

LE DIAGNOSTIC IN VITRO ET LA PRISE EN CHARGE DES MALADIES INFECTIEUSES

Danièle Olivier

Parties des programmes associées

Programme d'enseignement physique et chimie de terminale, spécialité : Déterminer la composition d'un système par des méthodes physiques et chimiques

Programme d'enseignement scientifique commun de terminale : Thème 3 – Une histoire du vivant

Programme de première SVT : Thème 3 – Corps humain et santé

Mots-clés : diagnostic, sepsis, maladies infectieuses, résistance aux antibiotiques, médecine personnalisée

INTRODUCTION

La valeur médicale, économique et sociétale du diagnostic est fondamentale, 60 à 70 % des décisions médicales s'appuient sur les résultats d'au moins un test de diagnostic.

L'importance du diagnostic se révèle dans tous les domaines de la médecine, notamment dans la prise en charge des maladies infectieuses comme on le voit avec la pandémie de la COVID 19. La valeur et l'impact du diagnostic sont de plus croissants dans le domaine politique et sociétal.

Les délais d'analyses doivent être de plus en plus courts afin de rendre la médecine précise et personnalisée. Les performances grandissantes des outils diagnostiques s'expliquent par des ruptures technologiques majeures pour lesquelles la chimie représente naturellement une source d'innovation essentielle.

Bien qu'il ne représente que 2 % des dépenses de santé, le diagnostic in vitro – c'est-à-dire réalisé en milieu artificiel en laboratoire – est considéré comme essentiel dans 70 % des décisions médicales. Il regroupe toutes les techniques, tous les appareils ou les dispositifs utilisés sur des échantillons de tissus ou des liquides biologiques humains ou animaux dans un but de diagnostic des pathologies au sein des laboratoires médicaux.

C'est la pierre angulaire de la médecine personnalisée qui a transformé l'oncologie et qui est en train de transformer le domaine des maladies infectieuses.

Les progrès diagnostiques très récents qui ont permis d'améliorer considérablement la prise en charge des patients sont présentés. L'exposé est complété par une projection dans le futur pour illustrer l'impact pressenti sur la lutte contre la résistance aux antibiotiques et la relance de l'innovation thérapeutique dans ce domaine.

LE SEPSIS

Définition et symptômes du sepsis

Le sepsis ou le choc septique, qui en est la forme la plus grave, est défini comme une infection grave à laquelle l'organisme va surréagir en aboutissant au final à des défaillances d'organes. Le sepsis est une maladie très grave, très fréquente et malheureusement peu connue.

Le sepsis peut apparaître à la suite d'une intervention chirurgicale qui s'est par ailleurs très bien passée, ou plus récemment comme nous venons de le voir avec la pandémie de COVID 19, lors d'une infection virale.

On estime à environ 30 millions, le nombre de cas de sepsis post-opératoires dans le monde et on envisage que ce chiffre puisse doubler d'ici 2050, à cause du vieillissement de la population. L'OMS en a fait une priorité mondiale depuis 2017.

Le diagnostic : clé pour l'identification des agents pathogènes

L'objectif du clinicien est de connaître le plus rapidement possible, l'identité de la bactérie ou du pathogène responsable du sepsis. Chaque heure de retard prise dans la mise en place d'une thérapie efficace est corrélée à une augmentation de la probabilité de décès du patient, parfois dans les heures ou dans les jours qui suivent.

Le deuxième objectif est d'ajuster le traitement le plus rapidement possible afin d'éviter que le patient soit traité par des médicaments dont il n'a pas besoin et qui peuvent être toxiques au niveau des organes.

Afin d'identifier les agents pathogènes, on réalise deux types de prélèvements sur le patient :

- ▶ un prélèvement sanguin pour faire une hémoculture dans l'hypothèse d'une généralisation de l'infection au niveau du sang, ce qui serait un signe d'aggravation,
- ▶ un prélèvement pulmonaire quand on envisage qu'il y a une chance que l'infection soit d'origine pulmonaire.

