

L'innovation diagnostique au service de la médecine personnalisée pour la prise en charge du sepsis et des maladies infectieuses

Alexandre Pachot est Directeur des Partenariats de recherche chez Biomérieux¹, une société française, historiquement lyonnaise, fondée en 1963 par Alain Mérieux, dont le grand-père était un élève de Louis Pasteur, et maintenant pilotée par son fils Alexandre Mérieux.

D'après la conférence d'Alexandre Pachot

1. www.biomerieux.com

Ce chapitre a pour objet d'illustrer l'importance que représente le diagnostic dans la prise en charge des patients, et en particulier pour des maladies infectieuses. Le diagnostic *in vitro* est considéré aujourd'hui comme étant essentiel dans environ 70 % des décisions médicales, pour autant, il ne représente que 2 % des dépenses de santé. C'est sans doute quelque chose qui va évoluer dans le temps puisque c'est la pierre angulaire de ce qu'on appelle la médecine personnalisée, qui a réellement transformé le domaine de l'oncologie et qui est en train de transformer aussi le domaine des maladies infectieuses.

1 Présentation du sepsis

1.1. Les symptômes du sepsis

Prenons l'exemple d'un patient que nous appellerons Maxime : il a 54 ans, il n'a pas particulièrement d'antécédents médicaux. Il est en pleine forme, il travaille. Son chirurgien cardiologue lui diagnostique un anévrisme aortique¹. Il a une chirurgie programmée et est pris en charge dans un grand centre hospitalo-universitaire. La chirurgie se passe très bien mais trois jours plus tard, il a un pic de fièvre et a des difficultés à respirer. Cinq jours plus tard, il se retrouve dans un service de réanimation avec une défaillance pulmonaire importante qui nécessite une assistance de ventilation. Il a également une défaillance cardiovasculaire majeure avec une chute de tension persistante. Ce patient a un choc septique.

Le sepsis, ou le choc septique, qui est la forme la plus grave du sepsis, est défini comme étant une infection grave. C'est un syndrome, une situation clinique qui est provoquée par une infection, et en réponse à cette infection, l'organisme va surréagir, aboutissant au final à des défaillances d'organes, en l'occurrence ici, une défaillance pulmonaire et cardiovasculaire (**Figure 1**).

Cet exemple est loin d'être un cas isolé, puisqu'on considère

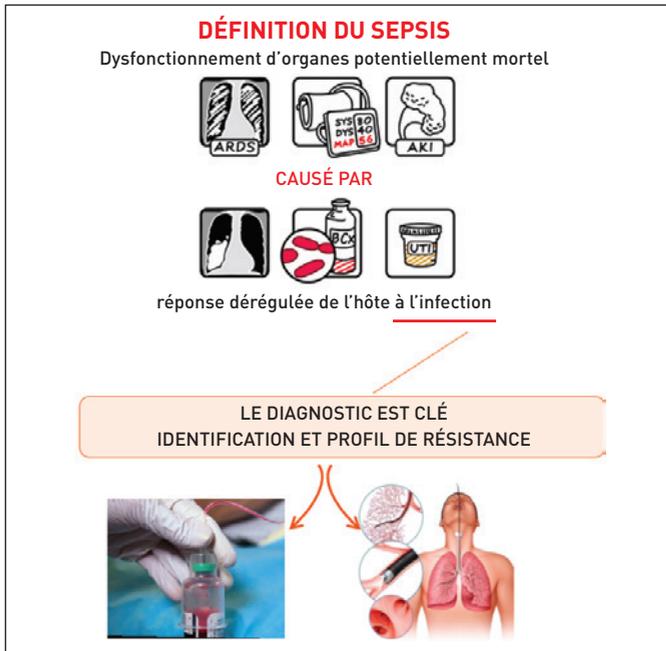


Figure 1

Le choc septique est une infection qui touche des organes vitaux et qui peut causer le décès du patient. Il est essentiel de mettre en place rapidement une antibiothérapie à spectre large car le retard de traitement par un antibiotique adapté augmente la mortalité.

1. Anévrisme aortique : dilatation locale de l'aorte, qui est la plus grosse artère du corps, elle part du cœur et se divise en bas du dos pour irriguer les jambes.

qu'il y a environ trente millions de cas de sepsis dans le monde chaque année, et c'est probablement sous-estimé. On envisage que ce chiffre va doubler d'ici 2050, notamment à cause du vieillissement de la population. On considère également qu'il y a un décès lié au sepsis toutes les trois à quatre secondes dans le monde.

Pour autant, c'est très peu connu du grand public, une des raisons pour lesquelles, notamment, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en a fait une priorité mondiale depuis 2017.

