

Diagnostic moléculaire des infections à mycobactéries

Molecular diagnosis of mycobacteria

● S. Godreuil*, C. Carrière*, E. Jumas-Bilak**, D. Terru*, H. Marchandin*

Points forts

- Le diagnostic biologique classique de la tuberculose ou d'une mycobactériose atypique est le plus souvent long car les méthodes traditionnelles de diagnostic bactériologique reposent sur la culture du micro-organisme qui, le plus souvent, présente une croissance lente.
- La rapidité du diagnostic bactériologique est augmentée par l'utilisation de diverses techniques moléculaires.
- L'apport des techniques de biologie moléculaire en mycobactériologie est considérable pour détecter *M. tuberculosis* directement dans les prélèvements cliniques, pour identifier les autres espèces de mycobactéries et rechercher leurs résistances éventuelles aux traitements antituberculeux.

Mots-clés : Mycobactéries - Tuberculose - Diagnostic moléculaire - Identification - Antibiogramme.

Main points

- Diagnosis of mycobacterial diseases usually involves the isolation and identification of the infecting organism in the laboratory. This diagnosis can take several weeks or longer due to usual slow growth rate of mycobacteria.
- Several molecular methods can reduce this delay to the diagnosis.
- These methods have been developed for direct detection, species identification, and drug susceptibility testing of mycobacteria.

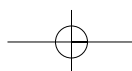
Keywords: Mycobacteria - Tuberculosis - Molecular diagnosis - Identification - Susceptibility testing.

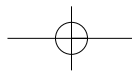
Le genre *Mycobacterium* regroupe de nombreuses espèces impliquées en pathologie humaine, notamment *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose, et les mycobactéries dites atypiques comme *Mycobacterium avium-intracellulare* ou *Mycobacterium xenopi*, plus fréquemment rencontrées chez les immunodéprimés ou les patients présentant des bronchopathies chroniques. L'examen direct ne permet pas de réaliser un diagnostic différentiel entre les espèces de mycobactéries impliquées en pathologie humaine. L'identification de l'espèce et la réalisation de l'antibiogramme sont deux étapes longues et parfois complexes du diagnostic bactériologique d'une mycobactériose, compte tenu de la lenteur de croissance de la plupart des mycobactéries. Les mesures prophylactiques ainsi que le traitement à instaurer sont différents selon l'espèce impliquée, d'où l'intérêt de poser un diagnostic d'espèce rapide. De plus, l'apparition de souches de *M. tuber-*

culosis résistantes, voire multirésistantes, aux antituberculeux impose également la réalisation rapide d'un antibiogramme. Ces dernières années, l'évolution des techniques bactériologiques appliquées au diagnostic des infections à mycobactéries a permis de raccourcir notablement les délais d'obtention des résultats, en optimisant les milieux de culture utilisés, en automatisant la détection de la croissance mycobactérienne et, enfin, en utilisant des techniques de biologie moléculaire (1). En bactériologie, les infections à mycobactéries ont été parmi les premières à bénéficier d'un diagnostic moléculaire avec *Chlamydia* et *Mycoplasma*. En ce qui concerne la tuberculose, ces techniques ont été développées à la fois pour permettre la détection directe de *M. tuberculosis* dans les prélèvements mais aussi pour l'identification de l'espèce et l'étude de la sensibilité des mycobactéries aux antituberculeux. Dans cet article, nous allons nous attacher à décrire les méthodes de biologie moléculaire actuellement disponibles pour le diagnostic des infections à mycobactéries, ainsi que leur intérêt pour le diagnostic et la prise en charge de la tuberculose et des mycobactérioses.

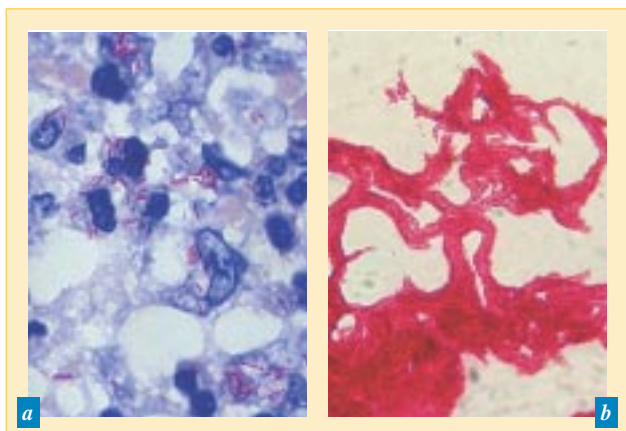
* Laboratoires de bactériologie, hôpital Arnaud-de-Villeneuve.

** Faculté de pharmacie, Montpellier.





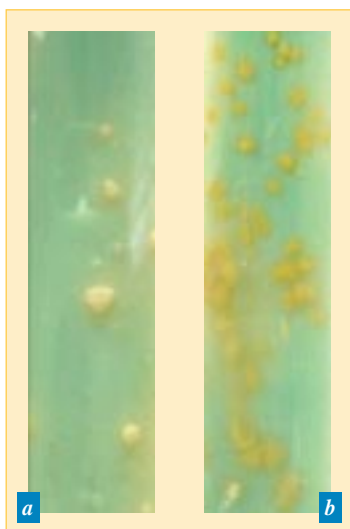
D O N N É E S N O U V E L L E S



Figures 1a et b. *Mycobacterium tuberculosis* : coloration de Ziehl-Neelsen (gr. x 1 000 en microscopie optique). a : frottis obtenu à partir d'une expectoration. b : aspect de *M. tuberculosis* en culture en milieu liquide : cordes de bacilles tuberculeux.

LES LIMITES DES MÉTHODES DITES CLASSIQUES DE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE D'UNE MYCOBACTÉRIOSE

● L'examen direct microscopique des échantillons cliniques fait appel aux colorations de Ziehl-Neelsen (figure 1) et à l'auramine (figure 2), toutes deux basées sur la propriété d'acido-alcoolo-résistance des mycobactéries. Bien que de réalisation aisée, cet examen direct manque de sensibilité et nécessite une observation méthodique et prolongée des frottis par des personnels qualifiés (2).



