

UNIVERSITE DE STRASBOURG  
FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG

ANNEE : 2019

N° : 97

**THESE**  
**PRESENTEE POUR LE DIPLOME DE**  
**DOCTEUR EN MEDECINE**

**Diplôme d'État**  
**Mention : D.E.S. de Médecine Interne**

Par

**Axel URSENBACH**  
Né le 21/09/1991 à Strasbourg (67)

---

**Impact clinique de la PCR 16S**  
**au CHU de Strasbourg**

Président de thèse : Professeur Yves HANSMANN

Directeur de thèse : Docteur Xavier ARGEMI



**FACULTÉ DE MÉDECINE**  
(U.F.R. des Sciences Médicales)

- **Président de l'Université** M. DENEKEN Michel
- **Doyen de la Faculté** M. SIBILIA Jean
- **Assesseur du Doyen (13.01.10 et 08.02.11)** M. GOICHOT Bernard
- **Doyens honoraires :** (1976-1983) M. DORNER Marc
- (1983-1989) M. MANTZ Jean-Marie
- (1989-1994) M. VINCENDON Guy
- (1994-2001) M. GERLINGER Pierre
- (3.10.01-7.02.11) M. LUDES Bertrand
- **Chargé de mission auprès du Doyen** M. VICENTE Gilbert
- **Responsable Administratif** M. BITSCH Samuel

Edition MAI 2019  
Année universitaire 2018-2019

HOPITAUX UNIVERSITAIRES  
DE STRASBOURG (HUS)  
**Directeur général :**  
M. GAUTIER Christophe



**A1 - PROFESSEUR TITULAIRE DU COLLEGE DE FRANCE**

MANDEL Jean-Louis Chaire "Génétique humaine" (à compter du 01.11.2003)

**A2 - MEMBRE SENIOR A L'INSTITUT UNIVERSITAIRE DE FRANCE (I.U.F.)**

BAHRAM Séiamak Immunologie biologique (01.10.2013 au 31.09.2018)  
DOLLFUS Héléne Génétique clinique (01.10.2014 au 31.09.2019)

**A3 - PROFESSEUR(E)S DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS (PU-PH)**

PO191

| NOM et Prénoms                           | CS*          | Services Hospitaliers ou Institut / Localisation   | Sous-section du Conseil National des Universités  |
|--|--------------|--|---|
| ADAM Philippe<br>P0001                   | NRP6<br>NCS  | • Pôle de l'Appareil locomoteur<br>- Service de chirurgie orthopédique et de Traumatologie / HP  | 50.02 Chirurgie orthopédique et traumatologique   |
| AKLADIOS Cherif<br>P0191                 | NRP6<br>CS   | • Pôle de Gynécologie-Obstétrique<br>- Service de Gynécologie-Obstétrique/ HP  | 54.03 Gynécologie-Obstétrique ; gynécologie médicale<br>Option : <b>Gynécologie-Obstétrique</b> |
| ANDRES Emmanuel<br>P0002                 | NRP6<br>CS   | • Pôle de Médecine Interne, Rhumatologie, Nutrition, Endocrinologie, Diabétologie (MIRNED)<br>- Service de Médecine Interne, Diabète et Maladies métaboliques / HC | 53.01 Option : médecine Interne   |
| ANHEIM Mathieu<br>P0003                  | NRP6<br>NCS  | • Pôle Tête et Cou-CETD<br>- Service de Neurologie / Hôpital de Hautepierre  | 49.01 Neurologie  |
| ARNAUD Laurent<br>P0186                  | NRP6<br>NCS  | • Pôle MIRNED<br>- Service de Rhumatologie / Hôpital de Hautepierre  | 50.01 Rhumatologie  |
| BACHELLIER Philippe<br>P0004             | RP6<br>CS    | • Pôle des Pathologies digestives, hépatiques et de la transplantation<br>- Serv. de chirurgie générale, hépatique et endocrinienne et Transplantation / HP        | 53.02 Chirurgie générale  |
| BAHRAM Seiamak<br>P0005                  | NRP6<br>CS   | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire d'Immunologie biologique / Nouvel Hôpital Civil<br>Institut d'Hématologie et d'Immunologie / Hôpital Civil / Faculté           | 47.03 Immunologie (option biologique)   |
| BALDAUF Jean-Jacques<br>P0006            | NRP6<br>NCS  | • Pôle de Gynécologie-Obstétrique<br>- Service de Gynécologie-Obstétrique / Hôpital de Hautepierre   | 54.03 Gynécologie-Obstétrique ; gynécologie médicale<br>Option : <b>Gynécologie-Obstétrique</b> |
| BAUMERT Thomas<br>P0007                  | NRP6<br>CU   | • Pôle Hépatodigestif de l'Hôpital Civil<br>- Unité d'Hépatologie - Service d'Hépatogastro-Entérologie / NHC   | 52.01 Gastro-entérologie ; <b>hépatologie</b><br>Option : hépatologie                           |
| Mme BEAU-FALLER Michèle<br>M0007 / PO170 | NRP6<br>NCS  | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire / HP   | 44.03 Biologie cellulaire (option biologique)   |
| BEAUJEU Rémy<br>P0008                    | NRP6<br>Resp | • Pôle d'Imagerie - CME / Activités transversales<br>• Unité de Neuroradiologie interventionnelle / Hôpital de Hautepierre   | 43.02 Radiologie et imagerie médicale (option clinique)   |
| BECMEUR François<br>P0009                | RP6<br>NCS   | • Pôle médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Service de Chirurgie Pédiatrique / Hôpital Hautepierre   | 54.02 Chirurgie infantile   |
| BERNA Fabrice<br>P0192                   | NRP6<br>CS   | • Pôle de Psychiatrie, Santé mentale et Addictologie<br>- Service de Psychiatrie I / Hôpital Civil   | 49.03 Psychiatrie d'adultes ; Addictologie<br>Option : <b>Psychiatrie d'Adultes</b>             |
| BERTSCHY Gilles<br>P0013                 | NRP6<br>CS   | • Pôle de Psychiatrie et de santé mentale<br>- Service de Psychiatrie II / Hôpital Civil   | 49.03 Psychiatrie d'adultes   |
| BIERRY Guillaume<br>P0178                | NRP6<br>NCS  | • Pôle d'Imagerie<br>- Service d'Imagerie II - Neuroradiologie-imagerie ostéoarticulaire-Pédiatrie / Hôpital Hautepierre   | 43.02 Radiologie et Imagerie médicale (option clinique)   |
| BILBAULT Pascal<br>P0014                 | NRP6<br>CS   | • Pôle d'Urgences / Réanimations médicales / CAP<br>- Service des Urgences médico-chirurgicales Adultes / Hôpital de Hautepierre                                   | 48.02 Réanimation ; <b>Médecine d'urgence</b><br>Option : médecine d'urgence                    |
| BODIN Frédéric<br>P0187                  | NRP6<br>NCS  | • Pôle de Chirurgie Maxillo-faciale, morphologie et Dermatologie<br>- Service de Chirurgie maxillo-faciale et réparatrice / Hôpital Civil                          | 50.04 <b>Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique</b> ; Brûlologie                    |
| Mme BOEHM-BURGER Nelly<br>P0016          | NCS          | • Institut d'Histologie / Faculté de Médecine  | 42.02 Histologie, Embryologie et Cytogénétique (option biologique)                              |
| BONNOMET François<br>P0017               | NRP6<br>CS   | • Pôle de l'Appareil locomoteur<br>- Service de Chirurgie orthopédique et de Traumatologie / HP  | 50.02 Chirurgie orthopédique et traumatologique   |
| BOURCIER Tristan<br>P0018                | NRP6<br>NCS  | • Pôle de Spécialités médicales-Ophthalmologie / SMO<br>- Service d'Ophthalmologie / Nouvel Hôpital Civil  | 55.02 Ophthalmologie  |
| BOURGIN Patrice<br>P0020                 | NRP6<br>NCS  | • Pôle Tête et Cou - CETD<br>- Service de Neurologie / Hôpital Civil   | 49.01 Neurologie  |
| Mme BRIGAND Cécile<br>P0022              | NRP6<br>NCS  | • Pôle des Pathologies digestives, hépatiques et de la transplantation<br>- Service de Chirurgie générale et Digestive / HP  | 53.02 Chirurgie générale  |
| BRUANT-RODIER Catherine<br>P0023         | NRP6<br>CS   | • Pôle de l'Appareil locomoteur<br>- Service de Chirurgie Maxillo-faciale et réparatrice / Hôpital Civil   | 50.04 Option : chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique                               |

| NOM et Prénoms                            | CS*          | Services Hospitaliers ou Institut / Localisation  | Sous-section du Conseil National des Universités   |
|---|--------------|---|--|
| Mme CAILLARD-OHLMANN<br>Sophie<br>P0171   | NRP6<br>NCS  | • Pôle de Spécialités médicales-Ophthalmologie / SMO<br>- Service de Néphrologie-Transplantation / NHC  | 52.03 Néphrologie  |
| CANDOLFI Ermanno<br>P0025                 | RP6<br>CS    | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie médicale / PTM HUS<br>• Institut de Parasitologie / Faculté de Médecine        | 45.02 Parasitologie et mycologie<br>(option biologique)  |
| CASTELAIN Vincent<br>P0027                | NRP6<br>NCS  | • Pôle Urgences - Réanimations médicales / Centre antipoison<br>- Service de Réanimation médicale / Hôpital Hautepierre                             | 48.02 Réanimation  |
| CHAKFE Nabil<br>P0029                     | NRP6<br>CS   | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Chirurgie Vasculaire et de transplantation rénale / NHC                     | 51.04 <b>Chirurgie vasculaire</b> ; médecine vasculaire / Option : chirurgie vasculaire                                    |
| CHARLES Yann-Philippe<br>M0013 / P0172    | NRP6<br>NCS  | • Pôle de l'Appareil locomoteur<br>- Service de Chirurgie du rachis / Chirurgie B / HC  | 50.02 Chirurgie orthopédique et traumatologique  |
| Mme CHARLOUX Anne<br>P0028                | NRP6<br>NCS  | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Physiologie et d'Explorations fonctionnelles / NHC  | 44.02 Physiologie (option biologique)  |
| Mme CHARPIOT Anne<br>P0030                | NRP6<br>NCS  | • Pôle Tête et Cou - CETD<br>- Serv. d'Oto-rhino-laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale / HP  | 55.01 Oto-rhino-laryngologie   |
| CHELLY Jameledine<br>P0173                | NRP6<br>CS   | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Diagnostic génétique / NHC   | 47.04 Génétique (option biologique)  |
| Mme CHENARD-NEU Marie-<br>Pierre<br>P0041 | NRP6<br>CS   | • Pôle de Biologie<br>- Service de Pathologie / Hôpital de Hautepierre  | 42.03 Anatomie et cytologie pathologiques<br>(option biologique)   |
| CLAVERT Philippe<br>P0044                 | NRP6<br>CS   | • Pôle de l'Appareil locomoteur<br>- Service d'Orthopédie / CCOM d'Ilkirsch   | 42.01 Anatomie (option clinique, orthopédie<br>traumatologique)  |
| COLLANGE Olivier<br>P0193                 | NRP6<br>NCS  | • Pôle d'Anesthésie / Réanimations chirurgicales / SAMU-SMUR<br>- Service d'Anesthésiologie-Réanimation Chirurgicale / NHC                          | 48.01 <b>Anesthésiologie-Réanimation</b> ;<br>Médecine d'urgence (option Anesthésio-<br>logie-Réanimation - Type clinique) |
| CRIBIER Bernard<br>P0045                  | NRP6<br>CS   | • Pôle de Urologie, Morphologie et Dermatologie<br>- Service de Dermatologie / Hôpital Civil  | 50.03 Dermato-Vénérologie  |
| DANION Jean-Marie<br>P0046                | NRP6<br>NCS  | • Pôle de Psychiatrie et de santé mentale<br>- Service de Psychiatrie 1 / Hôpital Civil   | 49.03 Psychiatrie d'adultes  |
| de BLAY de GAIX Frédéric<br>P0048         | RP6<br>CS    | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Pneumologie / Nouvel Hôpital Civil  | 51.01 Pneumologie  |
| DEBRY Christian<br>P0049                  | NRP6<br>CS   | • Pôle Tête et Cou - CETD<br>- Serv. d'Oto-rhino-laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale / HP  | 55.01 Oto-rhino-laryngologie   |
| de SEZE Jérôme<br>P0057                   | NRP6<br>NCS  | • Pôle Tête et Cou - CETD<br>- Service de Neurologie / Hôpital de Hautepierre   | 49.01 Neurologie   |
| DERUELLE Philippe                         |              | • Pôle de Gynécologie-Obstétrique<br>- Service de Gynécologie-Obstétrique / Hôpital de Hautepierre  | 54.03 Gynécologie-Obstétrique; gynécologie<br>médicale: option gynécologie-obsté-<br>trique                                |
| DIEMUNSCH Pierre<br>P0051                 | RP6<br>CS    | • Pôle d'Anesthésie / Réanimations chirurgicales / SAMU-SMUR<br>- Service d'Anesthésie-Réanimation Chirurgicale / Hôpital de Hautepierre            | 48.01 Anesthésiologie-réanimation<br>(option clinique)   |
| Mme DOLLFUS-WALTMANN<br>Hélène<br>P0054   | NRP6<br>CS   | • Pôle de Biologie<br>- Service de Génétique Médicale / Hôpital de Hautepierre  | 47.04 Génétique (type clinique)  |
| DUCLOS Bernard<br>P0055                   | NRP6<br>CS   | • Pôle des Pathologies digestives, hépatiques et de la transplantation<br>- Service d'Hépto-Gastro-Entérologie et d'Assistance Nutritive / HP       | 52.01 Option : Gastro-entérologie  |
| DUFOUR Patrick (5) (7)<br>P0056           | S/nb<br>Cons | • Centre Régional de Lutte contre le cancer Paul Strauss (convention)   | 47.02 Option : Cancérologie clinique   |
| EHLINGER Matfhieu<br>P0188                | NRP6<br>NCS  | • Pôle de l'Appareil Locomoteur<br>- Service de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie/Hôpital de Hautepierre                                   | 50.02 Chirurgie Orthopédique et Traumatologique  |
| Mme ENTZ-WERLE Natacha<br>P0059           | NRP6<br>NCS  | • Pôle médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Service de Pédiatrie III / Hôpital de Hautepierre   | 54.01 Pédiatrie  |
| Mme FACCA Sybille<br>P0179                | NRP6<br>NCS  | • Pôle de l'Appareil locomoteur<br>- Service de la Main et des Nerfs périphériques / CCOM Ilkirsch  | 50.02 Chirurgie orthopédique et traumatologique  |
| Mme FAFI-KREMER Samira<br>P0060           | NRP6<br>CS   | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire (Institut) de Virologie / PTM HUS et Faculté  | 45.01 <b>Bactériologie-Virologie</b> ; Hygiène Hospitalière<br>Option Bactériologie-Virologie biologique                   |
| FALCOZ Pierre-Emmanuel<br>P0052           | NRP6<br>NCS  | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Chirurgie Thoracique / Nouvel Hôpital Civil   | 51.03 Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire  |
| GANGI Afshin<br>P0062                     | RP6<br>CS    | • Pôle d'Imagerie<br>- Service d'Imagerie A interventionnelle / Nouvel Hôpital Civil  | 43.02 Radiologie et imagerie médicale<br>(option clinique)   |
| GAUCHER David<br>P0063                    | NRP6<br>NCS  | • Pôle des Spécialités Médicales - Ophthalmologie / SMO<br>- Service d'Ophthalmologie / Nouvel Hôpital Civil  | 55.02 Ophtalmologie  |
| GENY Bernard<br>P0064                     | NRP6<br>CS   | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Physiologie et d'Explorations fonctionnelles / NHC  | 44.02 Physiologie (option biologique)  |
| GEORG Yannick                             |              | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Chirurgie Vasculaire et de transplantation rénale / NHC                     | 51.04 <b>Chirurgie vasculaire</b> ; médecine vasculaire / Option : chirurgie vasculaire                                    |
| GICQUEL Philippe<br>P0065                 | NRP6<br>CS   | • Pôle médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Service de Chirurgie Pédiatrique / Hôpital Hautepierre  | 54.02 Chirurgie infantile  |
| GOICHOT Bernard<br>P0066                  | RP6<br>CS    | • Pôle de Médecine Interne, Rhumatologie, Nutrition, Endocrinologie,<br>Diabétologie (MIRNED)<br>- Service de Médecine interne et de nutrition / HP | 54.04 Endocrinologie, diabète et maladies<br>métaboliques  |
| Mme GONZALEZ Maria<br>P0067               | NRP6<br>CS   | • Pôle de Santé publique et santé au travail<br>- Service de Pathologie Professionnelle et Médecine du Travail / HC                                 | 46.02 Médecine et santé au travail Travail   |

| NOM et Prénoms                    | CS*         | Services Hospitaliers ou Institut / Localisation   | Sous-section du Conseil National des Universités   |
|-----------------------------------|-------------|--|--|
| GOTTENBERG Jacques-Eric<br>P0068  | NRPô<br>CS  | • Pôle de Médecine Interne, Rhumatologie, Nutrition, Endocrinologie, Diabétologie (MIRNED)<br>- Service de Rhumatologie / Hôpital Hautepierre                                      | 50.01 Rhumatologie   |
| HANNEDOUCHE Thierry<br>P0071      | NRPô<br>CS  | • Pôle de Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service de Néphrologie - Dialyse / Nouvel Hôpital Civil   | 52.03 Néphrologie  |
| HANSMANN Yves<br>P0072            | NRPô<br>CS  | • Pôle de Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service des Maladies infectieuses et tropicales / Nouvel Hôpital Civil  | 45.03 Option : Maladies infectieuses   |
| HERBRECHT Raoul<br>P0074          | RPô<br>NCS  | • Pôle d'Oncolo-Hématologie<br>- Service d'hématologie et d'Oncologie / Hôp. Hautepierre   | 47.01 <b>Hématologie</b> ; Transfusion   |
| HIRSCH Edouard<br>P0075           | NRPô<br>NCS | • Pôle Tête et Cou - CETD<br>- Service de Neurologie / Hôpital de Hautepierre  | 49.01 Neurologie   |
| IMPERIALE Alessio<br>P0194        | NRPô<br>NCS | • Pôle d'Imagerie<br>- Service de Biophysique et de Médecine nucléaire/Hôpital de Hautepierre  | 43.01 Biophysique et médecine nucléaire  |
| ISNER-HOROBETI Marie-Eve<br>P0189 |             | • Pôle de Médecine Physique et de Réadaptation<br>- Institut Universitaire de Réadaptation / Clémenceau  | 49.05 <b>Médecine Physique et Réadaptation</b>   |
| JAULHAC Benoît<br>P0078           | NRPô<br>CS  | • Pôle de Biologie<br>- Institut (Laboratoire) de Bactériologie / PTM HUS et Faculté de Méd.   | 45.01 Option : <b>Bactériologie</b> -virologie (biologique)                                  |
| Mme JEANDIDIER Nathalie<br>P0079  | NRPô<br>CS  | • Pôle de Médecine Interne, Rhumatologie, Nutrition, Endocrinologie, Diabétologie (MIRNED)<br>- Service d'Endocrinologie, diabète et nutrition / HC                                | 54.04 Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques                                       |
| Mme JESEL-MOREL Laurence          |             | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Cardiologie / Nouvel Hôpital Civil   | 51.02 Cardiologie  |
| KALTENBACH Georges<br>P0081       | RPô<br>CS   | • Pôle de Gériatrie<br>- Service de Médecine Interne - Gériatrie / Hôpital de la Robertsau   | 53.01 Option : gériatrie et biologie du vieillissement                                       |
| KEMPF Jean-François<br>P0083      | RPô<br>CS   | • Pôle de l'Appareil locomoteur<br>- Centre de Chirurgie Orthopédique et de la Main-CCOM / Illkirch  | 50.02 Chirurgie orthopédique et traumatologique  |
| Mme KESSLER Laurence<br>P0084     | NRPô<br>NCS | • Pôle de Médecine Interne, Rhumatologie, Nutrition, Endocrinologie, Diabétologie (MIRNED)<br>- Service d'Endocrinologie, Diabète, Nutrition et Addictologie / Méd. B / HC         | 54.04 Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques                                       |
| KESSLER Romain<br>P0085           | NRPô<br>NCS | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Pneumologie / Nouvel Hôpital Civil   | 51.01 Pneumologie  |
| KINDO Michel<br>P0195             | NRPô<br>NCS | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Chirurgie Cardio-vasculaire / Nouvel Hôpital Civil   | 51.03 Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire  |
| KOPFERSCHMITT Jacques<br>P0086    | NRPô<br>NCS | • Pôle Urgences - Réanimations médicales / Centre antipoison<br>- Service d'Urgences médico-chirurgicales adultes/Nouvel Hôpital Civil   | 48.04 Thérapeutique (option clinique)  |
| Mme KORGANOW Anne-Sophie<br>P0087 | NRPô<br>CS  | • Pôle de Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service de Médecine Interne et d'Immunologie Clinique / NHC   | 47.03 Immunologie (option clinique)  |
| KREMER Stéphane<br>M0038 / P0174  | NRPô<br>CS  | • Pôle d'Imagerie<br>- Service Imagerie 2 - Neuroradio Ostéoarticulaire - Pédiatrie / HP   | 43.02 Radiologie et imagerie médicale (option clinique)                                      |
| KUHN Pierre<br>P0175              | NRPô<br>NCS | • Pôle médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Service de Néonatalogie et Réanimation néonatale (Pédiatrie II) / Hôpital de Hautepierre   | 54.01 Pédiatrie  |
| KURTZ Jean-Emmanuel<br>P0089      | NRPô<br>CS  | • Pôle d'Onco-Hématologie<br>- Service d'hématologie et d'Oncologie / Hôpital Hautepierre  | 47.02 Option : Cancérologie (clinique)   |
| Mme LALANNE-TONGIO<br>Laurence    |             | • Pôle de Psychiatrie et de santé mentale<br>- Service de Psychiatrie I / Hôpital Civil  | 49.03 Psychiatrie d'adultes  |
| LANG Hervé<br>P0090               | NRPô<br>NCS | • Pôle de Chirurgie plastique reconstructrice et esthétique, Chirurgie maxillo-faciale, Morphologie et Dermatologie<br>- Service de Chirurgie Urologique / Nouvel Hôpital Civil    | 52.04 Urologie   |
| LANGER Bruno<br>P0091             | RPô<br>NCS  | • Pôle de Gynécologie-Obstétrique<br>- Service de Gynécologie-Obstétrique / Hôpital de Hautepierre   | 54.03 <b>Gynécologie-Obstétrique</b> ; gynécologie médicale : option gynécologie-Obstétrique |
| LAUGEL Vincent<br>P0092           | NRPô<br>CS  | • Pôle médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Service de Pédiatrie 1 / Hôpital Hautepierre   | 54.01 Pédiatrie  |
| LE MINOR Jean-Marie<br>P0190      | NRPô<br>NCS | • Pôle d'Imagerie<br>- Institut d'Anatomie Normale / Faculté de Médecine<br>- Service de Neuroradiologie, d'imagerie Ostéoarticulaire et interventionnelle/ Hôpital de Hautepierre | 42.01 <b>Anatomie</b>  |
| LIPSKER Dan<br>P0093              | NRPô<br>NCS | • Pôle de Chirurgie plastique reconstructrice et esthétique, Chirurgie maxillo-faciale, Morphologie et Dermatologie<br>- Service de Dermatologie / Hôpital Civil                   | 50.03 Dermato-vénéréologie   |
| LIVERNEAUX Philippe<br>P0094      | NRPô<br>CS  | • Pôle de l'Appareil locomoteur<br>- Service de Chirurgie de la main - CCOM / Illkirch   | 50.02 Chirurgie orthopédique et traumatologique  |
| MALOUF GABRIEL                    |             | • Pôle d'Onco-hématologie<br>- Service d'Hématologie et d'Oncologie / Hôpital de Hautepierre   | 47.01 Hématologie: transfusion   |
| MARESCAUX Christian (5)<br>P0097  | NRPô<br>NCS | • Pôle Tête et Cou - CETD<br>- Service de Neurologie / Hôpital de Hautepierre  | 49.01 Neurologie   |
| MARK Manuel<br>P0098              | NRPô<br>NCS | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Cytogénétique, Cytologie et Histologie quantitative / Hôpital de Hautepierre  | 54.05 Biologie et médecine du développement et de la reproduction (option biologique)        |
| MARTIN Thierry<br>P0099           | NRPô<br>NCS | • Pôle de Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service de Médecine Interne et d'Immunologie Clinique / NHC   | 47.03 Immunologie (option clinique)  |