1.2. Le diagnostic : clé pour l'identification des agents pathogènes et du profil de résistance aux antibiotiques

Quand un patient est pris en charge pour un sepsis, le clinicien et le réanimateur sécurisent les organes vitaux, ce qu'ils font très bien pendant les toutes premières heures, notamment dans les pays occidentaux. L'objectif du clinicien est d'identifier l'origine du sepsis, en l'occurrence l'infection, et de mettre le patient sous antibiotiques le plus rapidement possible. On sait en effet que chaque heure de retard de mise en place d'une antibiothérapie efficace est fortement corrélée à une augmentation du décès du patient dans les heures ou les jours qui suivent. À ce moment-là, le problème du clinicien est qu'il ne connaît pas l'identité de la bactérie ou du pathogène responsable de l'infection. Il est donc obligé d'utiliser une antibiothérapie à large spectre, généralement un cocktail d'antibiotiques,

pour pouvoir couvrir la bactérie responsable (**Figure 2**).

Le deuxième objectif du clinicien est d'ajuster ce traitement antibiotique le plus rapidement possible, et cela, pour deux raisons principales :

- éviter que le patient soit traité par des médicaments dont il n'a pas besoin : certains de ces antibiotiques peuvent en effet être toxiques pour certains organes, notamment au niveau du rein. Cela peut également complètement perturber son microbiote intestinal, dont on connaît de plus en plus l'importance pour la santé humaine (voir le **Chapitre de J. Doré** dans cet ouvrage *Chimie et nouvelles thérapies*, EDP Sciences, 2020) ;

- une raison sociétale : les résistances aux antibiotiques émergent du fait de leur surutilisation. Or, de moins en moins de nouveaux antibiotiques sont découverts et sont mis sur le marché. Nous avons donc une sorte de bombe à retardement entre nos mains, et on envisage, d'ici 2050, environ dix millions de morts liés au fait que nous n'aurons plus d'antibiotiques efficaces dans certaines situations cliniques. Pour ces deux raisons, individuelle et sociétale, il est vraiment important d'adapter l'antibiothérapie du patient. C'est pourquoi le diagnostic est un facteur clé qui prend à ce niveau toute sa valeur.

Afin d'identifier les agents pathogènes et leur profil de résistance aux antibiotiques, on réalise deux prélèvements sur le patient :

- un prélèvement sanguin pour réaliser une hémoculture, car le clinicien et le

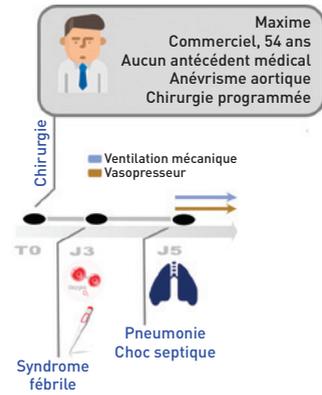


Figure 2

Les problèmes du traitement du choc septique par une antibiothérapie à spectre large est la résistance aux antibiotiques qui augmente, tandis que le retard de traitement par un antibiotique adapté augmente la mortalité.

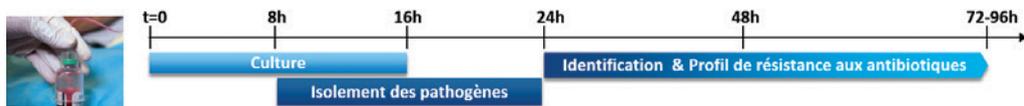


Figure 3

Les étapes microbiologiques pour identifier les agents pathogènes et leurs profils de résistance aux antibiotiques.

réanimateur veut écarter l'hypothèse d'une généralisation de l'infection au niveau systémique, au niveau du sang, qui est un signe d'aggravation ;

- un prélèvement pulmonaire puisque, au vu de la clinique de l'exemple choisi, on envisage qu'il y a une grande chance que l'infection soit d'origine pulmonaire.

2 Identification et profil de résistance des agents pathogènes responsables de l'infection

L'objectif de la microbiologie est de fournir le plus rapidement possible au clinicien la carte d'identité du ou des pathogènes responsables de l'infection, ainsi que leurs profils de résistance aux antibiotiques ou de susceptibilité aux antibiotiques. C'est un domaine qui a, comme beaucoup de domaines de la biologie, bénéficié de deux types d'innovations :

- les innovations incrémentales, à savoir celles qui permettent de faire évoluer des approches anciennes en les rendant plus performantes ;
- les innovations de rupture grâce à de nouvelles approches technologiques.

L'analyse microbiologique repose généralement sur trois ou quatre étapes : la mise en culture pour faire proliférer la bactérie au laboratoire, l'isolement des agents pathogènes,

puis l'utilisation de différentes techniques qui permettent de les identifier et de définir leur profil de résistance (**Figure 3**).