Figures 3a et b. Colonies de mycobactéries en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen. a : *M. tuberculosis* donne des colonies rugueuses, friables, en chou-fleur, opaques, de couleur beige crème et se détachant facilement du milieu de culture. b : certaines mycobactéries atypiques donnent des colonies lisses, plus ou moins enchâssées dans le milieu et parfois pigmentées.

● La culture des mycobactéries nécessite des milieux spéciaux enrichis à l'œuf comme les milieux de Löwenstein-Jensen ou de Coletso sur ces milieux, de détecter 10 à 100 bactéries viables, mais cette culture est très lente. Par exemple, le temps de doublement de *M. tuberculosis* est de 20 à 24 heures alors qu'il n'est, par exemple, que de 20 minutes pour *Escherichia coli*. De ce fait, un délai de 2 à 4 semaines est nécessaire pour isoler *M. tuberculosis* en culture sur milieu solide à partir d'un

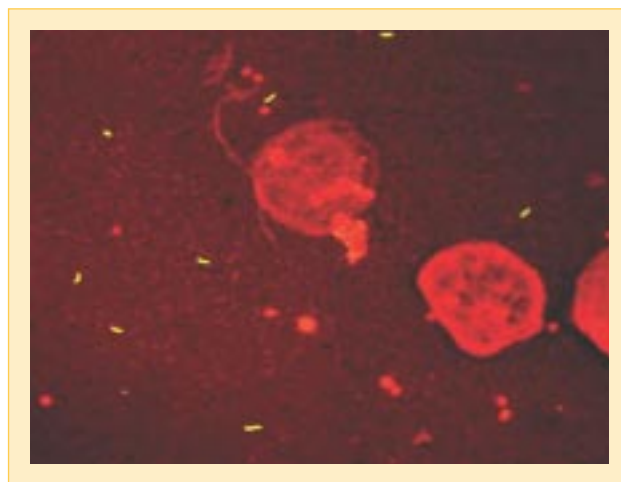


Figure 2. *Mycobacterium tuberculosis* : coloration à l'auramine (gr. x 400 au microscope à fluorescence).

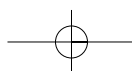
prélèvement. Quatre à 5 semaines supplémentaires sont nécessaires pour son identification et la réalisation d'un antibiogramme. Ainsi, l'identification définitive de l'espèce en cause et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques ne seront connues, en moyenne, que 6 à 9 semaines après le recueil des prélèvements (figure 4a).

LES PREMIÈRES ÉVOLUTIONS SURVENUES DANS LES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE D'UNE INFECTION À MYCOBACTÉRIE

De nouvelles techniques ont été développées pour diminuer les délais du diagnostic bactériologique par rapport aux méthodes dites classiques.

Systèmes automatisés de détection de la croissance mycobactérienne

Une évolution en termes de rapidité de diagnostic a déjà été amorcée avec la mise sur le marché de systèmes automatisés de détection de la croissance mycobactérienne. Nous prendrons l'exemple de la détection radiométrique en milieu liquide par le système Bactec® (Becton Dickinson). Cette méthode radiométrique utilise un milieu liquide contenant de l'acide palmitique marqué au carbone 14 et l'automate mesure le CO₂ radioactif produit par le métabolisme mycobactérien. Ce système permet de réduire le temps d'obtention des premiers résultats à un délai de 7 à 10 jours comparativement aux 2 à 4 semaines nécessaires au développement d'une culture sur milieu solide (figure 4b). Cette méthode permet également de déterminer la sensibilité aux antibiotiques en moins de sept jours. Cependant, elle est coûteuse et ne peut être utilisée en routine dans tous les laboratoires. De plus, ce test utilise des composés radioactifs qui imposent de respecter certaines règles supplémentaires de sécurité au sein du laboratoire. Ces composés doivent également être décontaminés avant leur élimination, ce qui vient encore alourdir le coût du test.



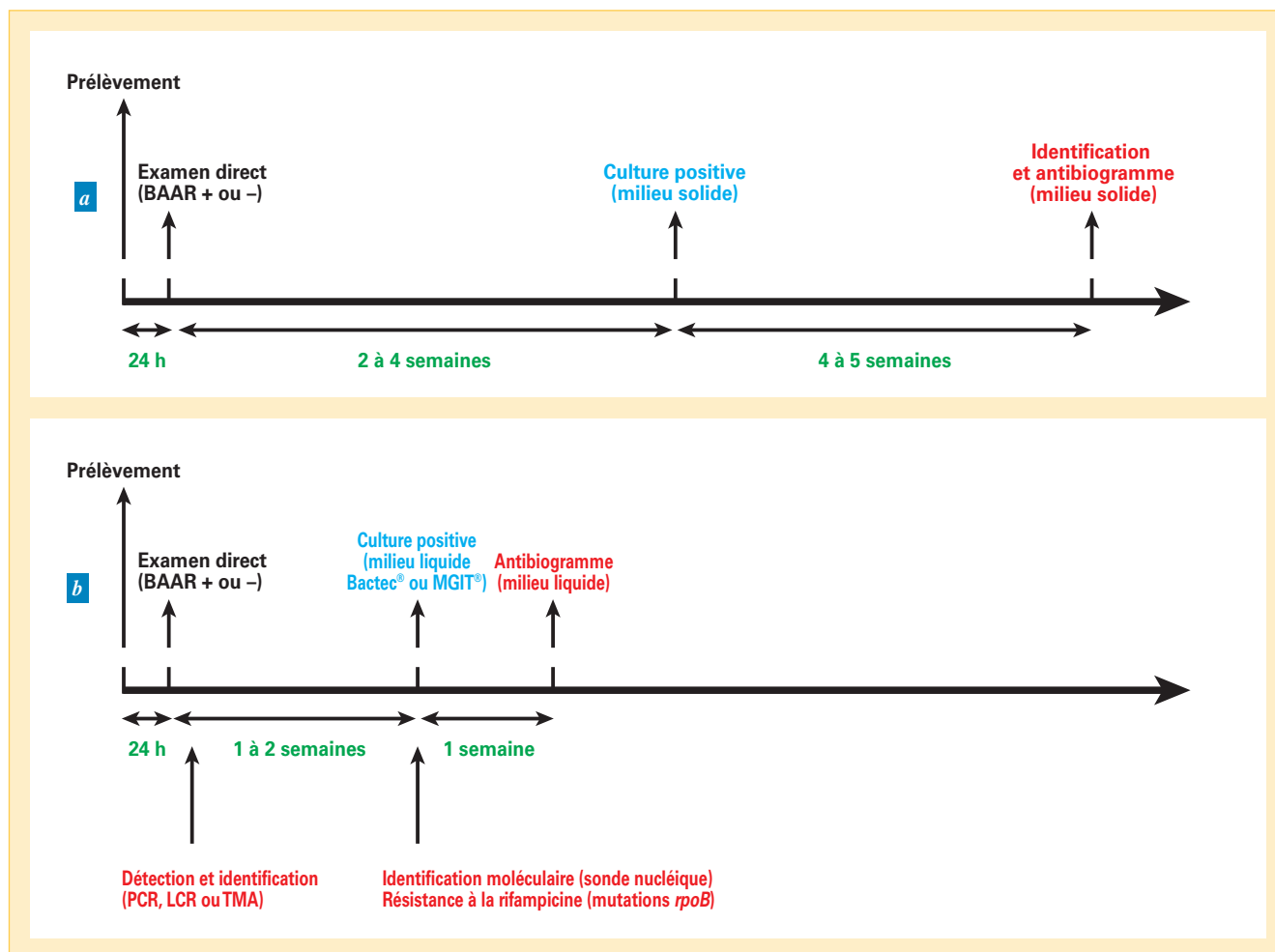
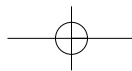