IDENTIFICATION ET PROFIL DES AGENTS PATHOGÈNES RESPONSABLES DE L'INFECTION

Actuellement, l'identification et l'étude de la sensibilité des micro-organismes nécessitent plusieurs étapes qui reposent principalement sur la détection des caractéristiques phénotypiques du germe étudié. L'utilisation de colorations (par exemple, la coloration de Gram), la morphologie des colonies, l'examen au microscope, l'isolement en culture sur différents milieux, les tests biochimiques, qu'ils soient réalisés manuellement ou par des automates, sont les principes même de la classification et de l'identification des bactéries, des levures et des champignons. Ces approches, utilisées depuis de nombreuses années, permettent le rendu des résultats dans un laps de temps compris entre 24 h et 72 h.

La mise en culture

La première étape pour identifier les agents pathogènes est l'ensemencement d'un milieu de culture.

- ▶ L'hémoculture est l'ensemencement d'un milieu de culture avec du sang. Cette technique ancienne est maintenant automatisée pour avoir des identifications régulières des échantillons et des résultats rapides. La composition des milieux de culture est adaptée pour optimiser la prolifération des bactéries et augmenter la rapidité des résultats.
- ▶ Les prélèvements pulmonaires sont ensemencés dans des boîtes de Pétri. C'est une technique utilisée depuis longtemps en microbiologie. Cette technique, qui sert à la croissance des colonies bactériennes, a bénéficié d'innovations chimiques qui permettent d'obtenir comme on le voit sur l'exemple de la **figure 1**, très rapidement à partir de réactifs chimiques sélectifs, une information sur l'appartenance à la famille bactérienne responsable de l'infection, cela à partir de la couleur dans différents milieux de culture ou à partir de l'observation de la morphologie de la colonie qui a poussé.

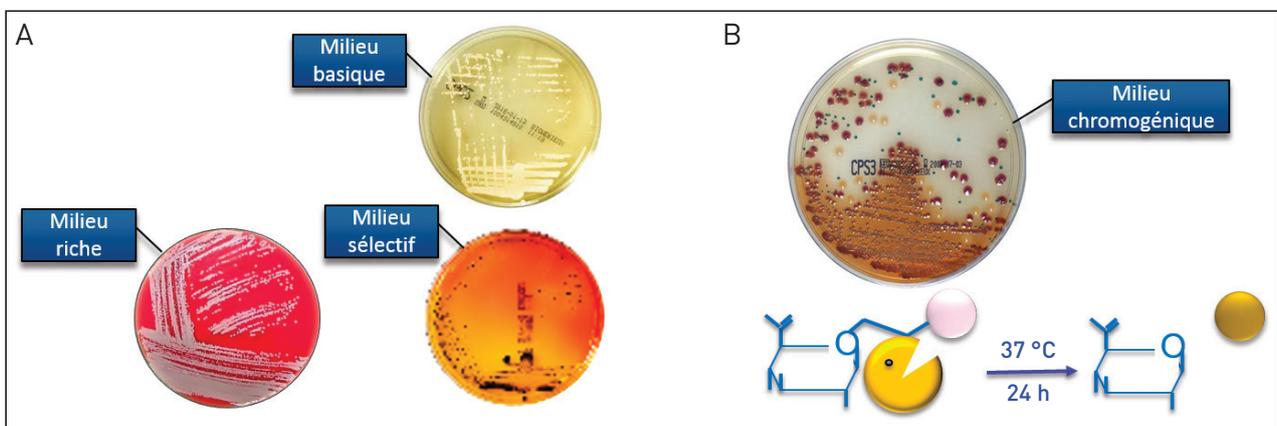


Figure 1 – Boîte de Pétri pour l'analyse des agents pathogènes.

L'identification des agents pathogènes

La précision dans l'identification des agents pathogènes dépend des techniques utilisées.

Les techniques colorimétriques automatisées analysent les caractéristiques biochimiques et enzymatiques et permettent d'aller plus loin dans l'identification des agents pathogènes (Figure 2A).