2.1. La mise en culture

L'hémoculture fait partie des examens bactériologiques anciens ayant bénéficié d'innovations en termes d'automatisation pour avoir des lectures des bouteilles d'hémoculture le plus régulièrement possible et rendre le résultat au clinicien plus rapidement (**Figure 4**). Les hémocultures ont également bénéficié d'innovations au niveau de la composition du milieu de culture à l'intérieur des bouteilles, afin d'optimiser la capacité de prolifération des bactéries et donc d'avoir un rendu de résultat plus rapide auprès du clinicien.

Le deuxième type de prélèvement qui, dans notre exemple, est un prélèvement pulmonaire est directementensemencé dans des boîtes de Pétri. Ces milieux de culture solides font aussi partie des approches anciennes de la microbiologie, mais qui ont énormément bénéficié d'innovations chimiques dans leur composition pour les rendre de plus en plus riches et de plus en plus spécifiques. Par exemple, sur la **Figure 5** (à droite), on observe ce qu'on appelle des milieux chromogéniques : à partir de la morphologie de la colonie qui a poussé sur la boîte de Pétri ou de sa couleur dans différents milieux



Figure 4

L'hémoculture, un examen bactériologique consistant à rechercher la présence de germes (microbes) dans le sang, est maintenant automatisée. À droite : capteur de CO₂ contenant un indicateur de pH.

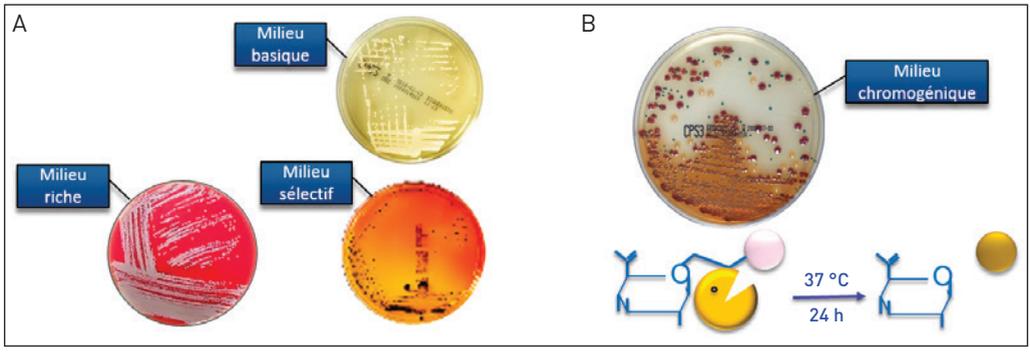


Figure 5
Boîte de Pétri pour l'analyse des agents pathogènes.

(à gauche), on peut déjà avoir une information sur l'espèce bactérienne responsable de l'infection.

2.2. Isolement des pathogènes

Historiquement, l'identification des pathogènes repose sur des techniques colorimétriques qui analysent leurs caractéristiques biochimiques et enzymatiques (Figure 6A). Ces outils ont également été automatisés ces dernières décennies.

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques

supposés ou connus. On utilise du papier buvard imprégné d'antibiotiques à une certaine dose et que l'on dépose sur la boîte de Pétri : la bactérie sensible va disparaître autour du papier buvard (Figure 6B).

2.3. Les nouvelles technologies d'identification

2.3.1. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est la première technologie de rupture qui, ces dernières années, a réellement transformé la microbiologie. La colonie bactérienne est récupérée à la surface de la boîte de culture, puis déposée sur

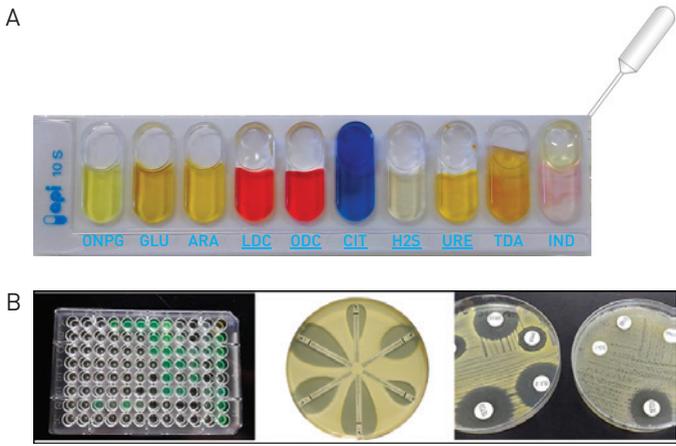


Figure 6
A) Les techniques colorimétriques permettent d'analyser les caractères biochimiques et enzymatiques des pathogènes ; B) l'antibiogramme permet de tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'antibiotiques.

une lame (**Figure 7** à gauche) et protégée par une matrice d'ionisation² à la surface de la colonie. L'ensemble est déposé dans le spectromètre de masse du type MaldiToF³, où un rayonnement laser provoque une désorption, puis une ionisation des molécules. Un panel de molécules avec des poids et des charges différentes est émis. 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.