Figure 4. Représentation schématique des délais d'obtention des résultats concernant l'identification et l'antibiogramme de *M. tuberculosis* à partir d'un prélèvement biologique chez un patient tuberculeux. **a** : En utilisant les techniques traditionnelles de culture en milieu solide (Löwenstein-Jensen) et les méthodes de diagnostic classique. **b** : En utilisant les techniques de culture rapide (Bactec®, MGIT®) associées aux méthodes de diagnostic moléculaire. BAAR + ou - : présence ou absence de bacilles acido-alcoolo-résistants à l'examen direct.

Des systèmes de détection non radioactive de la croissance mycobactérienne en milieu liquide ont été récemment commercialisés.

Tube indicateur de la croissance mycobactérienne ou *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT®)

Ce tube contient un milieu permettant la croissance des mycobactéries. Le fond du tube est constitué d'un support de silicone dans lequel est incluse une substance dont la fluorescence est inversement corrélée à la pression partielle d'oxygène du milieu de culture. Si des mycobactéries sont présentes dans le prélèvement et se développent, la consommation d'O₂ conduira à l'émission d'une fluorescence jaune orangée détectée sous lumière ultraviolette.

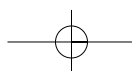
Ce système permet donc de raccourcir les délais de détection de la croissance mycobactérienne de manière sensiblement équivalente aux systèmes automatisés sans avoir recours à un équipement lourd.

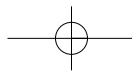
Identification des différentes espèces de mycobactéries par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

En détectant les acides mycoliques spécifiques des différentes espèces de mycobactéries en culture, l'HPLC appliquée aux cultures peut permettre d'identifier une cinquantaine d'espèces de mycobactéries en 4 heures environ. Ces techniques sont bien évidemment réservées à des laboratoires spécialisés.

Utilisation de mycobactériophages porteurs du gène de la luciférase

Une technique originale utilisant des mycobactériophages porteurs du gène de la luciférase a été décrite et s'est avérée être un outil performant et rapide pour détecter *M. tuberculosis* dans les prélèvements et déterminer sa sensibilité aux antituberculeux. Si l'on infecte des mycobactéries avec un mycobactériophage porteur du gène de la luciférase, les phages vont s'adsorber à la surface des bactéries de façon spécifique ; le génome du phage





D O N N É E S N O U V E L L E S

est ensuite injecté dans la mycobactérie et sa réplication va avoir lieu. Le gène luciférase étant sous contrôle d'un promoteur mycobactérien, celui-ci sera transcrit puis traduit en luciférase. Cette enzyme s'accumulera alors dans la bactérie. Lorsqu'on ajoute le substrat de l'enzyme, la luciférine, il y a émission de photons que l'on détecte à l'aide d'un luminomètre. Le résultat est exprimé en RLU (unité relative de lumière). Le mycobactériophage luciférase permet par conséquent de détecter la présence de mycobactéries dans un échantillon clinique et l'intensité d'émission des photons est proportionnelle à la quantité de mycobactéries présentes. La sensibilité aux antituberculeux de *M. tuberculosis* peut également être déterminée par cette technique en réalisant le test en présence de diverses concentrations d'antituberculeux (3).

MÉTHODES DE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE EN MYCOBACTÉRIOLOGIE

Les mycobactéries sont des bactéries difficiles à cultiver et constituaient donc d'excellents candidats pour le développement de techniques de diagnostic moléculaire. Ces méthodes ont connu un essor important au cours de la dernière décennie avec deux voies

de développement principales : diagnostic direct sans culture et identification après culture. Elles présentent de nombreux avantages par rapport aux méthodes dites traditionnelles (examen direct, culture et identification biochimique), notamment rapidité, sensibilité et spécificité (4, 5). L'obtention plus rapide du diagnostic permet d'instaurer un traitement antituberculeux plus précoce. Des trousse de diagnostic faisant appel aux techniques de biologie moléculaire ont été commercialisées, permettant un accès de ces méthodes à un plus grand nombre de laboratoires. Cependant, celles-ci ont en commun d'être onéreuses et de réalisation délicate et restent, malgré tout, réservées à des centres spécialisés, bien équipés et dotés de personnels qualifiés.

