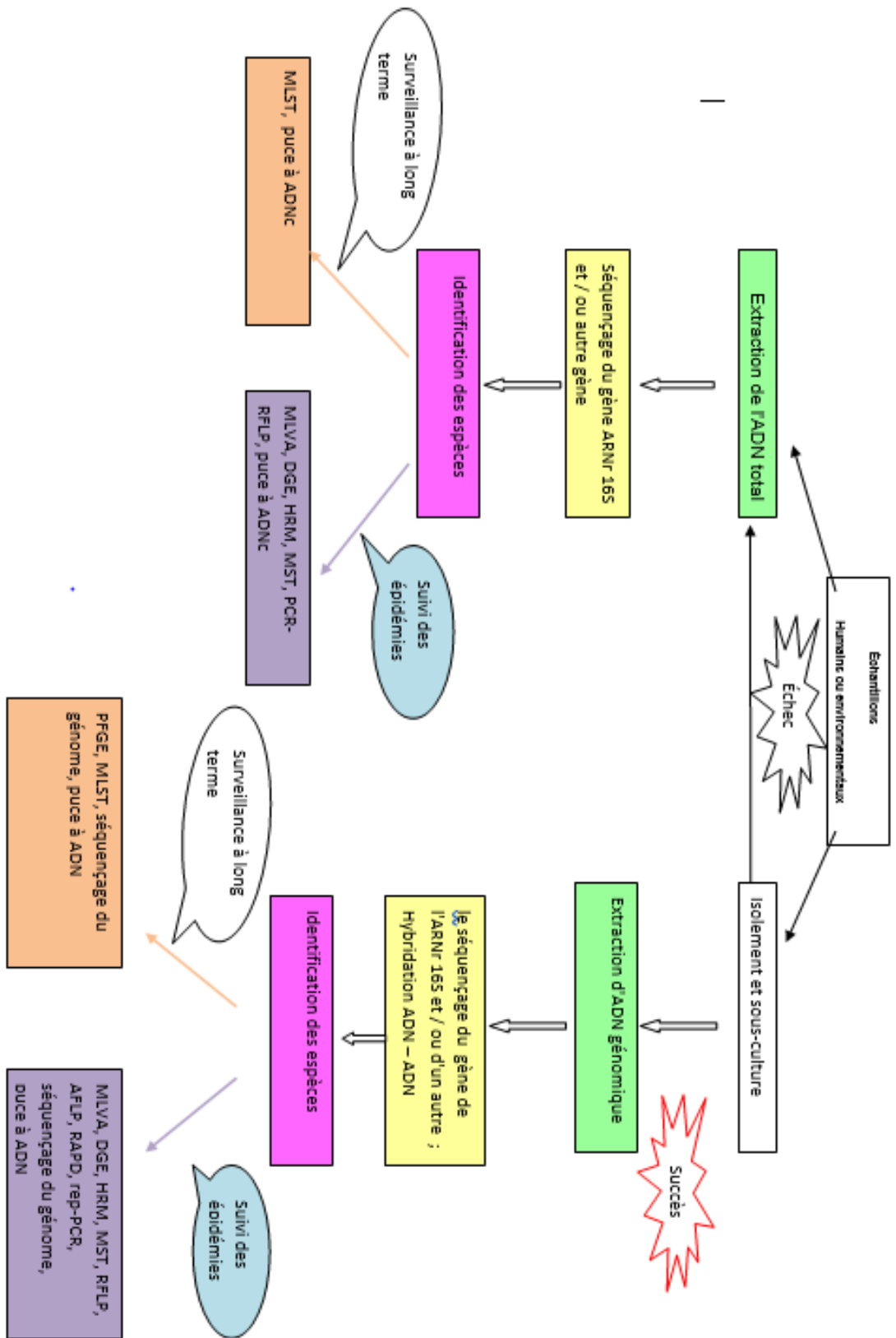


Figure 38 : Sélection de la méthode de génotypage appropriée pour le sous-typage des souches bactériennes [137].

CHAPITRE VII
« EXEMPLE D'APPLICATION DES
METHODES DE GENOTYPAGE : TYPAGE
DES MRSA »

CHAPITRE VII : EXEMPLE D'APPLICATION DES METHODES DE GENOTYPAGE : TYPAGE DES MRSA

Le *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), est une bactérie anaérobie facultative à Gram positif et à coagulase positive, appartenant à la famille des Staphylococcaceae [138, 4]. *S. aureus* est communément hébergé par environ 30 à 60 % des personnes dans les narines et la peau [4].

La pathogénicité et la virulence de *S. aureus* sont associées à sa capacité à produire plusieurs facteurs de virulence : des entérotoxines notamment les sérotypes A à Q (SEA-SEQ), la toxine-1 du syndrome de choc toxique (TSST-1), les toxines cytolytiques (hémolysines alpha et bêta), les toxines exfoliatives, la Leucocidine Panton-Valentine (PVL), la protéine A et plusieurs enzymes [139].

L'expression de ces facteurs de virulence est régulée en partie par le système agr (accessory gene regulator). Ce dernier est habituellement décrit comme ayant deux actions sur la transcription protéique : la répression de la transcription de protéines de la membrane cellulaire (protéine A, coagulase, protéine de liaison à la fibronectine, etc.) et l'activation de la transcription de plusieurs exoprotéines (hémolysine α et β , TSST-1, leucotoxines) en phase post-exponentielle (*figure 39*) [140].

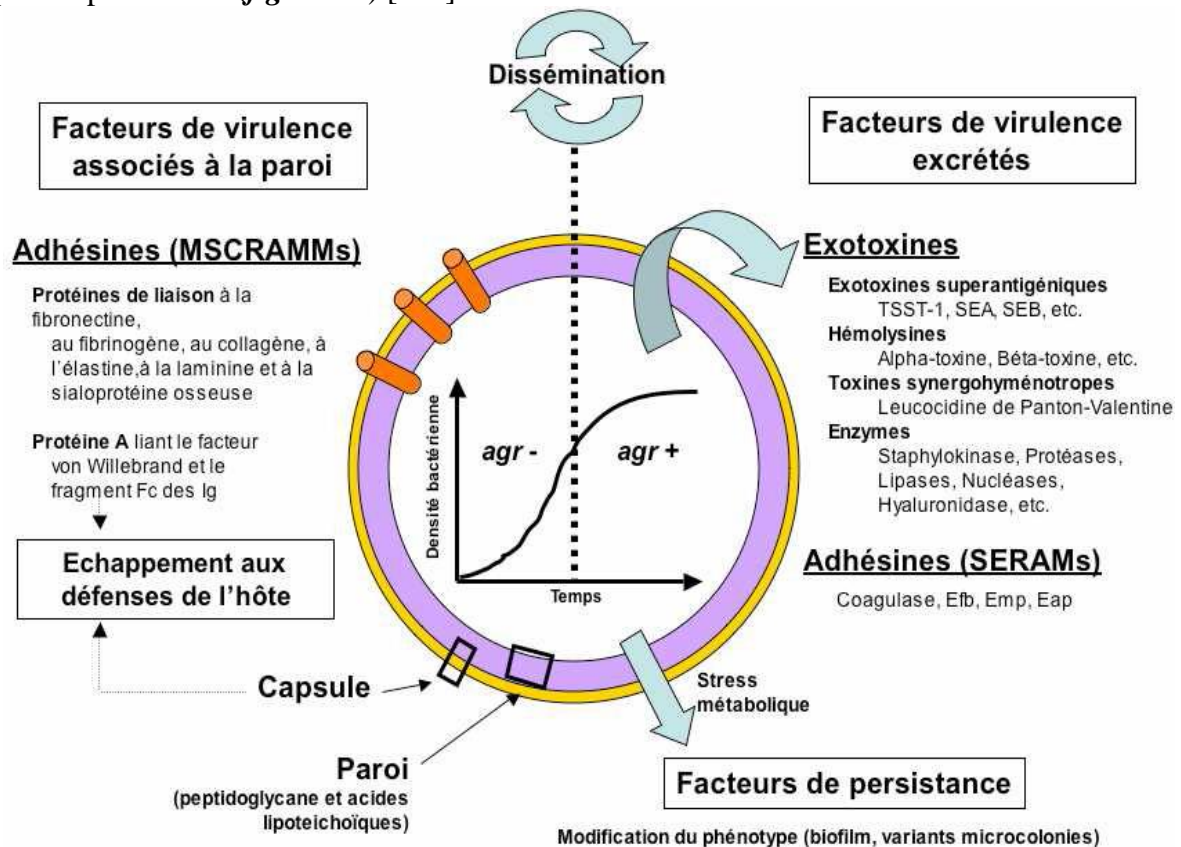


Figure 39 : Régulation des facteurs de virulence par le système agr [140].

L'émergence continue d'agents pathogènes résistants aux médicaments, en particulier les isolats multirésistants et les *S. aureus* résistants à la méthicilline (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ou MRSA), cause de graves problèmes de santé publique [139].

La résistance à la méthicilline des *S. aureus* est médiée par la PBP2a (Penicillin-Binding Protein 2a), une protéine de liaison à la pénicilline avec une faible affinité aux bêta-lactames, codée par le gène *mecA* [139].

Une souche épidémique de MRSA est capable de se propager dans le monde entier sous la forme d'une expansion clonale et prend naissance chaque fois qu'une lignée épidémique de *S. aureus* sensible à la méthicilline (Methicillin-Sensible *Staphylococcus aureus* ou MSSA) acquiert le chromosome en cassette staphylococcique *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* ou SCC *mec*) [4]. Le SCC *mec* est un élément génétique mobile unique qui porte le gène de résistance à la méthicilline, *mecA* [139].

Bien que la plupart des souches de MRSA soient acquises en milieu hospitalier (Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ou HA-MRSA), les souches acquises dans la communauté (Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* ou CA-MRSA) sont maintenant de plus en plus reconnues dans le monde entier et sont à la fois phénotypiquement et génotypiquement différentes des souches d'HA-MRSA[4](**tableau VIII**).

Depuis 2004, des MRSA ont aussi été retrouvés chez les animaux (Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ou LA-MRSA). Le contact rapproché des humains avec les animaux et l'utilisation d'antibiotiques chez ces derniers semblent être les causes les plus probables de l'émergence des MRSA parmi le règne animal. Les LA-MRSA ont déjà été la cause de quelques cas d'infections chez l'humain ayant mené à des pathologies variées : endocardite, pneumonie, otite externe et infections de la peau et des tissus mous [141].

Actuellement, le gène *mecA* n'est plus le seul déterminant génétique conférant une résistance à la méthicilline chez *S. aureus*. En fait, un nouvel homologue du gène *mecA*, renommé *mecC*, a été découvert en 2011. Cette variante du *mec* a été signalée chez différentes espèces animales. Les isolats signalés à ce jour et transportant la *mecC*, suggérant un réservoir zoonotique [142].

De nombreux et massifs efforts de typage avec de grandes collections de MRSA ont produit des informations importantes sur l'origine, la propagation et les voies d'évolution des clones de MRSA [4].

En raison du faible pouvoir discriminatoire des techniques phénotypiques, les techniques basées sur l'ADN ou génotypiques sont maintenant les méthodes de typage des souches de choix pour le MRSA [139].

Les techniques de typage moléculaire ont été largement appliquées pour étudier l'épidémiologie moléculaire du MRSA, dans le but de distinguer les isolats apparentés de ceux qui ne sont pas épidémiologiquement apparentés [4].

Les techniques les plus couramment utilisées pour le typage des MRSA sont la PFGE, les techniques basées sur PCR, le typage du cassette chromosomale staphylococcique mec *SCCmec* et le typage des séquences (le typage génomique multilocus (MLST) et le typage spa) [143].

Une brève description de ces techniques et de leur utilité pour la discrimination des souches de MRSA est décrite ci-dessous et est résumée dans les *tableaux VIII et IX*.

VII.1. Typage par PFGE

La PFGE utilise des enzymes de restriction pour couper l'ADN aux sites de restriction, ce qui donne des fragments d'ADN de tailles diverses. Le *SmaI* est une enzyme couramment utilisée pour digérer l'ADN du MRSA [144]. Avant l'introduction des méthodes séquentielles, la PFGE était considérée comme la norme d'excellence pour le typage de nombreuses espèces bactériennes, dont *S. aureus* [145]. Aux États-Unis, le PFGE est utilisé par le Center for Disease Control and Prevention pour évaluer le type de souche américaine des isolats de *S. aureus*. Chaque type de souche des États-Unis est décrit par un profil PFGE, un antibiogramme, un type mec, et la présence ou l'absence du gène Panton-Valentine leukocidin (PVL). Chaque type de souche des États-Unis possède un type MLST et un type spa correspondants [3].

VII.2. Typage des cassettes chromosomiques staphylococcique (*SCCmec*)

Les souches de MRSA sont caractérisées par la présence d'un élément génétique mobile hétérologue appelé cassette chromosomale staphylococcique mec (*SCCmec*), qui comprend le gène *mecA*, l'élément central de la résistance à la méthicilline.

Outre le complexe de gènes mec (qui comprend le gène *mecA*, ses gènes régulateurs *mecRI* (activateur) et *mecI* (répresseur) et des séquences d'insertion et peut aussi inclure une séquence d'insertion appelée *IS431*), le *SCCmec* contient le complexe de gènes *ccr*, qui code pour les recombinases responsables de la mobilité de *SCCmec* [141].

Les parties restantes du complexe génique sont appelées régions J (régions J1, J2 et J3), qui constituent des composants non essentiels de la cassette. Bien que, dans certains cas, ces régions abritent des déterminants supplémentaires de la résistance aux antibiotiques [146].

Ces complexes géniques varient en fonction du MRSA, et cette variation est à la base du système de classification *SCCmec* [144]. Au moins 12 types de *SCCmec* (I-XII), ont été identifiés, et les systèmes de classification par typage des mecs sont largement utilisés. La **figure 40** présente la structure des dix types de *SCCmec* [147, 144]

Le système de classification de Chongtrakool et *al.* pour la nomenclature du *SCCmec* est basé sur les gènes *ccr* (indiqués par un chiffre) et le complexe *mec* (indiqué par une lettre majuscule).