| NOM et Prénoms                            | CS*         | Services Hospitaliers ou Institut / Localisation  | Sous-section du Conseil National des Universités  |
|---|-------------|---|---|
| MASSARD Gilbert<br>P0100                  | NRP6<br>NCS | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Chirurgie Thoracique / Nouvel Hôpital Civil   | 51.03 Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire   |
| Mme MATHÉLIN Carole<br>P0101              | NRP6<br>NCS | • Pôle de Gynécologie-Obstétrique<br>- Unité de Sénologie - Hôpital Civil   | 54.03 <b>Gynécologie-Obstétrique</b> ; Gynécologie Médicale                                       |
| MAUVIEUX Laurent<br>P0102                 | NRP6<br>CS  | • Pôle d'Onco-Hématologie<br>- Laboratoire d'Hématologie Biologique - Hôpital de Haute-pierre<br>• Institut d'Hématologie / Faculté de Médecine   | 47.01 <b>Hématologie</b> ; Transfusion<br>Option Hématologie Biologique                           |
| MAZZUCOTELLI Jean-Philippe<br>P0103       | RP6<br>CS   | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Chirurgie Cardio-vasculaire / Nouvel Hôpital Civil  | 51.03 Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire   |
| MERTES Paul-Michel<br>P0104               | NRP6<br>CS  | • Pôle d'Anesthésiologie / Réanimations chirurgicales / SAMU-SMUR<br>- Service d'Anesthésiologie-Réanimation chirurgicale / Nouvel Hôpital Civil  | 48.01 Option : Anesthésiologie-Réanimation (type mixte)   |
| MEYER Nicolas<br>P0105                    | NRP6<br>NCS | • Pôle de Santé publique et Santé au travail<br>- Laboratoire de Biostatistiques / Hôpital Civil<br>• Biostatistiques et Informatique / Faculté de médecine / Hôpital Civil                             | 46.04 Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication (option biologique) |
| MEZIANI Ferhat<br>P0106                   | NRP6<br>NCS | • Pôle Urgences - Réanimations médicales / Centre antipoison<br>- Service de Réanimation Médicale / Nouvel Hôpital Civil  | 48.02 Réanimation   |
| MONASSIER Laurent<br>P0107                | NRP6<br>CS  | • Pôle de Pharmacie-pharmacologie<br>• Unité de Pharmacologie clinique / Nouvel Hôpital Civil   | 48.03 Option : Pharmacologie fondamentale   |
| MOREL Olivier<br>P0108                    | NRP6<br>NCS | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Cardiologie / Nouvel Hôpital Civil  | 51.02 Cardiologie   |
| MOULIN Bruno<br>P0109                     | NRP6<br>CS  | • Pôle de Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service de Néphrologie - Transplantation / Nouvel Hôpital Civil  | 52.03 Néphrologie   |
| MUTTER Didier<br>P0111                    | RP6<br>CS   | • Pôle Hépato-digestif de l'Hôpital Civil<br>- Service de Chirurgie Digestive / NHC   | 52.02 Chirurgie digestive   |
| NAMER Izzie Jacques<br>P0112              | NRP6<br>CS  | • Pôle d'Imagerie<br>- Service de Biophysique et de Médecine nucléaire / Haute-pierre / NHC   | 43.01 Biophysique et médecine nucléaire   |
| NISAND Israël<br>P0113                    | NRP6<br>NCS | • Pôle de Gynécologie-Obstétrique<br>- Service de Gynécologie Obstétrique / Hôpital de Haute-pierre   | 54.03 <b>Gynécologie-Obstétrique</b> ; gynécologie médicale : option gynécologie-Obstétrique      |
| NOEL Georges<br>P0114                     | NCS         | • Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss (par convention)<br>- Département de radiothérapie   | 47.02 Cancérologie ; <b>Radiothérapie</b><br>Option Radiothérapie biologique                      |
| OHLMANN Patrick<br>P0115                  | NRP6<br>CS  | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Cardiologie / Nouvel Hôpital Civil  | 51.02 Cardiologie   |
| Mme OLLAND Anne                           |             | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Chirurgie thoracique / Nouvel Hôpital Civil   | 51.03 Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire   |
| Mme PAILLARD Catherine<br>P0180           | NRP6<br>CS  | • Pôle médico-chirurgicale de Pédiatrie<br>- Service de Pédiatrie III / Hôpital de Haute-pierre   | 54.01 Pédiatrie   |
| PELACCIA Thierry                          |             | • Pôle d'Anesthésie / Réanimations chirurgicales / SAMU-SMUR<br>- Service SAMU/SMUR   | 48.02 Réanimation et anesthésiologie<br>Option : Médecine d'urgences                              |
| Mme PERRETTA Silvana<br>P0117             | NRP6<br>NCS | • Pôle Hépato-digestif de l'Hôpital Civil<br>- Service d'Urgence, de Chirurgie Générale et Endocrinienne / NHC  | 52.02 Chirurgie digestive   |
| PESSAUX Patrick<br>P0118                  | NRP6<br>NCS | • Pôle des Pathologies digestives, hépatiques et de la transplantation<br>- Service d'Urgence, de Chirurgie Générale et Endocrinienne / NHC   | 53.02 Chirurgie Générale  |
| PETIT Thierry<br>P0119                    | CDp         | • Centre Régional de Lutte Contre le Cancer - Paul Strauss (par convention)<br>- Département de médecine oncologique  | 47.02 <b>Cancérologie</b> ; Radiothérapie<br>Option : Cancérologie Clinique                       |
| PIVOT Xavier                              |             | • Centre Régional de Lutte Contre le Cancer - Paul Strauss (par convention)<br>- Département de médecine oncologique  | 47.02 <b>Cancérologie</b> ; Radiothérapie<br>Option : Cancérologie Clinique                       |
| POTTECHER Julien<br>P0181                 | NRP6<br>NCS | • Pôle d'Anesthésie / Réanimations chirurgicales / SAMU-SMUR<br>- Service d'Anesthésie et de Réanimation Chirurgicale / Hôpital de Haute-pierre   | 48.01 <b>Anesthésiologie-réanimation</b> ;<br>Médecine d'urgence (option clinique)                |
| PRADIGNAC Alain<br>P0123                  | NRP6<br>NCS | • Pôle de Médecine Interne, Rhumatologie, Nutrition, Endocrinologie,<br>Diabétologie (MIRNED)<br>- Service de Médecine interne et nutrition / HP  | 44.04 Nutrition   |
| PROUST François<br>P0182                  | NRP6<br>CS  | • Pôle Tête et Cou<br>- Service de Neurochirurgie / Hôpital de Haute-pierre   | 49.02 Neurochirurgie  |
| Mme QUOIX Elisabeth<br>P0124              | NRP6<br>CS  | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Pneumologie / Nouvel Hôpital Civil  | 51.01 Pneumologie   |
| Pr RAUL Jean-Sébastien<br>P0125           | NRP6<br>CS  | • Pôle de Biologie<br>- Service de Médecine Légale, Consultation d'Urgences médico-judiciaires<br>et Laboratoire de Toxicologie / Faculté et NHC<br>• Institut de Médecine Légale / Faculté de Médecine | 46.03 Médecine Légale et droit de la santé  |
| REIMUND Jean-Marie<br>P0126               | NRP6<br>NCS | • Pôle des Pathologies digestives, hépatiques et de la transplantation<br>- Service d'Hépto-Gastro-Entérologie et d'Assistance Nutritive / HP   | 52.01 Option : Gastro-entérologie   |
| Pr RICCI Roméo<br>P0127                   | NRP6<br>NCS | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire / HP  | 44.01 Biochimie et biologie moléculaire   |
| ROHR Serge<br>P0128                       | NRP6<br>CS  | • Pôle des Pathologies digestives, hépatiques et de la transplantation<br>- Service de Chirurgie générale et Digestive / HP   | 53.02 Chirurgie générale  |
| Mme ROSSIGNOL -BERNARD<br>Sylvie<br>P0196 | NRP6<br>CS  | • Pôle médico-chirurgicale de Pédiatrie<br>- Service de Pédiatrie I / Hôpital de Haute-pierre   | 54.01 Pédiatrie   |

| NOM et Prénoms                        | CS*                   | Services Hospitaliers ou Institut / Localisation  | Sous-section du Conseil National des Universités  |
|---------------------------------------|-----------------------|---|---|
| ROUL Gérard<br>P0129                  | NRP0<br>NCS           | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Cardiologie / Nouvel Hôpital Civil  | 51.02 Cardiologie   |
| Mme ROY Catherine<br>P0140            | NRP0<br>CS            | • Pôle d'Imagerie<br>- Serv. d'Imagerie B - Imagerie viscérale et cardio-vasculaire / NHC   | 43.02 Radiologie et imagerie médicale (opt clinique)  |
| SAUDER Philippe<br>P0142              | NRP0<br>CS            | • Pôle Urgences - Réanimations médicales / Centre antipoison<br>- Service de Réanimation médicale / Nouvel Hôpital Civil  | 48.02 Réanimation   |
| SAUER Arnaud<br>P0183                 | NRP0<br>NCS           | • Pôle de Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service d'Ophtalmologie / Nouvel Hôpital Civil   | 55.02 Ophtalmologie   |
| SAULEAU Erik-André<br>P0184           | NRP0<br>NCS           | • Pôle de Santé publique et Santé au travail<br>- Laboratoire de Biostatistiques / Hôpital Civil<br>• Biostatistiques et Informatique / Faculté de médecine / HC  | 46.04 Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication (option biologique) |
| SAUSSINE Christian<br>P0143           | RP0<br>CS             | • Pôle d'Urologie, Morphologie et Dermatologie<br>- Service de Chirurgie Urologique / Nouvel Hôpital Civil  | 52.04 Urologie  |
| SCHNEIDER Francis<br>P0144            | RP0<br>CS             | • Pôle Urgences - Réanimations médicales / Centre antipoison<br>- Service de Réanimation médicale / Hôpital de Haute-pierre   | 48.02 Réanimation   |
| Mme SCHRÖDER Carmen<br>P0185          | NRP0<br>CS            | • Pôle de Psychiatrie et de santé mentale<br>- Service de Psychothérapie pour Enfants et Adolescents / Hôpital Civil  | 49.04 <u>Pédopsychiatrie</u> ; Addictologie   |
| SCHULTZ Philippe<br>P0145             | NRP0<br>NCS           | • Pôle Tête et Cou - CETD<br>- Serv. d'Oto-rhino-laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale / HP  | 55.01 Oto-rhino-laryngologie  |
| SERFATY Lawrence<br>P0197             | NRP0<br>NCS           | • Pôle des Pathologies digestives, hépatiques et de la transplantation<br>- Service d'Hépto-Gastro-Entérologie et d'Assistance Nutritive / HP   | 52.01 Gastro-entérologie ; Hépatologie ; Addictologie<br>Option : <b>Hépatologie</b>              |
| SIBILIA Jean<br>P0146                 | NRP0<br>NCS           | • Pôle de Médecine Interne, Rhumatologie, Nutrition, Endocrinologie, Diabétologie (MIRNED)<br>- Service de Rhumatologie / Hôpital Haute-pierre  | 50.01 Rhumatologie  |
| Mme SPEEG-SCHATZ Claude<br>P0147      | RP0<br>CS             | • Pôle de Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service d'Ophtalmologie / Nouvel Hôpital Civil   | 55.02 Ophtalmologie   |
| STEIB Jean-Paul<br>P0149              | NRP0<br>CS            | • Pôle de l'Appareil locomoteur<br>- Service de Chirurgie du rachis / Hôpital Civil   | 50.02 Chirurgie orthopédique et traumatologique   |
| STEPHAN Dominique<br>P0150            | NRP0<br>CS            | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service des Maladies vasculaires - HTA - Pharmacologie clinique / Nouvel Hôpital Civil   | 51.04 Option : Médecine vasculaire  |
| THAVEAU Fabien<br>P0152               | NRP0<br>NCS           | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Chirurgie vasculaire et de transplantation rénale / NHC   | 51.04 Option : Chirurgie vasculaire   |
| Mme TRANCHANT Christine<br>P0153      | NRP0<br>CS            | • Pôle Tête et Cou - CETD<br>- Service de Neurologie / Hôpital de Haute-pierre  | 49.01 Neurologie  |
| VEILLON Francis<br>P0155              | NRP0<br>CS            | • Pôle d'Imagerie<br>- Service d'Imagerie 1 - Imagerie viscérale, ORL et mammaire / Hôpital Haute-pierre  | 43.02 Radiologie et imagerie médicale (option clinique)   |
| VELTEN Michel<br>P0156                | NRP0<br>NCS<br><br>CS | • Pôle de Santé publique et Santé au travail<br>- Département de Santé Publique / Secteur 3 - Epidémiologie et Economie de la Santé / Hôpital Civil<br>• Laboratoire d'Epidémiologie et de santé publique / HC / Fac de Médecine<br>• Centre de Lutte contre le Cancer Paul Strauss - Serv. Epidémiologie et de biostatistiques | 46.01 Epidémiologie, économie de la santé et prévention (option biologique)                       |
| VETTER Denis<br>P0157                 | NRP0<br>NCS           | • Pôle de Médecine Interne, Rhumatologie, Nutrition, Endocrinologie, Diabétologie (MIRNED)<br>- Service de Médecine Interne, Diabète et Maladies métaboliques/HC  | 52.01 Option : Gastro-entérologie   |
| VIDAILHET Pierre<br>P0158             | NRP0<br>NCS           | • Pôle de Psychiatrie et de santé mentale<br>- Service de Psychiatrie I / Hôpital Civil   | 49.03 Psychiatrie d'adultes   |
| VIVILLE Stéphane<br>P0159             | NRP0<br>NCS           | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Parasitologie et de Pathologies tropicales / Fac. de Médecine  | 54.05 Biologie et médecine du développement et de la reproduction (option biologique)             |
| VOGEL Thomas<br>P0160                 | NRP0<br>CS            | • Pôle de Gériatrie<br>- Service de soins de suite et réadaptations gériatriques / Hôpital de la Robertsau  | 51.01 Option : Gériatrie et biologie du vieillissement  |
| WEBER Jean-Christophe Pierre<br>P0162 | NRP0<br>CS            | • Pôle de Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service de Médecine Interne / Nouvel Hôpital Civil   | 53.01 Option : Médecine Interne   |
| WOLF Philippe<br>P0164                | NRP0<br>NCS           | • Pôle des Pathologies digestives, hépatiques et de la transplantation<br>- Service de Chirurgie Générale et de Transplantations multiorganes / HP<br>- Coordonnateur des activités de prélèvements et transplantations des HU  | 53.02 Chirurgie générale  |
| Mme WOLFF Valérie                     |                       | • Pôle Tête et Cou<br>- Service de Neurochirurgie / Hôpital de Haute-pierre   | 49.01 Neurologie  |

| NOM et Prénoms | CS* | Services Hospitaliers ou Institut / Localisation | Sous-section du Conseil National des Universités |
|----------------|-----|--|--|
|----------------|-----|--|--|

HC : Hôpital Civil - HP : Hôpital de Haute-pierre - NHC : Nouvel Hôpital Civil

\* : CS (Chef de service) ou NCS (Non Chef de service hospitalier) Cspi : Chef de service par intérim CSp : Chef de service provisoire (un an)

CU : Chef d'unité fonctionnelle

Pô : Pôle

RPô (Responsable de Pôle) ou NRPô (Non Responsable de Pôle)

Cons. : Consultanat hospitalier (poursuite des fonctions hospitalières sans chefferie de service) Dir : Directeur

(1) En surnombre universitaire jusqu'au 31.08.2018

(7) Consultant hospitalier (pour un an) éventuellement renouvelable --> 31.08.2017

(3)

(5) En surnombre universitaire jusqu'au 31.08.2019

(8) Consultant hospitalier (pour une 2ème année) --> 31.08.2017

(6) En surnombre universitaire jusqu'au 31.08.2017

(9) Consultant hospitalier (pour une 3ème année) --> 31.08.2017

#### A4 - PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES

|                      |            |   |       |                    |
|----------------------|------------|---|-------|--------------------|
| HABERSETZER François | CS         | Pôle Hépato-digestif 4190<br>Service de Gastro-Entérologie - NHC                      | 52.01 | Gastro-Entérologie |
| CALVEL Laurent       | NRPô<br>CS | Pôle Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>Service de Soins palliatifs / NHC | 55.02 | Ophtalmologie      |
| SALVAT Eric          |            | Centre d'Evaluation et de Traitement de la Douleur                                    |       |                    |

**MO112 B1 - MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS (MCU-PH)**

| NOM et Prénoms                                   | CS* | Services Hospitaliers ou Institut / Localisation  | Sous-section du Conseil National des Universités  |
|--|-----|---|---|
| AGIN Arnaud<br>M0001                             |     | • Pôle d'Imagerie<br>- Service de Biophysique et de Médecine nucléaire/Hôpital de Hautepierre   | 43.01 Biophysique et Médecine nucléaire   |
| Mme ANTAL Maria Cristina<br>M0003                |     | • Pôle de Biologie<br>- Service de Pathologie / Hautepierre<br>• Faculté de Médecine / Institut d'Histologie  | 42.02 Histologie, Embryologie et Cytogénétique (option biologique)                        |
| Mme ANTONI Delphine<br>M0109                     |     | • Centre de lutte contre le cancer Paul Strauss   | 47.02 Cancérologie ; <b>Radiothérapie</b>   |
| ARGEMI Xavier<br>M0112                           |     | • Pôle de Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service des Maladies infectieuses et tropicales / Nouvel Hôpital Civil   | 45.03 Maladies infectieuses; Maladies tropicales<br>Option : <b>Maladies infectieuses</b> |
| Mme AYME-DIETRICH Estelle                        |     | • Pôle de Pharmacologie<br>- Unité de Pharmacologie clinique / NHC  | 48.03 Option: pharmacologie fondamentale  |
| Mme BARNIG Cindy<br>M0110                        |     | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles / NHC  | 44.02 <b>Physiologie</b>  |
| Mme BARTH Heidi<br>M0005<br>(Dispo → 31.12.2018) |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Virologie / Hôpital Civil  | 45.01 Bactériologie - <u>Virologie</u><br>(Option biologique)                             |
| Mme BIANCALANA Valérie<br>M0008                  |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Diagnostic Génétique / Nouvel Hôpital Civil  | 47.04 Génétique (option biologique)   |
| BLONDET Cyrille<br>M0091                         |     | • Pôle d'Imagerie<br>- Service de Biophysique et de Médecine nucléaire/Hôpital de Hautepierre   | 43.01 Biophysique et médecine nucléaire   |
| BONNEMAINS Laurent<br>M0099                      |     | • Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Chirurgie cardio-vasculaire / Nouvel Hôpital Civil  | 54.01 Pédiatrie   |
| BOUSIGES Olivier<br>M0092                        |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire / HP  | 44.01 Biochimie et biologie moléculaire   |
| CARAPITO Raphaël<br>M0113                        |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire d'Immunologie biologique / Nouvel Hôpital Civil   | 47.03 Immunologie   |
| CAZZATO Roberto                                  |     | • Pôle d'Imagerie<br>- Service d'Imagerie A interventionnelle / NHC   | 43.02 Radiologie et imagerie médicale (option clinique)                                   |
| CERALINE Jocelyn<br>M0012                        |     | • Pôle d'Oncologie et d'Hématologie<br>- Service d'Oncologie et d'Hématologie / HP  | 47.02 <b>Cancérologie</b> ; Radiothérapie (option biologique)                             |
| CHOQUET Philippe<br>M0014                        |     | • Pôle d'Imagerie<br>- Service de Biophysique et de Médecine nucléaire / HP   | 43.01 Biophysique et médecine nucléaire   |
| COLLONGUES Nicolas<br>M0016                      |     | • Pôle Tête et Cou-CETD<br>- Centre d'Investigation Clinique / NHC et HP  | 49.01 Neurologie  |
| DALI-YOUCEF Ahmed Nassim<br>M0017                |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire / NHC  | 44.01 Biochimie et biologie moléculaire   |
| Mme de MARTINO Sylvie<br>M0018                   |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Bactériologie / PTM HUS et Faculté de Médecine   | 45.01 <b>Bactériologie-virologie</b><br>Option bactériologie-virologie biologique         |
| Mme DEPIENNE Christel<br>M0100 (Dispo->15.08.18) | CS  | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Cytogénétique / HP   | 47.04 Génétique   |
| DEVYS Didier<br>M0019                            |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Diagnostic génétique / Nouvel Hôpital Civil  | 47.04 Génétique (option biologique)   |
| DOLLÉ Pascal<br>M0021                            |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et biologie moléculaire / NHC  | 44.01 Biochimie et biologie moléculaire   |
| Mme ENACHE Irina<br>M0024                        |     | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Physiologie et d'Explorations fonctionnelles / NHC  | 44.02 Physiologie   |
| FILISSETTI Denis<br>M0025                        |     | • Pôle de Biologie<br>- Labo. de Parasitologie et de Mycologie médicale / PTM HUS et Faculté  | 45.02 Parasitologie et mycologie (option biologique)                                      |
| FOUCHER Jack<br>M0027                            |     | • Institut de Physiologie / Faculté de Médecine<br>• Pôle de Psychiatrie et de santé mentale<br>- Service de Psychiatrie I / Hôpital Civil  | 44.02 Physiologie (option clinique)   |
| GUERIN Eric<br>M0032                             |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire / HP  | 44.03 Biologie cellulaire (option biologique)   |
| Mme HARSAN-RASTEI Laura                          |     | • Pôle d'Imagerie<br>- Service de Biophysique et de Médecine nucléaire/Hôpital de Hautepierre   | 43.01 Biophysique et médecine nucléaire   |
| Mme HEIMBURGER Céline                            |     | • Pôle d'Imagerie<br>- Service de Biophysique et de Médecine nucléaire/Hôpital de Hautepierre   | 43.01 Biophysique et médecine nucléaire   |
| Mme HELMS Julie<br>M0114                         |     | • Pôle d'Urgences / Réanimations médicales / CAP<br>- Service de Réanimation médicale / Nouvel Hôpital Civil  | 48.02 Réanimation ; Médecine d'urgence<br>Option : <b>Réanimation</b>                     |
| HUBELE Fabrice<br>M0033                          |     | • Pôle d'Imagerie<br>- Service de Biophysique et de Médecine nucléaire / HP et NHC  | 43.01 Biophysique et médecine nucléaire   |
| Mme JACAMON-FARRUGIA<br>Audrey<br>M0034          |     | • Pôle de Biologie<br>- Service de Médecine Légale, Consultation d'Urgences médico-judiciaires et Laboratoire de Toxicologie / Faculté et HC<br>• Institut de Médecine Légale / Faculté de Médecine | 46.03 Médecine Légale et droit de la santé  |
| JEGU Jérémie<br>M0101                            |     | • Pôle de Santé publique et Santé au travail<br>- Service de Santé Publique / Hôpital Civil   | 46.01 Epidémiologie, Economie de la santé et Prévention (option biologique)               |

| NOM et Prénoms                                    | CS* | Services Hospitaliers ou Institut / Localisation  | Sous-section du Conseil National des Universités                                      |
|---|-----|---|---|
| JEHL François<br>M0035                            |     | • Pôle de Biologie<br>- Institut (Laboratoire) de Bactériologie / PTM HUS et Faculté  | 45.01 Option : <b>Bactériologie</b> -virologie (biologique)                           |
| KASTNER Philippe<br>M0089                         |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de diagnostic génétique / Nouvel Hôpital Civil  | 47.04 Génétique (option biologique)   |
| Mme KEMMEL Véronique<br>M0036                     |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire / HP  | 44.01 Biochimie et biologie moléculaire   |
| Mme LAMOUR Valérie<br>M0040                       |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire / HP  | 44.01 Biochimie et biologie moléculaire   |
| Mme LANNES Béatrice<br>M0041                      |     | • Institut d'Histologie / Faculté de Médecine<br>• Pôle de Biologie<br>- Service de Pathologie / Hôpital de Hautepierre   | 42.02 Histologie, Embryologie et Cytogénétique (option biologique)                    |
| LAVAUX Thomas<br>M0042                            |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire / HP  | 44.03 Biologie cellulaire   |
| LAVIGNE Thierry<br>M0043                          | CS  | • Pôle de Santé Publique et Santé au travail<br>- Service d'Hygiène hospitalière et de médecine préventive / PTM et HUS<br>- Equipe opérationnelle d'Hygiène  | 46.01 Epidémiologie, économie de la santé et prévention (option biologique)           |
| Mme LEJAY Anne<br>M0102                           |     | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Physiologie et d'Explorations fonctionnelles / NHC  | 44.02 Physiologie (Biologique)  |
| LENORMAND Cédric<br>M0103                         |     | • Pôle de Chirurgie maxillo-faciale, Morphologie et Dermatologie<br>- Service de Dermatologie / Hôpital Civil   | 50.03 Dermato-Vénérologie   |
| LEPILLER Quentin<br>M0104<br>(Dispo → 31.08.2018) |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Virologie / PTM HUS et Faculté de Médecine   | 45.01 <b>Bactériologie-Virologie</b> ; Hygiène hospitalière (Biologique)              |
| Mme LETSCHER-BRU Valérie<br>M0045                 |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie médicale / PTM HUS<br>• Institut de Parasitologie / Faculté de Médecine  | 45.02 Parasitologie et mycologie (option biologique)                                  |
| LHERMITTE Benoît<br>M0115                         |     | • Pôle de Biologie<br>- Service de Pathologie / Hôpital de Hautepierre  | 42.03 Anatomie et cytologie pathologiques   |
| Mme LONSDORFER-WOLF<br>Evelyne<br>M0090           |     | • Institut de Physiologie Appliquée - Faculté de Médecine<br>• Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Physiologie et d'Explorations fonctionnelles / NHC   | 44.02 Physiologie   |
| LUTZ Jean-Christophe<br>M0046                     |     | • Pôle de Chirurgie plastique reconstructrice et esthétique, Chirurgie maxillo-faciale, Morphologie et Dermatologie<br>- Serv. de Chirurgie Maxillo-faciale, plastique reconstructrice et esthétique/HC | 55.03 Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie                                       |
| MEYER Alain<br>M0093                              |     | • Institut de Physiologie / Faculté de Médecine<br>• Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Physiologie et d'Explorations fonctionnelles / NHC   | 44.02 Physiologie (option biologique)   |
| MIGUET Laurent<br>M0047                           |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire d'Hématologie biologique / Hôpital de Hautepierre et NHC  | 44.03 Biologie cellulaire (type mixte : biologique)                                   |
| Mme MOUTOU Céline<br>ép. GUNTNER<br>M0049         | CS  | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Diagnostic préimplantatoire / CMCO Schiltigheim  | 54.05 Biologie et médecine du développement et de la reproduction (option biologique) |
| MULLER Jean<br>M0050                              |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Diagnostic génétique / Nouvel Hôpital Civil  | 47.04 Génétique (option biologique)   |
| NOLL Eric<br>M0111                                |     | • Pôle d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale SAMU-SMUR<br>- Service Anesthésiologie et de Réanimation Chirurgicale - Hôpital Hautepierre  | 48.01 <b>Anesthésiologie-Réanimation</b> ; Médecine d'urgence                         |
| Mme NOURRY Nathalie<br>M0011                      |     | • Pôle de Santé publique et Santé au travail<br>- Service de Pathologie professionnelle et de Médecine du travail - HC  | 46.02 Médecine et Santé au Travail (option clinique)                                  |
| PENCREAC'H Erwan<br>M0052                         |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et biologie moléculaire / Nouvel Hôpital Civil   | 44.01 Biochimie et biologie moléculaire   |
| PFAFF Alexander<br>M0053                          |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie médicale / PTM HUS   | 45.02 Parasitologie et mycologie  |
| Mme PITON Amélie<br>M0094                         |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Diagnostic génétique / NHC   | 47.04 Génétique (option biologique)   |
| PREVOST Gilles<br>M0057                           |     | • Pôle de Biologie<br>- Institut (Laboratoire) de Bactériologie / PTM HUS et Faculté  | 45.01 Option : <b>Bactériologie</b> -virologie (biologique)                           |
| Mme RADOSAVLJEVIC<br>Mirjana<br>M0058             |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire d'Immunologie biologique / Nouvel Hôpital Civil   | 47.03 Immunologie (option biologique)   |
| Mme REIX Nathalie<br>M0095                        |     | • Pôle de Biologie<br>- Labo. d'Explorations fonctionnelles par les isotopes / NHC<br>• Institut de Physique biologique / Faculté de Médecine   | 43.01 Biophysique et médecine nucléaire   |
| RIEGEL Philippe<br>M0059                          |     | • Pôle de Biologie<br>- Institut (Laboratoire) de Bactériologie / PTM HUS et Faculté  | 45.01 Option : <b>Bactériologie</b> -virologie (biologique)                           |
| ROGUE Patrick (cf. A2)<br>M0060                   |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biochimie et biologie moléculaire / NHC  | 44.01 Biochimie et biologie moléculaire (option biologique)                           |
| Mme ROLLAND Delphine                              |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire d'Hématologie biologique / NHC  | 44.03 Biologie cellulaire (type mixte : biologique)                                   |
| ROMAIN Benoît<br>M0061                            |     | • Pôle des Pathologies digestives, hépatiques et de la transplantation<br>- Service de Chirurgie générale et Digestive / HP   | 53.02 Chirurgie générale  |
| Mme RUPPERT Elisabeth<br>M0106                    |     | • Pôle Tête et Cou<br>- Service de Neurologie - Unité de Pathologie du Sommeil / Hôpital Civil  | 49.01 Neurologie  |

| NOM et Prénoms                                 | CS* | Services Hospitaliers ou Institut / Localisation   | Sous-section du Conseil National des Universités   |
|--|-----|--|--|
| Mme SABOU Alina<br>M0096                       |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie médicale / PTM HUS<br>• Institut de Parasitologie / Faculté de Médecine     | 45.02 Parasitologie et mycologie<br>(option biologique)                                  |
| Mme SAMAMA Brigitte<br>M0062                   |     | • Institut d'Histologie / Faculté de Médecine  | 42.02 Histologie, Embryologie et Cytogénétique<br>(option biologique)                    |
| Mme SCHEIDECKER Sophie                         |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Diagnostic génétique / Nouvel Hôpital Civil   | 47.04 Génétique (option biologique)  |
| Mme SCHNEIDER Anne<br>M0107                    |     | • Pôle médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Service de Chirurgie pédiatrique / Hôpital de Hautepierre  | 54.02 Chirurgie Infantile  |
| SCHRAMM Frédéric<br>M0068                      |     | • Pôle de Biologie<br>- Institut (Laboratoire) de Bactériologie / PTM HUS et Faculté   | 45.01 Option : <b>Bactériologie</b> -virologie (biologique)                              |
| Mme SOLIS Morgane                              |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Diagnostic Génétique / Nouvel Hôpital Civil   | 47.04 Génétique (option biologique)  |
| Mme SORDET Christelle<br>M0069                 |     | • Pôle de Médecine Interne, Rhumatologie, Nutrition, Endocrinologie, Diabétologie (MIRNED)<br>- Service de Rhumatologie / Hôpital de Hautepierre | 50.01 Rhumatologie   |
| TALHA Samy<br>M0070                            |     | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Physiologie et explorations fonctionnelles / NHC   | 44.02 Physiologie (option clinique)  |
| Mme TALON Isabelle<br>M0039                    |     | • Pôle médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Service de Chirurgie Infantile / Hôpital Hautepierre   | 54.02 Chirurgie infantile  |
| TELETIN Marius<br>M0071                        |     | • Pôle de Biologie<br>- Service de Biologie de la Reproduction / CMCO Schiltigheim   | 54.05 Biologie et médecine du développement<br>et de la reproduction (option biologique) |
| Mme URING-LAMBERT Béatrice<br>M0073            |     | • Institut d'Immunologie / HC<br>• Pôle de Biologie<br>- Laboratoire d'Immunologie biologique / Nouvel Hôpital Civil                             | 47.03 Immunologie (option biologique)  |
| VALLAT Laurent<br>M0074                        |     | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire d'Hématologie Biologique - Hôpital de Hautepierre  | 47.01 <b>Hématologie</b> ; Transfusion<br>Option Hématologie Biologique                  |
| Mme VILLARD Odile<br>M0076                     |     | • Pôle de Biologie<br>- Labo. de Parasitologie et de Mycologie médicale / PTM HUS et Fac   | 45.02 Parasitologie et mycologie (option biologique)                                     |
| Mme WOLF Michèle<br>M0010                      |     | • Chargé de mission - Administration générale<br>- Direction de la Qualité / Hôpital Civil   | 48.03 Option : Pharmacologie fondamentale  |
| Mme ZALOSZYC Ariane<br>ép. MARCANTONI<br>M0116 |     | • Pôle Médico-Chirurgical de Pédiatrie<br>- Service de Pédiatrie I / Hôpital de Hautepierre  | 54.01 Pédiatrie  |
| ZOLL Joffrey<br>M0077                          |     | • Pôle de Pathologie thoracique<br>- Service de Physiologie et d'Explorations fonctionnelles / HC  | 44.02 Physiologie (option clinique)  |