Les principales techniques utilisées sont :

- des techniques fondées sur l'amplification génique comme la *Polymerase Chain Reaction* (PCR), la *Ligase Chain Reaction* (LCR) ou la *Transcription Mediated Amplification* (TMA), ces techniques permettant soit la recherche directe des mycobactéries dans les prélèvements cliniques, soit l'identification de l'espèce de mycobactérie en cause ;
- des sondes nucléiques permettant soit l'identification de l'espèce en culture (sans étape d'amplification génique préalable), soit la recherche des principales mutations dans les gènes codant pour la résistance aux antituberculeux (après une étape d'amplification génique).

Détection de *M. tuberculosis* directement dans les échantillons cliniques

Trois principaux types de techniques fondées sur l'amplification génique peuvent actuellement être appliqués à la détection directe et rapide de *M. tuberculosis* directement dans les prélèvements cliniques (1, 4, 5).

Les tests suivants sont actuellement commercialisés :

- l'Amplificor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor, Roche Diagnostic Systems) : ce test est basé sur le principe de la PCR rappelé schématiquement en *figure 5*. La cible de l'amplification est une portion du gène qui code pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr). Chaque cycle d'amplification comprend une étape de dénaturation de l'ADN au cours de laquelle les deux brins d'ADN se séparent, une étape d'hybridation des amorces sur les séquences complémentaires présentes sur chacun des brins de l'ADN cible, et une étape d'élongation par la *Taq* polymérase à partir des amorces hybridées.

D'autres tests fondés sur le même principe ont été secondairement développés pour la recherche de *M. avium* et de *M. intracellulare* directement dans les prélèvements cliniques ;

- l'AMTDT ou Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (Gen-Probe®, bioMérieux) est basé sur le principe de la TMA. Ce test repose sur une méthode d'amplification isotherme (à 42 °C) d'une séquence spécifique de l'ARNr. La cible est un ARNr simple brin qui est amplifié via un intermédiaire d'ADN. Elle consiste en des cycles continus de transcription inverse et de transcription générant de multiples copies d'ARNr. La détection des séquences d'ARNr amplifiées se fait par hybridation d'une sonde d'ADN marquée à l'ester d'acridinium selon le même principe que celui décrit dans le paragraphe sur les sondes nucléiques (voir p. 76) ;

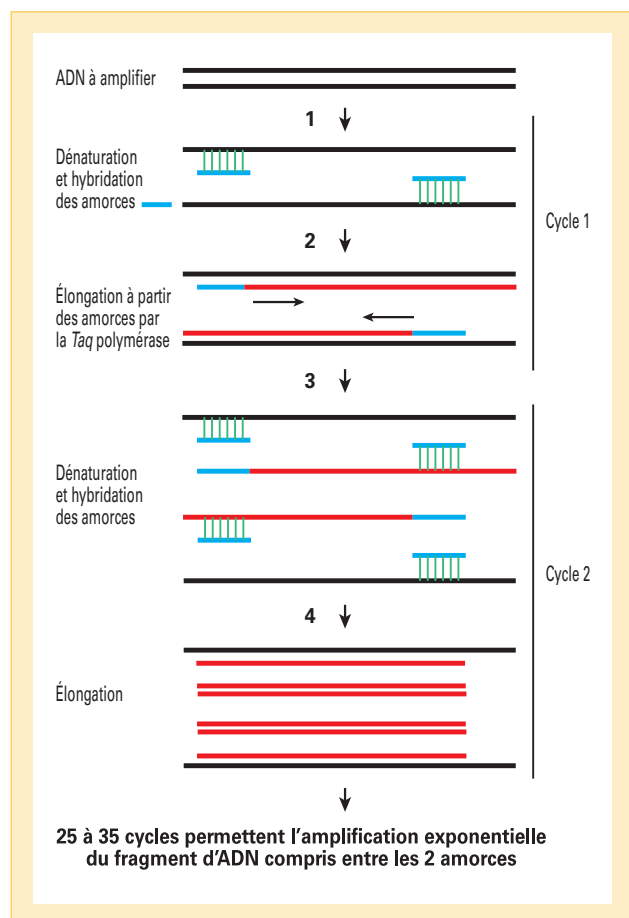
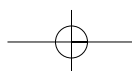
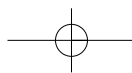


Figure 5. Schéma simplifié des différentes étapes d'une amplification génique par PCR.





– le LCx Probe System (Abbott) est fondé sur le principe de l'amplification de sonde par LCR, dont le principe est schématiquement représenté en [figure 6](#) et qui peut également être automatisé. La LCR consiste en une amplification de sonde et met en œuvre deux outils : deux couples de sondes spécifiques de la séquence nucléique à rechercher et une enzyme thermostable : la ligase. Les deux sondes hybridant avec des fragments adjacents au sein de la séquence cible sont mises en présence de celle-ci. Une ligase permet alors la réunion des deux fragments s'ils sont hybridés à leur cible. Après dénaturation, le cycle peut recommencer. De cette manière, les deux brins de la séquence cible servent de support à une ligation et les produits formés à chaque cycle peuvent s'hybrider avec les sondes complémentaires. Quelle que soit la méthode d'amplification utilisée, les produits d'amplification éventuellement générés seront, dans un second temps, détectés par des méthodes diverses (colorimétriques ou chimiluminescentes).

Ces diverses techniques augmentent donc considérablement la rapidité du diagnostic puisque les résultats peuvent être obtenus en 4 à 6 heures environ. Elles ne peuvent toutefois en aucun cas remplacer l'examen direct, comme nous le verrons ultérieurement, et la culture à partir de laquelle sont réalisés les antibiogrammes et les études épidémiologiques éventuelles. De plus, ces tests permettent uniquement de détecter les mycobactéries du complexe *tuberculosis* et du complexe *avium-intracellulare*. L'identification et l'étude de la résistance aux antituberculeux de toutes les autres mycobactéries nécessitent l'obtention d'une culture en milieu solide ou liquide. De plus, elles ne peuvent distinguer les mycobactéries mortes des organismes vivants ni servir à suivre l'évolution d'une infection mycobactérienne sous traitement (à l'exception de la TMA).