Le très grand progrès pour l'analyse microbiologique est l'obtention de l'information en quelques minutes alors qu'auparavant, plusieurs heures voire plusieurs jours étaient nécessaires pour identifier la colonie bactérienne.

2. Matrice d'ionisation : sert à protéger la molécule qui pourrait être endommagée par le faisceau laser.

3. MaldiToF : appareil de spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser, qui va exciter la molécule, avec un analyseur à temps de vol, qui permet de différencier les molécules.

2.3.2. Le FilmArray[®] pour un ajustement rapide et ciblé des antibiothérapies

Les progrès de la biologie moléculaire ont transformé la microbiologie. La PCR (« *polymerase chain reaction* ») est une technique d'amplification enzymatique permettant d'obtenir des millions de copies de fragments d'ADN. Cette technique ancienne consiste à utiliser des enzymes d'amplification d'acides nucléiques⁴, soit pour détecter la présence d'un gène, soit pour quantifier le nombre de copie d'acides nucléiques dans un prélèvement biologique (**Figure 8**). Utilisée dans le domaine de la recherche au départ, cette technologie est maintenant largement utilisée dans le domaine du diagnostic. Son accès de manière intégrée et automatisée a été rendu possible grâce à de nouveaux outils, notamment la technologie FilmArray[®], développée par Biofire, une société de Salt Lake City devenue

4. Acides nucléiques : motifs moléculaires constitutifs de notre ADN et de notre ARN.

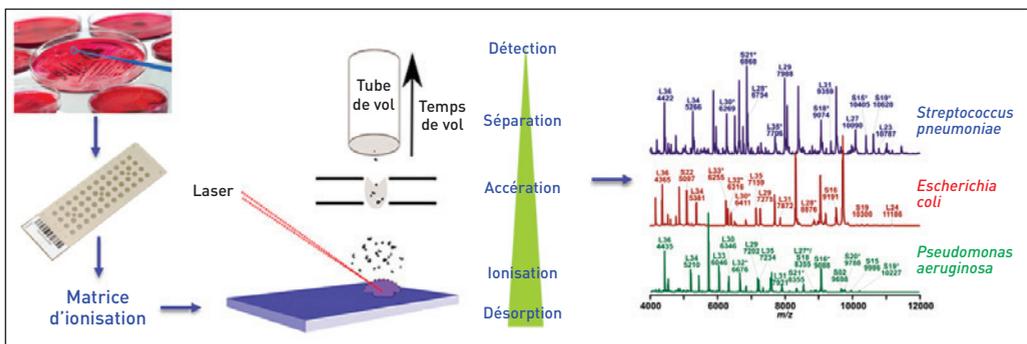


Figure 7

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

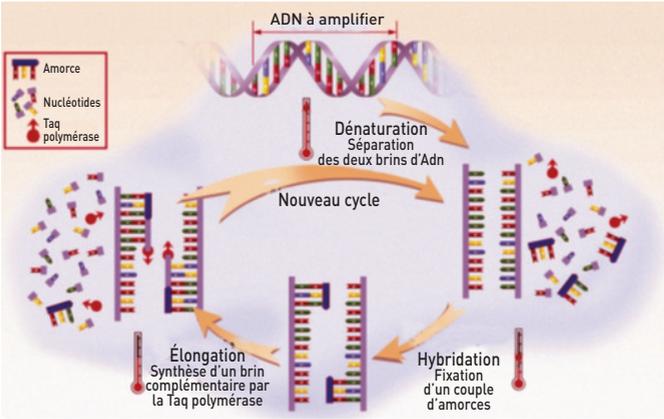


Figure 8

Principe de la PCR (« polymérase chain reaction »), technique d'amplification de l'ADN.

maintenant une société du groupe Biomérieux.

Le principe repose sur l'utilisation d'un dispositif médical automatisé, de la taille d'une main environ, dans lequel toutes les étapes de la technique PCR sont intégrées (Figure 9). Le prélèvement biologique du patient (dans notre exemple, un prélèvement pulmonaire) 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 PCR sont intégrées à l'intérieur de la poche : la lyse des cellules (destruction de la membrane cellulaire), l'extraction des acides nucléiques, puis une première PCR qui cible les pathogènes généralement responsables d'infections pulmonaires.

Ensuite, une deuxième PCR (que l'on appelle PCR nichée, ou *nested-PCR*) est mise en place sur la partie à droite 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 même obtenir une information sur le profil de résistance puisqu'on peut rechercher la présence ou non de certains gènes liés à la résistance aux antibiotiques.