A

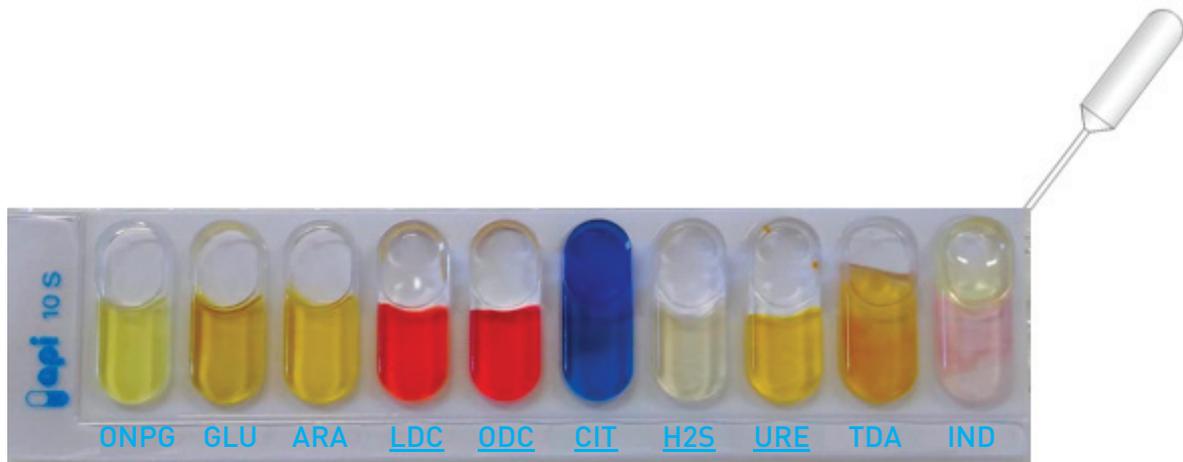


Figure 2A – Les techniques colorimétriques permettent d'analyser les caractères biochimiques et enzymatiques des pathogènes.

L'antibiogramme permet de tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Pour cela, du papier buvard imprégné d'antibiotique à une certaine dose est déposé sur la boîte de Pétri : la bactérie sensible disparaît autour du papier buvard (Figure 2B).

B



Figure 2B – L'antibiogramme permet de tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'antibiotiques. Cela contribue à son identification, à dresser sa carte d'identité, à lister ses caractéristiques.

Les nouvelles technologies d'identification

Les nouvelles techniques spectroscopiques et biologiques permettent d'augmenter la précision de l'analyse mais elles ne peuvent être réalisées que dans des laboratoires spécialisés privés ou en milieu hospitalier

La spectrométrie de masse MALDI-TOF

Initialement réservée au domaine de la recherche, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF fait, depuis peu de temps, son apparition dans les laboratoires de microbiologie hospitalière et aussi d'analyse médicale. L'essor de cette technologie est lié à la grande précision et à la rapidité d'identification des bactéries, levures mais aussi champignons, à son utilisation aisée, à la simplicité de son intégration en routine dans les laboratoires, et au faible coût des analyses. De plus, cette approche peut être utilisée pour identifier directement les micro-organismes à partir des prélèvements dont les hémocultures et les urines, permettant au final, d'optimiser la prise en charge des patients.

La désorption-ionisation laser assistée par matrice (en anglais *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* ou MALDI) est une technique d'ionisation douce utilisée en spectrométrie de masse. Elle permet l'ionisation et la vaporisation de biomolécules, des sucres et de grosses molécules organiques. Ces molécules ont tendance

à se fragmenter lorsqu'elles sont ionisées par des méthodes plus conventionnelles. Dans son application en microbiologie elle est utilisée pour la détection des peptides.

La première étape consiste à déposer la colonie bactérienne récupérée à la surface de la boîte de Pétri sur une lame, à la mélanger à la matrice d'ionisation dont le rôle est d'absorber l'énergie provenant du laser, ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec la formation d'ions de masses différentes tout en protégeant les biomolécules de la destruction.

Le spectromètre de masse. MALDI-TOF couple la source laser avec un analyseur à temps de vol, qui permet de différencier les molécules (Figure 3).

Le panel de molécules émises par l'espèce bactérienne analysée, de poids et de charges différentes, est accéléré dans une zone où est appliquée une tension d'accélération, puis en fonction du temps de vol de ces molécules jusqu'au détecteur, on obtient un profil spécifique de l'espèce bactérienne présente dans la colonie en quelques minutes.

Tous les ions de même rapport m/z (m = masse, z = la charge) sont focalisés au même endroit. Les ions de rapport m/z le plus petit arrivent les premiers au détecteur.