Ces méthodes sont validées uniquement pour la recherche de mycobactéries dans les prélèvements de type respiratoire (expectorations, aspirations bronchiques, liquides de lavage bronchoalvéolaire et tubages gastriques), elles peuvent toutefois offrir une aide diagnostique pour la recherche de mycobactéries dans d'autres prélèvements (liquide céphalorachidien ou liquide péricardique, par exemple). Les performances de ces techniques dépendent fortement de l'importance de l'inoculum bactérien dans le prélèvement considéré : ainsi, la sensibilité de ces tests est de 95 à 96 % pour les prélèvements à frottis positifs et de 48 à 53 % pour les prélèvements à frottis négatifs ; la spécificité varie de 96 à 100 % selon le test considéré (1). Leurs principaux inconvénients sont un manque de sensibilité pour les prélèvements à examen direct négatif, la possibilité d'obtention de résultats faussement négatifs dus à la présence éventuelle d'inhibiteurs de l'amplification et, enfin, la possibilité d'obtention de résultats faussement positifs par contamination des prélèvements. Les résultats obtenus grâce à ces techniques doivent donc toujours être interprétés en fonction du résultat de l'examen direct réalisé sur le même échantillon mais aussi en fonction des données cliniques.

In fine, l'interprétation se fera de la manière suivante (5) :

- si l'examen direct et le test d'amplification sont tous deux positifs, le patient est suspect de tuberculose ;
- si l'examen direct est positif et le test d'amplification négatif, on doit tout d'abord entreprendre la recherche d'éventuels inhi-

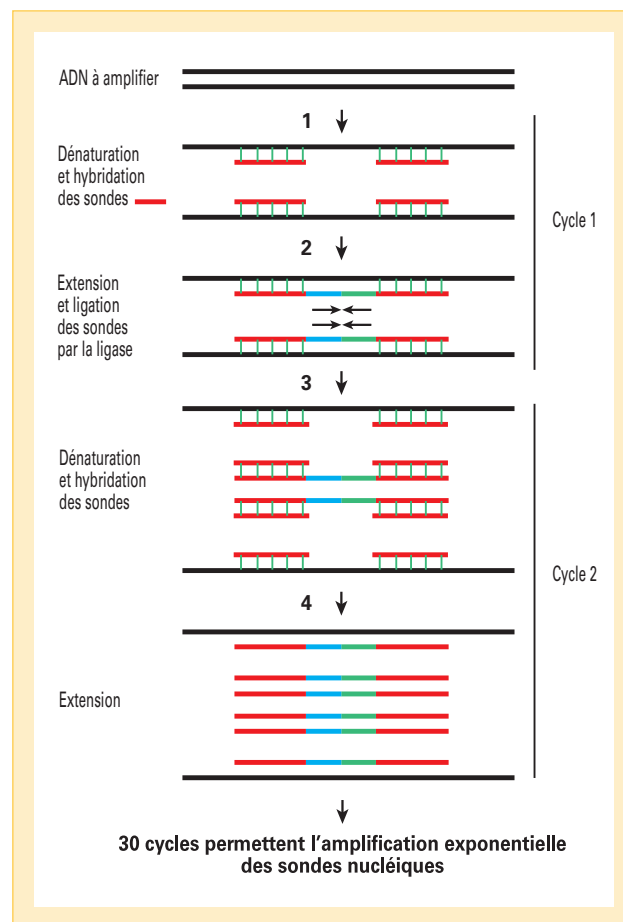


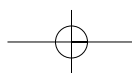
Figure 6. Schéma simplifié des différentes étapes d'une amplification génique par LCR.

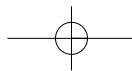
biteurs de l'amplification présents dans le prélèvement. Si l'absence d'inhibiteur est affirmée et que les résultats sont reproductibles sur un second prélèvement du même patient, une infection à mycobactérie non tuberculeuse sera à considérer. Si la présence d'inhibiteurs est détectée, les tests d'amplification n'apporteront aucune aide au diagnostic ;

– si l'examen direct est négatif et le test d'amplification positif, et que ces résultats sont confirmés sur un second échantillon, la présomption de tuberculose est importante, mais la contagiosité du patient peut être considérée comme négligeable ;

– si l'examen direct et le test d'amplification sont tous deux négatifs, il faudra attendre le résultat de la culture pour poser un diagnostic définitif, mais le patient peut être considéré comme non contagieux.

Enfin, pour conclure ce paragraphe et être tout à fait exhaustif, il nous faut citer une nouvelle technique de PCR dite "PCR cinétique" ou "PCR en temps réel". De développement très récent, cette technique permet également la mise en évidence rapide de *M. tuberculosis* dans les échantillons cliniques. Elle associe l'amplification d'une cible spécifique de *M. tuberculosis* par PCR à un système de détection dit "en temps réel" fondé sur l'utilisation de fluorophores, l'ensemble de ces réactions étant réalisé dans un automate