### B2 - PROFESSEURS DES UNIVERSITES (monoappartenant)

|                           |       |   |   |
|---------------------------|-------|---|---|
| Pr BONAHE Christian       | P0166 | Département d'Histoire de la Médecine / Faculté de Médecine | 72. Epistémologie - Histoire des sciences et des techniques |
| Mme la Pre RASMUSSEN Anne | P0186 | Département d'Histoire de la Médecine / Faculté de Médecine | 72. Epistémologie - Histoire des Sciences et des techniques |

### B3 - MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (monoappartenant)

|                       |       |   |   |
|-----------------------|-------|---|---|
| Mr KESSEL Nils        |       | Département d'Histoire de la Médecine / Faculté de Médecine | 72. Epistémologie - Histoire des Sciences et des techniques |
| Mr LANDRE Lionel      |       | ICUBE-UMR 7357 - Equipe IMIS / Faculté de Médecine          | 69. Neurosciences   |
| Mme THOMAS Marion     |       | Département d'Histoire de la Médecine / Faculté de Médecine | 72. Epistémologie - Histoire des Sciences et des techniques |
| Mme SCARFONE Marianna | M0082 | Département d'Histoire de la Médecine / Faculté de Médecine | 72. Epistémologie - Histoire des Sciences et des techniques |

### B4 - MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

|                     |       |  |                                    |
|---------------------|-------|--|------------------------------------|
| Mme CHAMBE Juliette | M0108 | Département de Médecine générale / Faculté de Médecine | 53.03 Médecine générale (01.09.15) |
|---------------------|-------|--|------------------------------------|

---

**C - ENSEIGNANTS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE**  
**C1 - PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES DE M. G. (mi-temps)**

|                        |       |   |
|------------------------|-------|---|
| Pr Ass. GRIES Jean-Luc | M0084 | Médecine générale (01.09.2017)  |
| Pr Ass. KOPP Michel    | P0167 | Médecine générale (depuis le 01.09.2001, renouvelé jusqu'au 31.08.2016) |

---

**C2 - MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE - TITULAIRE**

|                     |       |                                      |
|---------------------|-------|--------------------------------------|
| Dre CHAMBE Juliette | M0108 | 53.03 Médecine générale (01.09.2015) |
|---------------------|-------|--------------------------------------|

---

**C3 - MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DES UNIVERSITES DE M. G. (mi-temps)**

|                             |       |  |
|-----------------------------|-------|--|
| Dre BERTHOU anne            | M0109 | Médecine générale (01.09.2015 au 31.08.2018) |
| Dr BREITWILLER-DUMAS Claire |       | Médecine générale (01.09.2016 au 31.08.2019) |
| Dr GUILLOU Philippe         | M0089 | Médecine générale (01.11.2013 au 31.08.2016) |
| Dr HILD Philippe            | M0090 | Médecine générale (01.11.2013 au 31.08.2016) |
| Dr ROUGERIE Fabien          | M0097 | Médecine générale (01.09.2014 au 31.08.2017) |
| Dr SANSELMÉ Anne-Elisabeth  |       | Médecine générale                            |

---

**D - ENSEIGNANTS DE LANGUES ETRANGERES**  
**D1 - PROFESSEUR AGREGE, PRAG et PRCE DE LANGUES**

|                             |       |  |
|-----------------------------|-------|--|
| Mme ACKER-KESSLER Pia       | M0085 | Professeure certifiée d'Anglais (depuis 01.09.03)  |
| Mme CANDAS Peggy            | M0086 | Professeure agrégée d'Anglais (depuis le 01.09.99) |
| Mme SIEBENBOUR Marie-Noëlle | M0087 | Professeure certifiée d'Allemand (depuis 01.09.11) |
| Mme JUNGER Nicole           | M0088 | Professeure certifiée d'Anglais (depuis 01.09.09)  |
| Mme MARTEN Susanne          | M0098 | Professeure certifiée d'Allemand (depuis 01.09.14) |

---

**E - PRATICIENS HOSPITALIERS - CHEFS DE SERVICE NON UNIVERSITAIRES**

|                                   |                     |  |
|-----------------------------------|---------------------|--|
| Dr ASTRUC Dominique               | NRPô<br>CS          | • Pôle médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Serv. de Néonatalogie et de Réanimation néonatale (Pédiatrie 2) / Hôpital de Hautepierre                                 |
| Dr ASTRUC Dominique (par intérim) | NRPô<br>CS          | • Pôle médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Service de Réanimation pédiatrique spécialisée et de surveillance continue / Hôpital de Hautepierre                      |
| Dr CALVEL Laurent                 | NRPô<br>CS          | • Pôle Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- Service de Soins Palliatifs / NHC et Hôpital de Hautepierre  |
| Dr DELPLANCQ Hervé                | NRPô<br>CS          | - SAMU-SMUR  |
| Dr GARBIN Olivier                 | CS                  | - Service de Gynécologie-Obstétrique / CMCO Schiltigheim   |
| Dre GAUGLER Elise                 | NRPô<br>CS          | • Pôle Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- UCSA - Centre d'addictologie / Nouvel Hôpital Civil  |
| Dre GERARD Bénédicte              | NRPô<br>CS          | • Pôle de Biologie<br>- Département de génétique / Nouvel Hôpital Civil  |
| Mme GOURIEUX Bénédicte            | RPô<br>CS           | • Pôle de Pharmacie-pharmacologie<br>- Service de Pharmacie-Stérilisation / Nouvel Hôpital Civil   |
| Dr KARCHER Patrick                | NRPô<br>CS          | • Pôle de Gériatrie<br>- Service de Soins de suite de Longue Durée et d'hébergement gériatrique / EHPAD / Hôpital de la Robertsau                                    |
| Pr LESSINGER Jean-Marc            | NRPô<br>CS          | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de Biologie et biologie moléculaire / Nouvel Hôpital Civil + Hautepierre   |
| Mme Dre LICHTBLAU Isabelle        | NRPô<br>Resp        | • Pôle de Biologie<br>- Laboratoire de biologie de la reproduction / CMCO de Schiltigheim  |
| Mme Dre MARTIN-HUNYADI Catherine  | NRPô<br>CS          | • Pôle de Gériatrie<br>- Secteur Evaluation / Hôpital de la Robertsau  |
| Dr NISAND Gabriel                 | RPô<br>CS           | • Pôle de Santé Publique et Santé au travail<br>- Service de Santé Publique - DIM / Hôpital Civil  |
| Dr REY David                      | NRPô<br>CS          | • Pôle Spécialités médicales - Ophtalmologie / SMO<br>- «Le trait d'union» - Centre de soins de l'infection par le VIH / Nouvel Hôpital Civil                        |
| Dr TCHOMAKOV Dimitar              | NRPô<br>CS          | • Pôle Médico-chirurgical de Pédiatrie<br>- Service des Urgences Médico-Chirurgicales pédiatriques - HP  |
| Mme Dre TEBACHER-ALT Martine      | NRPô<br>NCS<br>Resp | • Pôle d'Activité médico-chirurgicale Cardio-vasculaire<br>- Service de Maladies vasculaires et Hypertension<br>- Centre de pharmacovigilance / Nouvel Hôpital Civil |
| Mme Dre TOURNOUD Christine        | NRPô<br>CS          | • Pôle Urgences - Réanimations médicales / Centre antipoison<br>- Centre Antipoison-Toxicovigilance / Nouvel Hôpital Civil   |

---

## F1 - PROFESSEURS ÉMÉRITES

- o **de droit et à vie (membre de l'Institut)**
  - CHAMBON Pierre (Biochimie et biologie moléculaire)
  - pour trois ans (1er septembre 2016 au 31 août 2019)*
  - BOUSQUET Pascal
  - PINGET Michel
- o *pour trois ans (1er septembre 2017 au 31 août 2020)*
  - BELLOCCO Jean-Pierre (Anatomie Cytologie pathologique)
  - CHRISTMANN Daniel (Maladies Infectieuses et tropicales)
  - MULLER André (Thérapeutique)
- o *pour trois ans (1er septembre 2018 au 31 août 2021)*
  - Mme DANION-GRILLIAT Anne (Pédopsychiatrie, addictologie)
- o *pour trois ans (1er avril 2019 au 31 mars 2022)*
  - Mme STEIB Annick (Anesthésie, Réanimation chirurgicale)

---

## F2 - PROFESSEUR des UNIVERSITES ASSOCIE (mi-temps)

M. SOLER Luc                      CNU-31                      IRCAD (01.09.2009 - 30.09.2012 / renouvelé 01.10.2012-30.09.2015-30.09.2021)

---

## F3 - PROFESSEURS CONVENTIONNÉS\* DE L'UNIVERSITE

|                              |  |
|------------------------------|--|
| Dr BRAUN Jean-Jacques        | ORL (2012-2013 / 2013-2014 / 2014-2015 / 2015-2016)                    |
| Pr CHARRON Dominique         | Université Paris Diderot (2016-2017 / 2017-2018)                       |
| Mme GUI Yali                 | (Shaanxi/Chine) (2016-2017)  |
| Mme Dre GRAS-VINCENDON Agnès | Pédopsychiatrie (2010-2011 / 2011-2012 / 2013-2014 / 2014-2015)        |
| Dr JENNY Jean-Yves           | Chirurgie orthopédique (2014-2015 / 2015-2016 / 2016-2017 / 2017-2018) |
| Mme KIEFFER Brigitte         | IGBMC (2014-2015 / 2015-2016 / 2016-2017)                              |
| Dr KINTZ Pascal              | Médecine Légale (2016-2017 / 2017-2018)                                |
| Dr LAND Walter G.            | Immunologie (2013-2014 à 2015-2016 / 2016-2017)                        |
| Dr LANG Jean-Philippe        | Psychiatrie (2015-2016 / 2016-2017 / 2017-2018)                        |
| Dr LECOCQ Jehan              | IURC - Clémenceau (2016-2017 / 2017-2018)                              |
| Dr REIS Jacques              | Neurologie (2017-2018)   |
| Pr REN Guo Sheng             | (Chongqing / Chine) / Oncologie (2014-2015 à 2016-2017)                |
| Dr RICCO Jean-Baptiste       | CHU Poitiers (2017-2018)   |

(\* 4 années au maximum)

---

## G1 - PROFESSEURS HONORAIRES

ADLOFF Michel (Chirurgie digestive) / 01.09.94  
 BABIN Serge (Orthopédie et Traumatologie) / 01.09.01  
 BAREISS Pierre (Cardiologie) / 01.09.12  
 BATZENSCHLAGER André (Anatomie Pathologique) / 01.10.95  
 BAUMANN René (Hépatogastro-entérologie) / 01.09.10  
 BERGERAT Jean-Pierre (Cancérologie) / 01.01.16  
 BERTHEL Marc (Gériatrie) / 01.09.18  
 BLICKLE Jean-Frédéric (Médecine Interne) / 15.10.2017  
 BLOCH Pierre (Radiologie) / 01.10.95  
 BOURJAT Pierre (Radiologie) / 01.09.03  
 BRECHENMACHER Claude (Cardiologie) / 01.07.99  
 BRETTE Jean-Philippe (Gynécologie-Obstétrique) / 01.09.10  
 BROGARD Jean-Marie (Médecine interne) / 01.09.02  
 BUCHHEIT Fernand (Neurochirurgie) / 01.10.99  
 BURGHARD Guy (Pneumologie) / 01.10.86  
 BURSZTEJN Claude (Pédopsychiatrie) / 01.09.18  
 CANTINEAU Alain (Médecine et Santé au travail) / 01.09.15  
 CAZENAVE Jean-Pierre (Hématologie) / 01.09.15  
 CHAMPY Maxime (Stomatologie) / 01.10.95  
 CINQUALBRE Jacques (Chirurgie générale) / 01.10.12  
 CLAVERT Jean-Michel (Chirurgie infantile) / 31.10.16  
 COLLARD Maurice (Neurologie) / 01.09.00  
 CONRAUX Claude (Oto-Rhino-Laryngologie) / 01.09.98  
 CONSTANTINESCO André (Biophysique et médecine nucléaire) / 01.09.11  
 DIETEMANN Jean-Louis (Radiologie) / 01.09.17  
 DOFFOEL Michel (Gastroentérologie) / 01.09.17  
 DORNER Marc (Médecine Interne) / 01.10.87  
 DUPEYRON Jean-Pierre (Anesthésiologie-Réa.Chir.) / 01.09.13  
 EISENMANN Bernard (Chirurgie cardio-vasculaire) / 01.04.10  
 FABRE Michel (Cytologie et histologie) / 01.09.02  
 FISCHBACH Michel (Pédiatrie) / 01.10.2016  
 FLAMENT Jacques (Ophtalmologie) / 01.09.2009  
 GAY Gérard (Hépatogastro-entérologie) / 01.09.13  
 GERLINGER Pierre (Biol. de la Reproduction) / 01.09.04  
 GRENIER Jacques (Chirurgie digestive) / 01.09.97  
 GROSSHANS Edouard (Dermatologie) / 01.09.03  
 GUT Jean-Pierre (Virologie) / 01.09.14  
 HASSELMANN Michel (Réanimation médicale) / 01.09.18  
 HAUPTMANN Georges (Hématologie biologique) / 01.09.06  
 HEID Ernest (Dermatologie) / 01.09.04  
 IMBS Jean-Louis (Pharmacologie) / 01.09.2009  
 IMLER Marc (Médecine interne) / 01.09.98  
 JACQMIN Didier (Urologie) / 09.08.17  
 JAECK Daniel (Chirurgie générale) / 01.09.11  
 JAEGER Jean-Henri (Chirurgie orthopédique) / 01.09.2011  
 JESEL Michel (Médecine physique et réadaptation) / 01.09.04  
 KEHR Pierre (Chirurgie orthopédique) / 01.09.06  
 KEMPF Jules (Biologie cellulaire) / 01.10.95  
 KIRN André (Virologie) / 01.09.99  
 KREMER Michel (Parasitologie) / 01.05.98  
 KRIEGER Jean (Neurologie) / 01.01.07  
 KUNTZ Jean-Louis (Rhumatologie) / 01.09.08  
 KUNTZMANN Francis (Gériatrie) / 01.09.07  
 KURTZ Daniel (Neurologie) / 01.09.98  
 LANG Gabriel (Orthopédie et traumatologie) / 01.10.98  
 LANG Jean-Marie (Hématologie clinique) / 01.09.2011  
 LEVY Jean-Marc (Pédiatrie) / 01.10.95  
 LONSDORFER Jean (Physiologie) / 01.09.10  
 LUTZ Patrick (Pédiatrie) / 01.09.16  
 MAILLOT Claude (Anatomie normale) / 01.09.03  
 MAITRE Michel (Biochimie et biol. moléculaire) / 01.09.13  
 MANDEL Jean-Louis (Génétique) / 01.09.16  
 MANGIN Patrice (Médecine Légale) / 01.12.14  
 MANTZ Jean-Marie (Réanimation médicale) / 01.10.94  
 MARESCAUX Jacques (Chirurgie digestive) / 01.09.16  
 MARK Jean-Joseph (Biochimie et biologie cellulaire) / 01.09.99  
 MESSER Jean (Pédiatrie) / 01.09.07  
 MEYER Christian (Chirurgie générale) / 01.09.13  
 MEYER Pierre (Biostatistiques, informatique méd.) / 01.09.10  
 MINCK Raymond (Bactériologie) / 01.10.93  
 MONTEIL Henri (Bactériologie) / 01.09.2011  
 MOSSARD Jean-Marie (Cardiologie) / 01.09.2009  
 OUDET Pierre (Biologie cellulaire) / 01.09.13  
 PASQUALI Jean-Louis (Immunologie clinique) / 01.09.15  
 PATRIS Michel (Psychiatrie) / 01.09.15  
 Mme PAULI Gabrielle (Pneumologie) / 01.09.2011  
 POTTECHER Thierry (Anesthésie-Réanimation) / 01.09.18  
 REYS Philippe (Chirurgie générale) / 01.09.98  
 RITTER Jean (Gynécologie-Obstétrique) / 01.09.02  
 RUMPLER Yves (Biol. développement) / 01.09.10  
 SANDNER Guy (Physiologie) / 01.09.14  
 SAUVAGE Paul (Chirurgie infantile) / 01.09.04  
 SCHAFF Georges (Physiologie) / 01.10.95  
 SCHLAEDER Guy (Gynécologie-Obstétrique) / 01.09.01  
 SCHLIENGER Jean-Louis (Médecine Interne) / 01.08.11  
 SCHRAUB Simon (Radiothérapie) / 01.09.12  
 SCHWARTZ Jean (Pharmacologie) / 01.10.87  
 SICK Henri (Anatomie Normale) / 01.09.06  
 STIERLE Jean-Luc (ORL) / 01.09.10  
 STOLL Claude (Génétique) / 01.09.2009  
 STOLL-KELLER Françoise (Virologie) / 01.09.15  
 STORCK Daniel (Médecine interne) / 01.09.03  
 TEMPE Jean-Daniel (Réanimation médicale) / 01.09.06  
 TREISSER Alain (Gynécologie-Obstétrique) / 24.03.08  
 VAUTRAVERS Philippe (Médecine physique et réadaptation) / 01.09.16  
 VETTER Jean-Marie (Anatomie pathologique) / 01.09.13  
 VINCENDON Guy (Biochimie) / 01.09.08  
 WALTER Paul (Anatomie Pathologique) / 01.09.09  
 WEITZENBLUM Emmanuel (Pneumologie) / 01.09.11  
 WIHLM Jean-Marie (Chirurgie thoracique) / 01.09.13  
 WILK Astrid (Chirurgie maxillo-faciale) / 01.09.15  
 WILLARD Daniel (Pédiatrie) / 01.09.96

### Légende des adresses :

**FA** : Faculté de Médecine - 4, rue Kirschleger - F - 67085 Strasbourg Cedex - Tél. : 03.68.85.35.20 - Fax : 03.68.85.35.18 ou 03.68.85.34.67

### HOPITAUX UNIVERSITAIRES DE STRASBOURG (HUS) :

- NHC : **Nouvel Hôpital Civil** : 1, place de l'Hôpital - BP 426 - F - 67091 Strasbourg Cedex - Tél. : 03 69 55 07 08
- HC : **Hôpital Civil** : 1, Place de l'Hôpital - B.P. 426 - F - 67091 Strasbourg Cedex - Tél. : 03.88.11.67.68
- HP : **Hôpital de Hautepierre** : Avenue Molière - B.P. 49 - F - 67098 Strasbourg Cedex - Tél. : 03.88.12.80.00
- **Hôpital de La Robertsau** : 83, rue Himmerich - F - 67015 Strasbourg Cedex - Tél. : 03.88.11.55.11
- **Hôpital de l'Elsau** : 15, rue Cranach - 67200 Strasbourg - Tél. : 03.88.11.67.68

**CMCO** - Centre Médico-Chirurgical et Obstétrical : 19, rue Louis Pasteur - BP 120 - Schiltigheim - F - 67303 Strasbourg Cedex - Tél. : 03.88.62.83.00

**C.C.O.M.** - Centre de Chirurgie Orthopédique et de la Main : 10, avenue Baumann - B.P. 96 - F - 67403 Illkirch Graffenstaden Cedex - Tél. : 03.88.55.20.00

**E.F.S.** : Etablissement Français du Sang - Alsace : 10, rue Spielmann - BP N°36 - 67065 Strasbourg Cedex - Tél. : 03.88.21.25.25

**Centre Régional de Lutte contre le cancer "Paul Strauss"** - 3, rue de la Porte de l'Hôpital - F-67085 Strasbourg Cedex - Tél. : 03.88.25.24.24

**IURC** - Institut Universitaire de Réadaptation Clemenceau - CHU de Strasbourg et UGECAM (Union pour la Gestion des Etablissements des Caisses d'Assurance Maladie) - 45 boulevard Clemenceau - 67082 Strasbourg Cedex

## RESPONSABLE DE LA BIBLIOTHÈQUE DE MÉDECINE ET ODONTOLOGIE ET DU DÉPARTEMENT SCIENCES, TECHNIQUES ET SANTÉ DU SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Monsieur Olivier DIVE, Conservateur

LA FACULTÉ A ARRÊTÉ QUE LES OPINIONS ÉMISES DANS LES DISSERTATIONS  
QUI LUI SONT PRÉSENTÉES DOIVENT ÊTRE CONSIDÉRÉES COMME IMPROPR  
A LEURS AUTEURS ET QU'ELLE N'ENTEND NI LES APPROUVER, NI LES IMPROUVER

**SERMENT D'HIPPOCRATE**

*En présence des maîtres de cette école, de mes chers condisciples, je promets et je jure au nom de l'Être suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.*

*Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.*

*Ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis resté fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

## Remerciements

A Clémence, ma princesse, pour avoir su illuminer mes journées pendant ce travail de thèse, pour ta relecture assidue et pour m'avoir appris, difficilement, les bases du traitement de texte, je t'aime.

A mes parents, ma sœur, vous me manquez. Merci d'avoir toujours cru en moi, je vous aime.

A ma famille et belle-famille, pour votre soutien depuis des années. A Françoise et Mamie, j'aurais aimé vous avoir parmi nous aujourd'hui.

A Bichat.

A mes chefs...

A Xavier ARGEMI, pour m'avoir encadré durant tout ce travail. Ton départ laisse un gouffre au CHU de Strasbourg, mais tu as, je pense, avec brio formé la relève. Nous suivons ton exemple.

Au Pr HANSMANN, qui m'a accepté au sein de cette merveilleuse spécialité. Votre humilité et vos compétences m'impressionneront toujours.

Au Dr SCHRAMM, sans qui rien n'aurait été possible. Merci d'avoir mis en place cette PCR 16S et d'avoir pris le temps de répondre à mes questions. Merci de m'avoir encadré pour le travail sur *Robinsoniella peoriensis*.

Au Pr ANDRES, merci d'avoir bien voulu participer au Jury de ma thèse en tant que référent des Internistes de la région.

Au Dr CARO, pour m'avoir accompagné lors de mon premier semestre d'internat, y compris lors des moments difficiles.

A l'équipe d'Immunologie, Pr KORGANOW, Dr POINDRON et Dr GUFFROY, pour m'avoir ouvert l'esprit au diagnostic et à la prise en charge de nombreuses maladies de système.

A l'équipe de Réanimation Médicale de Pasteur, en particulier au Dr ALVAREZ « El Jefe », Dr LESSIRE la flèche de Namur, Dr BOUTERRA et Dr BELILITA. Merci pour la confiance que vous m'avez donnée. « On ne va pas essayer de faire un geste, on va le faire ».

A Nicolas KELLER et Éric PRINZ, pour leur bonne humeur. L'hyperkaliémie n'a grâce à vous plus de secret pour moi. Vous avez toujours su répondre présent, même après mon stage en néphrologie.

A Nawal DOUIRI, Aurélie MARTIN et Nicolas LEFEBVRE. Une équipe de choc, j'ai tant appris pendant un semestre à vos côtés...

A Léa FRANTZEN et au Dr ARDIZZONE. Vous avez rendu mon stage à Mulhouse captivant malgré les trajets. Merci de m'avoir fait participer à des diagnostics « d'OVNI ».