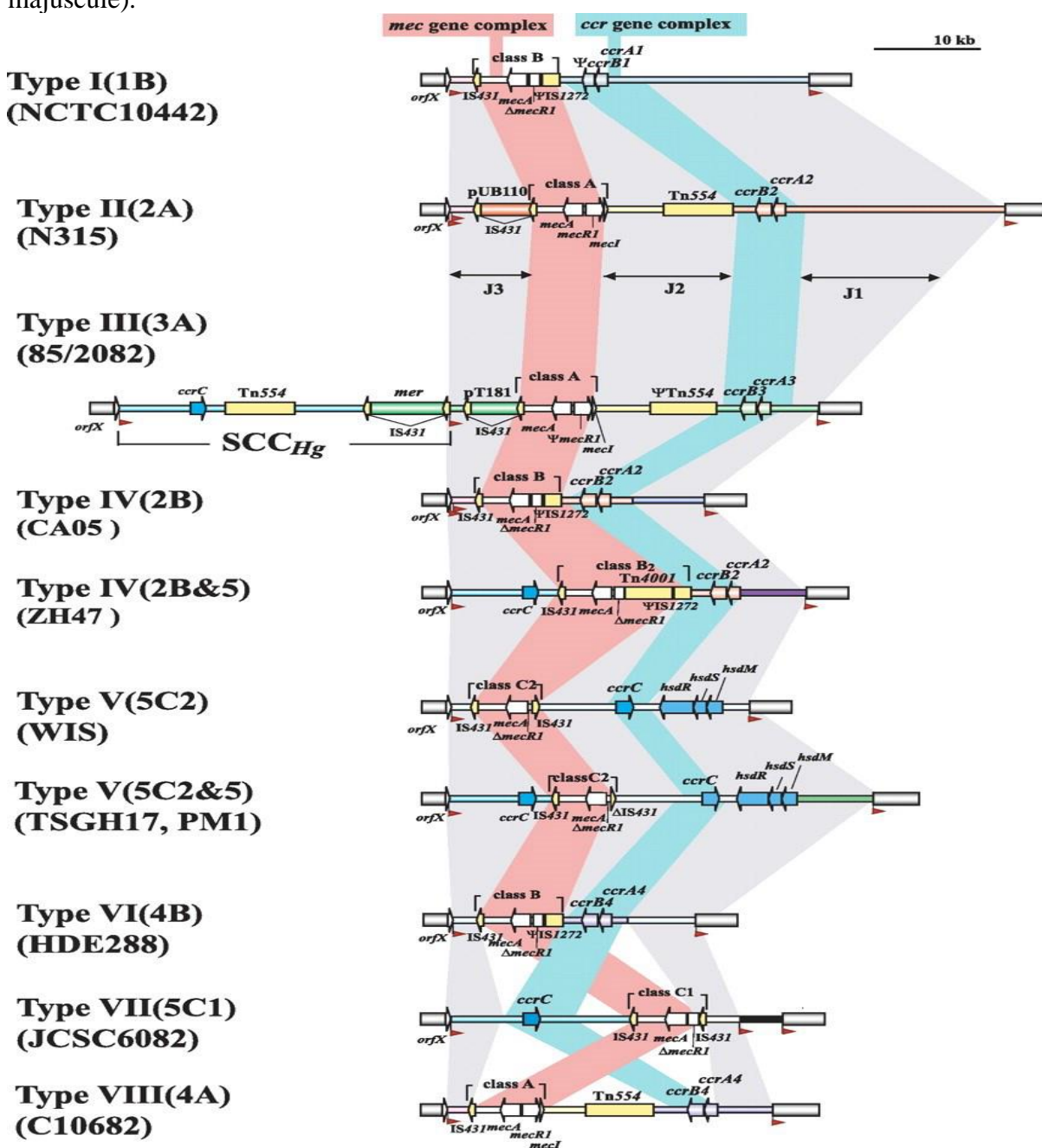


Figure 40 : Typage de *SCCmec* [144]

L'application de cette nomenclature donne les résultats suivants : *SCCmec* type 1A (type I), type 2A (type II), type 3A (type III), type 2B (type IV) et type 5C (type V) [148].

Les différences entre la région J1 et les régions J2-J3 sont alors désignées par des numéros, par exemple, *SCCmec* type 2B.2.1 (type IVb). Les gènes *ccr* et les régions J sont numérotés par ordre chronologique en fonction de leur découverte [148].

Des études ont montré que les types I, II et III sont couramment signalés dans le MRSA associé aux soins de santé (HA-MRSA), tandis que les types IV et V sont fréquemment présents dans le SARM associé à la communauté (CA-MRSA) [147], bien que plusieurs variantes aient également été signalées [148].

Ces dernières années, la normalisation de la nomenclature des sous-types s'est avérée difficile. Le typage *SCCmec* souffre également d'un faible débit et d'un coût élevé. En outre, il n'existe aucune procédure standard pour cette méthode de typage, bien qu'une variante de la PCR multiplex soit généralement utilisée [144]. L'utilisation de techniques de PCR pour déterminer le type de *Scmec* peut aider à distinguer les souches de MRSA comme étant d'origine sanitaire ou communautaire [3]. Elle peut, donc, être utilisée uniquement pour classer les souches du MRSA [145], voir **tableau VII**.

Toutefois, la méthode n'est pas suffisamment discriminatoire pour être considérée seule comme une approche de la surveillance épidémiologique [54].

Une combinaison de deux approches comme le typage *SCCmec* avec la MLST est recommandée pour un typage fiable pour la surveillance multicentrique, la transmission inter-hospitalière et internationale et l'évolution des souches de MRSA [148].

Caractéristique	HA-MRSA	CA-MRSA
La population concernée	-Hôpitaux/soins de santé/soins infirmiers -Patients/résidents à domicile -Personnes âgées -Nouveau-né prématuré -Immunodéprimé	-Généralement des jeunes en bonne santé dans la communauté -Ceux qui n'ont pas de facteurs de risque pour l'acquisition de HA-MRSA
Site d'infection	-Bactériémie et infections des plaies. -Infections symptomatiques des voies respiratoires et urinaires	-Principalement la peau (abcès et cellulite, furonculose, infections graves de la peau et des tissus mous. -Dans les cas graves, choc septique et bactériémie. Pneumonie nécrosante
Présence du gène <i>pvl</i>: Panton Valentine leukocidin	Faible (<5 %)	Élevé (>95 %)
Type <i>SCCmec</i>	Principalement sous-classes I, II ou III	Principalement IV et V
Génotype agr	A prédominance II	A prédominance I et III

Tableau VII : Comparaison des caractéristiques cliniques, épidémiologiques et microbiologiques du MRSA associé à la communauté (CA) et aux soins de santé (HA) [149].

VII.3. Le typage spa

Le gène codant pour la protéine A de *S. aureus* (spa) contient trois régions distinctes : Fc, X et C.

Le typage spa est basé sur le séquençage de la région polymorphe X de la protéine A et dépend de l'amplification par PCR de cette région hypervariable (*figure 41*).

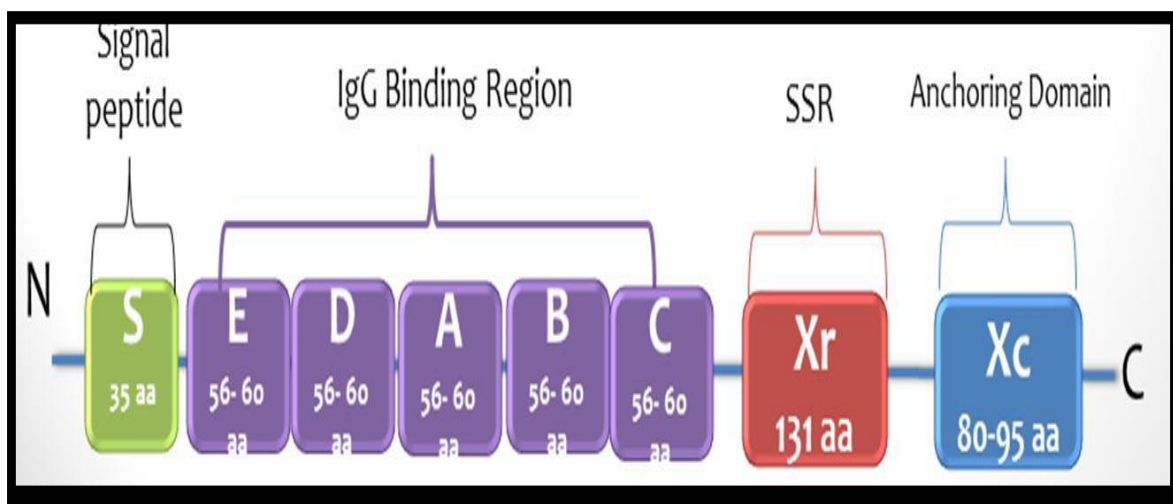


Figure 41 : Schéma des domaines et des régions des spa. La région N-terminale est composée du peptide de signalisation région (S) en jachère par les cinq domaines de liaison IgG (E, D, A, B, C). La région C-terminale est composée de Xr et Xc. Le Xr est composé de nombres variables pour les répétitions de séquences courtes (SSR) et le domaine d'ancrage (Xc) [149].

La région X est composée principalement de 3 à 15 répétitions d'une séquence de 24 paires de bases qui peuvent différer par mutation ou suppression spontanée et duplication des répétitions. Chaque répétition est attribuée à un code alphanumérique et le type de spa est dérivé de l'ordre des répétitions spécifiques [140, 148].

Le typage spa fournit un schéma de typage de séquence mono-locus à haut débit et à faible coût avec une nomenclature normalisée et une base de données accessible (<http://www.spaserver.ridom.de/>) [55].

Le principal inconvénient du typage des spas est que 1 à 2 % des souches ne sont pas typables en raison de réarrangements dans la région du gène qui se lie aux IgG ciblées par l'amorce [144].

Le pouvoir discriminant du typage spa est inférieur à celui du PFGE mais supérieur à celui du MLST. Néanmoins, le typage spa représente un outil rapide et facile pour étudier l'épidémiologie des infections à *S. aureus*, en particulier au niveau local et peut être utilisé dans les études phylogénétiques [145, 148].

Cette technique est une option intéressante pour la surveillance systématique en laboratoire de la diversité des MRSA et des types de souches en circulation, en particulier lorsqu'ils sont associés à des marqueurs supplémentaires ou à des tests de confirmation comme le typage de la cassette SCC mec [150, 140].

VII.4. Typage génomique multilocus (MLST)

La MLST est basée sur l'analyse par séquençage de 7 gènes de ménage conservés au sein de l'espèce *S. aureus* : *arcC* (carbamate kinase), *aroE* (shikimate déshydrogénase), *glpF* (glycerol kinase), *gmk* (guanylate kinase), *pta* (phosphate acétyltransferase), *tpi* (triosephosphate isomérase) et *yqiL* (acétyl-coenzyme A acétyltransferase).

La composition en allèles de chaque souche, ou profil allélique, définit le *sequence type* (ST) de la souche. Deux isolats présentant au moins 5 allèles identiques sont considérés comme génétiquement liés et peuvent être regroupés au sein d'une unité appelée complexe clonal (CC) [140].

La MLST fournit de nombreuses informations sur l'épidémiologie et la génétique des populations de bactéries et elle est un excellent outil pour étudier l'évolution clonale du MRSA [148].

En outre, des combinaisons de techniques basées sur les bandes d'ADN et de techniques basées sur les séquences d'ADN sont fréquemment utilisées pour différencier les souches du MRSA au niveau local et international. Ces techniques ont confirmé la notion que *S. aureus* est une espèce polymorphe avec une structure de population clonale [148].

Le typage de séquence multilocus (MLST) fournit, également, une nomenclature uniforme pour décrire les séquences types (ST) du MRSA attribués en référence à la base de données MLST (URL : <http://www.mlst.net>) [3]. Cette nomenclature utilise généralement le ST couplé au type SCCmec pour nommer les souches des MRSA [140].

(Voir *figure 42*).