Cette technique est réellement une avancée importante dans la mesure où elle permet en moins d'une heure d'avoir

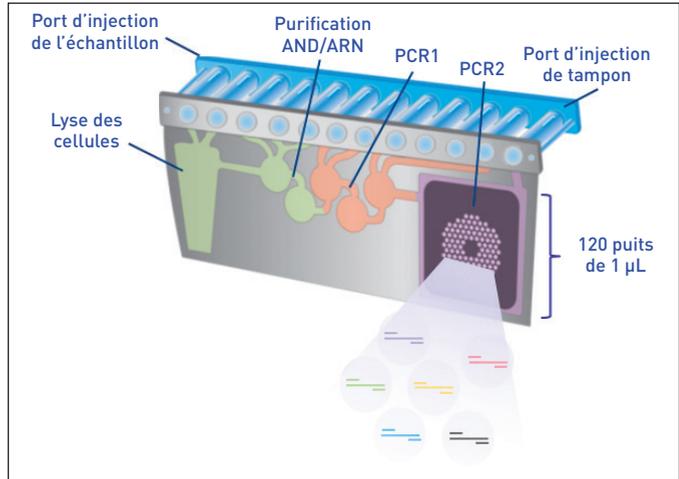


Figure 9

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.

l'information permettant au clinicien d'ajuster rapidement l'antibiothérapie.

2.3.3. Le séquençage

Les cliniciens utilisent beaucoup l'information phénotypique, c'est-à-dire l'ensemble des données observables d'un organisme, notamment à l'échelle cellulaire. La prochaine révolution technologique qui va impacter la microbiologie est probablement le séquençage⁵.

Le séquençage a énormément progressé en termes de délai de rendu de résultats, ainsi qu'en termes de profondeur de séquençage et de robustesse (Figure 10). Il trouvera naturellement une place dans le domaine de la microbiologie parce qu'il permet en particulier d'avoir une analyse beaucoup plus globale du génome bactérien.

Aujourd'hui, le séquençage n'est pas encore un outil utilisé en routine, mais plutôt dans des laboratoires spécialisés. Mais les techniques de séquençage auront incontestablement, dans quelques années, une place dans le domaine de la microbiologie. Certains suggèrent que l'analyse par séquençage permettra peut-être de remplacer toutes les étapes de la microbiologie et que l'on pourrait avoir l'identification, le profil de résistance, et même prédire le dosage d'antibiotiques qui est nécessaire d'être administré au patient. Il y a néanmoins encore énormément de chemin pour le démontrer.



Figure 10

Le séquençage a considérablement progressé en termes de robustesse grâce à l'outil informatique.

3 Les nouveaux systèmes de diagnostic en développement

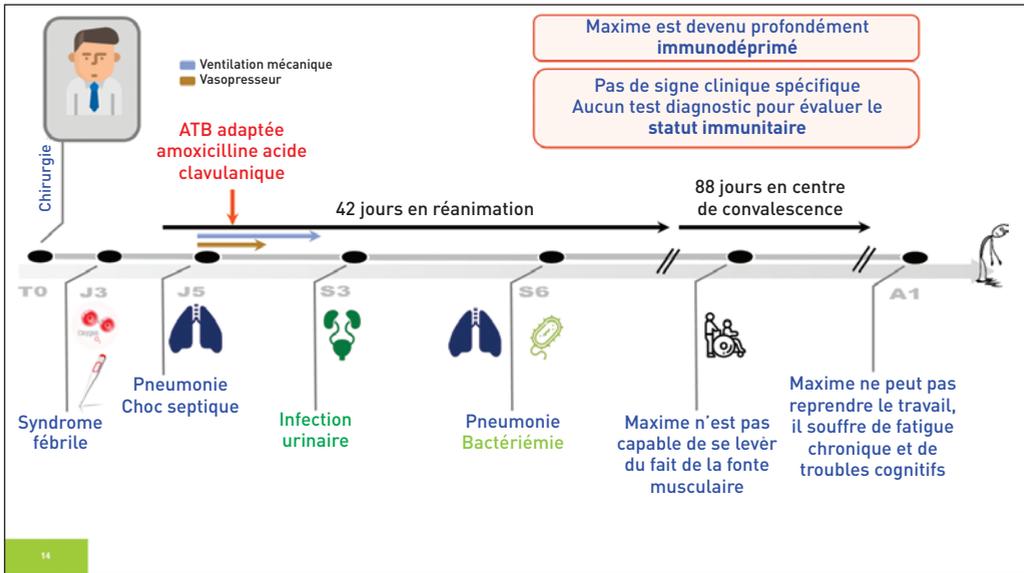
3.1. L'évaluation du statut immunitaire des patients

Reprenons l'exemple initial du patient sur lequel a été identifiée, au niveau pulmonaire, une bactérie appelée *Klebsiella Pneumoniae* (Figure 11), qui n'est pas particulièrement résistante, ce qui a permis au clinicien d'adapter l'antibiothérapie et d'utiliser un antibiotique classique, moins toxique, l'Augmentin®. Puisque le patient a été pris en charge correctement et rapidement, dans un service clinique spécialisé, on pouvait penser que les choses allaient bien se dérouler.