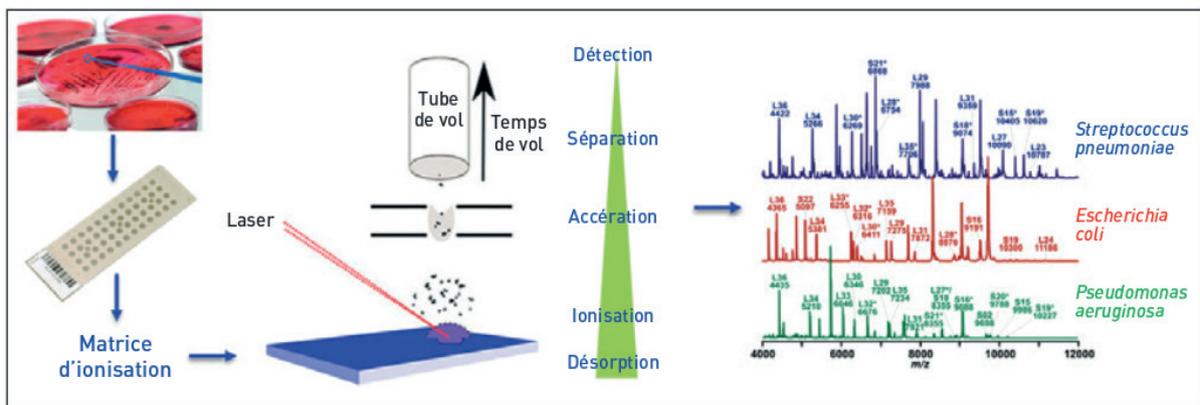


Figure 3 – La spectrométrie de masse permet d'analyser les agents pathogènes présents dans une colonie bactérienne.

Dans son application en microbiologie, la technique repose sur la détection de peptides dont la nature est mal connue. On utilise des banques de données dans lesquelles, pour une espèce bactérienne donnée, l'essentiel des pics de plusieurs souches est conservé. On compare le spectre de la souche à tester aux pics spécifiques de la banque de données.

La technique PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique d'amplification enzymatique qui permet d'obtenir des millions de copies de fragments d'ADN, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique (de l'ordre du picogramme) soit pour détecter la présence d'un gène, soit pour quantifier le nombre d'acides nucléiques dans un prélèvement biologique. La découverte de cette technique en 1986 par Kary Mullis lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993.

Utilisée dans le domaine de la recherche au départ, elle l'est maintenant largement dans le domaine du diagnostic pour rechercher la présence d'un certain nombre de bactéries ou de virus responsables d'infections pulmonaires à partir de l'analyse des gènes de ces agents pathogènes. On peut rechercher aussi la présence de certains gènes liés à la résistance aux antibiotiques.

Le test PCR est maintenant automatisé grâce à la technologie FilmArray développée par la société Biofire du groupe Biomérieux.

Le dispositif automatisé est de la taille d'une main (Figure 4).

Le prélèvement biologique du patient est déposé dans le port d'injection. À l'autre extrémité est déposé un tampon qui réhydrate les réactifs à l'intérieur de la poche réactionnelle. Toutes les étapes de la technique PCR d'amplification de l'ADN sont intégrées à l'intérieur de la poche (Figure 5).

- ▶ La destruction des membranes cellulaires (la lyse).

- ▶ L'extraction des acides nucléiques (motifs moléculaires constitutifs de l'ADN ou de l'ARN).
- ▶ Une première étape PCR1 qui cible les pathogènes généralement responsables d'infections pulmonaires.
- ▶ Une deuxième étape PCR2 permet de faire une analyse génétique des pathogènes qui conduira à la liste des virus et bactéries présents.