A toute l'équipe du Plateau Technique de Microbiologie, Pr JAULHAC, Dr BOYER, Dr MENARD, Dr KOEBEL, Dr TALAGRAND, Dr GRILLON, Dr RIEGEL, Dr JEHL et Dr DENIS. Ce stage m'a passionné, merci de m'avoir autant impliqué au sein de l'équipe.

Au Dr REY, pour sa confiance et son accueil au Trait d'Union.

Merci au Dr SEVERAC pour son aide concernant la partie statistique de ce travail.

A mes amis et co-internes...

Seb, Paul et Julien, pour notre amitié qui perdure depuis la P2 ! C'est aussi grâce à vous que je me suis surpassé pour arriver jusqu'ici.

Anne, quel premier semestre d'internat ! Souvenirs de moments extraordinaires et difficiles, on s'en est bien sorti !

Léa et Sylvain, vous avez joué pour moi le rôle de grande sœur et grand frère et êtes devenus de grands amis. Merci pour tout. Sans oublier Davide pour ses cours d'italien et son fameux externe Mathieu !

Mélessande, Lise et Gautier, mes co-réanimateurs. Pour avoir survécu au rythme effréné des gardes dans la bonne humeur.

A Sébastien, alias Francky Vincent. Pour mon semestre le plus « fun ».

A Lily, tu m'as donné un bon avant-goût du travail de thèse.

Jonas, Yvon et Baptiste, pour la plus belle brochette d'internes que le 2401 n'ait jamais connu.

Marion, Abel, Arthur, Fanny, Laure et Magali. « Le PTM en feu » .... « SANGLIER ! ». Merci de m'avoir adopté dans le monde de la microbiologie et plus si affinité !

Merci à toutes les équipes avec lesquelles j'ai travaillé, notamment :

Toutes les infirmières du 2401, une équipe d'élite.

Hôpital de jour bonjour ! Audrey, Emilie et Evelyne de Mulhouse « Piavala ».

Les tech' du PTM, en particulier l'équipe de biologie moléculaire, Claire, Véronique et Cédric, pour m'avoir ouvert les portes de la PCR 16S.

Les trois spécialistes de l'injection intramusculaire de Pénicilline G qui se reconnaîtront !

Merci à tous mes externes, je vous garde dans mon cœur !

## Table des matières

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | Introduction .....  | 25 |
| 2       | Principe de la PCR 16S et mise en place au laboratoire de microbiologie ..... | 26 |
| 2.1     | Historique de l'utilisation de la PCR 16S.....                                | 26 |
| 2.2     | La place actuelle de la PCR 16S en médecine.....                              | 29 |
| 2.3     | Les bases moléculaires .....  | 31 |
| 2.3.1   | Le ribosome procaryote.....   | 32 |
| 2.3.2   | Rôle dans la synthèse protéique .....   | 33 |
| 2.3.3   | Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S .....                                 | 40 |
| 2.4     | Les détails techniques .....  | 44 |
| 2.4.1   | La PCR .....  | 45 |
| 2.4.1.1 | Les amorces .....   | 45 |
| 2.4.1.2 | Les étapes de la PCR.....   | 46 |
| 2.4.1.3 | La quantification du produit amplifié .....                                   | 47 |
| 2.4.2   | Le séquençage .....   | 48 |
| 2.4.2.1 | Les différents acteurs .....  | 49 |
| 2.4.2.2 | Le principe .....   | 49 |
| 2.4.2.3 | Electrophorèse capillaire.....  | 50 |
| 2.5     | Mise en place de la PCR 16S en temps réel au CHU de Strasbourg.....           | 52 |
| 2.5.1   | Choix de la méthode de révélation.....  | 52 |
| 2.5.2   | Choix des amorces ciblant d'ADN ribosomal 16S .....                           | 53 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.5.3   | Optimisation de la technique.....   | 55 |
| 2.5.4   | Etude comparative de la PCR en temps réel versus la PCR « en point final » ..             | 56 |
| 2.5.5   | Limites de cette méthode pour la pratique clinique .....                                  | 58 |
| 2.6     | Analyse de données, la phylogénie moléculaire.....  | 59 |
| 2.6.1   | Prétraitement de la séquence .....  | 59 |
| 2.6.2   | Sélection d'une base de données de séquences d'ADN 16S.....                               | 62 |
| 2.6.3   | L'identification bactérienne utilisant l'ADN ribosomal 16S avec leBIBI <sup>QBPP</sup> .. | 62 |
| 2.6.3.1 | Sélection de la base de données .....   | 62 |
| 2.6.3.2 | La comparaison heuristique de la séquence à la base de données .....                      | 63 |
| 2.6.3.3 | La phylogénie moléculaire.....  | 65 |
| 2.6.3.4 | L'arbre phylogénétique .....  | 67 |
| 2.7     | La PCR 16S : réalisation pratique au CHU de Strasbourg .....                              | 69 |
| 2.7.1   | La qualité du prélèvement .....   | 69 |
| 2.7.2   | Le travail des techniciens de laboratoire .....   | 70 |
| 2.7.3   | Le séquençage et l'interprétation des résultats.....                                      | 75 |
| 2.7.4   | Limites de l'utilisation de la PCR 16S au laboratoire de microbiologie.....               | 75 |
| 3       | Etude de l'impact clinique de la PCR 16S au CHU de Strasbourg.....                        | 76 |
| 3.1     | Introduction .....  | 76 |
| 3.2     | Revue de la littérature.....  | 78 |
| 3.3     | Problématique.....  | 83 |
| 3.4     | Matériel et méthodes .....  | 83 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3.4.1   | Design de l'étude et considérations éthiques .....                    | 83  |
| 3.4.2   | Recueil de données.....   | 83  |
| 3.4.3   | Analyse des échantillons .....  | 84  |
| 3.4.4   | Protocole de PCR 16S .....  | 86  |
| 3.4.5   | Analyses statistiques .....   | 87  |
| 3.5     | Résultats.....  | 88  |
| 3.5.1   | La population.....  | 88  |
| 3.5.2   | L'impact clinique général.....  | 89  |
| 3.5.3   | L'impact clinique selon le type de prélèvement.....                   | 89  |
| 3.5.4   | Cas particulier des endocardites .....                                | 91  |
| 3.5.5   | Les bactéries identifiées .....                                       | 92  |
| 3.5.6   | Impact clinique de la PCR 16S en cas de culture négative .....        | 93  |
| 3.5.7   | Impact d'une antibiothérapie préalable .....                          | 93  |
| 3.5.8   | Gestion des résultats discordants.....                                | 94  |
| 3.6     | Discussion.....   | 97  |
| 3.6.1   | Comparaison des résultats aux données de la littérature.....          | 97  |
| 3.6.1.1 | Données de la littérature sur des prélèvements d'origine variée ..... | 97  |
| 3.6.1.2 | Données de la littérature sur les valves cardiaques.....              | 98  |
| 3.6.1.3 | Données de la littérature sur les prélèvements ostéoarticulaires..... | 99  |
| 3.6.2   | Analyse des résultats .....   | 100 |
| 3.6.3   | Limites et forces de l'étude .....                                    | 102 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.6.4 | Perspectives en microbiologie clinique, la métagénomique ..... | 105 |
| 4     | Conclusion.....  | 108 |
| 5     | Annexes.....   | 122 |
| 5.1   | Annexe 1 : Article original soumis.....                        | 122 |
| 5.2   | Annexe 2 : Liste des bactéries identifiées par PCR 16S.....    | 136 |

## Table des illustrations

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Structure tridimensionnelle des ARN ribosomaux procaryotes .....   | 33 |
| Figure 2 : Structure d'un ARN de transfert d' <i>Escherichia coli</i> .....   | 35 |
| Figure 4 : Le processus d'élongation de la chaîne polypeptidique chez les procaryotes.....  | 39 |
| Figure 5 : Répartition des régions constantes et variables de l'ADN ribosomal 16S d' <i>Escherichia coli</i> , exemples d'amorces « universelles ».....   | 44 |
| Figure 6 : Courbes de fluorescence positive (rose, témoin positif) et négative (vert, témoin négatif) réalisées lors d'une série de PCR 16S en mars 2019 au Plateau Technique de Microbiologie de Strasbourg..... | 48 |
| Figure 7 : Exemple de chromatogramme partiel de l'ADN ribosomal 16S provenant d'un échantillon clinique du CHU de Strasbourg, 2019.....   | 51 |
| Figure 8 : Analyse d'un chromatogramme parasité par le logiciel Ripseq mixed .....  | 61 |
| Figure 9 : Exemple d'arbre phylogénétique construit par leBIBI <sup>QBPP</sup> .....  | 68 |
| Figure 10 : Les différentes étapes de la PCR 16S au laboratoire de microbiologie.....   | 74 |
| Figure 11 : Répartition des épisodes impliquant des EPC (Entérobactéries Productrices de Carbapénèmes) en France signalés entre 2009 et 2016 .....  | 77 |
| Tableau 1 : Revue de la littérature des performances diagnostiques de la PCR 16S sur différents types d'échantillons.....   | 80 |
| Tableau 2 : Caractéristiques microbiologiques de la population .....  | 88 |
| Tableau 3 : Rentabilité de la PCR 16S selon le type de prélèvement .....  | 90 |
| Tableau 4 : Impact clinique d'une PCR 16S positive selon le type d'échantillon.....   | 91 |
| Tableau 5 : Impact clinique d'une PCR 16S positive selon le type de bactérie.....   | 92 |
| Figure 12 : Gestion des résultats discordants entre PCR 16S et culture de l'échantillon .....   | 95 |
| Figure 13 : Gestion des résultats discordants entre PCR 16S et hémocultures.....  | 96 |

## **Abréviations**

ACP : Amplification en Chaîne par Polymérase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : ADN ribosomal

ARN : Acide ribonucléique

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool*

BLB : Bacterial Lysis Buffer

BMGE : Block Mapping and Gathering with Entropy

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

Ct : Cycle threshold

Da : Dalton

DDBJ : DNA Data Bank of Japan

EF-G : Elongation Factor G

EF-Tu : Elongation Factor Thermo unstable

ENA : European Nucleotide Archive

EPC : Entérobactéries Productrices de Carbapénèmes

FOS : Fructooligosaccharides

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

GEL : Guide des Examens de Laboratoire

GTP : Guanosine triphosphate

GTR : General Time Reversible

HSP : High-scoring Segment Pair

HUS : Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

LCS : Liquide cérobrospinal

leBIBI : *BioInformatics Bacterial Identification tool*

leBIBI<sup>QBPP</sup> : *Quick BioInformatic Phylogeny of Prokaryotes*

MALDI-TOF MS : Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

MAFFT : Multiple Alignment using Fast Fourier Transform

MRC5 : Medical Research Council cell strain 5

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NGS : Next Generation Sequencing

PCR : Polymerase Chain Reaction

PSM : Postes de Sécurité Microbiologique

PTC : Peptidyl Transferase Center

PTM : Plateau Technique de Microbiologie

PVX : PolyViteX

rpoB : gène codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase

RF1 : Releasing Factor 1

RF3 : Releasing Factor 3

RNase III : Ribonucléase III

RRF : Ribosome Recycling Factor

rtPCR : real time PCR

TLB : Tissue Lysis Buffer

# 1 Introduction

Les techniques de biologie moléculaire ont de multiples applications en médecine, et particulièrement en maladies infectieuses. Il s'agit principalement de la Polymerase Chain Reaction (PCR), ou Amplification en Chaîne par Polymérase (ACP) qui constitue désormais le pivot technologique de la plupart des techniques de diagnostic moléculaire. Le principe général de la PCR est la fixation d'amorces, qui sont des séquences nucléotidiques, sur un ADN cible, par exemple bactérien. Cet appariement est possible grâce à la complémentarité de séquence entre les amorces et leur cible. Plusieurs étapes sont ensuite nécessaires pour amplifier l'ADN cible compris entre les deux amorces. Les fragments amplifiés pourront ainsi être analysés après séquençage.

D'une manière générale il existe deux grands types de PCR utilisés en bactériologie :

Tout d'abord les PCR dites ciblées, où les amorces se fixent sur des séquences très spécifiques d'une bactérie. Ces PCR permettent de détecter un microorganisme précis, propre à l'amorce employée. Ces techniques ont de bonnes performances intrinsèques en termes de sensibilité et de spécificité, mais ne permettent de trouver que ce que l'on cherche et nécessitent donc une hypothèse étiologique préalable forte. Il s'agit par exemple de la PCR *Neisseria meningitidis* dans le cadre des méningites infectieuses bactériennes, ou la PCR *Tropheryma whipplei* pour les suspicions de maladie de Whipple. Dans ces situations, l'agent infectieux est suspecté par la clinique, et la PCR permet un diagnostic de certitude sur la base d'une hypothèse préalable clairement établie. On peut inclure dans ce groupe l'utilisation de PCR spécifiques pour détecter, au-delà de la bactérie en elle-même, la présence ou non de gènes d'intérêt comme ceux codant pour les toxines de *Clostridium difficile* (1) ou les gènes de résistance à la Vancomycine Van A et Van B pour les entérocoques (2).

Dans une perspective tout à fait différente il existe des techniques de PCR dites « universelles ». Celles-ci ont recours à des amorces ciblant des régions d'ADN hautement conservées parmi les bactéries. La cible au niveau de l'ADN bactérien a alors de grandes chances d'être amplifiée et une seconde étape de séquençage permet de déterminer l'espèce bactérienne sous-jacente. La détermination de l'espèce bactérienne s'appuie alors sur les variations nucléotidiques de la région amplifiée qui sont spécifiques de certaines espèces bactériennes. Cette technique nécessite de choisir des régions particulières de l'ADN ayant cette double propriété, d'être universellement présente mais aussi très spécifiques de chaque espèce bactérienne. Les gènes codant pour l'ARN ribosomal répondent à cette double nécessité, en particulier le gène codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal. On parle ainsi de PCR ADN<sub>r</sub> 16S ou PCR ARN<sub>r</sub> 16S (PCR 16S).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons voulu déterminer les conséquences cliniques des résultats de PCR 16S rendus par le laboratoire de microbiologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg sous la forme d'une analyse rétrospective de tous les résultats rendus entre 2014 et 2018.

## **2 Principe de la PCR 16S et mise en place au laboratoire de microbiologie**

### **2.1 Historique de l'utilisation de la PCR 16S**

Dubnau et ses collaborateurs décrivent pour la première fois en 1965 les caractéristiques du gène codant pour l'ARN 16S (3). C'est en étudiant l'ADN de huit membres du genre *Bacillus* par transformation génétique et hybridation qu'ils mettent en évidence des séquences

extrêmement conservées dans le génome de *Bacillus*, en particulier le gène codant pour l'ARN 16S.

Plusieurs études ont par la suite décrit que les modifications subies par ce gène au cours du temps sont directement corrélées aux distances évolutives entre les bactéries, introduisant la notion d'horloge moléculaire (4). Cette méthode d'identification a permis d'isoler les archées, microorganismes initialement classés parmi les bactéries au sein du groupe des procaryotes (5). F. Sanger publie en 1977 une nouvelle méthode de séquençage qui va bouleverser la génétique, une technique encore utilisée de nos jours sous le nom de méthode de Sanger, permettant d'analyser finement et simplement des séquences nucléotidiques entre deux amorces (6). Il recevra en 1980 son deuxième prix Nobel de chimie pour cette innovation. Plus tard, en 1986, K. Mullis révolutionne la biologie moléculaire en inventant la PCR, une technique qui s'appliquera entre autres à l'amplification des séquences codantes pour l'ADN 16S et s'ouvrira au champ de la microbiologie (7). Il sera récompensé par le prix Nobel de chimie en 1993.

Le premier article faisant référence à l'utilisation de la PCR 16S comme outil diagnostique est publié en 1989 par une équipe New-Yorkaise dirigée par K. Chen (8). Les auteurs y décrivent l'utilisation de deux amorces oligonucléotidiques ciblant les régions conservées de l'ADN ribosomal 16S. L'équivalent d'un picogramme d'ADN d'*Escherichia coli* est ainsi détecté par PCR malgré une grande quantité d'ADN de cellules eucaryotes. Les auteurs envisagent alors la possibilité de séquencer l'ADN amplifié pour le comparer à des séquences connues et ainsi permettre d'identifier des pathogènes. Ils décrivent également l'utilité de cette méthode pour détecter des bactéries inconnues ou non cultivables.

L'histoire de la bactérie *Rochalimaea elizabethae* illustre parfaitement l'apport scientifique majeur qu'a eu la PCR 16S dans le diagnostic des maladies infectieuses ainsi que dans la classification des espèces bactériennes (9). En 1993, une équipe du Massachusetts rapporte un cas d'endocardite prise en charge en 1986. C'était un patient de 31 ans admis pour fièvre,

dyspnée et altération de l'état général avec souffle d'insuffisance aortique. L'échographie cardiaque confirmait le diagnostic d'endocardite avec présence de végétations sur la valve aortique. La porte d'entrée était à la fois cutanée, avec des lacérations de deux doigts, et dentaire, 7 dents nécessitant d'être retirées. Malgré une bi-antibiothérapie efficace sur le syndrome infectieux, une intervention chirurgicale fut nécessaire en raison de l'insuffisance cardiaque. L'examen direct de la valve mettait en évidence des coccobacilles à Gram négatif, mais la culture s'avérait positive à des bactéries diphtéroïdes anaérobies considérées comme contaminantes. Les hémocultures restaient négatives malgré trois semaines d'incubation, mais les subcultures sur gélose au sang et gélose chocolat incubées sous 5 à 10 % de CO<sub>2</sub> de façon prolongée permettaient d'obtenir des colonies dont les caractéristiques phénotypiques ne permettaient pas l'identification. L'évolution du patient était favorable. C'est quelques années plus tard, après description des caractéristiques phénotypiques de *Rochalimaea henselae* par une autre équipe, que la réévaluation de la souche permettait de conclure à une bactérie *Rochalimaea-like*. Il existait cependant quelques différences avec les trois espèces connues (*R. henselae*, *R. quintana* et *R. vinsonii*). Notamment, la PCR 16S retrouvait un degré de dissimilarité comparable à celui existant entre les trois espèces, et permettait de définir une nouvelle espèce nommée *Rochalimaea elizabethae*. A cette époque, les bactéries du genre *Bartonella* (*Bartonella bacilliformis*), et du genre *Rochalimaea*, comprenant les quatre espèces précédemment mentionnées, étaient classées respectivement dans la famille des *Bartonellaceae* et des *Rickettsiaceae*, comprises dans l'ordre des *Rickettsiales*. C'est à la suite d'une nouvelle publication de la même équipe décrivant l'absence de proximité entre ces deux genres bactériens et les autres *Rickettsiales* (*Rickettsia prowazekii*) qu'il fut proposé de les sortir de cet ordre (10). Devant la similarité entre *B. bacilliformis* et les quatre espèces du genre *Rochalimaea*, ces bactéries furent regroupées dans la famille des *Bartonellaceae*. On parle ainsi maintenant de *Bartonella elizabethae*.

## 2.2 La place actuelle de la PCR 16S en médecine

Les méthodes de bactériologie dites classiques avec coloration, examen direct, mise en culture et identification restent aujourd'hui suffisantes pour la très grande majorité des échantillons biologiques.

L'examen direct avec coloration par le Gram peut déjà mettre en évidence des bactéries, avec un aspect qui peut être caractéristique ou au moins orienter vers un groupe de bactéries (cocci, bacilles, cocco-bacilles, filamenteuses, à Gram positif ou négatif).

L'ensemencement des prélèvements sur différentes géloses avec des températures et des atmosphères d'incubation adaptées aux bactéries suspectées permet de faire pousser la majorité des bactéries cultivables. A partir des colonies obtenues l'identification bactérienne est presque toujours possible, sur des critères morphologiques, biochimiques, et plus récemment par l'utilisation de la spectrométrie de masse, MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight spectrometry) (11). Cette technique utilise un faisceau ionisant (laser ultraviolet), qui, au contact du prélèvement, transfère de l'énergie aux protéines qui s'ionisent positivement. Les molécules chargées migrent selon un champ électrique, et sont ainsi séparées par leur masse-charge, ce qui permet d'obtenir un profil, appelé spectre. Ce spectre est propre à chaque espèce bactérienne et peut être comparé à une base de données permettant *in fine* de déterminer l'espèce bactérienne présente. La culture standard permet également de déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques, jusqu'à mesurer des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice), une étape cruciale pour la mise en place d'une antibiothérapie adaptée chez les patients.

La sérologie, méthode de diagnostic indirect, peut dans certains cas être utile comme pour les infections à *Coxiella burnetii* ou à *Bartonella spp* (12).

La PCR 16S occupe une place encore discutée au sein de l'arsenal diagnostique microbiologique. Chaque laboratoire, chaque équipe, positionne sa réalisation à des étapes différentes de la démarche diagnostique et selon des critères qui ne font pas aujourd'hui l'objet de recommandations nationales ou européennes. Elle a néanmoins de nombreuses applications en médecine :

- Elle peut apporter le diagnostic microbiologique quand une infection bactérienne est suspectée et que la culture standard est négative, situation pouvant être le témoin d'une infection à bactérie non cultivable, difficilement cultivable, d'un prélèvement réalisé après antibiothérapie, mais aussi dans certains cas de l'absence d'infection bactérienne. Elle est utilisée préférentiellement sur des échantillons de sites habituellement stériles, comme les valves cardiaques en cas de suspicion d'endocardite (13), les prélèvements ostéoarticulaires pour les arthrites, ostéites et spondylodiscites (14), les LCS (liquides cérébro-spinaux) en cas de méningite (15), les liquides pleuraux pour les pleurésies (16) et les humeurs aqueuses en cas d'endophtalmie (17), mais est aussi largement utilisée pour les abcès profonds (18). Plusieurs auteurs ont d'ailleurs proposé d'ajouter la PCR 16S sur valve cardiaque dans les critères microbiologiques du diagnostic d'endocardite infectieuse, mais ce critère n'est pas encore validé (19–22).
- La PCR 16S permet une identification bactérienne au rang d'espèce par analyse phylogénétique en cas d'échec des techniques d'identification standard après culture. Ces échecs ont par exemple été décrits pour certaines bactéries à Gram positif avec une faible concentration bactérienne (23) ou lorsque la bactérie présente n'existe pas dans la base de données utilisée par le spectromètre de masse (par exemple Bruker, Saramis ou Andromas). C'était par exemple le cas pour *Robinsoniella peoriensis*, un bacille à Gram positif anaérobie, qui ne pouvait être identifié que grâce à la PCR 16S (24) jusqu'à son inclusion dans la base de données de Bruker en avril 2016. Une identification plus

précise a une valeur à la fois thérapeutique, car elle permet d'adapter les antibiotiques aux résistances habituelles de l'espèce, pronostique, nous renseignant sur la virulence de l'espèce, et étiologique, une bactériémie à *Streptococcus gallolyticus* avec endocardite conduisant à des explorations digestives à la recherche d'une porte d'entrée.

- Elle est aussi capable d'identifier les mycobactéries au rang d'espèce (25). Comme décrit précédemment, la PCR 16S permet de découvrir et de définir de nouvelles espèces, avec description de nouveaux cadres nosologiques ce qui contribue à améliorer la prise en charge des patients. L'agent de la maladie de Whipple, *Tropheryma whipplei*, a par exemple été caractérisé pour la première fois par PCR 16S sur biopsies duodénales en 1992 (26).
- La PCR 16S est aussi utilisée pour l'étude des microbiotes, notamment intestinal. Elle permet, via la métagénomique ciblée utilisant des méthodes de séquençage haut débit comme le pyroséquençage, d'identifier un nombre important de bactéries à partir de prélèvements polymicrobiens. Des perturbations du microbiote intestinal ont ainsi été décrites comme possiblement responsables de pathologies, par exemple l'entérocrite ulcéro-nécrosante chez les enfants prématurés (27).

## 2.3 Les bases moléculaires

Ce chapitre a pour objectif de rappeler brièvement les bases moléculaires qui permettent de comprendre le principe, l'intérêt et les limites de la PCR 16S. Nous verrons dans un premier temps la structure du ribosome procaryote, puis sa fonction dans la synthèse protéique. Finalement, nous détaillerons les caractéristiques du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome.

### 2.3.1 Le ribosome procaryote

Les ribosomes sont des composites intracellulaires, cytoplasmiques, découverts en 1955 par GE. Palade (28) et qui seront l'objet de son prix Nobel de médecine en 1974. Leur nombre est variable pour une même bactérie au cours du temps mais on estime qu'une cellule contient entre 6700 et 71000 ribosomes (29). C'est un complexe ribonucléoprotéique, c'est-à-dire une association d'ARN (dit ARN ribosomal, ARNr) et de protéines ribosomiques. Il est composé chez les procaryotes de l'assemblage de deux sous unités : la grande sous-unité 50S (30) et la petite sous-unité 30S (31), le tout constituant le ribosome 70S d'une masse de 2.5 MDa. L'unité utilisée pour nommer ces structures est le Svedberg (S) qui correspond à un coefficient de sédimentation. La grande sous-unité comprend les ARNr 23S et 5S, et la petite sous-unité l'ARNr 16S. Les ARNr comptent pour environ deux tiers de la masse du ribosome. Les protéines ribosomiques diffèrent selon la bactérie, pour *Escherichia coli*, 34 (L1 à L34, L pour « large ») composent sa grande sous-unité et 21 (S1 à S21, S pour « small ») sa petite sous-unité.

L'association des ARNr et des protéines ribosomiques forme une structure tridimensionnelle complexe avec de nombreuses hélices (Figure 1) (32). Ce sont les ARN qui dictent la forme générale de cette structure complexe, les protéines maintiennent sa conformation en interagissant entre elles et avec l'ARNr. Le déplacement du ribosome et l'enchaînement des différentes étapes de la traduction reposent sur des changements de conformation de ce complexe ribonucléoprotéique.