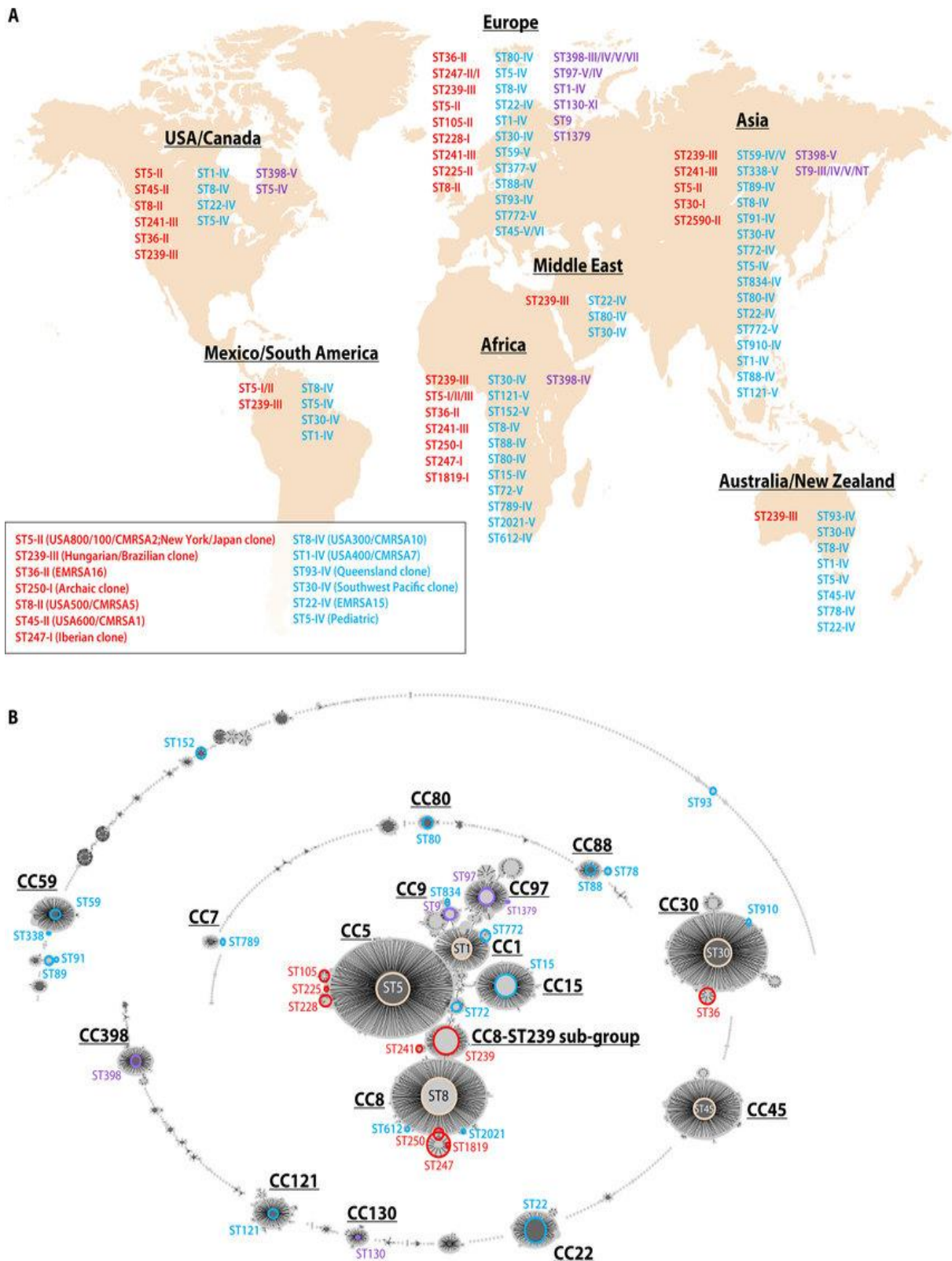


Figure 42 : Aperçu de la population mondiale de MRSA [4].
 (A) Structure de la population de SARM, montrant les principaux clones signalés dans chaque continent ou région ainsi que les types de SCCmecs communément associés. Bien qu'il y ait des chevauchements en termes de ST entre les continents, il existe de nombreux ST qui présentent une spécificité régionale marquée. Le rouge représente les ST appartenant à HA-MRSA, le bleu représente ceux appartenant à CA-MRSA, et le violet représente ceux appartenant à LA-MRSA. Alternatif ou traditionnel Les noms des principales souches épidémiques prédominantes se trouvent au bas de la liste.
 (B) Les relations évolutives entre les ST SARM prédominantes énumérées dans le panel A sont représentées par l'analyse eBURST (par rapport à la base de données internationale MLST, mise à jour le 31 janvier 2018). Les ST individuels, ainsi que les complexes clonaux à laquelle ils appartiennent, sont indiqués. Comme dans le panneau A, le rouge (HA-MRSA), le bleu (CA-MRSA) et le violet (LA-MRSA) sont utilisés pour distinguer les types. La couleur pêche est utilisée pour désigner les ST présents dans plus d'un groupe source.

VII.5. Séquençage du génome entier (WGS)

En ce qui concerne *S. aureus*, le WGS peut montrer des différences entre les souches qui sont impossibles à distinguer par le PFGE, la méthode la plus discriminatoire utilisée à ce jour. Le WGS a été utilisé avec succès pour enquêter sur les épidémies hospitalières, comme les épidémies de MRSA dans les unités de soins intensifs néonataux où l'analyse des SNP a permis de distinguer clairement les épidémies de souches non épidémiques [145].

Méthode	Cibles génétiques	Caractéristiques
Typage spa	Polymorphisme des séquences de la région variable X du gène spa codant pour la protéine de surface A de <i>S. aureus</i> .	Points forts : rapidité et haut débit, portabilité des résultats, en évolution dynamique, la nomenclature standard. Faiblesses : une mauvaise classification d'un petit nombre de lignées.
Typage génomique multilocus (MLST)	Population génétique de base (gènes de base et de base variable).	Points forts : définit la population génétique de base, la portabilité, la nomenclature standard. Faiblesses : faible débit, coût élevé.
Typage SCCmec	Eléments génétiques mobiles.	Points forts : la nomenclature standard. Faiblesses : faible débit, haut coût, pas de protocole standard, une nomenclature évolutive.
Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)	Polymorphisme de restriction du chromosome entier.	Points forts : indice de discrimination élevé. Faiblesses : techniquement difficile, lente, portabilité limitée, multiples nomenclatures, la classification erronée de certaines lignées.
Analyse VNTR multilocus (MLVA)	Polymorphisme dans les éléments chromosomiques VNTR	Points forts : rapidité et haut débit. Faiblesses : pas de protocole ou de nomenclature standard international, mauvaise classification de certaines lignées.

Tableau VIII : Caractéristiques des méthodes de typage les plus fréquemment utilisées pour le *Staphylococcus aureus* [151]

Laboratoire	Les fonctions	Méthodes de typage utilisées	La communication
Local	-Détecter les épidémies -Identification des agents pathogènes -Épidémiologie locale -Évaluations des risques (par exemple, antécédents de voyage)	-Principalement basé sur la PCR -Typage spa pour les épidémies	-Laboratoires régionaux -Laboratoires nationaux
Régional	-Prévention et contrôle des infections -Micro-épidémiologie -Évolution -Surveillance régionale	-Typage spa / SCCmec et de PVL (de base) -MLVA (facultatif) -MLST (analyse scientifique)	-Laboratoires locaux -Laboratoires nationaux
Nationale	-Épidémiologie à long terme -Études phylogénétiques -Évaluation des risques (virotypage) -Résoudre les problèmes régionaux et locaux -Résoudre les problèmes de propriété des données	-Typage du spa, SCCmec et de PVL, -MLVA, -MLST -Pathotypage de la virulence (par exemple, puces à ADN)	-Laboratoires locaux. -Laboratoires régionaux -Organisations internationales

Tableau IX : Résumé des principales décisions de consensus concernant l'harmonisation des méthodes de typage [151].

CONCLUSION

CONCLUSION

L'apport des techniques moléculaires en microbiologie se voit évidemment en épidémiologie. Ils présentent également un intérêt majeur dans le diagnostic, le traitement et l'immunoprophylaxie des maladies infectieuses.

Actuellement, les méthodes moléculaires sont de plus en plus utilisées dans le domaine de l'épidémiologie en raison de leur délai d'exécution court, de leur sensibilité et de leur spécificité, bien qu'elles soient coûteuses par rapport aux méthodes conventionnelles. De nombreuses techniques de génotypage ont irrémédiablement accédé aux laboratoires de microbiologie clinique, mais chacune d'entre elles a ses avantages et ses limites qui la rendent utile dans certaines études et restrictive dans d'autres.

L'avènement des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) ont révolutionné les méthodes de typage moléculaire. Le séquençage de génome entier de nombreuses souches a été possible. Le terme d'épidémiologie génomique aussi a été de plus en plus utilisé pour décrire la pratique de l'utilisation du WGS pour accéder, indexer et analyser les caractéristiques des séquences d'ADN d'importance épidémiologique.

L'application rapide et en temps réel de méthodes d'épidémiologie génomique a été récemment démontrée dans les laboratoires de santé publique, les laboratoires de référence et les laboratoires affiliés au contrôle des infections en milieu hospitalier, non seulement comme une « Gold standard » pour le typage de nombreux agents pathogènes cliniquement significatifs mais aussi pour la détection des gènes de virulence et de résistance.

Il est susceptible de remplacer les méthodes traditionnelles de diagnostic et de typage en microbiologie clinique dans un avenir proche.

	<i>Principe</i>	<i>Avantages</i>	<i>Limites</i>
PFGE	Elle consiste à digérer l'ADN génomique à l'aide d'une endonucléase de restriction spécifique et à fractionner les fragments d'ADN résultants à l'aide de champs électriques alternés.	<ul style="list-style-type: none"> Pouvoir discriminant élevé Reproductible Excellente typabilité Concordance épidémiologique notabl Grande sensibilité Interprétation facile 	<ul style="list-style-type: none"> Faible portabilité Techniquement exigeante (personnel qualifié et matériel très spécialisé) Coûteuse Longue Manque de résolution
PPA	Cette technique est fondée sur l'analyse des profils des bandes électrophorétiques des fragments d'ADN plasmidique digéré.	<ul style="list-style-type: none"> Facile d'exécuter et d'interpréter Rapide Faible coût 	<ul style="list-style-type: none"> Reproductibilité et discrimination faibles Instabilité des plasmides Ne peut pas être utilisée si manque de plasmides
Ribotypage	Les fragments d'ADNr générés par la digestion enzymatique sont séparés par électrophorèse et sont transférés sur une membrane. Il s'en suit une hybridation avec une sonde marquée spécifique.	<ul style="list-style-type: none"> Reproductible, Portable et Flexible Rapide Automatisation possible Disponibilité de bases des données Exécution simple Sondes universelles 	<ul style="list-style-type: none"> Pouvoir discriminant diminué Laborieuse (coûteuse) Résolution moins élevée Interprétation difficile Dépendance de l'extraction de l'ADN
AFLP	Les fragments de restriction de l'ADN sont ligaturés à des adaptateurs pour subir une amplification (pré-sélective puis sélective). Les amplicons sont ensuite séparés et analysés par électrophorèse.	<ul style="list-style-type: none"> Pouvoir discriminant excellent Très reproductible et peut être portabl Très automatisé Sensible Un degré élevé de résolution Relativement facile à interpréter Facile et relativement rapide 	<ul style="list-style-type: none"> Complexe Standardisation rigoureuse Coûteuse Forte intensité de main-d'œuvre Nécessité d'une expertise Profils générés très complexes Interprétation subjective Identification difficile des fragments homologues
Rep-PCR	Elle s'appuie sur l'amplification de l'ADN situé entre des motifs répétés du génome suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose.	<ul style="list-style-type: none"> Bon pouvoir discriminant Facilité d'utilisation : simple / faible intensité de main-d'œuvre Flexible Rapide Très bon marché (faible coût) 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessite une purification de l'ADN Nécessite un nombre de séquences répétitives suffisant Problème de contamination de l'ADN Amplification non spécifique des segments à l'extérieur de la région ciblée Reproductibilité intra- et inter-laboratoire limitée partiellement surmontée grâce au système Diversilab®
MLVA	Après avoir effectué la PCR des répétitions VNTR, les fragments d'ADN peuvent être séparés par électrophorèse et dimensionnés, créant ainsi un profil MLVA caractéristique.	<ul style="list-style-type: none"> Bonne capacité discriminante Reproductibilité élevée Haute résolution Rapide, relativement simple Facile à utiliser et à interpréter Peu coûteuse 	<ul style="list-style-type: none"> Instabilité des VNTRs Nécessite des amorces spécifiques pour chaque espèce ciblée Peu sensible Exige du personnel formé
RAPD / AP-PCR	La technique consiste à utiliser une amorce courte pour une amplification aléatoire. Les amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse et analysés.	<ul style="list-style-type: none"> Pouvoir discriminant moyen Flexible Rapide Simple et facile à utiliser Faible coût Ne nécessite pas une connaissance préalable des séquences Nécessite une petite quantité d'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> Faible reproductibilité intra et inter-laboratoires Manque de standardisation Lecture et interprétation difficile
MLST	Dans MLST, les séquences internes de sept (7) gènes de ménage (HK) sont amplifiées, et les produits PCR sont séquencés.	<ul style="list-style-type: none"> Manque d'ambiguïté Haute résolution Hautement discriminant Bonne reproductibilité inter- et intra-laboratoires La portabilité électronique et l'accessibilité des bases de données Fournit des données précises, définitives et standardisées Facilement normalisée et automatisée Possède une nomenclature normalisée à l'échelle internationale 	<ul style="list-style-type: none"> Coût élevé Consommation de temps Forte intensité de travail et de main-d'œuvre Nécessité des chercheurs qualifiés
WGS	En raison de la longueur du génome entier, il est initialement coupé en petits fragments. Ensuite, après une amplification étiquetée, les fragments générés sont séquencés par les méthodes de NGS.	<ul style="list-style-type: none"> Hautement reproductible Pouvoir discriminant élevé Rapide et simple Nécessite moins d'ADN Extrêmement sensible Plus détaillée et précise Grande fiabilité 	<ul style="list-style-type: none"> Coût élevé Expertise pour l'analyse et l'interprétation Accès difficile dans les laboratoires de routine Analyse dépendante de la qualité du séquençage, de l'assemblage, et de la qualité et de la sélection du génome de référence

Tableau X : Tableau récapitulatif des méthodes de génotypage(originale).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **P. Tang, M.A. Croxen et al.** , «Infection control in the new age of genomic epidemiology,» *American Journal of Infection Control*, pp. 170-179, 2017.
- [2] **W. Ruppitsch**, "Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation / Molekulare Typisierung von Bakterien für die epidemiologische Überwachung und Ausbruchsabklärung," *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, 2016.
- [3] **S. L. Foley**, *Molecular Techniques for the Study of Hospital-Acquired Infection*, Wiley, 2011.
- [4] **S. Lakhundi et K. Zhang**, «Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology,» *Clinical Microbiology Reviews*, 2018.
- [5] **N. A. Faria, J. A. Carrico, D. C. Oliveira, M. Ramirez et H. de Lencastre**, «Analysis of Typing Methods for Epidemiological Surveillance of both Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains,» *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, n° 11, 2007.
- [6] **A. J. Sabat et al.** , «Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance,» *Euro Surveill.*, 2013.
- [7] **R. Ranjbar, A. Karami, S. Farshad, G. M. Giammanco et C. Mammina**, «Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide,» *New Microbiologica*, 2014.
- [8] **M. Pérez-Losada, M. Arenas et E. Castro-Nallar**, «Microbial Sequence Typing in the Genomic Era,» *Infect Genet Evol*, 2018.
- [9] **B. Krawczyk, J. Kur, K. Stojowska-Swędryńska et M. Śpibida**, «Principles and applications of Ligation Mediated PCR methods for DNA-based typing of microbial organisms,» *Acta Biochimica Polonica*, 2016.
- [10] **Cooper et Feil**, «Multilocus sequence typing--what is resolved?,» *Trends Microbiol.*, 2004.