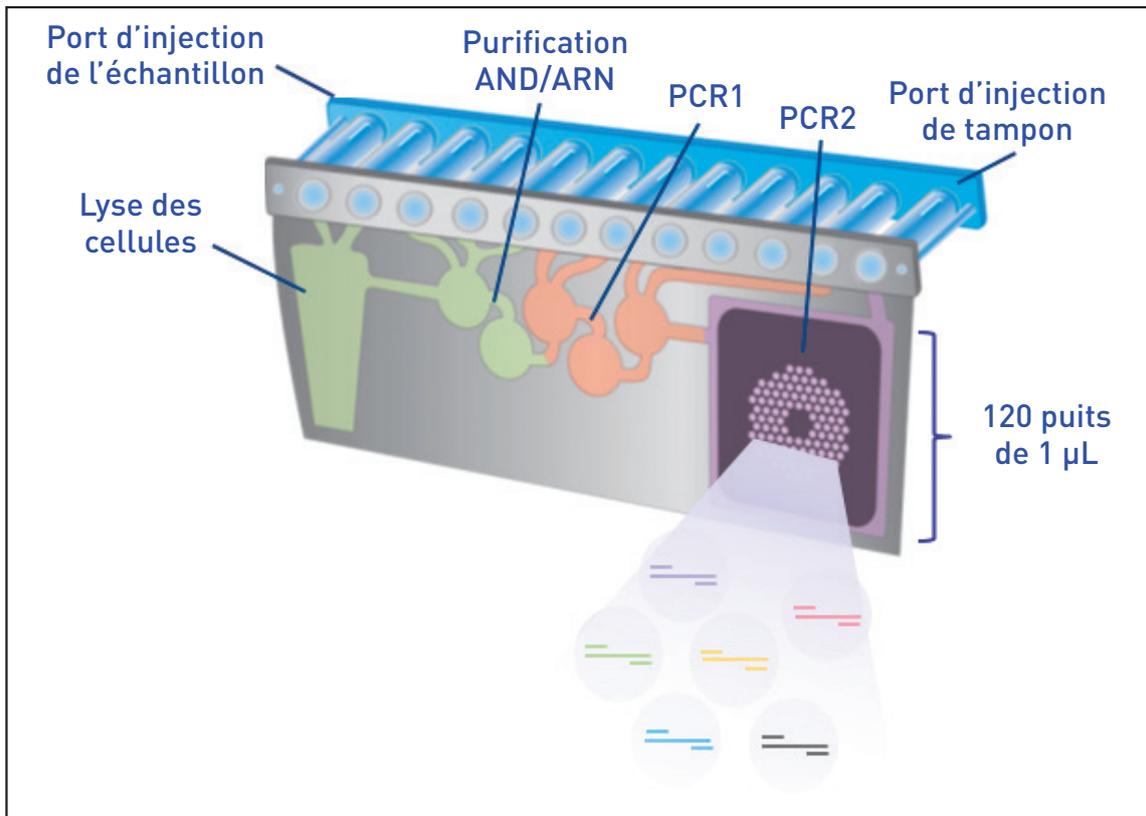


Figure 4 – Principe de fonctionnement de la technologie de BioFire, FilmArray®, qui permet de cibler les pathogènes responsables de l'infection, puis de faire une analyse génétique des pathogènes qui donnera la liste des virus et bactéries présents.