Pour autant, le patient n'a pas évolué de cette façon puisque trois semaines après son arrivée en réanimation, il a également fait une infection urinaire. Six semaines après son arrivée en réanimation, il fait une nouvelle infection pulmonaire : il a une bactériémie⁶ avec une hémoculture positive. Au total, il est resté 42 jours en réanimation. Quand il pouvait finalement quitter la réanimation, il était incapable de se lever, parce qu'il était resté alité pendant très longtemps, ce qui avait entraîné une fonte musculaire majeure. Il a donc été envoyé dans un service de convalescence pendant plus de 80 jours. Au final, il présentait des troubles cognitifs et une fatigue chroniques. Un an plus

5. Séquençage : détermination de l'ordre des nucléotides présents dans l'ADN.

6. Bactériémie : présence de bactéries dans le sang.



tard, il n'a ainsi toujours pas repris le travail.

Au total, il aura été traité 35 jours par des antibiotiques, et le coût direct de son hospitalisation aura été de plus de 275 000 euros, le coût d'un jour de réanimation, d'hospitalisation et de réanimation étant extrêmement élevé.

Comment cela peut-il arriver alors que la prise en charge précoce du patient a été optimale ? Tout simplement parce qu'on ne s'est en fait intéressé qu'à une facette du problème, l'infection, qui n'est que le déclencheur du syndrome septique, alors que le patient est finalement entré dans une phase de défaillance immunitaire profonde et persistante qui explique la récurrence de ses infections pendant son séjour en réanimation, malgré le fait que les antibiotiques étaient efficaces dès le départ.

Aujourd'hui on ne dispose strictement d'aucun outil pour caractériser le statut

immunitaire des patients de manière reproductible et standardisée, permettant d'avoir une information assez globale de l'état de bonne santé ou de mauvaise santé immunitaire, information pouvant être transmise au clinicien et au réanimateur pour adapter la prise en charge du patient.

Deux nouvelles technologies arrivent, qui semblent avoir une chance de pouvoir résoudre ce problème.

3.2. Le test fonctionnel immunitaire (IFA)

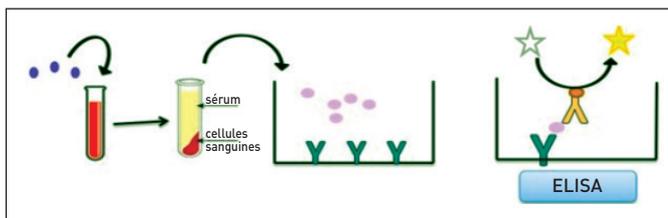
La première technologie, qui est considérée comme étant le test de référence pour les immunologistes, consiste à mesurer si le système immunitaire du patient est fonctionnel ou pas. Des cellules prélevées sur le patient sont stimulées *ex vivo* avec un agent stimulant assez général et global. Ces cellules sont incubées pendant quelques heures à 37 °C,

Figure 11

Évolution de l'état de santé du patient Maxime.

Figure 12

La stimulation *ex vivo* des cellules pour tester le système immunitaire n'est pas utilisée en clinique de routine.



et leur capacité de réponse est mesurée, notamment en dosant une cytokine⁷ qui est produite par les cellules circulantes comme les lymphocytes⁸ et les monocytes⁹ ; cette mesure permet de voir si le système immunitaire est fonctionnel (Figure 12).

Le problème est que ces outils ne sont pas du tout reproductibles, pas du tout pratiques à utiliser au laboratoire, donc encore assez peu utilisés en clinique de routine.

Des efforts d'automatisation sont en cours de développement notamment basée sur la microfluidique en gouttes développée avec les laboratoires de recherche de l'École supérieure de physique et de chimie industrielles de la ville de Paris (ESPCI). Elle consiste

à encapsuler les cellules du patient dans des gouttes (Figure 13). Dans la matrice de la goutte, a été mis un stimulant permettant de stimuler la cellule à l'intérieur, donc dans un milieu de réaction extrêmement confiné. Cela permet de mesurer la réaction cellulaire très rapidement après la simulation. À ce stade, cette technologie est encore assez futuriste, mais prometteuse.