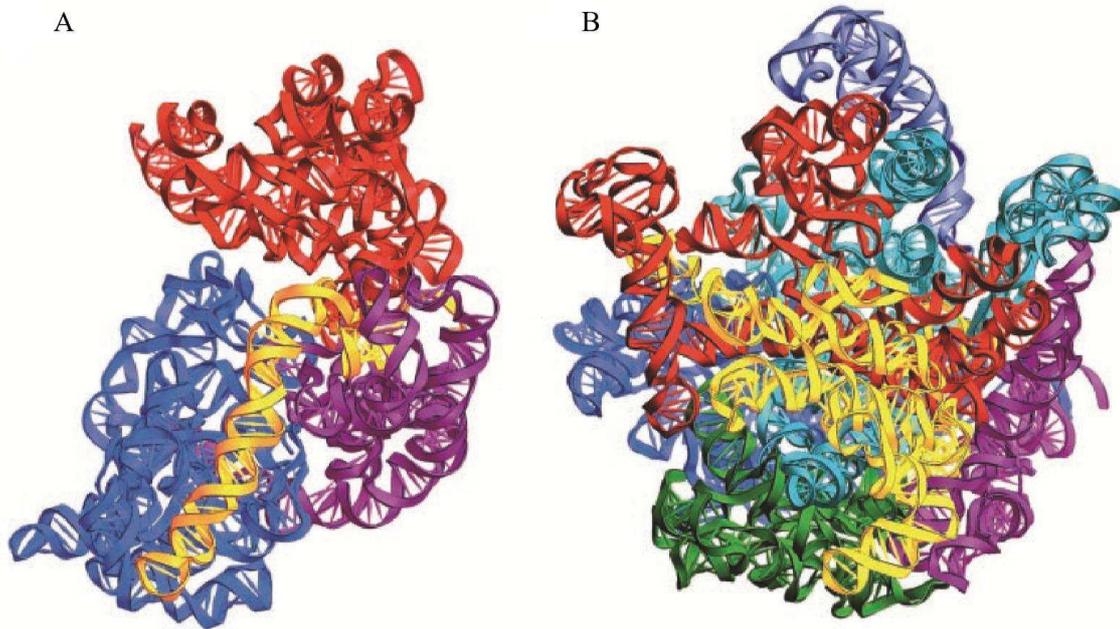


Figure 1 : Structure tridimensionnelle des ARN ribosomaux procaryotes

A : ARNr 16S. B : ARNr 23S et 5S. (Adapté et traduit de Yusupov et col., Science, 2001)

### 2.3.2 Rôle dans la synthèse protéique

Les ribosomes interviennent dans la synthèse protéique, lors de l'étape de la traduction des ARN messagers (ARNm).

Tout d'abord l'ADN est transcrit en ARN pré-messager, directement dans le cytoplasme pour les procaryotes, par l'ARN polymérase. Celle-ci apparie les ribonucléotides avec les désoxyribonucléotides de l'ADN matrice et établit des liaisons phosphodiester entre les

ribonucléotides. Il s'ensuit une étape de maturation qui réalise à la fois des modifications visant à protéger l'ARN dans le cytoplasme, et l'excision des introns du groupe I et II (séquences de l'ARN non retenues dans la séquence finale qui code la protéine), présents dans de rares gènes bactériens, par un mécanisme d'auto-épissage pour aboutir à l'ARNm.

Les ARN de transfert sont d'autres acteurs indispensables à la traduction des ARNm. Ce sont de petits ARN de 76 nucléotides en moyenne constitués des quatre bases A, G, C et U (adénine, guanine, cytosine et uracile) et de bases ayant subi des modifications post-transcriptionnelles. Ils ont une structure tridimensionnelle comprenant une extrémité 3' (CAA), le bras accepteur où se fixent les acides aminés, et trois boucles. La boucle T qui contient souvent une ribothymidine, la boucle D qui contient souvent une ou plusieurs dihydrouridines et la boucle A, portant l'anticodon correspondant à l'acide aminé fixé sur le bras accepteur, qui s'appariera à l'ARNm en cours de traduction. Les nucléotides sont numérotés de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' du numéro 1 au numéro 76, et les trois nucléotides de l'anticodon portent les numéros 34, 35 et 36. C'est l'adénosine en position 76 qui porte l'acide aminé (Figure 2) (33).

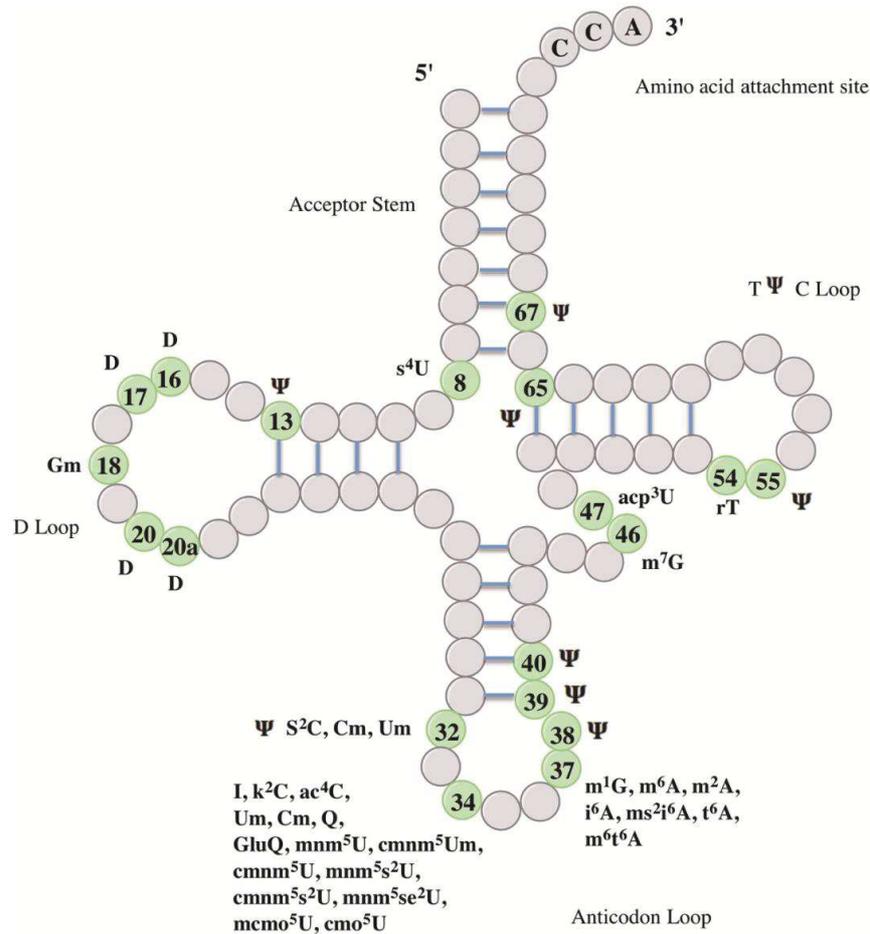


Figure 2 : Structure d'un ARN de transfert d'*Escherichia coli*

A : adénine, U : uracile, T : thymidine, C : cytosine, G : guanine, Ψ : pseudouridine, D : dihydrouridine, I : inosine, Q : queuosine, groupements ajoutés par modifications post-transcriptionnelles : Glu-, m-, c-, n-, o-, t-, i-, k-, r-, s-, acp-, ac- et se- (glutamyl, méthyl, carboxy, amino, oxy, thréonylcarbamoyl, isopentényl, lysyl, ribosyl, groupes thio, aminocarboxypropyl, acétyl et selenium) et leurs positions correspondantes. (Adapté et traduit de Shepherd et col., FEMS microbiology reviews, 2015)

Schématiquement chaque ARNt lie l'acide aminé spécifiquement associé à son anticodon. Les ARNt sont ainsi des molécules adaptatrices établissant un lien physique entre l'information génétique codée sur l'ARNm par 61 codons sens et 3 codons stop, et une séquence protéique écrite avec les 20 acides aminés naturels. Les 64 codons sont le résultat des différentes combinaisons de mots de trois lettres, écrits avec les quatre lettres A, G, C et U des acides nucléiques. Le code génétique donne la correspondance entre le codon de l'ARNm et l'acide aminé incorporé (Figure 3).

|   | U   |               | C   |           | A   |                   | G                |                   |   |
|---|-----|---------------|-----|-----------|-----|-------------------|------------------|-------------------|---|
| U | UUU | Phénylalanine | UCU | Sérine    | UAU | Tyrosine          | UGU              | Cystéine          | U |
|   | UUC |               | UCC |           | UAC |                   | UGC              |                   | C |
|   | UUA | Leucine       | UCA |           | UAA | <b>Codon STOP</b> | UGA              | <b>Codon STOP</b> | A |
|   | UUG |               | UCG |           | UAG |                   | UGG              | Tryptophane       | G |
| C | CUU | Leucine       | CCU | Proline   | CAU | Histidine         | CGU              | Arginine          | U |
|   | CUC |               | CCC |           | CAC |                   | CGC              |                   | C |
|   | CUA |               | CCA |           | CAA | CGA               | Glutamine        |                   | A |
|   | CUG |               | CCG |           | CAG | CGG               | G                |                   |   |
| A | AUU | Isoleucine    | ACU | Thréonine | AAU | Asparagine        | AGU              | Sérine            | U |
|   | AUC |               | ACC |           | AAC |                   | AGC              |                   | C |
|   | AUA | ACA           | AAA |           | AGA | Arginine          | A                |                   |   |
|   | AUG | Méthionine    | ACG |           | AAG |                   | AGG              | G                 |   |
| G | GUU | Valine        | GCU | Alanine   | GAU | Acide aspartique  | GGU              | Glycine           | U |
|   | GUC |               | GCC |           | GAC |                   | GGC              |                   | C |
|   | GUA |               | GCA |           | GAA | GGA               | Acide glutamique |                   | A |
|   | GUG |               | GCG |           | GAG | GGG               | G                |                   |   |

Figure 3 : Le code génétique

Il est dit redondant, car plusieurs codons codent pour le même acide aminé. Le nombre d'ARNt avec des anticodons différents varie entre 30 et 46 selon les organismes, ce qui semble insuffisant pour reconnaître la totalité des 61 codons sens. Il existe une stratégie d'économie d'anticodons. La reconnaissance de la dernière position du triplet du codon par la première base de l'anticodon (en position 34) peut en effet ne pas s'effectuer par l'intermédiaire d'appariements de type Watson-Crick (A-U, C-G), mais par des appariements non canoniques appelés appariements de type « wobble ». « Wobble » correspond à « bancal », car ces liaisons constituent en quelque sorte une irrégularité dans la règle classique d'appariement des bases. Dans 32 cas, les deux premières lettres du codon suffisent à définir l'acide aminé correspondant (CU pour la leucine, GU pour la valine, UC pour la sérine, CC pour la proline, AC pour la thréonine, GC pour l'alanine, CG pour l'arginine et GG pour la glycine). Dans les autres cas, la reconnaissance de la troisième lettre du codon est fondamentale pour associer le bon acide aminé. La base en position 34 de l'anticodon va donc fréquemment subir des modifications post-transcriptionnelles pour s'apparier spécifiquement au codon correspondant à l'acide aminé porté et ainsi assurer la fidélité de la traduction du code génétique. La Figure 2 illustre les modifications post-transcriptionnelles que l'on peut observer pour l'ARNt d'*Escherichia coli*. La base située en position 37 peut également être soumise à plusieurs de ces modifications, dont le rôle est d'augmenter la fidélité de la traduction en stabilisant l'appariement du nucléotide 36 avec le premier nucléotide du codon.

La fixation de l'acide aminé à son ARNt « spécifique » est catalysée par une aminoacyl-ARNt synthétase. Il existe une enzyme par acide aminé, soit 20, chez les procaryotes. Les erreurs d'appariement entraîneraient une synthèse de protéine non fonctionnelle, mais les propriétés physico-chimiques des chaînes latérales des acides aminés sont suffisamment différentes pour que les aminoacyl-ARNt synthétases n'aient pas de difficulté à reconnaître l'acide aminé correct. Ces erreurs surviennent tout de même environ une fois sur 10000.

Tous les protagonistes sont alors prêts à se rassembler au niveau des ribosomes pour la traduction. Trois étapes se succèdent : l'initiation, l'élongation puis la terminaison.

Elles se déroulent au sein du ribosome, entre la petite et la grande sous-unité, au niveau de trois sites voisins, le site A (Accepteur), P (Peptidyl), et E (Exit).

La première étape est l'initiation :

Chez les procaryotes, l'ARNm s'associe à la petite sous-unité grâce à la séquence de Shine-Dalgarno présente en amont du codon d'initiation AUG, en s'appariant directement à l'ARNr 16S qui comporte une séquence complémentaire. Le codon AUG de l'ARNm, commun à tous les ARNm, est alors positionné au niveau du site P. L'ARNt ayant l'anticodon correspondant et portant une Méthionine se fixe directement au site P. Ceci forme le complexe d'amorçage et permet à la grande sous-unité du ribosome de se fixer. On parle du complexe d'initiation, composé du ribosome 70S, de l'ARNm et de l'ARNt<sup>MET</sup> (ARNt portant une Méthionine). Plusieurs enzymes, appelées facteurs d'initiation interviennent pour assurer le bon déroulement de cette première phase.

La seconde étape est l'élongation :

Un nouvel ARNt ayant l'anticodon complémentaire au premier codon de l'ARNm et portant l'acide aminé correspondant s'y fixe au niveau du site A via le facteur d'élongation EF-Tu. Il se crée ensuite une liaison peptidique entre l'acide aminé porté par l'ARNt en position P et celui porté par l'ARNt en position A. Cette réaction enzymatique est catalysée par le PTC (centre peptidyl transférase) ribosomique, qui est un ensemble ribonucléoprotéique au niveau de la grande sous-unité (ARNr 23S). A ce moment-là, l'ARNt au site P est nu, et celui au niveau du site A porte la chaîne polypeptidique. Grâce à l'hydrolyse de GTP par un facteur d'élongation (EF-G), le ribosome réalise une translocation sur l'ARNm de trois nucléotides.

Ainsi, le site A se retrouve libre, l'ARNt qui était au site A se retrouve au site P, et celui au site P est décalé au site E. Les cycles d'élongation se répètent ainsi selon la longueur de la protéine. Ces étapes sont schématisées par la Figure 4 (34).

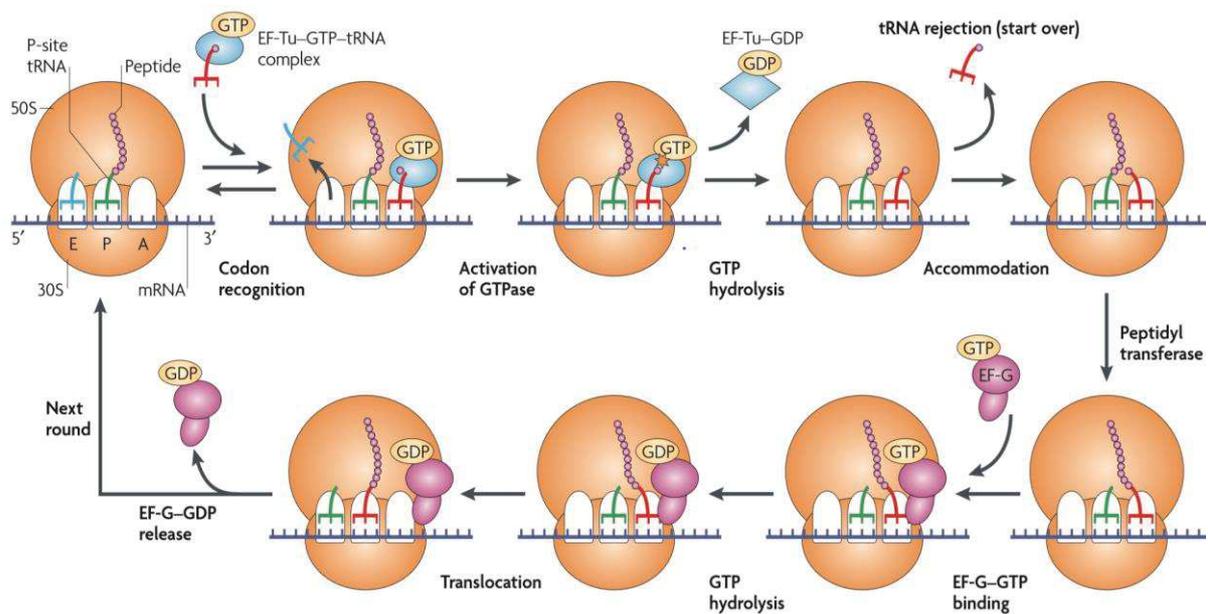


Figure 4 : Le processus d'élongation de la chaîne polypeptidique chez les procaryotes  
(Adapté et traduit de Steitz, Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2008)

La troisième étape est la terminaison :

Un codon STOP (UAA, UAG ou UGA) se positionne au site A. Il n'existe pas d'ARNt avec un anticodon complémentaire. Ce codon est reconnu par la protéine RF1 (releasing factor 1) qui, potentialisée par RF3, se fixe au ribosome et stimule le clivage de la liaison ester entre l'ARNt et la chaîne polypeptidique, ce qui libère la protéine du ribosome. Il s'ensuit un

processus de recyclage avec dissociation des complexes ribosome/ARNt/ARNm via différents facteurs dont le RRF (Ribosome Recycling Factor), qui sont alors disponibles pour de nouvelles traductions.

Il est intéressant de noter que les ribosomes constituent la cible privilégiée de plusieurs antibiotiques. Les oxazolidinones se fixent sur la sous-unité 50S du ribosome, ce qui l'empêche de se combiner à la sous-unité 30S et à l'ARNt pour former le complexe ribosomal d'initiation 70S. Les aminosides altèrent la synthèse protéique en se fixant sur l'ARNr 16S de la petite sous-unité, proche du site de décodage A. Des erreurs de reconnaissance codon-anticodon entre l'ARNm et les ARNt induisent alors la synthèse de protéines aberrantes. Les cyclines se fixent également au niveau de l'ARNr 16S proche du site A et bloquent l'accès au site A pour les ARNt. Le chloramphénicol et les antibiotiques du groupe MLSK (macrolides, lincosamides, synergistines, et kétolides) se fixent sur la grande sous unité ribosomale 50S, en particulier sur l'ARNr 23S pour les kétolides, ce qui entraîne un blocage de l'assemblage des peptides, donc une inhibition de la synthèse protéique. L'acide fusidique inhibe l'étape d'élongation en se fixant sur la protéine EF-G, ce qui entrave la translocation du ribosome sur l'ARNm.

### **2.3.3 Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S**

Les gènes codant pour les ARN ribosomiques ont été étudiés principalement depuis les années 80. Carl Richard Woese les a décrits comme « the ultimate molecular chronometers » (4), c'est-à-dire l'horloge moléculaire ultime. C'est le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S qui est utilisé en pratique. Il possède les trois caractéristiques fondamentales d'une horloge moléculaire : [1] sa fonction étant conservée, les mutations surviennent de façon aléatoire, [2] les taux de mutations sont proportionnels avec le spectre des distances évolutives des bactéries,

[3] sa taille est adaptée, assez grande pour contenir un éventail large de variabilité de fréquence de mutations tout au long de la séquence, et ces zones sont indépendantes les unes des autres sur le plan évolutif. Ainsi, des mutations non aléatoires affectant une partie du gène en raison de contraintes de sélection n'affecteront pas le reste de la séquence (35).

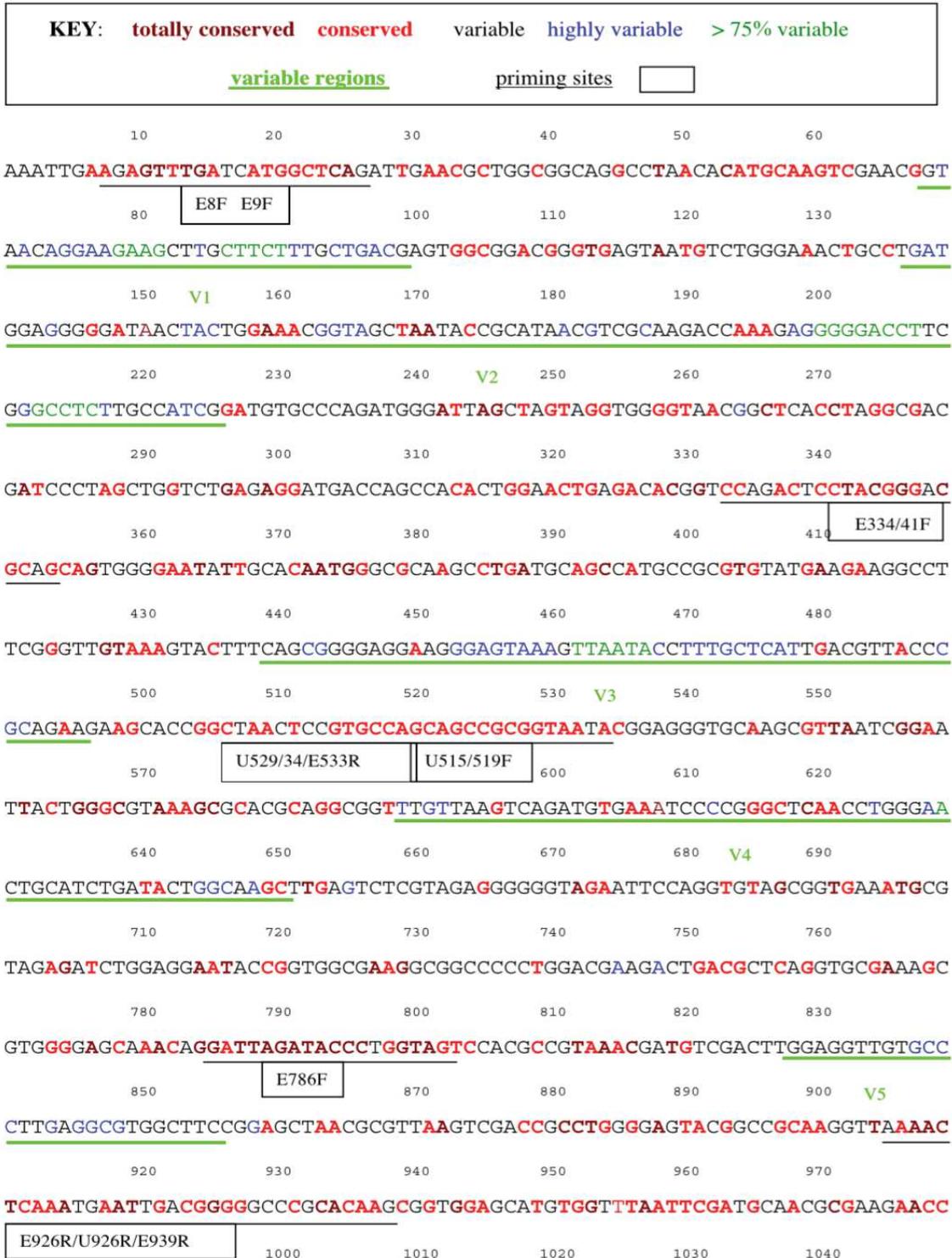
Les gènes codant pour les ARN ribosomiques appartiennent à l'opéron ribosomique. D'une manière générale, les opérons constituent des unités fonctionnelles associant plusieurs séquences nucléotidiques, plusieurs gènes. L'opéron ribosomique est transcrit sous la forme initiale d'un précurseur qui est ensuite clivé par la RNase III (ribonucléase III) libérant les 3 sous-unités, 23S, 16S et 5S. Le gène codant spécifiquement pour l'ARN 16S est composé d'environ 1500 paires de bases. Cette taille est relativement bien adaptée à la réalisation de PCR par rapport à d'autres gènes ribosomiques comme celui codant pour l'ARN ribosomal 5S (120 nucléotides) ou 23S (2900 nucléotides). Il existe un nombre variable de copies de ce gène par bactérie, de 1 à 15 selon l'espèce (36). Ce nombre variable de copies empêche toute analyse quantitative, mais peut s'avérer utile : un nombre de copies élevé augmente la sensibilité de détection de la PCR.

Le gène 16S est composé de séquences variables dont 9 régions hypervariables, nommées V1 à V9, flanquées de 10 régions hautement conservées parmi les bactéries, indispensables à la structure tertiaire de l'ARNr (Figure 5) (37). Il existe ainsi un large répertoire de variabilité de séquence au sein de ce gène, traduisant des divergences phylogénétiques lointaines entre les espèces pour les régions peu variables, plus récentes pour les régions hypervariables. Les aiguilles de l'horloge moléculaire tournent à une fréquence différente en différents points du gène.

Les amorces complémentaires aux régions conservées sont dites universelles, capables de se fixer à presque toutes les bactéries de façon non-spécifique. L'ADN séquencé compris entre les deux amorces contient plus ou moins de zones variables qui seront comparées à une base de

données pour finalement permettre de positionner la bactérie au sein des espèces les plus proches par le biais d'un arbre phylogénétique et en déterminer ainsi l'espèce.

Chakravorty et col. ont étudié l'intérêt des différentes régions variables pour l'identification phylogénétique des bactéries (38). Ils ont par exemple montré que pour différencier *Staphylococcus aureus* des staphylocoques à coagulase négative, l'analyse de la région V1 était la plus utile. Les régions V2 et V3 permettaient de différencier la majorité des bactéries testées, avec de meilleures performances pour les *Mycobacterium spp* et *Escherichia coli* O157H7 avec V2 et pour les autres entérobactéries et *Haemophilus spp* avec V3. La région hypervariable V6 était à la fois la plus courte et la plus riche en hétérogénéité nucléotidique, avec un intérêt particulier en cas de bioterrorisme pour différencier *Bacillus anthracis* de *Bacillus cereus*. Les régions V4, V5, V7 et V8 semblaient moins intéressantes. La région V9 avait été exclue de l'analyse en raison de nombreuses données incomplètes.



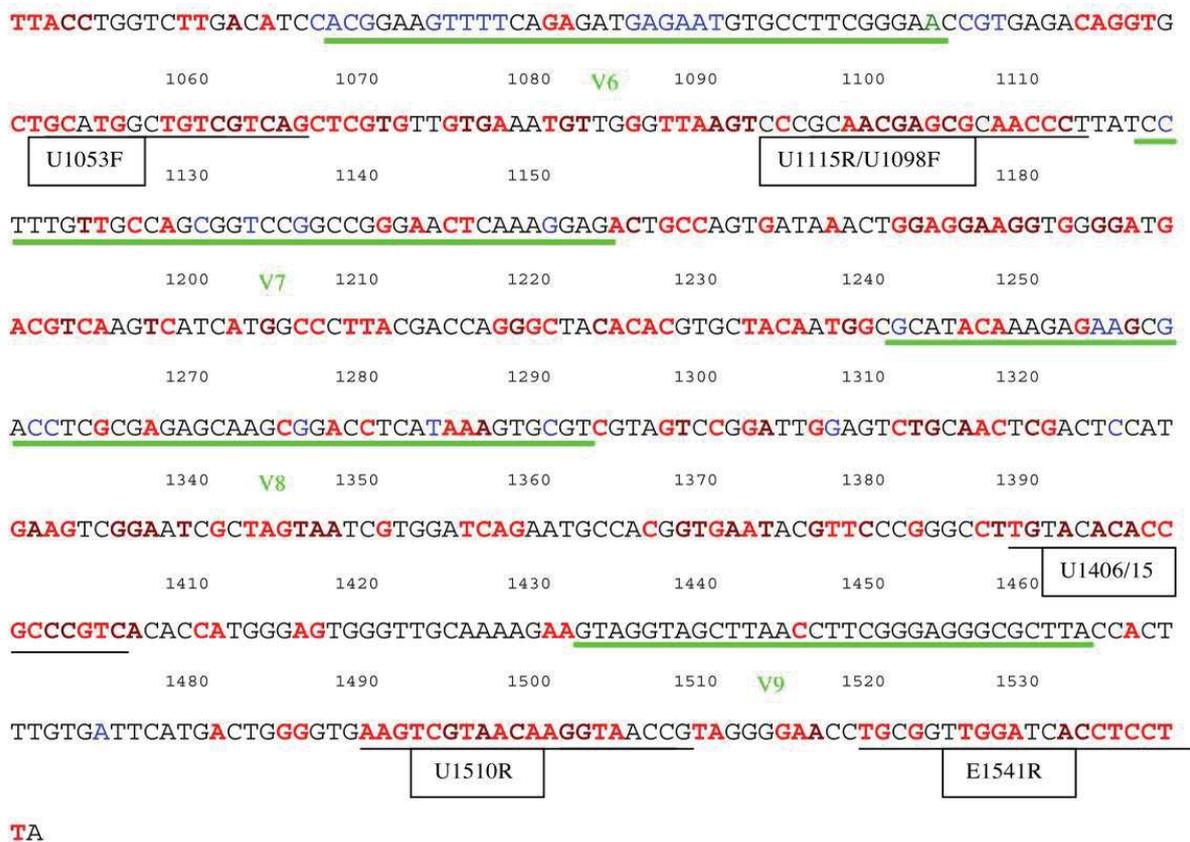


Figure 5 : Répartition des régions constantes et variables de l'ADN ribosomal 16S d'*Escherichia coli*, exemples d'amorces « universelles »

(Adapté et traduit de Baker et col., Journal of Microbiological Methods, 2003)

## 2.4 Les détails techniques

Ce chapitre a pour but de décrire schématiquement les techniques utilisées dans le cadre de la PCR 16S. Nous rappellerons dans un premier temps les principes de la PCR, puis nous verrons dans un second temps la méthode de Sanger.