- [11] **O. A. Oyarzabal et S. Kathariou**, DNA Methods in Food Safety: Molecular Typing of Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens, Wiley, 2014.
- [12] **C. Nauciel et J.L. Vildé**, bactériologie médicale, 2 éd., Elsevier masson, 2007.
- [13] Université Pierre et Marie curie, bactériologie, Paris: Université Pierre et Marie curie, 2003.
- [14] **P. Berche**, «bactériologie générale,» 2002-2003.
- [15] **A. I. M. Hoepelman, A. C. M. Kroes, R. W. Sauerwein, H. A. Verbrugh et J. Nouwen**, Leerboek microbiologie en infectieziekten, Houten, Netherlands : Springer, 2016.
- [16] **J. M. Martinko et M. T. Madigan**, Brock, biologie des micro-organismes, Paris: pearson education, 2007.
- [17] **K.V. Chaitanya**, Genome and Genomics From Archaea to Eukaryotes, Andhra Pradesh, India: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019.
- [18] **A. Muylaert et J. Mainil**, Résistances bactériennes aux antibiotiques :les mécanismes et leur « contagiosité », Université de Liège, 2012.
- [19] **S. Mézaache-aichour**, *génétique microbienne*, université de sétif -1, 2016-2017.
- [20] **J. Morteza et al.**, Basic Science Methods for Clinical Researchers, 2017.
- [21] **S. Medellel et A. Tedjani**, *Synthèse et étude in silico, in vitro et in vivo de l'activité biologique de dérivé N-ferrocénylméthylaniline*, 2018.
- [22] **A. Philoppon**, propriétés de chromosome :ADN bactérien, Paris: Faculté de Médecine COCHIN-PORT-ROYAL, Université PARIS V, 2000.
- [23] **H. Hacene**, Microbiologie fondamentale et appliquée, Houma, 2016.
- [24] **W. Prescott et W. Sherwood**, Microbiologie, 4 éd., Paris , bruxelles, 2013.
- [25] **M. Ploy, A. Gassama, D. Chainier et F. Denis**, «Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques,» *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, vol. 20, n° 16, 2005.

- [26] **C. Merlin et A. Toussaint**, les éléments transposables bactériens, 1999.
- [27] **N. Dahmane**, Caractérisation des éléments intégratifs conjugatifs de la famille ICES_{t3} et des facteurs influençant leur mobilité, 2018.
- [28] **K. Gaikwad**, *The Dynamic Genome: A Gateway of Evolution*, 2015.
- [29] **O. Barraud et M.C. Ploy**, Actualités sur les intégrons de résistance, 2011.
- [30] **J. J. Perry, a. T. Jstaley et S. Lory**, Microbiologie cours et qst de révision, Paris, 2004.
- [31] **J. Carter et V. Saunders**, VIROLOGIE principes and applications, Liverpool UK: WILEY, 2007.
- [32] **D. L. Hartl**, essential Genetics and génomic, Jones & Bartlett Learning, 2020.
- [33] **E. Darmon et al.**, Bacterial genome instability, Edinburgh: Institute of Cell Biology, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, United Kingdom, 2014.
- [34] **M. Juhas et al.**, Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution, Oxford: Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, 2009.
- [35] **M Pagano et al.**, *Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, 2016.
- [36] **J. T. Sullivan. et al.** , Comparative Sequence Analysis of the Symbiosis Island of Mesorhizobium loti Strain R7A, Department of Microbiology, University of Otago, Dunedin, New Zealand, 2002.
- [37] **E. F. Boyd et al.**, «Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution.,» 2009.
- [38] **J. Hacker et E. Carniel**, «Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity,» *EMBO Reports*, 2001.
- [39] **A. Van Belkum, P. Tassios, L. Dijkshoorn et al.**, «Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology,» *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2007.

- [40] **J. M. Farber**, «An Introduction to the Hows and Whys of Molecular Typing,» *Journal of Food Protection*, vol. 59, pp. 1091-1101, 1996.
- [41] **I. K. Jordan. L. W. Mayer. Xin Wang**, «A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology,» chez *Molecular Medical Microbiology volume1 second edition*, 2015, pp. 517-518.
- [42] **H. Tanja**, Characterization of bacteria causing outbreaks by using molecular methods in a clinical microbiology laboratory, Helsinki: ACADEMIC DISSERTATION, 2015.
- [43] **Société française de microbiologie , REMIC** (référentiel en microbiologie médicale), 5 éd., vol. 1, Paris: Societé française de microbiologie, 2015.
- [44] **A. Singh, R. V. S. S. Goering et al**, «Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection,» *clinical microbiology reviews*, pp. 512-530, 2006.
- [45] **P. Cholley, M. Thouvereza, H. Gbaguidi-Haore, X. Bertrand et D. Talona**, «Application des méthodes de typage génomique au laboratoire d'hygiène,» *revue francophone des laboratoires*, vol. 453, pp. 65-70, JUIN 2013.
- [46] **Gentilini**, Médecine tropicale, 6 éd., Lavoisier, 2012.
- [47] **P.-E. Fournier et G. D. Dubourg**, «Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era,» *Genome Medicine*, 2014.
- [48] **L. Bonofiglio, N. Bonofiglio et M. Mollerach**, Application of Molecular Typing Methods to the Study of Medically Relevant Gram-Positive Cocci, 2012.
- [49] **B. Probohdh**, Molecular typing of bacterial pathogens with special reference to Salmonella, Khanapara, 2018.
- [50] **F. Garnier, C. Burucoa et P. Lanotte**, «Biologie moléculaire : application à la détection, à l'identification et au génotypage,» chez *Bactériologie médicale: techniques usuelles*, 2 éd., Paris, Elsevier Masson SAS, 2011, pp. 43-63.
- [51] **B. Budowle, S. Schutzer et S. Morse**, MICROBIAL FORENSICS, 3 éd., Academic press, 2020.

- [52] **P. Lanotte, C. Isnard et al.**, «Du prélèvement à la caractérisation des souches,» chez *Bactériologie médicale: techniques usuelles*, 3 éd., Paris, Elsevier Masson SAS, 2016, pp. 14-43.
- [53] **A. Sankar Sastry et S. Bhat K.**, «Identification of bacteria,» chez *Essentials of Medical Microbiology*, 1 éd., New Delhi, Jaypee Brothers Medical Publishers, 2016, pp. 53- 64.
- [54] **Y. W. Tang et C. W. Stratton**, *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology : applications*, 3 éd., vol. 2, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2018b.
- [55] **Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton et J. Schwartzman**, *Molecular Medical Microbiology*, 2 éd., vol. 1, Europe: Academic Press, 2015.
- [56] **Y.-W. Tang et C. W. Stratton**, *Advanced techniques in diagnostic microbiology : techniques*, 3 éd., vol. 1, Springer Nature Switzerland AG, 2018a.
- [57] **L. Lopez-Canovas et al.**, «Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future,» *Analytical Biochemistry*, 2019.
- [58] **F. C. Tenover et al.**, «Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing,» *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, p. 2233–2239, 1995.
- [59] **T. J. Barrett et al.**, «Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns in Foodborne Disease Investigations and Surveillance,» *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*, pp. 20-31, 2006.
- [60] **S. Paramithiotis, A. Hadjilouka et E. H. Drosinos**, «Molecular Typing of Major Foodborne Pathogens,» chez *Foodborn diseases*, Agricultural University of Athens, Elsevier Masson SAS, 2018, pp. 421-472.
- [61] **J.-W. Chen, Y. Lau, T. Krishnan, K.-G. Chan et C.-Y. Chang**, «Recent advances in molecular diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* infection by State-of-the-Art genotyping techniques,» *Frontiers in Microbiology*, 2018.
- [62] **A. Salman Shaheer et A. Emine**, «Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains,» *the journal of infection in developing countries*, 2015.

- [63] **I. De Filippis et M. L. McKee**, *Molecular Typing in Bacterial Infections*, London: Humana Press, 2013.
- [64] **A. Frederick, H. Nurul et R. A. Gulam Rusul**, «Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks,» *Food Technology Division*, 2012.
- [65] **L. W. Mayer**, «Use of Plasmid Profiles in Epidemiologic Surveillance of Disease Outbreaks and in Tracing the Transmission of Antibiotic Resistance,» *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 1988.
- [66] **F. Tenover et al.** «How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists,» *INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY*, 1997.
- [67] **D. J. Platt, T. J. et K. A. Heraghty**, «Molecular divergence of the serotype-specific plasmid (pSLT) among strains of *Salmonella typhimurium* of human and veterinary origin and comparison of pSLT with the serotype specific plasmids of *S. enteritidis* and *S. dublin*,» *Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 1988.
- [68] **P. Severino et S. Brisse**, «Ribotyping in Clinical Microbiology,» chez *Medical Biometrics Handbook*, Humana Press, 2005.
- [69] **P. Ei, W. Aung, J. Lee, G. Choi et C. Chang**, «Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a Review of Frequently Used Methods,» *J Korean Med Sci*, 2016.
- [70] **A. Al Atrouni**, «Etude de l'épidémiologie moléculaire et de l'écologie d'*Acinetobacter* spp au Liban,» Liban, Université d'Angers; Université libanaise de Beyrouth, 2017.
- [71] **S. Kashyap, S. Maherchandani et N. Kumar**, «Ribotyping: A Tool for Molecular Taxonomy,» chez *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*, Elsevier Inc, 2014.
- [72] **R. Ranjbar, A. Karami, S. Farshad, G. M. Giammanco et C. Mammina**, «Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide,» *New Microbiologica*, 2014.

- [73] **V. Gadou**, Epidemiologie moleculaire des enterobacteries productrices de β - lactamases a spectre elargi resistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'abidjan, cote d'ivoire, Cote d'ivoire: Université Félix HOUPHOUET BOIGNY, 2019.
- [74] **E. Wee Chua, S. Maggo et M. A. Kennedy**, «Long Fragment Polymerase Chain Reaction,» chez *PCR, methods and protocols*, Springer Science+Business Media, 2017.
- [75] **S. Das et H. R. Dash**, Microbial Biotechnology- A Laboratory Manual for Bacterial Systems, Springer India, 2015.
- [76] **E. Van Pelt-Verkuil et al.**, «Principles of PCR,» chez *Molecular Diagnostics*, vol. 1 : Technical Backgrounds and Quality Aspects, Springer Nature Singapore, 2019.
- [77] **D. F. Geary et F. Schaefer**, Pediatric Kidney Disease, 2 éd., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016.
- [78] **C.-H. Shen**, «Amplification of Nucleic Acids,» chez *Diagnostic Molecular Biology*, Academic press, 2019.
- [79] **Y. Picó**, Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications, Elsevier Inc, 2012.
- [80] **A. Fawzy, M. Zschöck, C. Ewers et T. Eisenberg**, «Genotyping methods and molecular epidemiology of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP),» *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2018.
- [81] **C. Restrepo, A. Lianes et R. Lieonart**, «Use of AFLP for the study of eukaryotic pathogens affecting humans.,» *Infection, Genetics and Evolution*, 2018.
- [82] **F. Tabit**, «Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: a review.,» *Journal of Food Science and Technology*, 2016.
- [83] **H.-B. Yang, W.-H. Kang, S.-H. Nahm et B.-C. Kang**, «Methods for Developing Molecular Markers,» chez *Current Technologies in Plant Molecular Breeding*, Springer Science+Business Media Dordrecht, 2015.
- [84] **T. Jagielski, A. Minias, J. van Ingen, N. Rastogi, A. Brzostek, A. Żaczek, Dziadek et J.**, «Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria,» *Clinical Microbiology Reviews*, 2016.

- [85] **P. J. Janssen**, «Selective Restriction Fragment Amplification by AFLP,» chez *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*, Elsevier Science B.V., 2001.
- [86] **C. B. M. Fogher, L. Sebastiani et T. Bracci**, «Olive Genomics,» chez *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Elsevier, 2010.
- [87] **G. Gyulai, M. Humphreys, R. Lagler, Z. Szabo, Z. Toth, A. Bittsanszky, F. Gyulai et L. Heszky**, «Seed remains of common millet from the 4th (Mongolia) and 15th (Hungary) centuries: AFLP, SSR, and mtDNA sequence recoveries,» *Seed Science Research*, vol. 16, n° 13, pp. 179-191, 2006.
- [88] **R. Habibi, M. Kazempour et al.**, «Differentiation by Simplified AFLP of *Pseudomonas Syringe* Pv. *Syringae* Isolates from Fields, Panicles and Nurseries of the Guilan Province - Iran,» *JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH*, vol. 52, n° 12, 2012.
- [89] **G. Bertani, M. Savo Sardaro, E. Neviani et C. Lazzi**, «AFLP protocol comparison for microbial diversity fingerprinting,» *Journal of Applied Genetics*, 2019.
- [90] **P. Veselá, D. Volařík et J. Mráček**, «Optimization of AFLP for extremely large genomes over 70 Gb,» *Molecular Ecology Resources*, 2016.
- [91] **X. Wu, L. Liu, Z. Zhang et al.**, «Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains isolated from different environments by three PCR-based methods,» *Journal of Central South University*, 2015.
- [92] **F. Valicente et R. da Silva**, «Characterization of *Bacillus thuringiensis* Using Plasmid Patterns, AFLP and Rep-PCR,» chez *Bacillus thuringiensis and *Lysinibacillus sphaericus**, Springer, Cham, 2017.
- [93] **I. Serrano, D. De Vos, J. Santos et al.**, «Antimicrobial resistance and genomic rep-PCR fingerprints of *Pseudomonas aeruginosa* strains from animals on the background of the global population structure.,» *BMC Veterinary Research*, 2016.
- [94] **M. Sauget**, Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales, Université de Franche-Comté, 2016.