D O N N É E S N O U V E L L E S

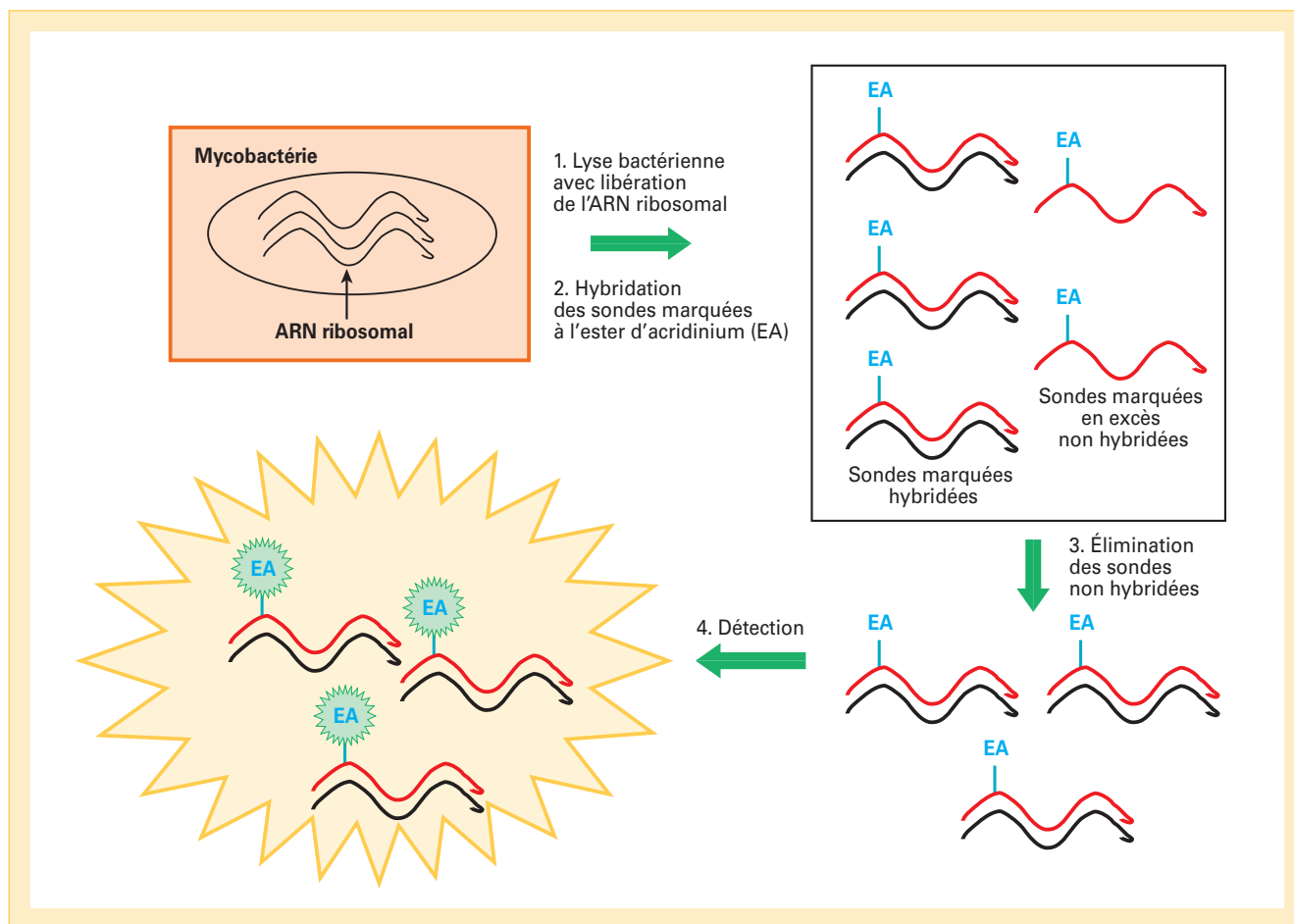


Figure 7. Représentation schématique du principe de l'identification des espèces mycobactériennes à l'aide de sondes nucléiques.

appelé LightCycler. La détection d'une éventuelle amplification se fait, cycle après cycle, par le suivi d'une courbe de fluorescence spécifique émise par les produits d'amplification. Les avantages de ces techniques de PCR en temps réel sont une grande spécificité, une plus grande rapidité d'obtention des résultats (moins de 3 heures) et une extrême sensibilité puisqu'elles associent la sensibilité de l'étape d'amplification par PCR à la sensibilité du système de détection en temps réel. Elles permettent également de pallier certains inconvénients d'une PCR classique que sont les problèmes de contamination et d'inhibition de l'amplification. En ce qui concerne les mycobactéries, ces techniques restent actuellement du domaine de la recherche mais sont vouées à un développement rapide en bactériologie clinique compte tenu de leurs performances.

Identification des espèces mycobactériennes en culture

Plusieurs techniques sont actuellement disponibles parmi lesquelles :

- des méthodes sans amplification utilisant des sondes nucléiques ;
- des méthodes d'identification après amplification d'une portion définie du génome.

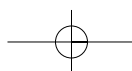
Sondes nucléiques

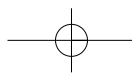
- Les trousse actuellement commercialisées permettent l'identification des principales espèces de mycobactéries impliquées en pathologie humaine : espèces du complexe *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, complexe *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii* et *M. goodii* (AccuProbe®, Gen-Probe®, bioMérieux).

- Principe : ces tests utilisent des sondes d'ADN et leur principe est fondé sur l'hybridation de deux séquences complémentaires d'acides nucléiques. La séquence cible détectée dans l'échantillon à tester est une portion de l'acide ribonucléique ribosomal 16S (ARNr 16S) bactérien, qui présente les avantages de se trouver sous forme monobrin (pas d'étape de dénaturation nécessaire) et multicopies dans la bactérie, ce qui confère aux techniques fondées sur ce principe simplicité d'utilisation et bonne sensibilité.

- Réalisation : ces tests se déroulent en quatre phases (figure 7) et nécessitent un équipement composé de blocs chauffants et d'un luminomètre :

- préparation de l'échantillon : à partir d'une culture obtenue en milieu soit solide, soit liquide (Bactec® ou MGIT®), les bactéries sont lysées pour avoir accès à leur ARNr ;





- hybridation d'une sonde ADN spécifique couplée à un marqueur luminescent, l'ester d'acridinium : si la sonde ADN mise en présence de l'ARNr bactérien trouve sa séquence complémentaire, il y aura formation d'un hybride ADN-ARNr ;
- élimination des sondes non hybridées ;
- détection de l'hybride formé en cas de réaction positive par chimiluminescence grâce à un luminomètre. Le signal obtenu est exprimé en RLU.

● Performances : ces méthodes sont aujourd'hui largement utilisées compte tenu :

- de leur simplicité d'utilisation ;
- du temps de réalisation relativement court d'environ 2 heures, comparativement aux 3 semaines nécessaires à la réalisation d'une identification biochimique ;
- de leurs performances satisfaisantes en termes de sensibilité et de spécificité.

Cette technique associée aux cultures en milieu liquide permet donc une réponse rapide au clinicien de type "présence ou absence de bacilles du complexe *tuberculosis*" (7 à 10 jours en moyenne) et, si nécessaire, la mise en place sans délai d'une thérapeutique adaptée (figure 4b).