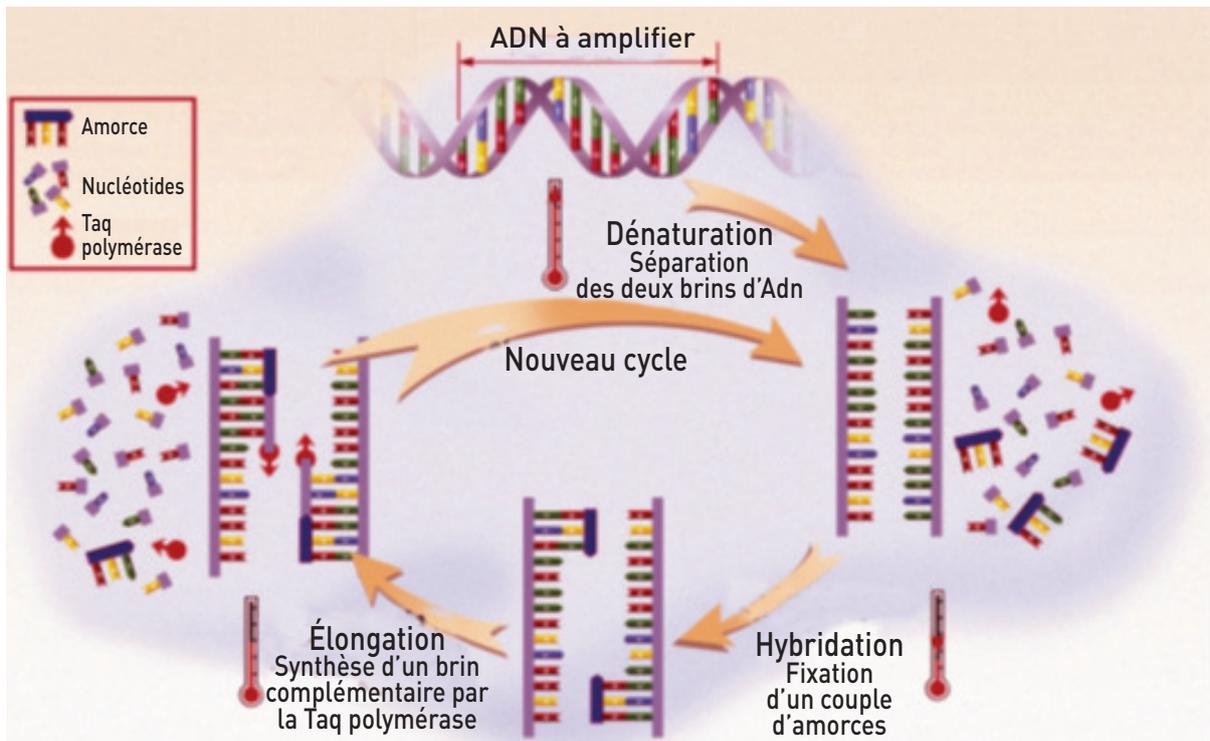


Figure 5 – Principe de la PCR [Polymerase Chain Reaction], technique d'amplification de l'ADN.

Dans Le cas de la COVID 19, le test PCR permet de mettre en évidence le matériel génétique ARN du virus à partir de prélèvements nasopharyngés.

Il aura fallu moins de deux mois pour développer, produire en France et commercialiser le premier test, ARGENE® SARS-CoV-2R-GENE®, un test RT-PCR ciblant deux gènes spécifiques du nouveau Coronavirus (RdRp gène et N-gène), ainsi qu'un gène générique (E-gène) des Sarbecovirus, famille à laquelle le SARS-CoV-2 appartient.

La première PCR permet la détection spécifique de SARS -CoV-2 sur les deux gènes distincts. La seconde PCR permet la détection de tous les virus du type SARS sans les différencier mais elle contient un contrôle cellulaire qui permet d'évaluer la qualité de l'échantillon initial.

Le test est réalisable sur de nombreux systèmes automatisés présents dans les laboratoires et permet de tester un grand nombre de patients à la fois, en environ quatre heures.

Le séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La séquence d'ADN contient l'information nécessaire aux êtres vivants pour survivre et se reproduire.

Ce n'est pas un outil de routine mais il est de plus en plus utilisé par les cliniciens dans des laboratoires spécialisés. Certains suggèrent que l'analyse par séquençage permettrait de remplacer toutes les étapes de la microbiologie et que l'on pourrait ainsi identifier le profil de résistance et même prédire le dosage d'antibiotiques qu'il est nécessaire d'administrer au patient.

CONCLUSION

Même si un antibiogramme permet déjà une thérapeutique plus personnalisée, la médecine personnalisée dans le domaine des maladies infectieuses a une dizaine ou une quinzaine d'années de retard par rapport au domaine de l'oncologie. L'utilisation des nouvelles méthodes d'identification précise des agents pathogènes comme la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans les laboratoires d'analyses médicales et en milieu hospitalier est récente.

Il est clair qu'avec la pandémie liée au COVID 19 les choses vont évoluer et que la biologie moléculaire va jouer un rôle essentiel, à la fois sur le volet identification du pathogène que sur le volet réponse de l'hôte.

On va évoluer vers des technologies d'analyses complexes permettant de caractériser le système immunitaire des patients.