- [95] **E. Torok, E. Moran et F. Cooke**, Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology, 2 éd., Oxford University Press, 2017.
- [96] **M. Ochoa-Díaz, S. Daza-Giovanetty et D. Gómez-Camargo**, «Bacterial Genotyping Methods: From the Basics to Modern,» chez *Host-Pathogen Interactions*, New York, Humana Press, 2018.
- [97] **CDC-MLVA**, «Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA) | PulseNet methods,» 2016. [En ligne]. Available: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html>.
- [98] **L. Chui, Li et Vincent**, «Technical and Software Advances in Bacterial Pathogen Typing,» chez *Methods in Microbiology*, vol. 42, Elsevier, 2015.
- [99] **O. Peuchant**, Développement de nouvelles méthodes moléculaires pour le typage et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de Chlamydia trachomatis, 2011.
- [100] **N. Raaf**, Prévalence de l'infection à Helicobacter pylori et typage, Alger, 2018.
- [101] **A. Pasqualone**, «Cultivar identification and varietal traceability in processed foods: A molecular approach,» 2013.
- [102] **J. Ronholm, N. Naseri, N. Petronella et F. Pagotto**, «Navigating Microbiological Food Safety in the Era of Whole-Genome Sequencing,» *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 837-857, 2016.
- [103] **AFMTELETHON**, «Les nouvelles techniques de séquençage,» 2018.
- [104] **F. Uhel et L. Zafrani**, «Nouvelles techniques de biologie moléculaire | New Techniques in Molecular Biology,» *Médecine Intensive Réanimation*, 2019.
- [105] **C.H. Shen**, «Techniques in sequencing,» chez *Diagnostic Molecular Biology*, 2019.
- [106] **A. Marjorie**, «DNA Sequencing and the Evolution of the “-Omics”,» chez *Insect Molecular Genetics : An Introduction to Principles and Applications*, 4 éd., Elsevier, 2019.
- [107] **N. Aghrouch**, Sequençage de l'ADN : principe, indications et applications, Rabat, Maroc: Université Mohamed V de Rabat, 2018.

- [108] **N. Gupta et V. K. Verm**, «Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality,» chez *Microbial Technology for the Welfare of Society. Microorganisms for Sustainability*, vol. 17, Springer, Singapore, 2019, pp. 313-341.
- [109] **Y. Shibata, L. Tien, R. Nomoto et R. Osawa**, «Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for *Streptococcus Gallolyticus*,» *Microbiology*, pp. 113-122, 2014.
- [110] **S.Y. Kim, I. K. Bae, J.H. Lee et Al**, «Molecular epidemiology and characterization of *Streptococcus mutans* strains in Korea,» *Journal of Korean Academy of Oral Health*, vol. 44, n° 11, pp. 34-40, 2020.
- [111] **S. W. J. M. S. e. a. Momeni**, «Transmission patterns of *Streptococcus mutans* demonstrated by a combined rep-PCR and MLST approach.,» *Clinical Oral Investigations*, vol. 22, p. 2847–2858 , 2018.
- [112] **B. Foxman**, *Molecular Tools and Infectious Disease Epidemiology*, 1 éd., Elsevier, 2011.
- [113] **D. Garcia-Hermoso, M. Desnos-Ollivier et S. Bretagne**, «Typing *Candida* Species Using Microsatellite Length Polymorphism and Multilocus Sequence Typing,» chez *Candida Species. Methods in Molecular Biology*, vol. 1356, Humana Press, New York, NY, 2016, pp. 199-214.
- [114] **H. Kim, S. Lee, D. Kwon, J. Cha, J. Ahn et K. Kim**, «Characterization of Oropharyngeal Carriage Isolates of *Neisseria meningitidis* in Healthy Korean Adolescents in 2015,» *Journal of Korean Medical Science*, vol. 32, n° 17, pp. 1111-1117, 2017.
- [115] **S. Adhikarya et al.**, «Development of multi locus sequence typing (MLST) of *Rodentibacter pneumotropicus*,» *Veterinary Microbiology*, vol. 231, pp. 11-17, 2019.
- [116] **CDC-WGS**, «whole genome sequencing (WGS) | Pulsenet methods | Pulsenet | CDC,» 2016. [En ligne]. Available: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/wgs.html>.
- [117] **S. Salipante, D. SenGupta, L. Cummings, T. Land, D. Hoogestraat et B. Cookson**, «Application of Whole-Genome Sequencing for Bacterial Strain Typing in Molecular Epidemiology,» *Journal of Clinical Microbiology* , 2015.

- [118] **S. Quainoo, J. Coolen, S. van Hijum et al.**, «Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis,» *Clinical Microbiology Reviews*, 2017.
- [119] **M. Abdelbary et al.**, «Evaluating the use of whole-genome sequencing for outbreak investigations in the lack of closely related reference genome,» *Infection, Genetics and Evolution*, 2018.
- [120] **J. Kwong, N. McCallum, V. Sintchenko et B. Howden**, «Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology,» *Pathology*, vol. 47, n° 13, pp. 199-210, 2015.
- [121] **n .d.** «Introduction to the Interpretation of Whole Genome Sequence Data in Food Safety,» 2016.
- [122] **A. W. Pightling et al.**, «Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations,» *Frontiers in Microbiology*, 2018.
- [123] **W. Yang, X. Kang, Q. Yang, Y. Lin et M. Fang**, «Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity,» *Journal of animal science and biotechnology*, 2013.
- [124] **F. Zakhia et al.**, La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques — application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL), Montpellier , France: Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier(AGRO-M) / Université Montpellier II (UM-II), Baillarguet, 2006.
- [125] **R. J. Olsen, S. Wesley long et J. M. Musser**, «Bacterial Genomics in Infectious Disease and the Clinical Pathology Laboratory,» *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 136, pp. 1414-1422, November 2012.
- [126] **M. Hallin, A. Deplano et M. J. Sruelens**, «Molecular Typing of Bacterial Pathogens:A Tool for the Epidemiological Study and Control of Infectious Diseases,» chez *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*, Springer, Dordrecht, 2012.

- [127] **D. S. G. a. J. Stavriniades**, «Population Genomics of Bacteria,» chez *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc, 2010, p. 127.
- [128] **D. E. Dykhuizen et A. Kalia**, «The Population Structure of Pathogenic Bacteria,» chez *Evolution in Health and Disease*, 2nd éd., Oxford University Press, 2008, pp. 185-198.
- [129] **B. J. Shapiro**, «How clonal are bacteria over time?,» *Current Opinion in Microbiology*, p. 116–123, 2016.
- [130] **M. J. Struelens et al.**, "Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems," *Clinical Microbiology and Infection*, 1996.
- [131] **P. Bidet et É. Bingen**, «Apports des marqueurs moléculaires dans l'analyse des mécanismes d'acquisition et dans le suivi des infections nosocomiales,» *mt pédiatrie*, vol. 15, pp. 46-61, novembre 2012.
- [132] **L. W. Riley, R. E. Blanton**, «Advances in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: definitions, approaches, and scope of the field,» 2018.
- [133] **D. A. Robinson**, «Epidemiological Methods in Microbiology,» chez *Practical Handbook of Microbiology Third Edition*, CRC Press, 2015, pp. 277-278.
- [134] **F. Allerberger**, «Molecular Typing in Public Health Laboratories: From an Academic Indulgence to an Infection Control Imperative,» *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, pp. 1-7, January 2012.
- [135] **W. Li, D. Raoult et P.-E. Fournier**, «Bacterial strain typing in the genomic era,» *FEMS Microbiol Rev*, 2009.
- [136] **M. J. Struelens**, «Molecular Epidemiologic Typing Systems of Bacterial Pathogens: Current Issues and Perspectives,» *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 93, pp. 581-585, Sep/Oct 1998.
- [137] **S. J. Patel and P. L. Graham**, "Use of Molecular Typing in Infection Control," *The Pediatric Infectious Disease Journal*, pp. 527-529, June 2007.

- [138] **S. Zare, A. Derakhshandeh, M. Haghkh, Z. Naziri et A. Motamedi Broujeni**, «Molecular typing of *Staphylococcus aureus* from different sources by RAPD-PCR analysis,» *Heliyon*, vol. 5, n° 18, August 2019.
- [139] **E. L. Palavecino**, «Clinical, Epidemiologic, and Laboratory Aspects of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections,» chez *Methicillin-Resistant staphylococcus aureus (MRSA) protocols*, Humana press, 2014, pp. 1-24.
- [140] **P. Perez**, Typage de *staphylococcus aureus* par MLVA : étude de faisabilité de la détection par HRM. Sciences du Vivant, UNIVERSITÉ DE LORRAINE, 2013.
- [141] **W. Chaalal**, Caractérisation moléculaire des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de denrées alimentaires, Algérie, 2018.
- [142] **M. Aires-de-Sousa**, «Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview» *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 15, p. 373–380, 2017.
- [143] **M. Ostojić et M. Hukić**, «Genotypic and phenotypic characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, isolated on three different geography locations,» *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 15, p. 48–56, Aug 2015.
- [144] **K. McCarthy Sommerhalter**, Use of molecular typing methods in characterizing MRSA infections in Ohio, The Ohio State University, 2015.
- [145] **F. Bagnoli, R. Rappuoli et G. Grandi**, «*Staphylococcus aureus*: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis,» *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017.
- [146] **J. Szabó**, «Molecular Methods in Epidemiology of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Advantages, Disadvantages of Different Techniques,» *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, pp. 1-3, 2014.
- [147] **N. Haque, M. Soe Aung, S. Kumar Paul, M. S. Bar, S. Ahmed, S. R. Sarkar, S. Roy, S. A. Nasreen, M. Chand Mahmud, M. A. Hossain, N. Urushibara, M. Kawaguchiya, A. Sumi and N. Kobayashi**, "Molecular Epidemiological Characterization of Methicillin-Susceptible and -Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Skin and Soft," *MICROBIAL DRUG RESISTANCE Volume 00, Number 00, 2018*, pp. 1-10, 2018.

- [148] **M. Chavez Vivas et A. del Cristo Martinez Gutierrez**, Typification Methods and Molecular Epidemiology of Staphylococcus aureus with Methicillin Resistance, 2018.
- [149] **A. Khateb**, The Role of Staphylococcal Protein A (SPA) in the Virulence of Staphylococcus aureus Infections, University of Calgary, Calgary, AB, 2014.
- [150] **D. MacCannell**, «bacterial strain typing,» *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 33, n° 13, pp. 629-650, 2013.
- [151] **S. Stefani, D. R. Chung, J. A. Lindsay, A. W. Friedrich, A. M. Kearns, H. Westh et F. M. MacKenzie**, «Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods,» *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 39, p. 273– 282, 2012.

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : Structure moléculaire de l'ADN bactérien.

ANNEXE II : Enzymes de restriction : bactéries productrices et sites de reconnaissance.

ANNEXE III : Les caractéristiques, les principaux caractères phénotypiques et le transfert des plasmides bactériens.

ANNEXE IV : Transposition et conséquences génétiques de la mobilité des transposons.

ANNEXE V : Epidémiologie des intégrons et le rôle dans la résistance aux antibiotiques.

ANNEXE VI : Expression et fonctions des cassettes.

ANNEXE VII : Cycle biologique des bactériophages et phénomène de transduction.

ANNEXE VIII : Types de la PFGE.

ANNEXE IX : Variants du ribotypage.

ANNEXE I : Structure moléculaire de l'ADN bactérien

Pour former un acide désoxyribonucléique, les nucléotides sont condensés les uns sur les autres avec des liaisons phospho-diester entre le carbone 3' d'un premier nucléotide et le carbone 5' du nucléotide suivant de sorte que ces liaisons définissent un sens à la molécule : le début étant le nucléotide dont le phosphate en 5' ne serait lié à aucun autre nucléotide et la fin correspond au nucléotide dont la fonction alcool en 3' n'est pas estérifiée (figure 1).

La structure secondaire du l'ADN est telle que les deux brins sont enroulés l'un autour de l'autre (figure 1.4). Chacun des deux brins est orienté (5'→3') dans le sens opposé à celui de l'autre brin (3'→5'). On dit qu'ils sont antiparallèles. Les bases azotées sont tournées vers l'intérieur de la double hélice de façon à ce que chacune s'hybride avec une base de l'autre brin (A avec T, C avec G, etc..). On dit que les bases successives de chacun des brins sont complémentaires. La double hélice a un « pas » de 3,4 nm c'est à dire qu'il y a environ 10 paires de nucléotides pour chaque tour d'hélice [1].

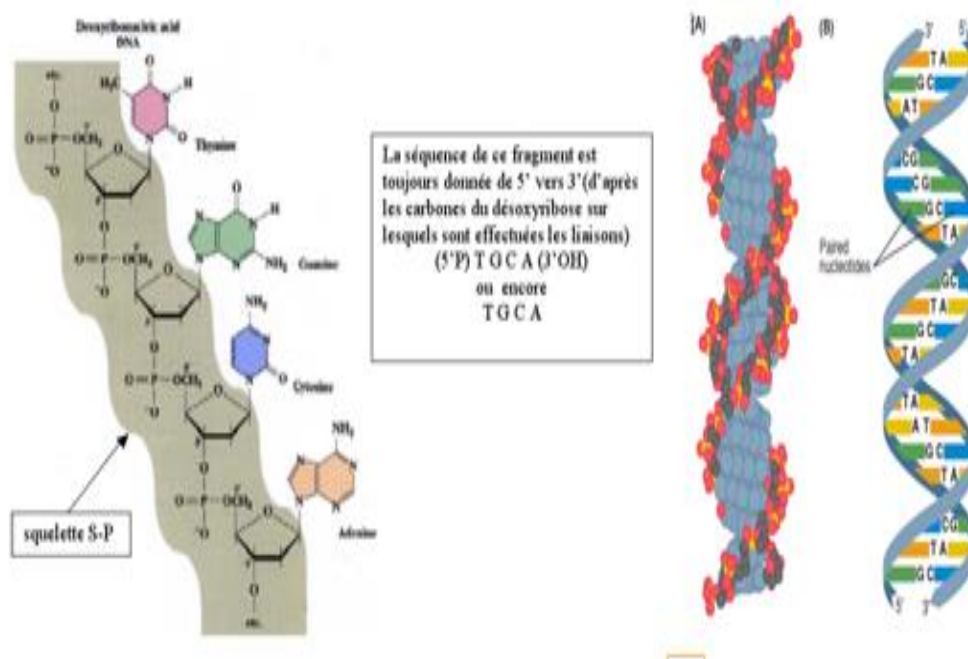


Figure 1 : Association des nucléotides formant un brin d'ADN / Enroulement des brins d'ADN [1, 2]

[1] S. Mézaache-aichour, *génétique microbienne*, université de sétif -1, 2016-2017.

[2] W. S. Klug, M. R. Cummings, C. Spencer, M. A. Palladino et D. Killian, «Concepts of Genetics,» 12 éd., 2019.