3.3. Biomarqueurs transcriptomiques

Le deuxième test en cours de développement est basé sur la transcriptomique (Figure 14), qui est l'étude des ARN messagers. Ces molécules remplissent dans les cellules vivantes une fonction de support intermédiaire de l'information contenue dans l'ADN (gènes). Elles sont formées par la transcription de gènes de l'ADN dont elles sont une copie. Leur rôle est de transporter cette information recueillie dans le noyau de la

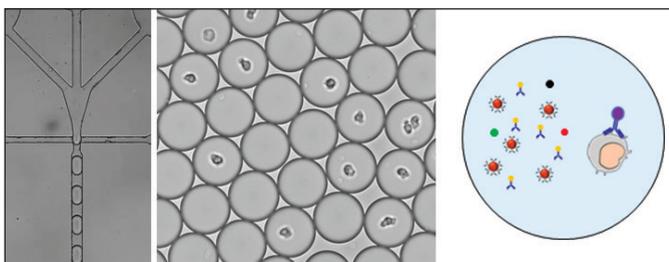
7. Cytokine : substance fabriquée par le système immunitaire qui permet de réguler la production de différentes cellules.

8. Lymphocyte : cellule présente dans le sang ayant pour but de défendre le système immunitaire.

9. Monocyte : type de lymphocyte.

Figure 13

La microfluidique permet d'encapsuler les cellules du patient dans des gouttes, à l'intérieur desquelles leur réponse à une stimulation peut être mesurée plus rapidement.



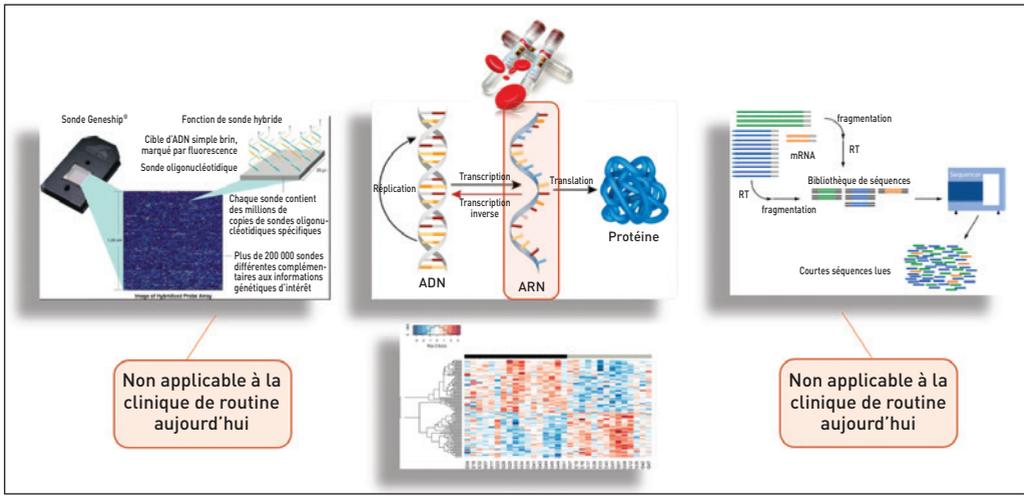


Figure 14

La transcriptomique permet, grâce à l'analyse des ARN messagers, d'identifier des biomarqueurs caractérisant le système immunitaire du patient.

cellule vers le cytoplasme où elle sera traduite en protéine. Les puces à ADN, et plus récemment le séquençage ARN, permettent la quantification systématique de ces ARN messagers et donc d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données. Ces technologies sont toutefois réservées à la recherche et ne peuvent pas

être utilisés en routine, et en l'occurrence dans le domaine de la réanimation. Ces outils nous ont néanmoins permis d'identifier des marqueurs intéressants que l'on peut maintenant quantifier de manière totalement automatisée grâce à la technologie FilmArray® décrite plus haut (Figure 15), et ce, avec un délai de rendu de résultats tout à fait adapté à la clinique et un

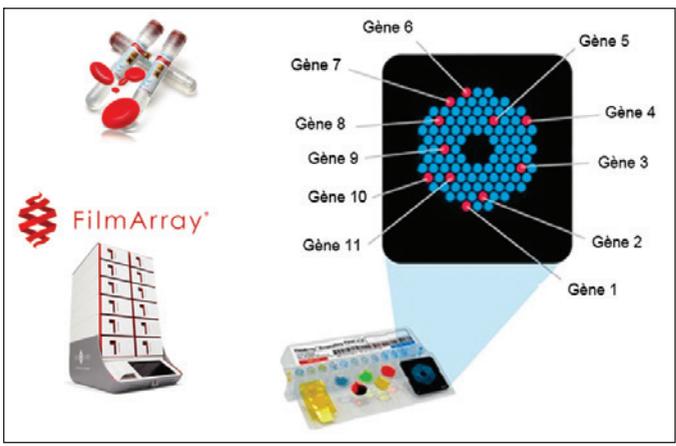


Figure 15

Identification d'ARN messagers (en rouge), marqueurs de l'état immunitaire du patient.

accès 7 jours sur 7, 24 heures sur 24.