Les sondes commercialisées à ce jour ne permettent pas la distinction entre les différentes espèces au sein du complexe *tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum* et *M. microti*) et ne sont disponibles que pour un nombre restreint de mycobactéries atypiques (5).

Méthodes d'identification des espèces mycobactériennes après amplification génique

Ces méthodes font appel à une première étape d'amplification génique par PCR dont les cibles préférentielles sont les gènes codant soit pour l'ARNr 16S, soit pour la protéine de choc thermique de 65 kDa (*Heat Shock Protein 65* ou *Hsp 65*) ou encore pour la région séparant les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'ARNr 23S (appelée ITS pour *Internal Transcribed Spacer*). Des amorces spécifiques du genre *Mycobacterium* sont actuellement disponibles. Une fois l'amplification obtenue, plusieurs possibilités peuvent alors être envisagées pour permettre l'identification de l'espèce :

- détermination de la séquence d'acides nucléiques du fragment amplifié par séquençage automatique et comparaison de la séquence obtenue à celles déposées dans des banques de données informatisées ;
- analyse des produits d'amplification par restriction enzymatique et comparaison à des profils obtenus pour des souches d'espèces connues, cette technique est appelée analyse du polymorphisme des fragments de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou *RFLP*). L'utilisation des techniques de *Hsp 65* PCR-RFLP pour le diagnostic d'espèce constitue une avancée importante dans le diagnostic des mycobactérioses en assurant une identification simple et rapide des bactéries du genre *Mycobacterium* ;
- hybridation des produits d'amplification sur une bandelette de nitrocellulose à la surface de laquelle ont été préalablement adsorbées des sondes spécifiques des différentes espèces mycobactériennes principalement rencontrées en pathologie humaine. C'est

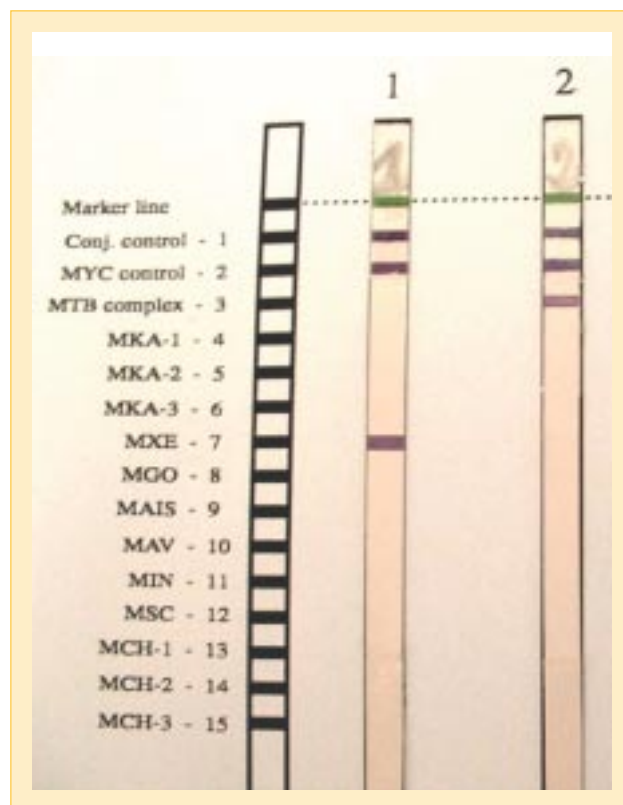
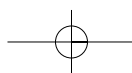


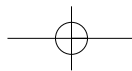
Figure 8. Exemple de résultats obtenus par la technique Inno-Lipa® *Mycobacteria* pour la détection et l'identification des espèces de mycobactéries (en cas de réaction positive, les hybridations sont visualisées sous forme de bandes de couleur violette). Piste 1 : profil d'hybridation obtenu pour *Mycobacterium xenopi*. Piste 2 : profil d'hybridation obtenu pour une mycobactérie du complexe *tuberculosis*. (1. conj. control : témoin de manipulation, 2. MYC control : identification d'une bactérie du genre *Mycobacterium*, 3. MTB complex : mycobactérie du complexe *tuberculosis*, 4-5-6. *Mycobacterium kansasii*, 7. *Mycobacterium xenopi*, 8. *Mycobacterium gordonae*, 9. *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum*, 10. *Mycobacterium avium*, 11. *Mycobacterium intracellulare*, 12. *Mycobacterium scrofulaceum*, 13-14-15. *Mycobacterium chelonae*.)

le principe utilisé par les techniques Inno-Lipa® et GenoType® MTBC. Les techniques Inno-Lipa® peuvent permettre la détection et l'identification de l'espèce ainsi que la recherche de la résistance à la rifampicine. La méthode GenoType® MTBC permet d'identifier les mycobactéries atypiques mais aussi de différencier les espèces au sein du complexe *tuberculosis*. Un exemple d'identification mycobactérienne par la technique Inno-Lipa® est donné en figure 8.

DÉTECTION DES MUTATIONS GÉNIQUES ASSOCIÉES AUX RÉSISTANCES AUX ANTITUBERCULEUX CHEZ *M. TUBERCULOSIS*

Diverses techniques de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence des mutations dans les gènes qui codent pour les molécules cibles des antibiotiques, mutations à l'origine de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux (6).





D O N N É E S N O U V E L L E S

Les méthodes actuellement commercialisées concernent toutes la détection de la résistance à la rifampicine car les bases génétiques de cette résistance sont, à ce jour, bien caractérisées. De plus, la résistance à la rifampicine peut être considérée comme un bon marqueur de dépistage des souches de *M. tuberculosis* multirésistantes qui se définissent comme des souches résistantes au moins à la rifampicine et à l'isoniazide.

Ces techniques, réalisables à partir d'une culture, comprennent deux étapes principales :

- l'amplification par PCR du gène ou d'une portion du gène *rpoB* qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase de *M. tuberculosis* ;
- la recherche des mutations connues éventuellement présentes dans ce gène soit par une méthode de séquençage, soit par une hybridation du produit d'amplification sur une bandelette regroupant les sondes spécifiques des mutations connues à ce jour pour conférer la résistance à la rifampicine.