ANNEXE II : Enzymes de restriction : bactéries productrices et sites de reconnaissance

Enzyme	Bacterie productrice	Site de reconnaissance
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC
BglI	<i>Bacillus globigii</i>	GCCNNNNNGGC
BglII	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT
Bse634I	<i>Bacillus species 634</i>	RCCGGY
BsoBI	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	CYCGRG
BstYI	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	RGATCY
Cfr10I	<i>Citrobacter freundii</i>	RCCGGY
EcoO109I	<i>Escherichia coli</i>	RGGNCCY
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC
EcoRII	<i>Escherichia coli</i>	CCWGG
EcoRV	<i>Escherichia coli</i>	GATATC
FokI	<i>Flavobacterium okeanokoites</i>	GGATG
HincII	<i>Haemophilus influenzae Rc</i>	GTYRAC
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	AAGCTT
MspI	<i>Moraxella species</i>	CCGG
MunI	<i>Mycoplasma species</i>	CAATTG
NaeI	<i>Nocardia aerocolonigenes</i>	GCCGGC
NgoMIV	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GCCGGC
PvuII	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG

Les représentations de sites de reconnaissance utilisent les abréviations standard suivantes : R = G ou A ; K = G ou T ; S = G ou C ; B = pas A (C ou G ou T) ; D = pas C ; Y = C ou T ; M = C ou A ; W = A ou T ; H = pas G ; V = pas T et N = G ou C ou A ou T .

[1] S. Nikolajewa, «Common patterns in type II restriction enzyme binding sites,» *Nucleic Acids Research*,, vol. 33, n° 18, p. 2726–2733, 2005.

ANNEXE III : Les caractéristiques, les principaux caractères phénotypiques et le transfert des plasmides bactériens

1. Caractéristiques des plasmides

✚ **Tailles** très variables entre 1 kilobases à plus de 1 mégabase (généralement inférieures à 5% de celle du chromosome) peuvent exister sous forme de copie unique (monocopie) ou multiples, les plus grands plasmides sont souvent présent à une ou deux copies par cellule comme le chromosome, contrairement aux plasmides de petites tailles qui se trouvent en plus grande quantité (exemple : 30 copies de plasmide **ColE1** par cellule) [1, 2, 3] .

✚ **La réplication** : la fonction ORI est l'origine de la réplication, le contrôle du nombre de copies d'un même plasmide présent dans une bactérie est strict pour les plasmides de grandes taille (1 à 3 copies par cellule) et relâché pour les plasmides de petites taille [3].

✚ **L'incompatibilité plasmidique** : quand un plasmide est transféré dans une cellule qui en porte déjà un, il a été souvent observé que le second plasmide ne peut se maintenir et qu'il est rapidement perdu au cours des cycles successifs de réplication. Dans ce cas, les deux plasmides sont dits incompatibles. Ces plasmides sont ainsi classés en groupe d'incompatibilité ou groupe Inc [1].

✚ Un certain nombre de groupe d'incompatibilité sont reconnus, les plasmides d'un groupe d'incompatibilité partagent un mécanisme commun pour réguler leur réplication [1].

✚ **Les épisomes** : certains plasmides, appelés épisomes, peuvent s'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cellule-hôte, et dans de telle conditions leur réplication et sous le contrôle du chromosome. De ce fait, ils peuvent être dupliqués à chaque division cellulaire de l'hôte [1] .

✚ Lors de la division cellulaire, les plasmides se répartissent de façon totalement aléatoire (contrairement aux chromosomes). Ainsi, même si la probabilité reste faible, il se peut qu'une des deux cellules filles ne possède aucun plasmide. La probabilité augmente avec la diminution du nombre de plasmides présents dans la cellule mère. Par exemple, avec un plasmide présent à 50 copies par cellule, la probabilité qu'une cellule fille ne reçoive aucune copie du plasmide est aussi faible que 1 sur 10^{15} [3].

2. Caractères phénotypiques portés par les plasmides

Ils sont le support de **caractères phénotypiques majeurs** :

✚ **Résistance acquise aux antibiotiques (plasmide de Résistance ou facteur R** : parmi les groupes les plus répandus et les mieux étudiés : ces plasmides peuvent protéger la cellule par différents mécanismes, le plus connu étant , la résistance enzymatique (la bactérie produit une substance capable d'inactiver directement l'antibiotique en le dénaturant, l'hydrolysant etc... (c'est le cas par exemple des bêta-lactamases). Un autre exemple connu est

l'imperméabilité de l'enveloppe cellulaire (des protéines qui peuvent altérer la structure de la membrane de façon à ce que l'antibiotique ne puisse pas entrer dans la cellule et atteindre sa cibles) ; cet mécanisme a pour effet d'empêcher la pénétration intra-cellulaire de l'antibiotique, et occasionnellement par la modification de cible (la cible de l'action d'un antibiotique se voit modifiée, rendant la bactérie résistante à cet antibiotique) [2].

✚ **Résistance aux métaux lourds** (composés mercuriels, sels de cadmium, de bismuth, de plomb, d'antimoine, aux arséniates et arsénites) [4] .

✚ **Production de substances pathogènes et de facteurs de virulence (plasmides de virulence)** : par exemple, chez les souches entéropathogène d'*Escherichia coli* responsable de la diarrhée, au moins deux toxines de l'entéropathogène *Escherichia coli* sont connues pour être codées par un plasmide : l'*hemolysine*, qui lyse les globules rouges et l'*entérottoxine* qui induit une intensive excrétion d'eau et de sels [1]. De même, la virulence de *Bacillus anthracis* qui cause l'anthrax dépend de la présence de deux grands plasmides [3].

✚ **Acquisition de caractères métabolique (les plasmides métaboliques)** : Les plasmides sont capables d'élargir la gamme d'activités métaboliques de la cellule hôte de diverses façons. Un grand nombre de gènes ont été trouvés sur les plasmides, y compris ceux pour la fermentation des sucres tels que le saccharose et le lactose, l'hydrolyse de l'urée ou la production de sulfure d'hydrogène. Un grand nombre d'entre eux ont été identifiés initialement en raison de la confusion qu'ils ont causée dans les tests d'identification biochimique [3].

3. Transfert des plasmides

De nombreux plasmides contiennent des gènes qui permettent le transfert de l'ADN plasmidique entre les cellules. Le transfert se fait par une structure tubulaire appelée pilus (Pili), formée entre les cellules, à travers laquelle passe l'ADN plasmidique. L'assemblage des cellules bactériennes dans le processus de transfert est appelé conjugaison, et les plasmides qui peuvent être transférés de cette façon sont appelés plasmides conjugatifs [5].

✚ **Conjugaison : Plasmides conjugatifs** : ceux sont des plasmides autotransférables d'une bactérie donatrice dite mâle (F+) à une autre bactérie receveuse dite femelle (F-) [6]. On les appelle aussi facteurs de fertilité ou plasmides **F**, ils possèdent le **gène tra** qui est le responsable du transfert. Ils sont généralement grands et ils sont présents en faible nombre de copies par cellule (1 ou 2 copies par cellule) [7, 5].

Lors de transfert conjugatif du plasmide on a :

- ✓ Contact direct entre les cellules qui est indispensable [1]
- ✓ Transfert toujours accompagné par la réplication de l'ADN transféré [5].
- ✓ Suite au transfert : - Le donneur garde sa copie du F.
- Le receveur est transformé en « mâle » car il porte une nouvelle copie du F [5].
- ✓ Transfert est orienté : - Unidirectionnel : du donneur vers le receveur [1].

✚ **Plasmides non conjugatifs** : ils **ne sont pas autotransférables** car ils ne possèdent pas les gènes requis pour la synthèse du pilus, et ils utilisent donc, au cours du transfert, le pilus d'un autre plasmide autotransférable présent dans la bactérie [8]. Sont des plasmides de petite taille et sont présent en grand nombre de copies [5]. Les plasmides non conjugatifs peuvent être transférés de cellule à cellule par mobilisation [5].

-
- [1] **J. M. Martinko et M. T. Madigan**, Brock, biologie des micro-organismes, Paris: pearson education, 2007.
 - [2] **J. Perry, a. T. Jstaley et S. Lory**, Microbiologie cours et qst de révsion, Paris, 2004.
 - [3] **J. W. Park et S. F. Dale**, Molecular Genetics of bacteria, 5 éd., UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.
 - [4] **Chabani**, la génétique bactérienne, Alger: université d'Alger faculté de medecine spécialité de microbiologie, 2016-2017.
 - [5] **D. L. Hartl**, essential Genetics and génomic, Jones & Bartlett Learning, 2020.
 - [6] **P. Singleton et D. Sainsbury**, dictionary of microbiology and molecular biology, 3 éd., 2006.
 - [7] **J. Nicklin, K. Graeme-Cook, T. Paget et R. Killington**, L'essentiel en microbiologie, P. Berti, Éd., Lavoisier SAS, 2000.
 - [8] **A. Muylaert et J. Mainil**, Résistances bactériennes aux antibiotiques :les mécanismes et leur « contagiosité », Université de Liège, 2012.

ANNEXE IV : Transposition et conséquences génétiques de la mobilité des transposons

1. Phénomène de transposition

C'est l'addition d'une séquence de gènes (ADN) de taille définie au sein d'un génome [1].

▪ Caractéristiques générales :

-Evènement rares (fréquence de 10^{-5} à 10^{-7} par génération) [2].

-Absence d'homologie entre les ADN interagissant [3] .

-Multicopies dans certaines bactéries, exemple : une souche d'*Escherichia coli* a 5 copies de IS2 et 5 copies de IS3 [2].

▪ Mécanismes de la transposition :

Il existe deux types de transposition : La première, dite **réplicative**, permet à l'élément de se déplacer d'un site donneur à un site récepteur suite à sa réplication préalable. Une copie de l'élément transposable est alors maintenue dans le site donneur, ce qui augmente le nombre de copies de l'élément au sein du génome hôte (**transposons de type I**). La deuxième, dite **conservatrice**, consiste en un transfert de l'élément transposable d'un site donneur à un site récepteur sans qu'une copie de celui-ci ne soit sauvegardée dans le site donneur [4].

2. Rôle et conséquences génétique de la mobilité des transposons

Les transposons procurent **une valeur adaptative** aux génomes bactériens en leur permettant de faire face à un environnement en constante évolution. Ils ont un rôle dans l'amplification et la dispersion de gènes ou groupes de gènes à forte valeur sélective (résistances aux antibiotiques, voies cataboliques, toxines, gènes de virulence, etc.)

Les éléments transposables sont une source de flexibilité génomique considérable et ils contribuent au polymorphisme par plusieurs mécanismes tel que :

✚ **Les mutations** : les éléments transposables ont inéluctablement **des effets mutateurs** sur les génomes cibles (Ils inactivent le gène cible et tous ceux du même opéron localisé en aval du site d'insertion, phénomène qui a été à l'origine de leur découverte).

✚ **La promotion** : ces éléments contiennent des promoteurs (certains gènes cryptiques de l'hôte peuvent donc être activés lorsqu'un SI ou un transposon s'insère en amont, comme c'est le cas pour l'opéron *bgl* de *Escherichia coli*).

✚ **Les réarrangements par l'inversion ou la délétion :** Ils sont présents à plus d'une copie sur un génome, de ce fait, la recombinaison des éléments transposables (et plus particulièrement les séquences IS) au sein d'un même réplicon peut provoquer soit une délétion et donc la perte d'information génétique. Ou bien l'inversion de la séquence d'ADN comprise entre ces éléments, ce qui peut avoir une incidence sur l'expression de certains gènes qui se retrouveraient par exemple connectés à un nouveau promoteur [5] .

-
- [1] **A. Muylaert et J. Mainil**, Résistances bactériennes aux antibiotiques :les mécanismes et leur « contagiosité », Université de Liège, 2012.
- [2] **J. M. Martinko et M. T. Madigan**, Brock, biologie des micro-organismes, Paris: pearson education, 2007.
- [3] **W. Prescott et W. Sherwood**, Microbiologie, 4 éd., Paris , bruxelles, 2013.
- [4] **J. W. Park et S. F. Dale**, Molecular Genetics of bacteria, 5 éd., UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.
- [5] **C. Merlin et A. Toussaint**, les éléments transposables bactériens, 1999.

ANNEXE V : Epidémiologie des intégrons et le rôle dans la résistance aux antibiotiques

1. Epidémiologie des intégrons

Les études épidémiologiques ont surtout porté sur la recherche des intégrons de classe 1. Beaucoup d'études ont montré que ces intégrons étaient très répandus chez différentes bactéries d'origine humaine, animale ou environnementale [1].

1) **Intégrons de classe 1** : la très large majorité des publications s'intéresse à la description des intégrons de classe 1. Ils ont été les premiers découverts, les plus recherchés et restent les plus décrits dans la littérature à ce jour [1]. Les intégrons de classe 1 ont surtout été décrits chez les entérobactéries et autres bactéries à Gram négatif, rarement chez les bactéries à Gram positif [2]. L'extrémité 3' conservée des intégrons de classe 1 se compose quant à elle, des gènes *sulI* et *qacEA1* codant respectivement pour une résistance aux sulfamides et aux ammoniums quaternaires [3].

2) **Intégrons de classe 2** : les intégrons de classe 2 ont été mis en évidence dans la famille du transposon Tn7 et d'autres transposons proches de la Tn7. Le *intI2* est non fonctionnelle, ce qui entraînerait une plus grande stabilité de la structure de l'intégron de Tn7. Des intégrons de classe 2 ont été retrouvés chez des **souches de bacilles à Gram négatif** d'origine humaine, animale ou environnementale [2].

3) **Intégrons de classe 3** : le premier intégron de classe 3 a été décrit chez *Serratia marcescens*, Il contient la cassette *blaIMP*, codant la résistance à l'imipénème par production d'une métalloenzyme et la cassette *aac(6')-Ib*. Un deuxième intégron de classe 3 a été identifié chez *Klebsiella pneumoniae*, contient le gène *intI3* qui présente 98,8 % d'homologie avec le gène *intI3* de *S. marcescens*. Il possède un site de recombinaison *attI3* et deux régions promotrices [2].

2. Intégrons et la résistance bactérienne aux antibiotiques

Les intégrons jouent un rôle important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif [2].