## 2.4.1 La PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction), ou encore ACP (Amplification en Chaîne par Polymérase) en français, est une technique de biologie moléculaire utilisée pour amplifier un fragment d'ADN. La problématique est d'obtenir une quantité importante d'ADN à partir d'un prélèvement qui en contient peu.

### 2.4.1.1 Les amorces

Il est nécessaire de sélectionner une zone bien précise que l'on souhaite amplifier, par exemple un gène d'intérêt. Des amorces permettront d'encadrer cette région à amplifier. Ces amorces sont des séquences oligonucléotidiques qui devront s'apparier sur l'ADN cible de part et d'autre du gène d'intérêt. L'ADN étant double-brin, on aura une amorce dite « sens » (qui se fixe sur le brin « antisens » 3'-5') et une amorce « antisens » (qui se fixe sur le brin « sens » 5'-3').

Exemple :



Les amorces, en tant que séquences nucléotidiques, se lisent de l'extrémité 5' à l'extrémité 3'. On a donc dans cet exemple l'amorce sens ACTG et l'amorce antisens GAAA. Le choix de ces amorces est fondamental à la fois en termes de longueur et de composition en bases nucléotidiques. Il est important que les amorces soient spécifiques de la région à amplifier. Des amorces trop courtes risqueraient de s'hybrider sur d'autres régions en raison d'un manque de spécificité et d'entraîner l'amplification d'un segment non souhaité. Il est également possible

d'utiliser des bases dites dégénérées au sein des séquences (39), c'est-à-dire que pour un oligonucléotide sur une position donnée on aura la moitié des amorces comportant une base et la moitié une autre. Dans certains cas, un mix de trois voir de quatre nucléotides peut être utilisé. Ces bases dégénérées sont désignées par des lettres : K, M, R, S, W et Y correspondant respectivement aux couples G/T, A/C, A/G, C/G, A/T et C/T. B, D, H et V correspondent respectivement aux couples C/G/T, A/G/T, A/C/T et A/C/G, et N correspond au couple A/C/G/T, les quatre bases sont alors présentes dans une proportion de 25 % sur une position de l'amorce. L'objectif de ces bases dégénérées est de prendre en compte le risque de mutation de l'ADN cible pour minimiser le risque de non-appariement et ainsi d'augmenter la sensibilité de la technique.

#### **2.4.1.2 Les étapes de la PCR**

La PCR consiste schématiquement en une succession de trois étapes qui va se répéter pour obtenir une amplification exponentielle de la séquence d'ADN cible (40).

La phase de dénaturation se déroule à haute température (95°C), et permet de déshybrider l'ADN double brin en ADN simple brin, avec homogénéisation du milieu. Puis vient une phase d'hybridation lors de laquelle les amorces sens et antisens se fixent sur leurs cibles. Cette étape se déroule à une température donnée, inférieure à celle de dénaturation, qui doit être thermodynamiquement favorable à la fixation des deux amorces. La troisième phase est l'élongation. Celle-ci met en jeu les ADN polymérases et les bases nucléotidiques A/C/T/G présentes dans le réactif. Les brins d'ADN complémentaires sont synthétisés à partir des amorces, les ADN polymérases parcourant les brins « matrice » de leur extrémité 3' vers leur extrémité 5'. La longueur des brins complémentaires synthétisés lors de cette première étape d'élongation ne dépend que de la durée de la réaction. Les produits de chaque étape de synthèse

sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes. Ainsi, lors des étapes d'élongation suivantes, l'ADN polymérase sera limitée par la longueur du nouveau segment « matrice » déterminé par les amorces. Ces différentes phases se répètent, on parle de cycles de PCR ( $C_n$ ,  $n$  correspondant au numéro du cycle). Dans le cas où l'on dispose initialement d'un unique double brin d'ADN, on obtient à la fin du premier cycle 4 brins, à la fin du deuxième 8 brins, 16 brins à la fin du troisième, réalisant une amplification exponentielle de l'ADN présent.

### **2.4.1.3 La quantification du produit amplifié**

Actuellement la grande majorité des PCR utilisent une méthode de révélation en temps réel, d'où le terme rtPCR (real time PCR).

De nombreuses techniques existent et nous décrivons ici l'utilisation du TB Green qui constitue une méthode extrêmement répandue de quantification (41). Il s'agit d'un agent intercalant qui s'insère entre les bases appariées d'une molécule d'ADN double brin et émet dans cette situation une fluorescence verte d'une longueur d'onde de 520 nm. Cette fluorescence est détectée et traduite en courbe en temps réel. La fluorescence n'est pas spécifique, et toute séquence d'ADN amplifiée entraînera l'émission de fluorescence lors de l'appariement en double brin, d'où l'importance de la spécificité des amorces. On considère que la PCR est positive si le seuil de fluorescence est atteint jusqu'au 40<sup>ème</sup> cycle (Figure 6).

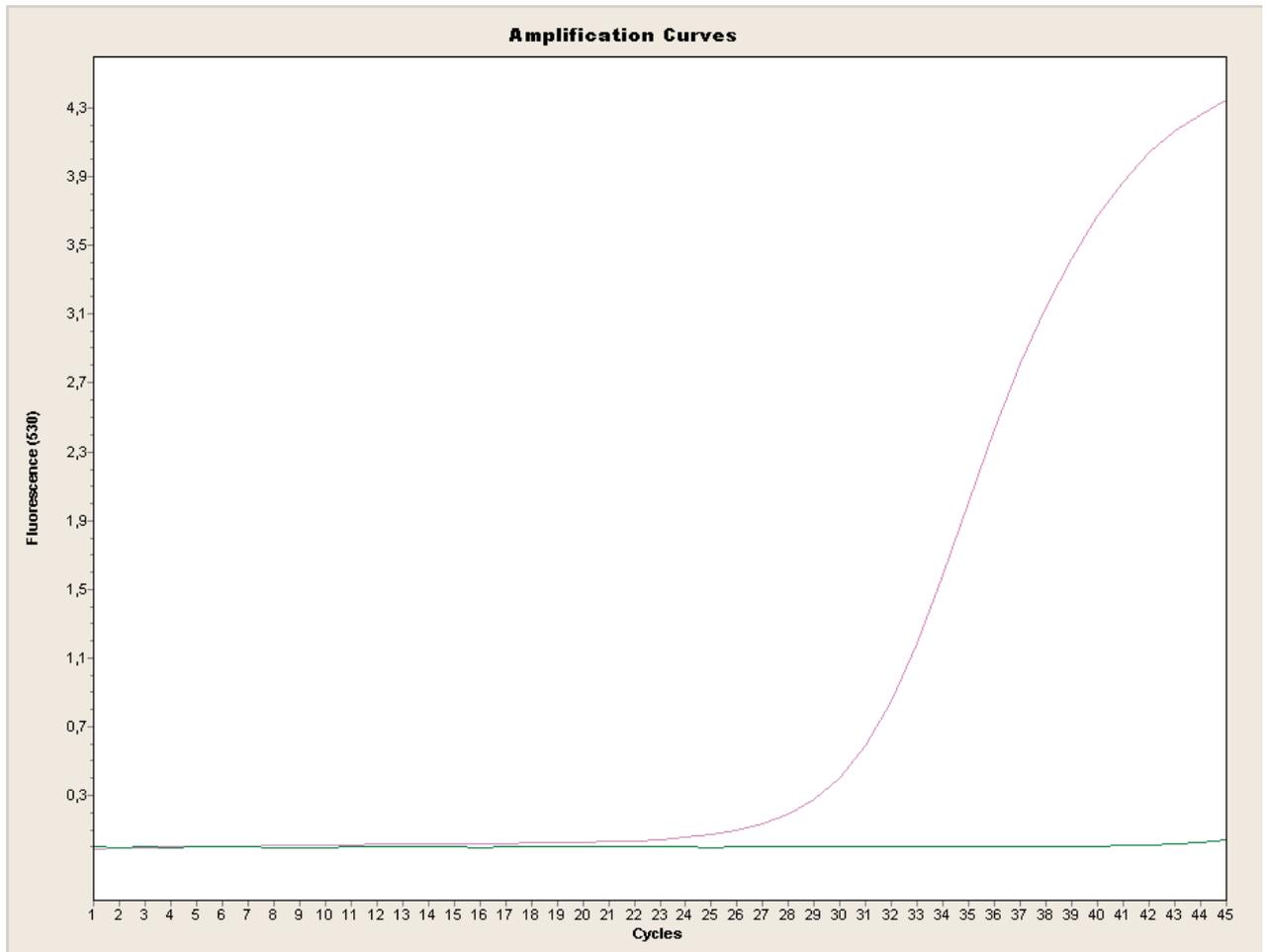


Figure 6 : Courbes de fluorescence positive (rose, témoin positif) et négative (vert, témoin négatif) réalisées lors d'une série de PCR 16S en mars 2019 au Plateau Technique de Microbiologie de Strasbourg (capture d'écran)

## 2.4.2 Le séquençage

Après avoir amplifié une quantité suffisante d'ADN, il faut pouvoir déterminer la séquence nucléotidique du segment d'intérêt. On utilise pour cela la méthode de séquençage dite de Sanger (6).

### 2.4.2.1 Les différents acteurs

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont mis en relation avec des amorces complémentaires à l'extrémité 3' du brin sens, les quatre désoxyribonucléotides triphosphates A/T/C/G, et de l'ADN polymérase. De plus sont incorporés des didésoxyribonucléotides ddATP (didésoxyadénosine triphosphate), ddTTP (didésoxythymidine triphosphate), ddCTP (didésoxycytosine triphosphate), et ddGTP (didésoxyguanosine triphosphate) qui ont la particularité de ne pas avoir d'extrémité OH en position 3'. Ainsi, une fois qu'un didésoxyribonucléotide est incorporé, la synthèse du brin complémentaire s'arrête car la liaison phosphodiester ne peut pas se faire. Chaque didésoxyribonucléotide est marqué avec un fluorophore particulier dont le spectre d'émission est spécifique.

### 2.4.2.2 Le principe

Après une étape de dénaturation permettant de dissocier l'ADN double brin, les amorces s'hybrident sur leur cible, l'extrémité 3' du brin sens. Les didésoxyribonucléotides sont en quantité beaucoup plus faible que les désoxyribonucléotides. Les désoxyribonucléotides sont incorporés par l'ADN polymérase qui parcourt le brin sens de son extrémité 3' vers son extrémité 5'. Il se forme des liaisons phosphodiesters entre l'extrémité 3' OH de la chaîne nucléotidique et le 5' phosphate des désoxyribonucléotides suivants, jusqu'à ce qu'un didésoxyribonucléotide soit introduit et que l'élongation s'arrête. L'incorporation des didésoxyribonucléotides est aléatoire. Le rapport didésoxyribonucléotide/désoxyribonucléotide et l'affinité de l'ADN polymérase pour chaque nucléotide sont optimisés pour que, statistiquement, les désoxyribonucléotides soient distribués sur toutes les positions possibles. On obtient des brins de longueur variable selon l'endroit d'incorporation des didésoxyribonucléotides.

### 2.4.2.3 Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse sur capillaires permet de faire migrer les différents fragments d'ADN selon leur longueur. Après application d'un champ électrique, les fragments d'ADN chargés négativement migrent vers la borne positive. Plus leur longueur, donc leur masse moléculaire est faible, plus la distance parcourue est importante. Les fragments se répartissent ainsi sur un capillaire d'une longueur allant de 30 à 50 cm. Cette technique automatisée applique ensuite un laser dans les différentes positions, couplé à un récepteur qui détecte la fluorescence correspondant au fluorophore donc au didésoxyribonucléotide ayant migré à cette position ddATP/ddTTP/ddCTP/ddGTP. On obtient ainsi un chromatogramme, comme celui présenté dans la Figure 7. Chaque pic coloré correspond à une base : A en vert, T en rouge, C en bleu et G en noir. La séquence d'ADN correspondant au fragment amplifié peut maintenant être analysée.

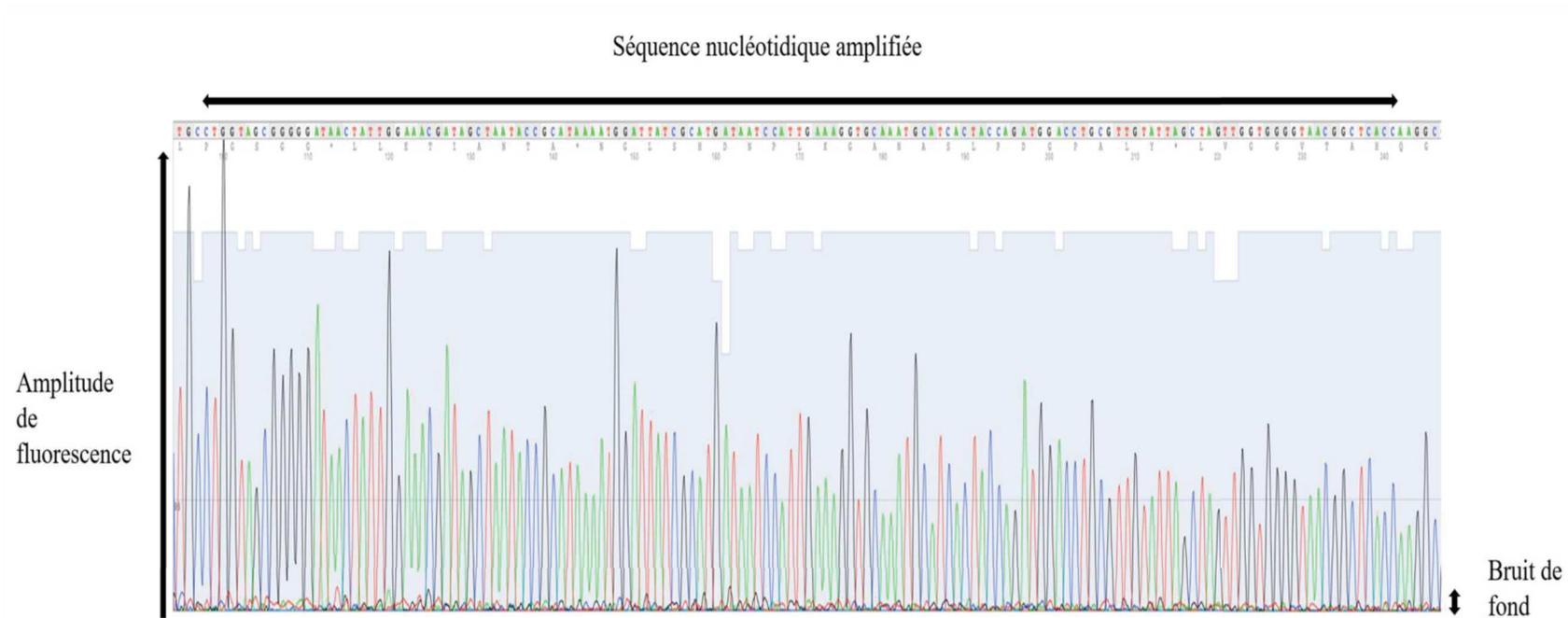


Figure 7 : Exemple de chromatogramme partiel de l'ADN ribosomal 16S provenant d'un échantillon clinique du CHU de Strasbourg, 2019 (capture d'écran)

## **2.5 Mise en place de la PCR 16S en temps réel au CHU de Strasbourg**

La technique initialement utilisée au CHU de Strasbourg était une PCR « en point final ». Son nom découle du principe de révélation de l'ADN amplifié, qui se déroule tout à la fin de la phase d'amplification par migration des amplicons sur gel d'agarose via un champ électrique. Cette méthode avait comme désavantage une étape de manipulation supplémentaire avec risque de contamination de l'échantillon, et un risque de toxicité pour le personnel. En effet, du bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant cancérigène, était employé pour la révélation sous lumière ultraviolette.

Les techniques en point final ont été progressivement remplacées par les techniques dites en temps réel (rtPCR, « real time PCR »), permettant de quantifier l'amplification de l'ADN en continu et de s'affranchir de leurs nombreuses contraintes.

En 2014, M. Meddeb et col. (42) ont évalué la mise en place de cette nouvelle technique pour la PCR 16S et produit une analyse complète des techniques disponibles qui ont constitué la base de travail permettant de développer cette technique au laboratoire de microbiologie de Strasbourg.

### **2.5.1 Choix de la méthode de révélation**

Différentes méthodes de révélation sont actuellement disponibles :

-Le SYBR<sup>®</sup> Green, un agent intercalant moins toxique que le BET, qui émet une fluorescence verte (520 nm de longueur d'onde) une fois inséré entre les bases appariées d'une molécule

d'ADN double brin. C'est une méthode de révélation non spécifique de la séquence amplifiée, mais proportionnelle à la quantité d'ADN double brin.

-Les sondes fluorescentes, parmi lesquelles les sondes d'hydrolyse, le système FRET en tandem, et les sondes de type balises moléculaires « BEACONS ». Celles-ci partagent le principe d'être des séquences d'ADN qui s'apparient à une région cible spécifique avec des fluorophores qui se manifestent lors des différentes étapes d'amplification.

Le SYBR<sup>®</sup> Green, actuellement TB<sup>®</sup> Green a finalement été choisi pour sa simplicité d'emploi et son coût plus faible malgré une moindre spécificité. Cette technique permet également de s'affranchir du risque de faux négatifs liés aux possibles mésappariements des sondes spécifiques avec leurs cibles.

## 2.5.2 Choix des amorces ciblant d'ADN ribosomal 16S

Une revue critique de la littérature avait permis de retenir cinq couples d'amorce : **27F/16S1RRB** (43), 27F/244R (44), Neck1/Neck2 (45), PL06/P13p (45), et RW1/DG74 (46,47). Ceux-ci ont été comparés, ainsi que ceux utilisés au CHU de Poitiers (27F/685R3), de Lyon (16S1/16S2), et celui qui était utilisé à Strasbourg pour la PCR « en point final » (27F/PCY540).

La première étape consistait en la réalisation de PCR 16S sur des souches bactériennes de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Kingella kingae*, *Bacteroides fragilis* et sur des contrôles négatifs. Le but était d'évaluer la capacité de ces amorces à amplifier correctement l'ADN 16S bactérien, avec analyse des caractères thermodynamiques, des courbes d'amplification et des chromatogrammes obtenus après séquençage. Six des huit couples d'amorce étaient alors exclus, notamment celui précédemment utilisé à Strasbourg. Celui-ci ne permettait pas

d'obtenir de résultat satisfaisant malgré quatre protocoles de rtPCR, avec amplification des témoins négatifs et un aspect parasite de nombreux chromatogrammes finalement ininterprétables après séquençage.

Les deux couples d'amorces sélectionnés, **27F/16S1RRB** et 27F/685R3, étaient, dans un second temps, comparés sur leur capacité d'amplification des espèces bactériennes présentant des mésappariements avec les amorces, leur limite de détection, et leur spécificité vis-à-vis de l'ADN humain :

-L'impact des mésappariements : le Ct (Cycle threshold, cycle auquel la fluorescence atteint le seuil défini lors d'une réaction de PCR) pour une bactérie avec mésappariements était comparé au Ct de la même bactérie sans mésappariement pour chaque couple d'amorce. Le seuil de 3 cycles de différence était considéré comme significatif. Ceci était le cas avec *Bacteroides fragilis*, *Capnocytophaga sp*, *Cardiobacterium hominis*, ainsi que *Borrelia sp* pour le couple **27F/16S1RRB** et avec *Abiotrophia defectiva*, *Bartonella sp*, *Borrelia sp*, *Brucella sp*, *Campylobacter sp*, *Cardiobacterium hominis*, *Ehrlichia sp*, *Fusobacterium sp*, *Helicobacter sp* et *Treponema pallidum* pour le couple 27F/685R3.

-La limite de détection : elle était évaluée par amplification de l'ADN de *Klebsiella pneumoniae* sur une gamme de concentrations décroissantes allant de 1 ng/μl à 10 fg/μl. La limite de détection était de 1 pg/μl pour la dyade **27F/16S1RRB** et de 10 fg/μl pour l'association 27F/685R3, soit 100 fois plus faible.

-La spécificité vis-à-vis de l'ADN eucaryote : de l'ADN de *Klebsiella pneumoniae* à différentes concentrations (de 10 fg/μl à 1 ng/μl) était mélangé volume pour volume avec de l'ADN eucaryote à 30 ng/μl provenant du sang d'un volontaire sain. Pour le couple **27F/16S1RRB**, l'ADN bactérien était détectable avant 40 cycles à partir d'une concentration de 10 pg/μl, et les chromatogrammes étaient nets. Ceci n'était pas le cas pour le couple d'amorce prêté par le CHU de Poitiers, avec une amplification non spécifique de l'ADN eucaryote. Il existait une positivité

précoce du témoin négatif avec seul de l'ADN humain au séquençage. L'ADN de *Klebsiella pneumoniae* était détecté avec une bonne sensibilité, à partir de 250 fg/μl, mais les chromatogrammes étaient fortement parasités, avec les 150 premières bases correspondant à une région du chromosome 1 humain.

Au final, c'est le couple d'amorce **27F/16S1RRB** (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')/ (5'-CTTTACGCCCARTRAWTCCG-3') qui a été retenu devant sa meilleure spécificité pour l'ADN bactérien vis-à-vis de l'ADN humain, nécessaire pour l'analyse de prélèvements cliniques. Ce couple permet d'amplifier un fragment d'environ 560 paires de bases comprenant les régions variables V1, V2 et V3 du gène codant pour d'ARN ribosomal 16S. On notera la présence, sur des positions stratégiques, de bases dégénérées (M, R et W). Elles permettent une plus grande sensibilité en diminuant le risque de mauvais appariement des amorces, ces positions nucléotidiques étant particulièrement variables. La base M correspond à 50% de désoxyadénosine et 50% de désoxycytidine, la base R à 50% de désoxyadénosine et 50% de désoxyguanosine, et la base W à 50% de désoxyadénosine et 50% de désoxythymidine.

### 2.5.3 Optimisation de la technique

Tout d'abord les conditions d'amplification ont été ajustées pour améliorer la sensibilité de la technique. La diminution de la température d'hybridation n'a pas été retenue en raison d'une perte de spécificité importante, mais la durée de l'étape d'élongation a été allongée de 18 à 30 secondes du fait de la taille importante du fragment amplifié avec les amorces choisies. Le protocole est actuellement le suivant au laboratoire de microbiologie :

- Pré-dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes
- 45 cycles de PCR

Dénaturation à 95 °C pendant 5 secondes

Hybridation à 60 °C pendant 10 secondes

Élongation à 72 °C pendant 30 secondes

- Refroidissement à 4 °C pendant 30 secondes

Ensuite, le volume de la matrice d'ADN a été augmenté de 2 à 5 µl pour d'une part accroître le volume de la cible, et d'autre part limiter l'impact de la fluctuation du volume de matrice déposé dans les capillaires réactionnels.

Finalement, ces mises au point ont permis de diminuer la limite de détection de 1 pg/µl à 250 fg/µl pour de l'ADN de *Klebsiella pneumoniae* (positivité de 5 sur 5 échantillons testés), ce qui correspond à 226 équivalents-génomes. En effet, 1 picogramme (pg), soit 1000 femtogrammes (fg) d'ADN correspond à 978 Mb (million de bases). Le génome de *Klebsiella pneumoniae* est composé de 5.4 Mb, et le volume de la matrice d'ADN utilisée est de 5 µl. Avec un seuil de détection à 250 fg/µl, on obtient donc  $\left(\frac{978}{5.4}\right) \times \left(\frac{250}{1000}\right) \times 5 = 226$  équivalents génomes. De même, ce seuil a été évalué à 266 pour *Escherichia coli* et 222 pour *Streptococcus pneumoniae*. Afin d'évaluer l'impact de l'ADN eucaryote sur cette technique d'amplification, des réactions avec concentration croissante d'ADN de cellules MRC5 ont été réalisées, et ont permis de mettre en évidence une perte de sensibilité à partir de 50 ng/µl (concentration évaluée comme « moyenne »), avec perte de trois cycles de positivité en moyenne, probablement en raison d'un effet inhibiteur. Ceci a permis de placer la concentration maximale d'ADN des extraits à tester avec cette technique de PCR 16S en temps réel à 50 ng/µl.

#### **2.5.4 Etude comparative de la PCR en temps réel versus la PCR « en point final »**

La totalité des échantillons cliniques du CHU de Strasbourg entre février 2013 et février 2014 a été analysée avec les deux techniques. La réaction était considérée comme positive en cas de

seuil atteint avant 40 Ct. La rtPCR était réalisée en aveugle, sans connaissance du résultat de la PCR « en point final » ou des cultures bactériennes. Le séquençage et l'interprétation étaient réalisés comme décrit ci-après. Le gold-standard était composite, défini par les résultats de la culture de l'échantillon considéré, des autres échantillons issus du même site anatomique ainsi que par les hémocultures du patient prélevées au cours du même épisode infectieux.

Sur 144 échantillons sélectionnés, 15 ont été exclus pour volume insuffisant, les 129 restant comprenaient 36 valves et prélèvements cardiaques divers, 34 LCS et échantillons cérébraux divers, 37 échantillons ostéoarticulaires (dont 4 disques intervertébraux), 4 échantillons oculaires, 4 liquides pleuraux, et 14 échantillons d'autres natures.