L'utilisation de ce test fonctionnel immunitaire et de ces biomarqueurs aurait permis au clinicien de caractériser l'état immunitaire du patient que nous avons pris comme exemple. Il aurait même été intéressant d'avoir un niveau basal du statut immunitaire du patient avant la chirurgie et de mesurer ensuite en réponse l'évolution de son statut immunitaire (*Figure 16*).

Si dans un cas, le patient montrait une récupération progressive de son statut immunitaire vers l'homéostasie, le clinicien aurait pu continuer à le prendre en charge normalement, voire même anticiper, peut-être, sa sortie de réanimation. En l'occurrence, dans l'exemple traité, le patient a sans doute eu une persistance de la défaillance immunitaire, qui explique ses infections

récurrentes. Le clinicien, s'il avait eu connaissance de cette défaillance, aurait pu optimiser sa prise en charge et diminuer le risque infectieux.

On peut également envisager, dans un futur probablement proche, d'utiliser des immunothérapies qui permettraient de restaurer le statut immunitaire du patient, l'aideraient à récupérer, et donc à prévenir les infections secondaires.

Ce qui est très intéressant, c'est que les thérapeutiques qui ont été énormément développés dans le domaine de l'oncologie (voir le *Chapitre de J.-P. Armand* dans *Chimie et nouvelles thérapies*) ont également un potentiel pour ce genre d'application, en particulier les thérapeutiques qui permettent de réveiller le système immunitaire et donc de pouvoir l'aider lui-même à se protéger contre les complications infectieuses.

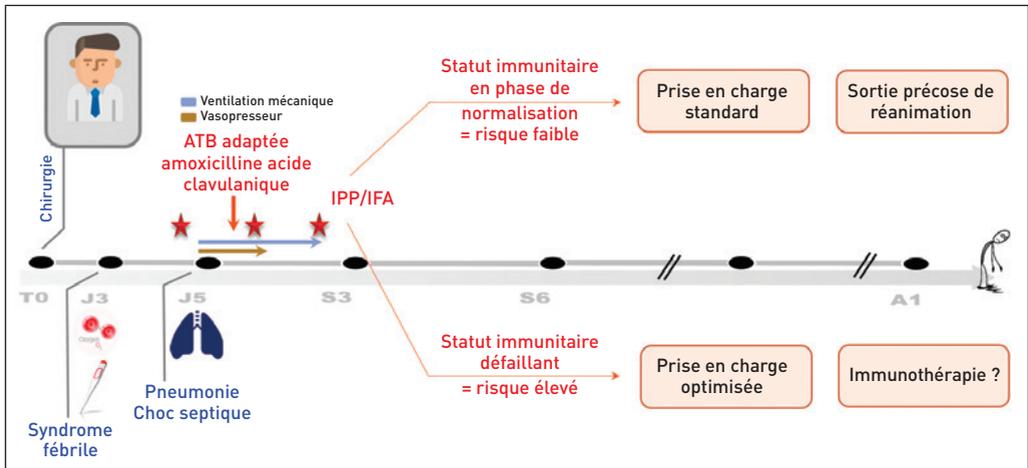


Figure 16

Prise en charge du patient si les deux techniques, test fonctionnel immunitaire (IFA) et identification des biomarqueurs du système immunitaire, sont disponibles.

L'avenir de la médecine personnalisée dans les maladies infectieuses

Il est clair que dans le domaine des maladies infectieuses, la médecine personnalisée est nettement moins avancée que dans le domaine de l'oncologie avec, sans doute une dizaine ou une quinzaine d'années de retard, même si un antibiogramme permet une thérapeutique plus personnalisée.

Il est clair que les choses vont évoluer et que la biologie moléculaire va jouer un rôle sans doute essentiel dans cette évolution, à la fois sur le volet pathogène, mais également sur le volet de la réponse de l'hôte.

Comme dans beaucoup de domaines, on va évoluer vers des technologies d'analyse beaucoup plus complexes permettant de caractériser le système immunitaire des patients.

Nous avons vu que de nouveaux outils vont être mis sur le marché, mais la R&D s'intéresse aussi à beaucoup d'autres répertoires : la métabolomique¹⁰, la génomique¹¹, etc., qui vont générer une énorme quantité de données très difficiles à interpréter pour le clinicien. Donc l'avenir repose aussi sur la création des outils qui permettront d'intégrer ces informations et les rendre facilement utilisables par le clinicien.

10. Métabolomique : étude des différents métabolites, qui sont créés lors d'un métabolisme comme les acides gras dans le corps humain.

11. Génomique : étude des génomes, ensembles de gènes dont on étudie le fonctionnement à l'échelle génomique.