Une étude sur près de 900 entérobactéries d'origine hospitalière et communautaire a montré une relation significative entre la présence d'IR et la multirésistance bactérienne, quelles que soient l'espèce bactérienne ou l'origine de la souche (les prévalences d'intégrons de résistance sont plus élevées chez les bactéries multirésistantes, atteignant 60 % voire 70 %). La résistance à certains antibiotiques (cotrimoxazole, gentamicine, tobramycine, ampicilline, pipéracilline, céfuroxime) était prédictive de la présence d'un IR [1]. Au-delà de la résistance aux ATBs, les intégrons seraient en fait des structures permettant l'adaptation des bactéries à leur environnement par l'acquisition de gènes indispensables à leur survie (métabolisme, facteurs de virulence, résistance aux antibiotiques). La présence de superintégrons hébergeant de très nombreux gènes codant différentes fonctions pourrait permettre à cette bactérie d'avoir une capacité d'adaptation rapide par ce système de capture de gènes, ce qui lui permettrait d'acquérir un avantage sélectif [2].

[1] O. Barraud et M. Ploy, Actualités sur les intégrons de résistance, 2011.

[2] M. Ploy, A. Gassama, D. Chainier et F. Denis, «Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques,» *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, vol. 20, n° 16, 2005.

[3] A. Muylaert et J. Mainil, Résistances bactériennes aux antibiotiques :les mécanismes et leur « contagiosité », Université de Liège, 2012.

ANNEXE VI : Expression et fonctions des cassettes.

1. Expression des cassettes

Les cassettes sont toutes orientées dans la même direction et sont généralement dépourvues de promoteur. Les gènes sont co-transcrits comme au sein d'un opéron sous la dépendance d'une région promotrice localisée dans la région 5' conservée de l'intégron. L'expression des cassettes est tributaire de la position par rapport au promoteur, les gènes localisés dans des cassettes éloignées étant faiblement exprimés. La pression de sélection antibiotique peut favoriser des réarrangements de cassettes afin de permettre le positionnement d'une cassette faiblement exprimée à une localisation plus proche du promoteur.

De rares cassettes possèdent leur propre promoteur telles que *cmlA* et *cmlA2* responsables de la résistance au chloramphénicol par un mécanisme non enzymatique.

Chez les intégrons de classe 1, deux promoteurs P1 et P2 ont été caractérisés. P2 n'est présent que chez quelques intégrons pour lesquels une insertion de 3 résidus guanine a entraîné un espacement de 17 paires de bases entre les séquences -35 et -10. P2 est situé 90 paires de bases en aval de P1. Il a été montré expérimentalement que ces deux promoteurs P1 et P2 étaient fonctionnels. P1 peut se présenter sous 3 versions différentes, une forte, une moyenne et une faible, selon les combinaisons de séquences -35 et -10. Quand une cassette est intégrée à un site secondaire, l'expression du gène n'est possible que si l'intégration s'est opérée en aval d'un promoteur potentiel [1].

2. Fonctions portées par les cassettes

- ✚ Les cassettes codent le plus souvent des résistances aux antibiotiques.
- ✚ Plus de 70 gènes de résistance aux antibiotiques ont été décrits dans des cassettes.
- ✚ Des gènes de résistance aux antiseptiques ont aussi été retrouvés sur des cassettes (*qacE*, *qacF*, *qacG*).
- ✚ Des cadres ouverts de lecture ne codant pour aucune fonction connue mais associés à des sites *attC* sous forme de cassettes ont aussi été décrits chez différents intégrons [2].

[1] F. Denis et M.C. Poly, cours de bactériologie générale, faculté de médecine de limoges, 2002.

[2] M. Ploy, A. Gassama, D. Chainier et F. Denis, «Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques,» *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, vol. 20, n° 16, 2005.

ANNEXE VII : Cycle biologique des bactériophages

Les bactériophages peuvent présenter **2 cycles principaux** : **lytique** ou **lysogénique**. Toutefois, il existe Un autre cycle de vie du phage moins fréquent qui est le cycle **pseudolysogénique** [1].

✚ **Cycle lytique** : Dans ce cycle, le virus lyse la cellule hôte bactérienne après la réplication virale, permettant la libération de nouvelles particules de phages dont chacune peut ensuite infecter une autre cellule bactérienne [1, 2]. On parle dans ce cas de **phage virulent** et son cycle productif est appelé **cycle lytique** [3].

✚ **Cycle lysogénique** : le phage ou seulement son acide nucléique est introduit dans la bactérie et s'intègre au génome bactérien à l'état **latent** sous la forme d'un **prophage**, (ex : phage λ « lambda »), ou rester dans le cytoplasme sous forme de plasmide (ex : phage P1). On parle dans ce cas de **phage tempéré** et le cycle est **qualifié de lysogénique** [3, 4].

Lors de cycle lysogénique on a :

- Les phages tempérés se répliquent avec le chromosome de l'hôte et sont transférés dans les cellules filles (transmission verticale) [4].
- La **lysogénie** permet à la fois la propagation de virus et la survie de l'hôte.
- Le passage de l'état lysogène à l'état lytique est appelé « **induction de cycle lytique** »
- L'acquisition par les bactéries lysogènes d'autres propriétés que leurs homologues non lysogènes n'ont pas est appelée « **convention lysogénique** » [5].

✚ **Cycle pseudolysogénique** : la pseudolysogénie est un autre cycle de vie du phage **moins fréquent**, décrite comme une **situation instable** dans laquelle le génome du phage ne parvient pas à se reproduire (cycle lytique) ou s'établit comme un prophage (cycle lysogénique). La pseudolysogénie a été **associée à des conditions dépourvues de nutriments**, qui nuisent à la réplication de l'ADN ou à la synthèse des protéines, au cours desquelles le génome du phage demeure pendant une longue période en tant que **préprophage** non intégré, semblable à un épisode. Selon cette hypothèse, lorsque l'état nutritionnel est rétabli, le phage entre dans un cycle de vie lysogénique ou lytique. Malgré le putatif cycle [1].

Deux types de phages transducteurs sont connus [6](*tableau 1*) :

a) **Un phage transducteur généralisé** : produit certaines particules **semblables à des phages** qui ne contiennent que de l'ADN obtenu de la bactérie hôte, plutôt que de l'ADN de phage; dans ce types de transduction le fragment d'ADN bactérien (produits par la dégradation du chromosome hôte par voie phage) peut être dérivé de n'importe quelle partie du chromosome bactérien (coupures aléatoires) [2, 6]. Au cours de transduction généralisée les fragments

uniques d'ADN bactérien de taille comparable à l'ADN des phages sont emballés à la place de l'ADN phagique [6].

b) Un phage transducteur spécialisé : produit des particules qui contiennent à la fois le phage et les gènes bactériens liés dans une seule molécule d'ADN, dans ce type de phage, les gènes bactériens sont obtenus à partir d'une région particulière du chromosome bactérien [6].

Transduction généralisée	Transduction spécialisée
<ul style="list-style-type: none"> - Ne contiennent que de l'ADN obtenu de la bactérie hôte. - ADN bactérien dérivé de n'importe quelle partie du chromosome (coupures aléatoires) 	<ul style="list-style-type: none"> - Contiennent à la fois le phage et les gènes bactériens. - ADN bactérien obtenus à partir d'une région particulière du chromosome

Tableau 1 : Types de phages transducteurs

La transduction est un processus impliqué dans le transfert horizontal de gènes de bactéries pathogènes. Ce dernier joue un rôle vital dans l'émergence de nouveaux pathogènes très virulents comme l'*Escherichia coli* entérohémorragiques [7].

[1] **F. F. Vale et p. Lehours**, «Relating Phage Genomes to Helicobacter pylori Population Structure: General Steps Using Whole-Genome Sequencing Data,» *international journal of molecular sciences*, 21 June 2018.

[2] **J. W. Park et S. F. Dale**, *Molecular Genetics of bacteria*, 5 éd., UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

[3] **A. Muylaert et J. Mainil**, *Résistances bactériennes aux antibiotiques :les mécanismes et leur « contagiosité »*, Université de Liège, 2012.

[4] **J. Nicklin, K. Graeme-Cook, T. Paget et R. Killington**, *L'Essentiel En Microbiologie*, P. Berti, Éd., Lavoisier SAS, 2000.

[5] **J. J. Perry, a. T. Jstaley et S. Lory**, *Microbiologie cours et qst de révsion*, Paris, 2004.

[6] **D. L. Hartl**, *essential Genetics and génomic*, Jones & Bartlett Learning, 2020.

[7] **K.-V. Chaitanya**, *Genome and Genomics From Archaea to Eukaryotes*, Andhra Pradesh, India: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019.

ANNEXE VIII : Types de la PFGE

L'utilisation de courant électrique avec la vitesse et les rotations alternées dans le champ magnétique conduit à l'émergence de différents types de PFGE [1]. Il est important, au moment de choisir un type PFGE, d'évaluer les coûts et les performances en fonction de l'utilisation prévue. Différents types de systèmes PFGE sont décrits ci-dessous (*figure 1*) [2] :

1) Champs électriques homogènes à contour clampé (Contour Clamped Homogeneous Electric Field ou CHEF): CHEF est Actuellement, la technique la plus couramment utilisée [3]. Dans ce système, la taille, l'emplacement, la coordination, la stabilité et la continuité du champ électrique sont contrôlés avec précision, ce qui permet la séparation des fragments d'ADN de tailles différentes. Les molécules de plus de 7000 kb peuvent être séparées dans ce système. [1].

2) Électrophorèse du gel d'inversion de champ (Field-Inversion Gel Electrophoresis ou FIGE): le travail avec FIGE est facile et simple. Elle est très populaire de nos jours en raison de la séparation des petites pièces. Elle fournit une résolution acceptable, plus de 800 kb [1].

3) Électrophorèse en champ alternatif transversal (Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis ou TAFE) : cette forme de PFGE permet de séparer de grands fragments d'ADN dans un format simple et pratique sans les inconvénients des autres techniques de champ pulsé [2].

4) Électrophorèse en gel à inversion de champ asymétrique (Asymmetric Field Inversion Gel Electrophoresis ou AFIGE) : la méthode est utilisée pour la détection des ruptures d'ADN à double brin [1].

5) Électrophorèse en champ alternatif orthogonal (Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis : OFAGE) : c'est une électrophorèse de champ alternant vertical qui utilise deux champs électriques non homogènes. Les molécules d'ADN entre 1000 kb et 2000 kb peuvent être séparées par cette méthode [1, 2].

6) Électrophorèse sur gel rotatif (Rotating Gel Electrophoresis ou RGE): le travail avec cette méthode est facile et adapté pour la séparation de l'ADN avec 50 - 6000 Kb [1].

7) **Électrodes programmables à commande autonome (Programmable Autonomously-Controlled Electrodes ou PACE)**: le système d'électrophorèse PACE offre un contrôle précis de tous les paramètres du champ électrique par la régulation indépendante des tensions. Le système PACE sépare les fragments d'ADN de 100 à plus de 6 Mo [2]

8) **Électrophorèse orthogonale à champ homogène pulsé (Pulsed-Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis ou PHOGE)**: elle utilise un angle de réorientation de 90°, mais les molécules d'ADN subissent quatre réorientations par cycle au lieu de deux [2].

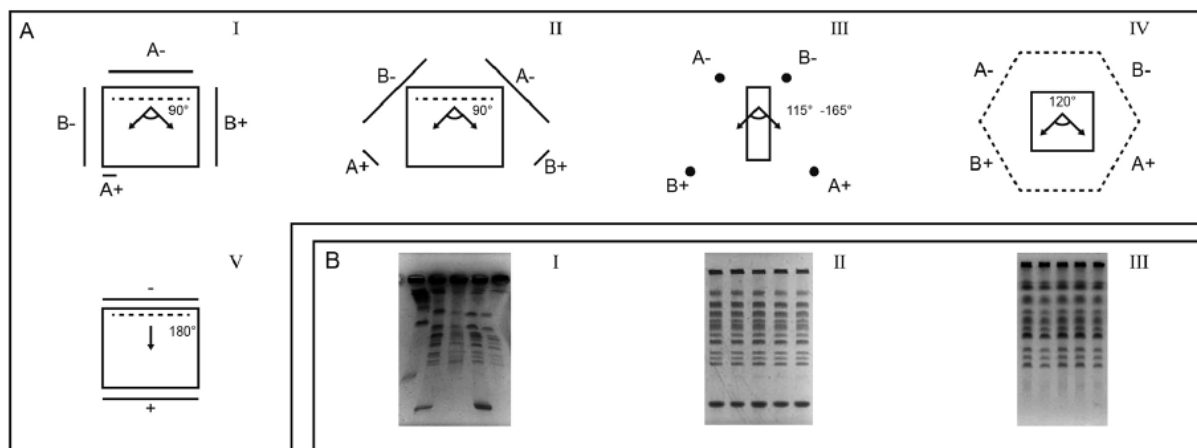


Figure 1 : Illustration schématique des configurations PFGE et de leurs images de gel représentatives.
 A : Matrice d'électrodes et disposition du gel en PFGE (I), OFAGE (II), TAFE (III), CHEF (IV) et FIGE (V).
 B : Karyotypes électrophorétiques obtenus en OFAGE (I), TAFE (II) et CHEF (III) *Invalid source specified.*

[1] **E. Gholami Parizad**, « The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies,» *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2016.

[2] **A. N. Chijioke**, «Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): Principles and Applications in Molecular Epidemiology: A Review,» *INTERNATIONAL JOURNAL OF CURRENT RESEARCH IN MEDICAL SCIENCES*, 2016.

[3] **A. Salman Shaheer et A. Emine** , «Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains,» *the journal of infection in developing countries*, 2015.

ANNEXE IX : Variants du ribotypage

1) Ribotypage automatisé RA (AR:Automated Ribotyping)

Un système entièrement automatisé pour le ribotypage (le Riboprinter Microbial Characterization System) a été introduit pour la première fois par Dupont Qualicon en 1995 pour l'identification et la caractérisation d'isolats bactériens, offrant un degré de standardisation qui permet de combiner les résultats réalisés sur différents instruments [1, 2].



Figure 1 : Système de RiboPrinter® [3].