Les détails des résultats ne sont pas rapportés, mais sur 100 échantillons négatifs pour le gold-standard, la technique en point final était négative dans 94 cas et la technique en temps réel dans 90 cas. Parmi les 29 échantillons positifs pour le gold-standard, 12 étaient positifs « en point final » et 23 en temps réel. La sensibilité de la PCR 16S en temps réel (76 %) était significativement plus élevée que celle de la PCR 16S « en point final » (41 %) ( $p = 0,03$ ) après réalisation d'un test du Chi-2 (significatif si  $p < 0,05$ ). La spécificité de la PCR 16S en temps réel (90 %) n'était en revanche pas significativement différente de celle de la PCR 16S « en point final » (94 %) ( $p = 0,2$ ).

A noter que les performances de ces tests peuvent être sous-estimées. En effet, il n'existe pas de gold-standard idéal, un des avantages de la PCR 16S étant de pouvoir être positive dans les situations où la culture bactérienne est négative, par exemple en cas d'antibiothérapie préalable ou de bactérie à croissance difficile. Sur 10 échantillons positifs en rtPCR 16S, et négatifs pour le gold-standard, 7 avaient des chromatogrammes parfaitement nets et ont malgré tout été considéré comme des faux positifs pour l'analyse statistique.

### 2.5.5 Limites de cette méthode pour la pratique clinique

Bien que la PCR 16S soit dite universelle, le choix des amorces impacte la sensibilité de la méthode, et certaines espèces bactériennes, rares, ne sont pas reconnues par ces amorces (39). En effet, il existe des mésappariements entre les bases des amorces et leurs cibles, les régions conservées de l'ADN ribosomal 16S. Ceci est en partie limité par l'emploi de bases dégénérées, mais cette perte de sensibilité est tout de même présente avec le couple d'amorces **27F/16S1RRB** pour les *Chlamydiaceae*, *Chryseobacterium sp*, *Prevotella sp*, *Borrelia sp*, *Coxiella burnetii*, *Peptococcus sp*, *Bacteroides sp*, *Capnocytophaga sp* et à un moindre degré *Cardiobacterium sp*. Toutes ces bactéries ont été décrites ponctuellement dans la survenue d'endocardites (48–56). D'autres méthodes diagnostiques sont néanmoins possibles, notamment les PCR spécifiques pour les *Chlamydiaceae* et la sérologie pour *Coxiella burnetii*. Le trou dans le spectre reste problématique pour *Cardiobacterium sp* et *Capnocytophaga sp* pour lesquelles la culture peut être mise en défaut. Mais il n'existe finalement aucune amorce décrite qui soit vraiment universelle.

Un autre défaut de la technique mis en évidence lors du travail de mise en place de la PCR 16S au laboratoire de microbiologie est la possible amplification de contaminants (57). Celle-ci est minimisée par toutes les précautions décrites ci-après. Elle est pourtant inévitable. En effet, même les réactifs de PCR contenus dans les Pré-mix vendus comme « DNA-free » sont en fait positifs à de très faibles concentrations. Ce biais peut être limité lors de l'interprétation des chromatogrammes, car les bactéries contaminantes sont connues et souvent associées à des courbes d'amplification d'élévation tardives.

## 2.6 Analyse de données, la phylogénie moléculaire

Une fois que tout ou partie de la séquence du gène codant pour d'ARN ribosomal 16S est obtenue à partir d'un échantillon biologique, il faut ensuite identifier l'espèce bactérienne auquel cet ADN 16S pourrait appartenir. Cette étape repose sur l'analyse des relations phylogénétiques entre la séquence amplifiée et celles issues de bases de données. Cette analyse est possible par l'intermédiaire du logiciel leBIBI<sup>QBPP</sup> (*Quick BioInformatic Phylogeny of Prokaryotes*) (58,59).

### 2.6.1 Prétraitement de la séquence

L'utilisation de la séquence obtenue nécessite au préalable une étape d'analyse de la qualité du chromatogramme. La qualité des chromatogrammes est évaluée selon différents paramètres : tout d'abord la longueur de la séquence amplifiée, qui est en théorie de 560 bases en comptant les amorces. On parle de chromatogramme tronqué si le segment amplifié est trop court, avec une perte de spécificité lors de la comparaison de la séquence à la base de données. Ensuite, l'aspect des pics du chromatogramme est apprécié : chaque pic correspond à une base, mais on peut observer des chromatogrammes « mixés » ou « parasités » avec plusieurs pics pour une même position, ce qui correspond soit à une infection polymicrobienne, soit à un bruit de fond en cas de faible amplification d'ADN. Cette situation conduit fréquemment à des examens ininterprétables, surtout quand il existe plus de deux pics par position. Nous utilisons dans ce cas le logiciel RipSeq mixed (Pathogenomix©, USA), qui prend en compte à la fois l'éventuel bruit de fond et aussi le fait que des fragments d'ADN migrent à la fois selon leur longueur et à un moindre degré selon leur composition en nucléotides qui ont des masses molaires différentes. Une séquence de  $n$  bases d'une bactérie A ne migrera pas à la même vitesse qu'une séquence de  $n$  bases d'une bactérie B. Le bruit de fond est écarté en fixant un seuil de

fluorescence minimal, qui permet de ne prendre en compte que les pics d'intensité significative correspondant à des bases nucléotidiques. Pour le décalage des pics de fluorescence, il faut pouvoir dire si deux pics successifs correspondent à un simple décalage d'une même position due à la vitesse de migration différente des deux séquences, ou s'il s'agit de deux positions différentes. Pour cela il faut faire appel à un algorithme de lecture contenu dans le logiciel RipSeq mixed. La distance entre deux pics successifs d'un même chromatogramme est légèrement fluctuante, mais la distance moyenne entre deux pics est très stable et connue. Les chromatogrammes mixés sont ainsi divisés en  $N$  « blocs » de lecture d'une longueur égale à la distance moyenne connue entre deux pics successifs. Les pics compris dans un même « bloc » de lecture sont considérés comme correspondant à une même position nucléotidique. Quand les deux séquences contiennent un même nucléotide sur une même position, on obtient un seul pic résultant de la fusion de la fluorescence émise par les deux nucléotides. Ces pics sont considérés comme des références pour le positionnement des « blocs » de lecture, ils sont appelés « anchors », que l'on peut traduire par « ancrage » ou « pivot ». Le centre du premier « bloc » de lecture est défini par le premier pic « pivot ». A chaque fois qu'un pic « pivot » est rencontré, le cadre de lecture défini par les « blocs » est réajusté (Figure 8) (60).

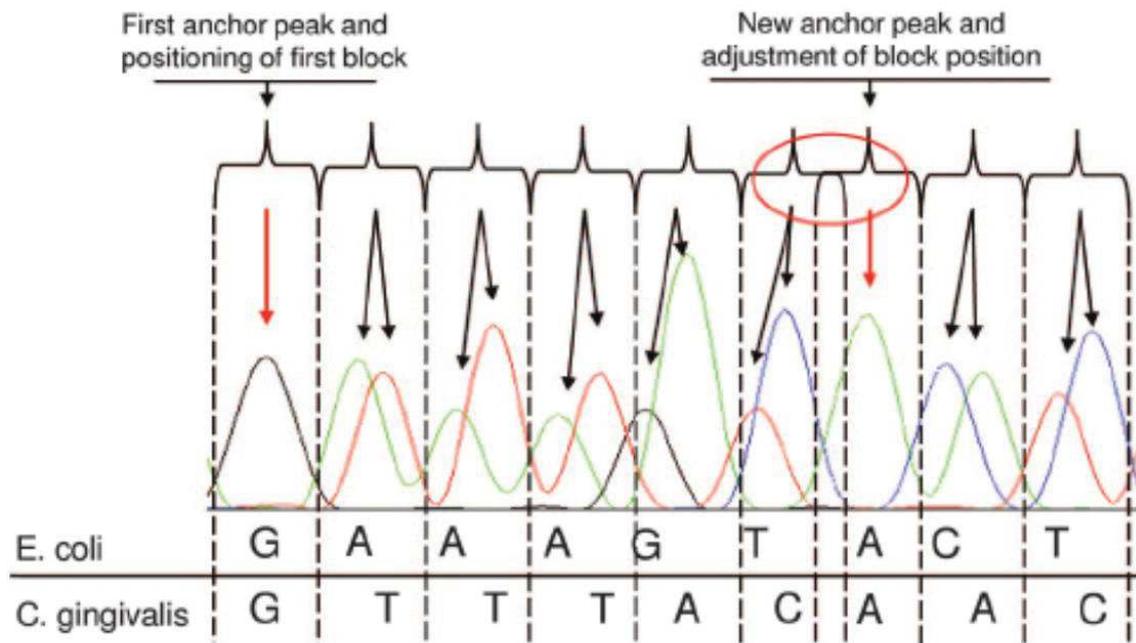


Figure 8 : Analyse d'un chromatogramme parasité par le logiciel Ripseq mixed  
(Adapté et traduit de Kommedal et col., Journal of Clinical Microbiology, 2008)

Il est ainsi aisé de reconstituer les deux séquences nucléotidiques, le premier pic de chaque « bloc » correspondant au nucléotide de la bactérie A, le second au nucléotide de la bactérie B, et les pics « pivots » correspondant à de mêmes nucléotides pour les deux bactéries. Le logiciel applique ensuite une procédure de « matching » qui compare les séquences obtenues à sa propre base de données pour identifier les bactéries.

Cette méthode est notamment utile pour les abcès, fréquemment polymicrobiens. Elle ne permet cependant pas de différencier les séquences de plus de trois bactéries provenant d'un même échantillon (61).

## **2.6.2 Sélection d'une base de données de séquences d'ADN 16S**

Pour l'analyse des chromatogrammes avec le logiciel leBIBI<sup>QBPP</sup>, la base de données utilisée est GenBank® (62), qui comprend les séquences nucléotidiques publiées dans la base de données américaine NCBI (the National Center for Biotechnology Information), en collaboration avec les bases de données Européenne ENA (the European Nucleotide Archive) et Japonaise DDBJ (the DNA Data Bank of Japan). On comptait en 2018 des séquences pour environ 420 000 espèces, à la fois eucaryotes et procaryotes, avec plus de 53 milliards de paires de bases pour les bactéries. Les séquences d'ADN ribosomal 16S soumises sont évaluées avant d'être incorporées, avec recherche de chimères, de contaminations, de séquences de mauvaises qualités, garantissant un certain niveau de qualité de la base de données (on parle de base de données « propre ») même si certaines séquences, notamment anciennes peuvent fausser les résultats d'interprétation lorsque les phylogénies bactériennes évoluent (63).

Plusieurs recherches sont possibles avec leBIBI. Bien sûr, la comparaison avec les séquences d'ADN ribosomal 16S de la base de données, mais aussi avec d'autres séquences, comme par exemple celles du gène *rpoB* (codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase) qui peut également être utile pour l'identification bactérienne.

## **2.6.3 L'identification bactérienne utilisant l'ADN ribosomal 16S avec leBIBI<sup>QBPP</sup>**

### **2.6.3.1 Sélection de la base de données**

Il existe différentes façons d'interroger la base de données avec leBIBI<sup>QBPP</sup>.

Tout d'abord, la comparaison à la « lax database » (« base de données lâche, ou large ») qui correspond à l'ensemble des séquences de GenBank®. C'est la méthode la plus exhaustive, mais également la plus à risque pour l'interprétation phylogénétique, car potentiellement polluée par des séquences erronées. Ce type de comparaison peut être utile, par exemple quand la bactérie analysée n'est encadrée dans aucun cluster satisfaisant d'espèce connue, mais que plusieurs séquences non-identifiées de la base de données se regroupent. Cette situation correspond vraisemblablement à la découverte d'une nouvelle espèce (64).

Ensuite, la « stringent database » (« base de données rigoureuse »). Elle ne contient que des séquences de très bonne qualité représentatives de la diversité des espèces, et permet de bonnes reconstructions phylogénétiques. Elle est cependant limitée pour les espèces fortement représentées dans GenBank®, avec un arbre phylogénétique saturé par une seule espèce ne permettant pas d'interpréter le résultat.

Enfin, la troisième base de données utilisée en pratique est la « TS-stringent » (« souche type »). Celle-ci contient uniquement des séquences provenant de souches types et comporte le risque d'erreur le plus faible. Elle est cependant moins exhaustive en ce qui concerne la biodiversité et peut être prise à défaut pour les espèces ayant une forte variabilité génétique.

En pratique, ces différentes stratégies sont associées avant de conclure.

### **2.6.3.2 La comparaison heuristique de la séquence à la base de données**

Le logiciel leBIBI<sup>QBPP</sup> applique un programme permettant l'alignement de séquences deux à deux, appelé BLAST (the Basic Local Alignment Search Tool) (65). BLAST compare notre séquence d'ADN ribosomal 16S (dite séquence-requête, « query ») avec les séquences existantes pour ce gène dans la base de données choisie.

La séquence nucléotidique est découpée en différents « mots » d'une même taille (11 nucléotides par défaut). Ces « mots » se superposent, permettant d'obtenir un éventail exhaustif des possibilités.

Exemple : séquence « query » :AAACCTGTGTGATCATCATGGTTAGCGGCGCG

Mot 1 : AAACCTGTGTG Mot 2 : AACCTGTGTGA Mot 3 : ACCTGTGTGAT ....

Ensuite, pour chaque mot et chaque séquence de la base de données, le programme recherche des alignements exacts, appelés « hits ». Pour chaque « hit » l'analyse est ensuite étendue de part et d'autre de la séquence. Les régions conservées sont celles qui gardent un certain pourcentage de similarité avec la séquence « query », dits HSP (High scoring Segment Pair). La significativité des alignements obtenus est ensuite évaluée, notamment par la « E-value » qui estime la probabilité que les segments alignés avec un tel degré de concordance puissent être le fruit du hasard. Par exemple, une E-value égale à 20 signifie que 20 HSP peuvent être le fruit du hasard. Le logiciel leBIBI<sup>QBPP</sup> fixe une E-value satisfaisante  $\leq 0.1$ .

Ensuite, les séquences sélectionnées par leurs similarités de bases doivent être alignées pour pouvoir être comparées. Cette étape est nécessaire pour déterminer l'homologie primaire des caractères. Il faut en effet tenir compte des « indels » (INsertions DELETions) qui décalent le cadre de lecture des séquences, et des éventuelles substitutions. Les séquences sont enregistrées au format FASTA puis le programme MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) (66) réalise un alignement multiple global permettant de s'assurer que les nucléotides ayant la même position dans différentes séquences sont issus d'un même nucléotide ancestral. En d'autres termes, cet alignement permet de comparer des nucléotides qui sont effectivement comparables.

La qualité de l'alignement multiple est essentielle pour une analyse phylogénétique de qualité. Pour pallier l'incertitude de l'alignement les séquences appropriées pour une inférence phylogénétique sont sélectionnées par le logiciel BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy) (67). Celui-ci permet d'éliminer les alignements ambigus comprenant à la fois les régions trop variables responsables d'un effet de saturation des mutations et les régions avec des gaps importants, selon une entropie basée sur les probabilités des différentes mutations.

En résumé, le programme BLAST permet de repérer les séquences ayant le plus de similarité en termes de nucléotides (les 30 à 200 séquences les plus similaires sont sélectionnées selon les paramètres choisis). Le logiciel MAFFT aligne les séquences, et les alignements d'intérêt sont sélectionnés par le logiciel BMGE. Ceci correspond à une méthode heuristique, et cette ressemblance de séquence nucléotidique n'équivaut pas forcément à une réalité phylogénétique. D'autres étapes sont nécessaires pour l'identification bactérienne.

### **2.6.3.3 La phylogénie moléculaire**

La phylogénie étudie classiquement des caractères morphologiques (internes ou externes), biogéographiques, écologiques ou comportementaux pour décrire le cours historique de la descendance des êtres organisés. Depuis la fin du XX<sup>e</sup> siècle avec le développement des techniques de biologie moléculaire, l'analyse de l'ADN a complètement bouleversé les notions de relations phylogéniques et donné naissance à la phylogénétique (68). Cette dernière est bien plus juste que les méthodes traditionnelles de classification des bactéries (méthodes phénotypiques). On convertit ainsi des informations contenues dans des séquences génétiques en une hypothèse d'histoire évolutive de groupes d'organismes, avec construction d'arbres phylogénétiques. L'hypothèse est la suivante : l'apparition ou non de mutations (substitutions par transition ou transversion, insertion et délétion) au cours du temps permet de différencier

deux espèces à partir d'un ancêtre commun. Tous les gènes ne sont pas soumis à la même pression de sélection et vont évoluer selon un tempo différent. Par exemple, des régions soumises à des contraintes évolutives moindres auront acquis aléatoirement au cours du temps plus de mutations que des régions soumises à des contraintes évolutives élevées. Les premières sont des marqueurs de divergences évolutives récentes, alors que les secondes sont des marqueurs de divergences évolutives plus anciennes. C'est en comparant les mutations présentes sur une même séquence pour deux espèces différentes, et connaissant la fréquence de mutation sur cette séquence, qu'on peut estimer la distance phylogénétique entre deux espèces. Le nombre de mutations survenues aléatoirement sur la séquence est en effet le produit de la fréquence de mutation et du temps.

La simple comparaison des bases nucléotidiques est rapidement mise en défaut. En effet, une seule différence observée peut provenir de plusieurs événements successifs, et un même nucléotide peut être présent soit parce qu'il n'y a pas eu de changement soit par exemple à la suite de deux substitutions donnant  $C \rightarrow G \rightarrow C$  (homoplasie moléculaire). Ce risque augmente avec le temps écoulé depuis la divergence des deux organismes, et la différence observée entre deux séquences ayant subi un nombre important de substitutions peut ne plus être distinguée du simple hasard (saturation des substitutions). C'est l'écueil des régions hypervariables.

Plusieurs modèles, dits de substitution ou d'évolution des séquences tentent de corriger cette quantité masquée de changements évolutifs. Ils estiment la probabilité de changement d'un nucléotide en un autre.

C'est le logiciel Fast Tree qui est utilisé par leBIBI<sup>QBPP</sup> pour l'analyse phylogénétique. Le modèle évolutif appliqué est le GTR (General Time Reversible) (69). Celui-ci intègre une fréquence différente pour chaque base et autorise des taux différents pour les six types de substitutions (les deux transitions  $A \leftrightarrow G$  et  $C \leftrightarrow T$  et les quatre transversions  $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$  et  $G \leftrightarrow T$ ). Une distribution gamma est appliquée pour modéliser la variation du taux de

substitutions entre sites. On observe en effet une très grande hétérogénéité de vitesse entre les régions codantes (conservées) et non codantes, par exemple pour l'ARN ribosomique (contraintes sélectives importantes), et au contraire une homogénéité de vitesse entre les sites pour les gènes avec faible pression de sélection.

Fast Tree emploie la méthode probabiliste du maximum de vraisemblance pour sélectionner l'arbre phylogénétique le plus probable. Un test de Shimodaira-Hasegawa, qui évalue si la différence de vraisemblance entre les différentes possibilités est statistiquement significative, est ensuite appliqué pour vérifier rapidement la pertinence de positionnement des différentes branches de l'arbre.

La robustesse de l'arbre est ensuite évaluée par bootstrapping. C'est un processus de simulation qui échantillonne les positions de l'alignement pour relancer la construction phylogénétique de façon itérative et compare les résultats obtenus après de nombreuses répétitions. Il apparaît alors à chaque branche des valeurs de bootstrap, exprimées en pourcentage, qui traduisent le nombre de fois où cette branche a été répétée. Plus la valeur de bootstrap est élevée, plus la phylogénie est robuste.

#### **2.6.3.4 L'arbre phylogénétique**

On obtient ainsi un arbre phylogénétique positionnant la bactérie analysée parmi les espèces les plus proches présentes dans la base de données. Il est composé de nœuds et de branches.

Les nœuds sont des unités taxonomiques : on définit des feuilles, qui sont les différentes espèces actuelles issues de la base de données intégrées à l'arbre, et des nœuds internes, hypothétiques, qui symbolisent les ancêtres communs.

Les branches relient les différents nœuds et représentent leurs liens de parenté. Le logiciel leBIBI<sup>QBPP</sup> crée des arbres basés sur la distance, et la longueur des branches correspond à une

unité de temps. La longueur des branches est proportionnelle au nombre d'évènements évolutifs. Plus deux nœuds sont éloignés plus ils ont divergé précocement lors de l'évolution. On parle d'arbres ultramétriques de type chronogrammes. L'ordre des branches n'a aucune importance et on peut les faire pivoter autour des nœuds. Les arbres dits enracinés présentent une racine qui correspond à l'ancêtre commun de de tous ses membres. Ce sont des arbres non enracinés qui sont créés par leBIBI<sup>QBPP</sup> (Figure 9).

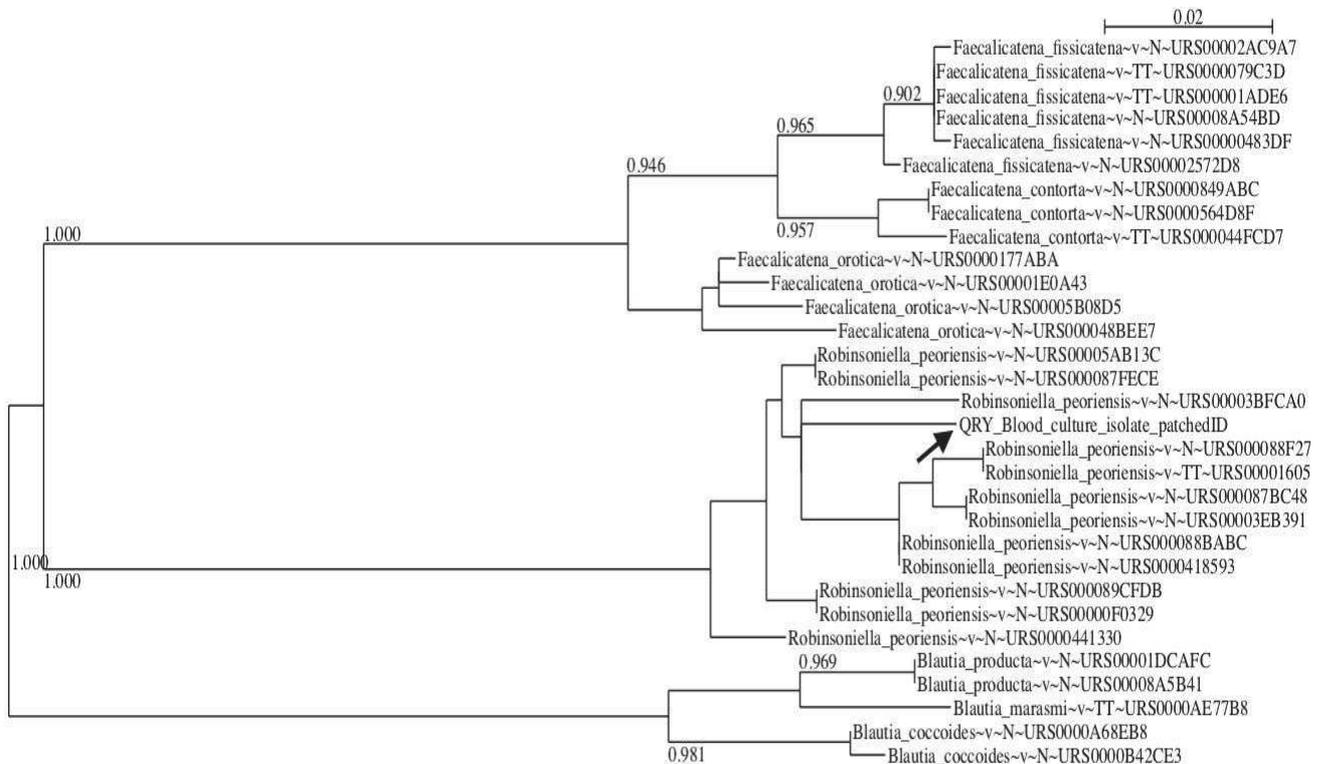


Figure 9 : Exemple d'arbre phylogénétique construit par leBIBI<sup>QBPP</sup>

Arbre non enraciné permettant d'identifier une souche de *Robinsoniella peoriensis* (flèche noire) isolée d'une hémoculture en utilisant l'analyse « Stringent » de l'ADN ribosomal 16S. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 0.9 sont affichées sur les branches (échantillon clinique du CHU de Strasbourg, 2018, capture d'écran)

## **2.7 La PCR 16S : réalisation pratique au CHU de Strasbourg**

### **2.7.1 La qualité du prélèvement**

Comme toute analyse en microbiologie, la qualité des prélèvements est fondamentale. La PCR 16S doit être réalisée sur des milieux habituellement stériles, comme sur des valves cardiaques, des biopsies osseuses, des ponctions articulaires, des ponctions lombaires ou autre prélèvement profond. La méthode de séquençage décrite plus tôt, de Sanger, ne permet pas d'interpréter des prélèvements polymicrobiens au-delà de 3 espèces bactériennes (mais reste optimale pour l'identification d'une seule espèce bactérienne).

L'asepsie lors du geste est comme toujours essentielle. En effet le risque d'amplifier une bactérie contaminante existe, comme pour la culture, et peut avoir des conséquences directes pour le patient.

La quantité de prélèvement nécessaire doit aussi être suffisante. Sans compter les analyses microbiologiques standards, il faut 100 à 200 µl pour l'analyse des liquides (selon la nécessité ou non d'ajout de tampon de lyse), et au moins 10 milligrammes pour les biopsies. La PCR 16S est rarement demandée lors du premier prélèvement, mais plutôt rajoutée lorsque la culture est négative, d'où l'importance d'un bon prélèvement initial. De plus, il peut s'avérer délétère pour le patient de répéter des prélèvements invasifs (ponction lombaire, ponction d'une articulation profonde, biopsie osseuse, etc...). À noter qu'on ne peut pas travailler sur les prélèvements manipulés dans les autres laboratoires. Par exemple, les tubes de LCS envoyés pour analyse biochimique et cytologique ne sont pas réutilisables pour la PCR 16S : ces laboratoires ne travaillent pas dans des conditions stériles, ils n'utilisent par exemple pas de pipette à emballage unique, et le risque de contamination est important. Les solutions possibles sont d'envoyer soit un prélèvement de bonne quantité en microbiologie, soit un deuxième tube qui sera conservé au laboratoire.

Il n'y a pas de conditionnement particulier pour cette analyse et il faut se référer aux recommandations du Guide des Examens de Laboratoire (GEL) sur Labonet pour les analyses de bactériologie standard.

Les échantillons doivent parvenir dans les meilleurs délais au laboratoire, et seront conservés au réfrigérateur. Si la demande de PCR 16S est faite après 72 heures de conservation, la stabilité de l'ADN n'est pas garantie avec risque de faux négatifs. Après extraction, les extraits d'ADN sont conservés à -20 degrés et le reste du prélèvement au congélateur à -80 degrés.

### **2.7.2 Le travail des techniciens de laboratoire**

Une fois arrivés au PTM (Plateau Technique de Microbiologie), les échantillons sont déballés, triés, et saisis dans le logiciel Glims utilisé au laboratoire, avec attribution d'un nouveau numéro d'identité.