L'infection n'est que le déclencheur du syndrome septique alors que dans les cas graves, le patient peut entrer dans une phase de défaillance immunitaire profonde et persistante qui entraîne une récurrence des infections alors même que les antibiotiques étaient efficaces au départ. Aujourd'hui, on ne dispose d'aucun outil pour caractériser le statut immunitaire des patients de manière reproductible et standardisée. Deux nouvelles technologies semblent avoir une chance de pouvoir résoudre ce problème :

– le test fonctionnel immunitaire IFA. Il consiste à étudier si le système immunitaire du patient est fonctionnel ou pas.

Des cellules prélevées sur le patient sont stimulées ex vivo avec un agent stimulant général et global. Mais à ce stade, cette technologie prometteuse n'est pas encore développée,

– les biomarqueurs transcriptomiques. La transcriptomique permet, grâce à l'analyse des ARN messagers (Figure 6), d'identifier des biomarqueurs caractérisant le système immunitaire des patients.

Ces outils ont permis d'identifier des marqueurs de l'état immunitaire du patient que l'on peut maintenant quantifier de façon totalement automatisée grâce à la technique FilmArray®, décrite précédemment sur la figure 4.

Ce test immunitaire en cours de développement pourra être réalisé dans des délais adaptés à la clinique, accessibles 7 jours sur 7 et 24 heures sur 24.

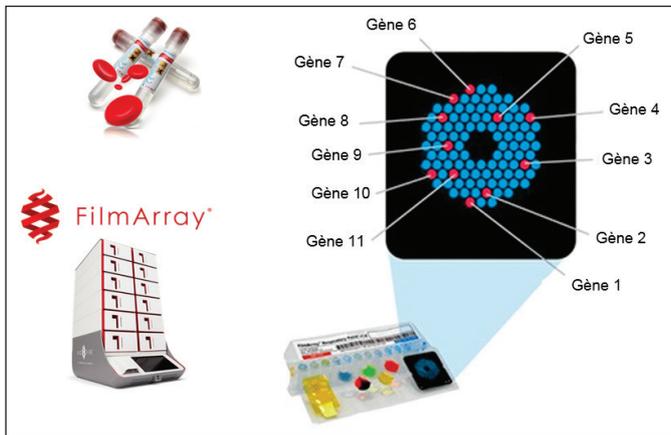


Figure 6 – identification d'ARN messagers en rouge, marqueurs de l'état immunitaire du patient.

Mais la R&D va générer une énorme quantité de données très difficiles à interpréter par le clinicien. L'avenir repose donc sur la création d'outils qui permettront d'intégrer ces informations pour les rendre facilement utilisables par le clinicien.

SOURCE PRINCIPALE

Chimie et nouvelles thérapies, EDP Sciences, 2020, ISBN 978-2-7598-2469-4, « L'innovation diagnostique au service de la médecine personnalisée pour la prise en charge du sepsis et des maladies infectieuses » par Alexandre Pachot.

POUR EN SAVOIR PLUS

- Site Médiachimie :
 - Étudier et combattre les bactéries pathogènes : <https://www.mediachimie.org/ressource/outils-crispr-pour-etudier-et-combattre-les-bacteries-pathogenes>
 - Diagnostic médical à l'échelle nanométrique : détection des biomarqueurs des maladies par des techniques de fluorescence : <https://www.mediachimie.org/ressource/diagnostic-medical-a-l-echelle-nanometrique-detection-des-biomarqueurs-des-maladies-par>
- Sur le même sujet
 - Nouveaux revêtements antimicrobiens pour les dispositifs médicaux : des stratégies contre les maladies nosocomiales ? <https://www.mediachimie.org/ressource/nouveaux-revetements-antimicrobiens-pour-les-dispositifs-medicaux-des-strategies-contre>
 - Les maladies tropicales négligées : un modèle collaboratif au service de l'innovation scientifique et médicale : <https://www.mediachimie.org/ressource/les-maladies-tropicales-negligees---un-modele-collaboratif-au-service-de-l-innovation>
 - La photoluminescence au service de la médecine : <https://www.mediachimie.org/ressource/la-photoluminescence-au-service-de-la-medecine>

Danièle Olivier est vice-présidente de la Fondation de la Maison de la Chimie

Comité éditorial : Danièle Olivier, Jean-Claude Bernier, Grégory Syoen