Le Ribotypage automatisé (Riboprinter®) est un instrument disponible sur le marché avec un haut niveau de reproductibilité et de normalisation (*figure 1*). Riboprinter® automatise toutes les étapes du processus, de la lyse cellulaire à la saisie des données et aux comparaisons de bases des données. De plus, des cassettes de réactifs, y compris les enzymes, la sonde d'hybridation conjuguée aux enzymes, le gel électrophorétique et la membrane, ont été mises au point pour offrir un rendement constant. La saisie des données se fait au moyen d'une caméra CCD et les modèles de gel obtenus sont stockés dans un format numérisé, ce qui facilite la comparaison des résultats entre les laboratoires et l'échange de données par voie électronique [1].

Le ribotypage automatisé (RA) est souvent considéré comme la méthode de choix de sous-typage de l'ADN de choix pour de nombreuses études à grande échelle ainsi que pour des applications industrielles, car le PFGE prend plus de temps et exige plus de main-d'œuvre, et nécessite plus de personnel avec un niveau plus élevé d'expertise technique [1]. Ce système est reproductible, pratique et rapide. Un seul lot se déroule en environ 8 heures de sorte que Riboprinter® peut traiter jusqu'à 32 échantillons par jour, et les données générées peuvent être distribuées dans le réseau [2, 1]. Ce système permet à pratiquement toutes les espèces de bactéries d'être caractérisées selon leur ribotype spécifique, et d'être identifiées selon leur

modèle de référence existant [2]. Cependant, le système est coûteux, les coûts d'exploitation sont élevés et une culture pure est nécessaire. Il nécessite également une bonne caractérisation et identification dans la base de données pour une utilisation efficace [2].

2) PCR-ribotypage (PCR- ribotyping)

Le ribotypage PCR a été développé dans les années 1990, à des fins de laboratoire de microbiologie clinique afin de discriminer les microorganismes pathogènes sans utiliser de sondes, ce qui rend l'analyse plus largement applicable [4, 5].

Le principe de cette technique est fondé sur le polymorphisme de longueur d'une séquence d'ADN séparant les gènes des ARNr 16S et 23S [6]. L'ADN chromosomique provenant d'isolats d'agents pathogènes bactériens est utilisé comme modèle dans la PCR avec des amorces oligonucléotidiques complémentaires à l'extrémité 3' du gène de l'ARNr 16S et à l'extrémité 5' du gène de l'ARNr 23S [7, 5]. Après la PCR, le produit amplifié est résolu par électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide, et les données de taille et de nombre de bandes sont analysées [2]. Le ribotypage PCR révèle l'hétérogénéité de longueur des régions d'espacement interne amplifiées par PCR situées entre ces gènes [5].

Cette technique s'est révélée particulièrement appropriée dans les laboratoires de microbiologie clinique dans les études épidémiologiques pour déterminer la relation et la discrimination des souches isolées de différentes sources [2]. Elle a été décrite comme une technique fiable pour le typage de différents pathogènes tels que *Clostridium difficile*, *Pseudomonas cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* et *Enterobacter sp.* Cependant, elle n'est utilisée, en biologie médicale, que pour typer l'espèce *Clostridium difficile* (ayant un total de 11 opérons ribosomiaux. La région d'espacement varie non seulement entre différentes souches, mais aussi entre différentes copies de l'opéron sur le même chromosome) [7, 6, 5]. D'autre part, des techniques modifiées du PCR-ribotypage ont été également développées.

2.1 PCR-Ribotypage suivi du sous-typage par l'endonucléase de restriction

Si le ribotypage PCR ne permet pas de résoudre l'hétérogénéité concluante dans les bandes amplifiées de plusieurs souches d'une ou de différentes espèces, le sous-typage des souches par l'analyse de restriction du produit amplifié peut générer des données supplémentaires sur l'hétérogénéité des séquences génomiques, ce qui peut aider à discriminer les souches bactériennes d'une seule espèce [2].

Cette hétérogénéité résulte du degré élevé de variabilité de séquences entre plusieurs copies de l'ISR, allant d'une mutation ponctuelle à la suppression ou à l'ajout de segments plus importants [2]. Cette variabilité s'explique en partie par le fait que les régions inter-gènes codent souvent un ou deux ARNt [4].

Bien que des pouvoirs discriminants supplémentaires aient été constatés avec cette méthode. Elle s'est révélée intrinsèquement limitée dans certains cas, générant généralement seulement deux à quatre bandes [4].

2.2. PCR-Ribotypage suivi du séquençage de l'ISR

Mycoplasma et *Mycobacterium* sont les organismes qui n'ont qu'une ou deux copies d'opérons d'ARNr dans un seul organisme et qui posent des difficultés de résolution de la variabilité de l'ISR en termes de longueur et de nombre d'opérons. Dans de telles situations, le séquençage direct des nucléotides du produit amplifié à la suite du ribotypage PCR de la région d'espacement peut permettre d'identifier des variations dans les séquences de génomes, contribuant ainsi à la discrimination des différentes souches d'une espèce. Elle est largement utilisée dans le laboratoire de microbiologie clinique [2].

2.3. Analyse de restriction de l'ADN ribosomique amplifié (ARDRA: amplified ribosomal DNA restriction analysis)

Cette technique simple et efficace est fondée sur l'amplification par PCR du gène 16S de l'ARNr, suivie de la restriction de la digestion des produits amplifiés [2].

Initialement, l'ADN est extrait de l'échantillon et puis il est soumis à une PCR à l'aide des amorces dérivées des régions conservées présentes aux deux extrémités du gène de l'ADNr 16S. La totalité de l'amplicon peut être directement soumise à la digestion enzymatique de restriction ou clonée dans des cellules d'*E. coli* pour séparer les produits PCR en cultures individuelles (Le clonage aide à obtenir une meilleure résolution par rapport à la digestion enzymatique de restriction directe des amplicons, en particulier lorsqu'une population complexe d'organismes est manipulée). Comme l'amplicon mesure environ 1500 pb de long, au moins trois enzymes de restriction de "tétra-cutter" sont utilisées. Une sélection appropriée des enzymes de restriction est également importante, car différentes enzymes de restriction peuvent donner des résolutions différentes des modèles de bandes [2].

Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose et les fragments d'ADN sont visualisés sous la lumière UV. Les profils seront ensuite comparés avec les bases de données pertinentes pour l'identification (*figure 2*) [8, 2].

Cette technique est utile si une sélection correcte des enzymes de restriction et l'électrophorèse a été faite pour résoudre les bandes de restriction correctement. Elle s'est révélée utile uniquement pour la différenciation des genres et des espèces, mais pas pour la discrimination intraspécifique des différents isolats bactériologiques [2].

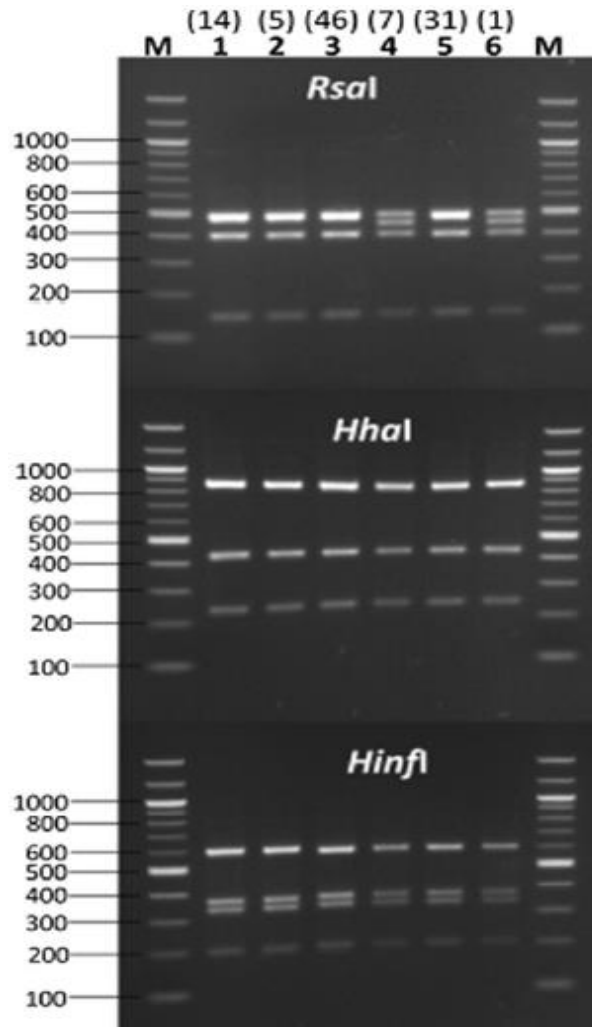


Figure 2 : Profils ARDRA enregistrés pour 104 isolats de *Bacillus* digérés avec les enzymes *RsaI*, *HhaI* et *HinfI*, respectivement. Chaque voie représente un point d'échantillonnage de l'échantillon et le temps d'échantillonnage. Le nombre d'isolats ayant le même dépôt d'ADN est indiqué entre parenthèses [8].

2.4. PCR-Ribotypage long

Comme moyen d'améliorer la capacité de différenciation du PCR-ribotypage suivi de la restriction enzymatique, Smith-Vaughan et *al.* ont élaboré le ribotypage par PCR long [4]. Cette technique est fondée sur l'amplification par PCR de l'opéron ribosomal 16S-23S-5S entier de longueur allant jusqu'à 6 kpb suivi de la digestion par l'endonucléase de restriction.

Les produits peuvent être ensuite visualisés d'une manière simple par l'électrophorèse en gel d'agarose [4, 2]. Cette méthode est considérée comme plus discriminante que le séquençage 16S seul, en ce sens qu'elle couvre l'ISR, plus variable, mais qui possède néanmoins les avantages épidémiologiques de la conservation spécifique des espèces 16S, et aussi les gènes d'ARNr 23S [4, 2].

2.5. Polymorphisme de la longueur du fragment de restriction terminale du gène de l'ARNr 16S (T-RFLP de l'ARNr 16S)

Il s'agit d'une méthode basée sur la PCR dans laquelle le gène 16S ARNr est amplifié avec des amorces étiquetées à l'extrémité 5'. Les produits amplifiés sont soumis à une digestion de restriction à l'aide d'enzymes, et les fragments de restriction terminale étiquetés fluorescents sont ensuite séquencés sur un séquenceur automatisé. Les membres de groupes phylogénétiques étroitement liés ont souvent les mêmes tailles de fragments de restriction terminale [2].

-
- [1] **M. Matloob et M. Griffiths**, «Ribotyping and Automated Ribotyping of *Listeria monocytogenes*,» chez *Listeria monocytogenes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 1157, Humana Press, New York, NY, 2014.
- [2] **S. Kashyap, S. Maherchandani et N. Kumar**, «Ribotyping: A Tool for Molecular Taxonomy,» chez *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*, Elsevier Inc, 2014.
- [3] «Riboprinter system technology,» [En ligne]. Available: <https://www.hygiena.com/riboprinter-system-technology.html>.
- [4] **P. Pal**, «Ribotyping as a molecular biological technique for studying diversity in *Shigella* isolates - A Review,» *International Letters of Natural Sciences*, 2014.
- [5] **H. Tanja**, Characterization of bacteria causing outbreaks by using molecular methods in a clinical microbiology laboratory, Helsinki: ACADEMIC DISSERTATION, 2015.
- [6] **P. Lanotte, C. Isnard et al**, «Du prélèvement à la caractérisation des souches,» chez *Bactériologie médicale: techniques usuelles*, 3 éd., Paris, Elsevier Masson SAS, 2016, pp. 14-43.
- [7] **B. Probodh**, Molecular typing of bacterial pathogens with special reference to *Salmonella*, Khanapara, 2018.
- [8] **S. Nel, S. B. Davis, A. Endo et L. M. T. Dicks**, «Diferentiation between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* isolated from a South African sugarcane processing factory using ARDRA and rpoB gene sequencing,» *Archives of Microbiology*, 2019.

RESUME

Les méthodes génotypiques remplacent progressivement les méthodes phénotypiques en raison de leur pouvoir discriminant, sensibilité et spécificité plus élevés. Le typage des bactéries est la caractérisation d'isolats ou des souches au-dessous de l'espèce ou de la sous-espèce.

De manière générale, les systèmes de génotypage sont utilisés pour étudier la dynamique des populations bactériennes et la propagation des bactéries et autres micro-organismes qui subissent une reproduction non sexuelle (clonale), dans la nature ou en milieu clinique, à des niveaux allant d'un seul hôte à l'écosystème de la population mondiale. Il est également utilisé pour étudier la structure des populations bactériennes, leur diversité génétique et la pathogénicité des infections. Il peut être effectué, selon la situation : (i) localement, dans un hôpital ou un autre laboratoire primaire, pour de petites investigations ; (ii) au niveau régional ou national, dans un laboratoire de référence, pour traiter des questions plus larges de santé publique et de surveillance ; ou (iii) à l'international, à travers des réseaux collaboratifs, pour définir ou étudier la diffusion mondiale des principaux clones bactériens.

Les méthodes de génotypage actuellement utilisées peuvent être classées en trois grandes catégories : (i) les méthodes basées sur la restriction enzymatique ; (ii) les méthodes basées sur l'analyse de profils de bandes après amplification de régions cibles ; et (iii) les méthodes basées sur le séquençage d'ADN. Bien que ces techniques ne soient pas toutes aussi efficaces pour le typage de tous les organismes, l'électrophorèse en champ pulsé est depuis longtemps considérée comme le « Gold standard » pour le typage de la plupart des agents pathogènes nosocomiaux. Cependant, avec l'évolution des techniques de nouvelle génération, le séquençage du génome entier des pathogènes est devenu la norme de référence. Néanmoins, les praticiens sont souvent limités en raison des coûts ou du manque de ressources. Par conséquent, du moins dans l'avenir immédiat, l'électrophorèse en champ pulsé continuera d'être la méthode la plus fréquemment employée en matière de génotypage bactérien.

Mots clés: génome bactérien, typage moléculaire, génotypage, électrophorèse en champ pulsé, séquençage du génome entier.

BOUROUBA Saoucen

saoucen17@gmail.com

06.73.46.80.29

BEN ADEL Amel

amelben2994@gmail.com

06.63.61.08.67

ACHOUR Hadjer

hadjer95ph@gmail.com

06.76.77.02.65