LES LIMITES DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

- Nécessité d'un matériel spécifique : luminomètre, thermocycleur et/ou automate de biologie moléculaire.
- Nécessité d'un personnel expérimenté.
- Nécessité de locaux adaptés, les techniques faisant intervenir une étape d'amplification devant obligatoirement être réalisée dans trois pièces séparées pour éviter les problèmes de contamination.
- Coût des trousse commercialisées relativement élevé : environ 12 euros pour une identification par sonde nucléique, 23 et 32 euros respectivement pour une identification par les techniques GenoType[®] MTBC ou Inno-Lipa[®], 37 euros pour la réalisation d'un antibiogramme sur automate Bactec[®], et environ 140 euros pour une amplification à partir d'un échantillon clinique par TMA. La majorité de ces techniques sont donc réalisées uniquement dans les laboratoires de bactériologie des Centres hospitaliers universitaires et de certains Centres hospitaliers généraux.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les différentes techniques décrites ont permis de grandes avancées en matière de diagnostic microbiologique des infections à mycobactéries. Elles ont considérablement réduit les délais de diagnostic, que ce soit pour détecter la mycobactérie, l'identifier ou déterminer son profil de résistance aux antituberculeux. De ce fait, elles ont permis une mise en place de traitements adaptés plus tôt dans l'évolution de la maladie. Elles sont toutefois encore réservées à des laboratoires spécialisés. Il faut également noter que l'apport des techniques de biologie moléculaire en mycobactériologie ne se limite pas au diagnostic mais que certaines d'entre elles ont été largement appliquées à des fins épidémiologiques en permettant le typage moléculaire de diverses souches de *M. tuberculosis*. Dans ce cas, elles contribuent à la réalisation de diverses enquêtes épidémiologiques : étude des caractéristiques de la transmission de la tuberculose à large échelle, confirmation de l'existence d'épidémies d'infections à mycobactéries avec, éventuellement, identification d'une source de contamination environnementale ou médicochirurgicale et, enfin, distinction entre rechute et réinfection chez un même patient.

Les séquences complètes du génome de plusieurs mycobactéries sont actuellement disponibles dans les banques de données génétiques. De nouveaux gènes d'intérêt pour le diagnostic des infections à mycobactéries devraient être identifiés dans un futur proche. À plus long terme, le diagnostic d'une infection à mycobactérie pourrait également faire appel aux puces à ADN qui offrent la possibilité de présenter simultanément plusieurs milliers de sondes sur une surface réduite. Ainsi, la détection d'une ou de plusieurs mycobactéries dans un prélèvement clinique, leur identification et la mise en évidence de l'ensemble des mécanismes de résistance aux antibiotiques pourraient être réalisées simultanément après une étape d'amplification, cela dans un laps de temps encore réduit.

Les séquences complètes du génome de plusieurs mycobactéries sont actuellement disponibles dans les banques de données génétiques. De nouveaux gènes d'intérêt pour le diagnostic des infections à mycobactéries devraient être identifiés dans un futur proche. À plus long terme, le diagnostic d'une infection à mycobactérie pourrait également faire appel aux puces à ADN qui offrent la possibilité de présenter simultanément plusieurs milliers de sondes sur une surface réduite. Ainsi, la détection d'une ou de plusieurs mycobactéries dans un prélèvement clinique, leur identification et la mise en évidence de l'ensemble des mécanismes de résistance aux antibiotiques pourraient être réalisées simultanément après une étape d'amplification, cela dans un laps de temps encore réduit.

Remerciements : les auteurs tiennent à remercier Anne-Catherine Artigues et Sylvia Gorassini pour la réalisation des photographies illustrant cet article.

R É F É R E N C E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

1. Site sur lequel on peut télécharger le rapport La tuberculose en France en l'an 2000 mis à disposition par l'Institut de veille sanitaire, Département des maladies infectieuses sur http://www.invs.sante.fr/publications/2002/tuberculose_fr_2000/. De nombreuses données sont disponibles, dont un chapitre sur "Les outils diagnostiques de la tuberculose en l'an 2000", par J. Grosset, CHU Pitié-Salpêtrière (Paris).
2. Un second site disponible sur Internet à l'adresse suivante : <http://www.recherche-fr.com/bk/>. Ce site propose notamment une galerie d'illustrations (<http://www.recherche-fr.com/bk/galerie/galdiv.htm>), ainsi qu'un descriptif de toutes les techniques de biologie moléculaire actuellement disponibles pour les mycobactéries (<http://www.recherche-fr.com/bk/biomol.htm>).
3. Carrière C, Riska PF, Zimhony O et al. Conditionally replicating luciferase reporter phages : improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997 ; 35 : 3232-9.
4. Vincent V, Rastogi N. Apport de la biologie moléculaire en mycobactériologie. *Précis de Bactériologie clinique*. Eska, 2000 : 1095-106.
5. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry* 2001 ; 47 : 809-14.
6. Sougakoff W, Truffot-Pernot C, Szpytma M, Cambau E, Lemaître N, Jarlier V. Diagnostic moléculaire de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux. *Revue Française des Laboratoires* 1999 ; 314 : 25-8.

C O U R S - C O N G R È S

2^e Journée de pneumologie en Pays cathare

Le samedi 8 novembre 2003, à Carcassonne. Cette journée de rencontre avec les experts sera composée de quatre sessions portant sur les thèmes suivants : Immuno-allergologie, asthme



et BPCO ; Pneumopathies interstitielles ; Pathologie respiratoire du sommeil ; Cancérologie.

Comité scientifique : B. Housset (Créteil), T. Rochat (Genève), Y. Sibille (Yvoir), J.P. Sculier (Bruxelles). Coordination scientifique et organisation : Dr Philippe Carré, Centre de pathologie thoracique, polyclinique Mont-réal, Carcassonne. Tél. : 04 68 11 91 11. Fax : 04 68 72 00 91. E-mail : CarrePh@aol.com