Généralement les prélèvements sont dans un premier temps transmis pour l'analyse bactériologique standard avec, selon les cas, comptage cellulaire, examen direct au Gram, et ensemencement sur différents milieux pour la culture. Le matériel restant est alors conservé, puis transféré au service de biologie moléculaire une fois l'indication de PCR 16S (ou d'un autre type de PCR) retenue.

-La première étape, réalisée tous les jours à l'arrivée de l'échantillon en biologie moléculaire, est le conditionnement. Les liquides sont directement transférés dans des aliquotes après homogénéisation, et les fragments sont « prédigérés » manuellement au scalpel avant d'être déposés dans les aliquotes. Toutes les manipulations sont réalisées dans des conditions optimales pour limiter le risque de contamination, avec compartimentation des zones de travail, utilisation de matériel à usage unique, de gants, de surblouses et charlottes pour certaines étapes,

travail sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique), et contrôles réguliers de l'environnement.

-Chaque matin se déroule l'extraction de l'ADN des échantillons conditionnés la veille et de ceux conservés pendant le week-end. Cette étape est réalisée par l'automate MagNA Pure 96, Roche, et nécessite l'utilisation d'un kit d'extraction de l'ADN (MagNA Pure LC™ DNA Isolation Kit 96, Roche) (70). Les aliquotes contenant les échantillons sont d'abord remplis avec un tampon de lyse et 10 µl de protéinase K pour atteindre un volume de 200 µl nécessaire pour l'analyse. Ceci permet une première lyse des tissus (lyse de la paroi bactérienne, des cellules et des protéines extracellulaires, fluidification de la solution). Il existe des tampons de lyse spécifiques selon le type d'échantillon (Tissue Lysis Buffer, TLB pour les tissus et Bacterial Lysis Buffer, BLB pour les liquides). Pour la majorité des liquides, 100 µl de tampon sont ajoutés aux 100 µl d'échantillon, sauf pour les liquides pauci-cellulaires comme les humeurs aqueuses ou les LCS qui ne nécessitent pas de première lyse, ce qui explique les 200 µl nécessaires pour leur traitement en PCR 16S. Après avoir homogénéisé par vortex la solution obtenue, elle est insérée dans le ThermoMixer® confort (Eppendorf) pendant 30 minutes pour les tissus, 10 minutes pour les liquides à 65 degrés avec agitation de 30 secondes toutes les 3 minutes pour une lyse optimale. Les échantillons ainsi préparés sont disposés dans des alvéoles spécifiques pour l'étape d'extraction.

Le protocole d'extraction de l'ADN est automatisé et consiste en :

- Une deuxième digestion de l'échantillon avec adjonction d'un nouveau tampon de lyse et de la protéinase K ;
- La fixation de l'ADN sur les microparticules magnétiques en verre ;
- L'application d'un champ magnétique permettant de retirer la pipette contenant les microparticules avec l'ADN de l'aliquote ;

- Plusieurs étapes de lavage de l'aliquote pour évacuer les débris cellulaires et extracellulaires ;
- La séparation des microparticules et de l'ADN et le retrait du champ magnétique avec élution à haute température de l'ADN dans l'aliquote.

Cette phase dure 1 heure environ. On récupère ainsi l'ADN « global » à la fois procaryote, cible de l'analyse, et eucaryote, du patient, qui est conservé à - 20 degrés après nouvelle répartition dans des aliquotes en attendant la réalisation de la PCR en tant que tel qui est réalisée une fois par semaine le mardi matin. Ces différentes étapes sont schématisées dans la Figure 10.

On prépare d'abord le mix pour la PCR 16S. Celui-ci est composé du pré-mix qui comprend du TB Green (agent intercalant fluorescent permettant la révélation de l'amplification non spécifique de l'ADN en temps réel) et de l'ADN polymérase, auxquels sont ajoutées les amorces ciblant le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S et de l'eau stérile « PCR grade » testée « DNA free » (dépourvue d'ADN). Un deuxième mix est préparé pour chaque échantillon avec de l'ADN de *Legionella* à la place de l'eau qui permettra de détecter un éventuel effet inhibiteur lors de l'amplification (71).

Ensuite, on reprend tous les échantillons à analyser sous forme d'extrait d'ADN dans des aliquotes. La densité en ADN est alors mesurée par le NanoDrop® (Thermo Fischer) sur une microgoutte de l'échantillon. La concentration cible est de 30 ng/µl et ne doit pas dépasser les 50 ng/µl au vu du risque majoré d'effet inhibiteur. Si c'est le cas, des étapes supplémentaires de dilution avec de l'eau stérile « PCR grade » sont nécessaires. Deux mesures consécutives doivent être concordantes pour valider cette étape.

Les échantillons et les mix étant prêts, ils sont répartis dans des capillaires, avec pour chacun 5 µl de la solution d'ADN et 15 µl du mix. Chaque échantillon est déposé avec le mix standard, ce sont les solutions que l'on souhaite analyser. En parallèle, ces mêmes échantillons sont associés au mix comprenant l'ADN de *Legionella*, ces solutions serviront de contrôle de l'effet inhibiteur. Pour chaque série on ajoute un témoin positif et négatif de l'étape d'extraction,

l'échantillon est remplacé par une souche de *Legionella* pour le témoin positif et par du tampon de lyse pour le témoin négatif. Ces témoins subissent la même étape d'extraction par le MagNA. On réalise également une analyse comprenant un témoin positif et négatif de la réaction d'amplification, avec de l'ADN de *Legionella* et de l'eau stérile respectivement, n'ayant pas subi l'étape d'extraction.

Ces témoins permettent de contrôler à la fois l'étape d'extraction et d'amplification pour s'assurer de l'absence de contamination ou de souci technique lors de ces manipulations et de repérer à quelle étape l'anomalie a eu lieu. L'utilisation du mix comprenant l'ADN de *Legionella* avec les échantillons permet de rechercher la présence d'un effet inhibiteur qui apparaîtrait comme un faux négatif de la réaction d'amplification. En effet, on sait qu'avec notre PCR 16S cet ADN standardisé se positive à 33 cycles. Si le seuil de positivité est atteint plus tardivement, il faut suspecter un effet inhibiteur qui peut être par exemple secondaire à des interactions avec l'ADN eucaryote.

Tous les capillaires sont par la suite insérés dans le Light Cycler® 2.0 (Roche) (72). C'est cet appareil qui réalise la réaction de PCR en elle-même. On visualise en temps réel les courbes qui correspondent à l'intensité de la fluorescence, proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. La courbe reste plate pour les témoins négatifs, et se positive avec croissance exponentielle avant 40 cycles pour les positifs. Cette analyse dure 45 minutes. Les positifs sont, après deuxième lecture par le biologiste, envoyés pour séquençage.



Mix standard : TB Green, ADN polymérase, amorces **27F/16S1RRB**, eau « PCR grade »

Mix pour contrôle de l'effet inhibiteur : eau remplacée par de l'ADN de *Legionella*

NanoDrop® (Thermo Fischer)

Concentration d'ADN cible à 30 ng/μL, étapes de dilution si supérieure à 50 ng/μL

Deux mesures de suite concordantes nécessaires

\*extraits d'ADN des échantillons avec mix standards

\*extraits d'ADN des échantillons avec contrôle de l'effet inhibiteur

\*contrôle positif et négatif de l'extraction

\*contrôle positif et négatif de l'amplification

Automate Light Cycler® 2.0 (Roche), durée : 45 minutes

Envoi des positifs pour séquençage

Figure 10 : Les différentes étapes de la PCR 16S au laboratoire de microbiologie

### **2.7.3 Le séquençage et l'interprétation des résultats**

Les amplicons sont ensuite adressés à un prestataire de séquençage, GATC BIOTECH (Eurofin Genomics). Le séquençage par la méthode de Sanger est automatisé sur une plateforme ABI 3730 XL system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les réactifs comprenant les désoxyribonucléotides, les didésoxyribonucléotides avec fluorophores, l'ADN polymérase thermostable et le tampon de réaction sont apportés par le BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), auquel il faut ajouter des amorces spécifiques. Les résultats sont transmis au biologiste le lendemain soir, sous forme de chromatogrammes et celui-ci les interprète au courant de la semaine, à l'aide du logiciel leBIBI<sup>OBPP</sup> qui permet d'identifier la bactérie par analyse phylogénétique. En cas d'analyse positive et après avoir éliminé les contaminations évidentes de l'échantillon, le clinicien est informé du résultat par téléphone et le serveur de résultats est mis à jour.

### **2.7.4 Limites de l'utilisation de la PCR 16S au laboratoire de microbiologie**

Il s'agit tout d'abord du coût de cette analyse, plus élevé que les méthodes de diagnostic traditionnelles : 151.20 euros (code HN560) pour les valves cardiaques, 137.70 euros (code HN 510) pour les autres prélèvements. Par ailleurs, les analyses ne sont finalement réalisées que le mardi matin. En effet les différentes étapes sont coûteuses en termes de temps-technicien, et devant le relatif faible nombre de demande les prélèvements sont analysés en un temps, lors de la même série. Ceci explique qu'actuellement, si un prélèvement arrive au laboratoire à partir du mardi après-midi, il faudra attendre environ 10 jours pour les résultats en cas de positivité. Plus les manipulations se multiplient, plus le risque de contamination augmente (73), de même que le risque de mauvaise identification des échantillons. L'erreur humaine persiste malgré

toutes les précautions prises lors des manœuvres de pipetage et d'aliquotage. Il se développe actuellement des méthodes d'automatisation totale de l'extraction d'ADN, avec réalisation de toutes les étapes sur tubes primaires.

Compte tenu de ces limites mais aussi de la performance de cette technique diagnostique lors de diagnostics difficiles nous avons voulu évaluer l'impact clinique réel des PCR 16S effectuées et rendues entre 2014 et 2018 dans notre CHU.

## **3 Etude de l'impact clinique de la PCR 16S au CHU de Strasbourg**

Voir l'article original (Annexe 1).

### **3.1 Introduction**

Les infections bactériennes sont une cause importante de sepsis et de décès chez les patients hospitalisés (74), d'autant plus quand le diagnostic est retardé (75). De plus, la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un enjeu majeur de santé publique (76). Il est crucial d'améliorer nos prescriptions d'antibiotiques. La culture standard est fondamentale pour le diagnostic et le traitement des infections bactériennes. Elle permet d'obtenir une identification d'espèce en utilisant actuellement surtout la spectrométrie de masse « Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry » (MALDI-TOF MS), et d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques. Néanmoins, la culture standard a des limites, notamment en cas de bactéries non ou difficilement cultivables (64) et lorsque le prélèvement est réalisé après une antibiothérapie (77). Cette errance diagnostique conduit à des antibiothérapies probabilistes avec plusieurs inconvénients. En effet, une antibiothérapie à large spectre, à forte dose ou

prolongée est un facteur de risque de toxicité médicamenteuse (78), d'infection à *Clostridioides difficile* (79), d'infections fongiques (80), de sélection de bactéries multirésistantes (81) (Figure 11) et a un coût non négligeable pour l'hôpital. D'un autre côté, une antibiothérapie inadaptée au pathogène peut conduire à des complications, des sepsis, des décès et des hospitalisations prolongées. Des méthodes complémentaires sont nécessaires pour améliorer les performances du diagnostic microbiologique.

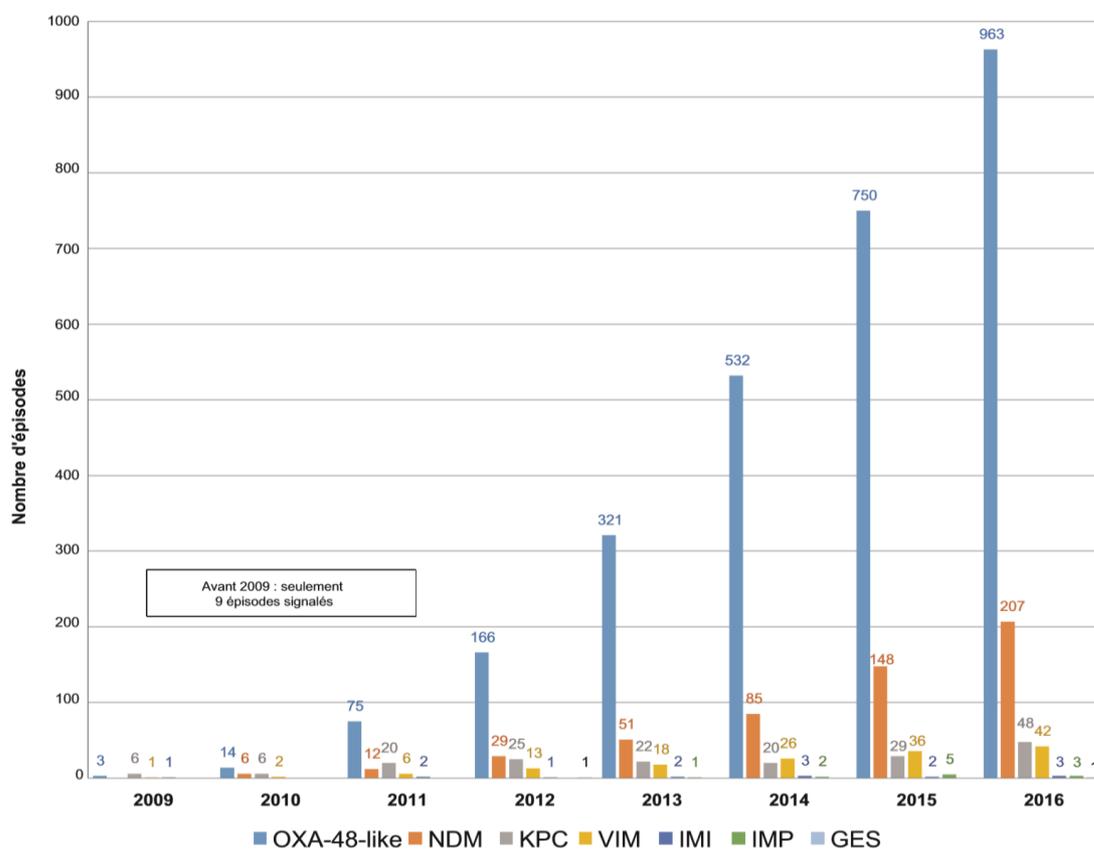


Figure 11 : Répartition des épisodes impliquant des EPC (Entérobactéries Productrices de Carbapénèmes) en France signalés entre 2009 et 2016, selon les mécanismes de résistance impliqués et l'année de signalement (N=3595). (<http://invs.santepubliquefrance.fr>)

La PCR de l'ADN ribosomal 16S, une PCR « pan-bactérienne », est une technique communément utilisée. Différentes amorces ciblant les régions conservées de l'ADN ribosomal 16S sont employées pour amplifier tout ou partie de ce gène par PCR. Une étape de séquençage permet ensuite de déterminer la séquence d'acides nucléiques du segment amplifié. La présence de régions variables sur ce gène, conservées au sein d'une même espèce, permet d'identifier la bactérie en utilisant des reconstructions phylogénétiques (4).

### 3.2 Revue de la littérature

Une revue de la littérature utilisant PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) en août 2018 a permis d'étudier 69 articles évaluant les performances diagnostiques de la PCR 16S. Les mots-clés utilisés pour les recherches étaient *16S PCR*, *16S DNA PCR*, *16S RNA PCR*, *endocarditis*, *cardiac valve*, *heart valve*, *meningitis*, *cerebrospinal fluid*, *pleurisy*, *pleural fluid*, *endophthalmitis*, *uveitis*, *aqueous humor*, *abscess*, *arthritis*, *synovial fluid*, *sonication fluid*, *osteitis*, *discitis*, *bone and joint infection*, *prosthetic joint infection*, *soft tissue* et *blood*. Parmi ces études, 22 évaluaient la technique sur des valves cardiaques, 14 sur des LCS, 11 sur des humeurs aqueuses, 3 sur des liquide pleuraux, 3 sur des abcès, 6 sur des prélèvements osseux et/ou articulaires, 3 sur des liquides de sonication, 3 sur des tissus mous, 1 méta-analyse récente évaluait 28 études sur la PCR 16S sur sang périphérique, et enfin 3 évaluaient la technique sur différents milieux.

Au final, 23 articles ont été retenus pour leur qualité méthodologique tout en conservant la diversité des tissus étudiés. Le Tableau 1 résume les caractéristiques de 7 études sur les valves cardiaques (13,22,82–86), 3 sur les LCS (15,87,88), 2 sur les humeurs aqueuses (17,89), 2 sur les liquides pleuraux (16,90), 2 sur les abcès (18,91), 2 sur des prélèvements osseux et/ou

articulaires (14,92), 2 sur des liquides de sonication de prothèse (93,94), 2 sur des tissus mous (95,96) et la méta-analyse sur de la PCR 16S sur sang périphérique (97).

Les valves cardiaques ont bénéficié d'un grand engouement autour de la PCR 16S. Ceci s'explique par la fréquence des endocardites à cultures négatives, la possible implication de bactéries difficilement ou non cultivables (*Tropheryma whipplei*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella spp*, *Brucella spp*, *Legionella spp*, *Mycoplasma spp*), le pronostic sombre en l'absence de traitement adéquat (98), et la nécessité d'un traitement de longue durée potentiellement toxique. Les Gold Standard utilisés pour le diagnostic d'endocardite dans les études analysées étaient principalement les critères de Duke modifiés (99), le résultat de la culture de valve, ou plus rarement l'analyse anatomopathologique de valve. Ces études de performance diagnostique bénéficiaient d'un important pool de contrôles négatifs bien définis, patients bénéficiant de remplacement valvulaire dans des indications autres qu'infectieuses. Ces différentes études retrouvaient une sensibilité de la PCR 16S de 41.2 à 96 %, supérieure à la culture de valve, sensiblement similaire à celle des hémocultures, avec une excellente spécificité.

Les liquides cérébro-spinaux ont également bénéficié de nombreuses évaluations, principalement du fait de l'urgence diagnostique et thérapeutique des méningites bactériennes et de la faible proportion de culture positive (100). Un des avantages de la PCR dans ce contexte est la rapidité du résultat quand les conditions techniques sont remplies au niveau du laboratoire. Le comparateur utilisé était également variable selon les études, parfois purement microbiologique et pouvant comprendre le résultat de l'examen direct, de la culture standard, de la recherche d'antigènes, ou encore biologique (analyse biochimique et cellularité du LCS), clinique, mais le plus souvent composite. La sensibilité de la PCR 16S variait entre 59 et 93 %, avec encore une très bonne spécificité.

| Auteur/année          | Pays         | Tissu étudié           | Vrai positif  | Primers  | Population  | Résultat                                       | Comparateur   |
|-----------------------|--------------|------------------------|---|--|---|--|---|
| Greub, 2005           | France       | Valve cardiaque        | Critères de Duke (certaine)                                     | 536f/1050r                                     | 127 valves, 118 contrôles   | Se 61% Spe 100%                                | Histologie Se 63% Spe 100%<br>Culture valve Se 13% Spe 98%                    |
| Breitkopf, 2005       | Allemagne    | Valve cardiaque        | Critères de Duke (possible+certaine)                            | 27f/907r(m)                                    | 52 valves, 16 contrôles   | Se 41,2% Spe 100%                              | Culture valve Se 7,8% Spe 93,8%<br>Examen direct valve Se 11,8% Spe 100%      |
| Marín, 2007           | Espagne      | Valve cardiaque        | Critères de Duke (certaine)                                     | PSLf/P13Pr                                     | 48 valves, 129 contrôles  | Se 96% Spe 95,3%                               | Hémoculture+ 91%<br>Culture valve Se 24,3% Spe 56,4%                          |
| Voldstedlund, 2008    | Danemark     | Valve cardiaque        | Critères de Duke (certaine)                                     | p2/p3 (Muyzer, 1993)                           | 74 valves, 16 contrôles   | Se 72% Spe 100%                                | Hémoculture+ 74%. PCR+ 14% hémocultures-<br>Culture valve Se 26% Spe 62%      |
| Vondracek, 2011       | Suède        | Valve cardiaque        | Critères de Duke (possible+certaine)                            | 16SU1f/16SU8r                                  | 57 valves, 61 contrôles   | Se 77% Spe 100%                                | Culture valve+ 23%, hémoculture+ 84%  |
| Harris, 2014          | Royaume-Uni  | Valve cardiaque        | Diagnostic clinique   | 16SFa/16SFb/16SR                               | 116 valves, 35 contrôles  | Se 67% Spe 91%                                 | PCR+ 62% des cultures-<br>Hémocultures Se 77,6% Spe 100%.                     |
| Miller, 2016          | Canada       | Valve cardiaque        | Critères de Duke (possible+certaine)                            | 16SDPOf/16SDPOr                                | 58 valves, 10 contrôles   | Se 92% Spe 77,8%                               | PCR+ 54% hémocultures-<br>Culture valve Se 46% Spe 100% (Gram 26%/100%)       |
| Schuurmann, 2004      | Pays-bas     | LCS                    | Culture positive  | 27f/1492r                                      | 37 LCS, 190 contrôles   | Se 86% Spe 97%                                 | Exclusion de 9 faux positifs de la culture pour calculer Se<br>Se culture 43% |
| Welinder-Olsson, 2007 | Suède        | LCS                    | Clinique ou microbiologique                                     | SSU1/806R                                      | 74 LCS, 271 contrôles   | Se 59% Spe 97%                                 | Antibiothérapie préalable:<br>Se 79% PCR, 45% culture                         |
| Rafi, 2010            | Inde         | LCS                    | Microbiologique (examen direct, culture, sérologie)             | u3'/ru8 (Radstrom, 1994)                       | 39 LCS, 63 contrôles  | Se 93% Spe 98%                                 | Gram+ 30 cas, culture+ 15 cas, Ag+ 27 cas                                     |
| Sugita, 2011          | Japon        | Humeur aqueuse         | Diagnostic clinique   | FD1/rp2  | 19 endophtalmies, 50 contrôles                                    | Se 95% Spe 94%                                 | Culture Se 53% Spe 100%<br>Gram Se 47%  |
| Joseph, 2012          | Inde         | Humeur aqueuse         | Clinico-échographique   | RW01/DG74/6FAM                                 | 64 endophtalmies, 50 contrôles                                    | Se 66% Spe 100%                                | Culture Se 34% Spe 100%   |
| Maskell, 2006         | Royaume-Uni  | Liquide pleural        | Clinique et aspect purulent, Gram, culture, pH<7,2              | LPW57/LPW205                                   | 434 pleurésies, 20 contrôles                                      | 16% cas PCR+/culture-                          | Gram ou culture + 58% cas   |
| Insa, 2012            | Espagne      | Liquide pleural        | Aspect purulent, critères de Light culture, histologie pleurale | E8f/E533r                                      | 82 pleurésies, 453 contrôles                                      | Se 81,7% Spe 99,1%                             | Culture Se 54,9% Spe 97,4%<br>Gram Se 24,4% Spe 99,5%                         |
| Song, 2014            | Corée du Sud | Abcès profond          | Radio-clinique  | 27F/518R, pyrosequencage                       | 20 abcès hépatiques   | PCR+ 90%                                       | Se hémoculture 20%, culture 45%   |
| Kommedal, 2014        | Norvège      | Abcès profond          | Diagnostic clinique   | 16SDPOf/16SDPOr<br>Séquencage massif parallèle | 52 abcès cérébraux  | Triple les bactéries identifiées               | NA  |
| Fenollar, 2006        | France       | Ostéo-articulaire      | Culture, PCR ciblées  | 536F/rp2                                       | 255 biopsies osseuses,<br>270 liquides articulaires<br>121+, 424- | Se 92,5% Spe 95,7%                             | Culture Se 86,7% Spe 89%  |
| Sheikh, 2017          | Iran         | Spondylodiscite        | Clinique, syndrome inflammatoire, IRM                           | pA/pl (Rogall, 1990)                           | 57 biopsies à culture négative                                    | PCR+ 37% cas                                   | Gram+ 16% cas   |
| Gomez, 2012           | Etats-Unis   | Sonication de prothèse | Liquide purulent, fistule, anatomopathologique                  | V3-V4 (Gomez, 2012)                            | 135 infections de prothèse,<br>231 contrôles                      | Se 70,4% Spe 97,8%                             | Culture Se 72,6% Spe 98,3%  |
| Bereza, 2016          | Pologne      | Sonication de prothèse | Clinico-bio-radiologique  | 27f/1387r (Dempsey, 2007)                      | 13 cas  | PCR+ 92% des cultures-                         | Culture+ 62% cas  |
| Johnson, 2012         | Etats-Unis   | Tissu mou              | Diagnostic clinique   | NR   | 32 aspirations de cellulite                                       | PCR+ 28% cas                                   | Hémoculture+ 7,4% (2/27)<br>et culture+ 33,3% (3/9)                           |
| Rudkjøbing, 2016      | Danemark     | Tissu mou              | Diagnostic clinique   | 500 premières bases<br>Pyrosequencage          | 20 échantillons de débridement<br>de cellulite nécrotique         | PCR+ 90% cas,<br>plus de bactéries identifiées | Culture+ 70% cas  |
| Su, 2015              | Chine        | Sang                   | Hémoculture   | Variable (méta-analyse)                        | 28 études   | Se 87% Spe 94%                                 | NA  |

Tableau 1 : Revue de la littérature des performances diagnostiques de la PCR 16S sur différents types d'échantillons

Les études évaluant la PCR 16S sur les humeurs aqueuses, motivées par le pronostic fonctionnel des endophtalmies (101), objectivaient une meilleure sensibilité que la culture, évaluée entre 66 et 95 %, avec une très bonne spécificité. Le Gold Standard utilisé pour le diagnostic positif était le plus souvent clinique ou clinico-échographique.

L'analyse des performances diagnostiques de la PCR 16S dans les pleurésies retrouvaient également une sensibilité de 81,7 %, supérieure à la culture, avec une spécificité de 99,1 %. La PCR était comparée à des critères composites cliniques, macroscopiques, biologiques et microbiologiques.

Concernant les abcès, il n'existe pas de contrôle négatif pour évaluer les performances diagnostiques intrinsèques de la PCR 16S. Plusieurs études ont cependant démontré son intérêt dans cette situation avec un diagnostic microbiologique positif malgré des cultures négatives mais aussi avec l'identification d'un nombre plus important de pathogènes qu'avec les méthodes standards. Ces études bénéficiaient des méthodes de séquençage de nouvelle génération permettant l'analyse d'échantillons polymicrobiens.

Les biopsies osseuses et les liquides articulaires sont fréquemment analysés conjointement dans la littérature. Les vrais positifs étaient définis par des critères microbiologiques comprenant les résultats de la culture standard et des PCR spécifiques, ou des critères mixtes clinico-bio-radiographique, comme pour les biopsies vertébrales en cas de spondylodiscite. La sensibilité et la spécificité de la PCR 16S dans cette indication semblaient très bonnes, respectivement à 92,5 et 95,7 %, meilleures que pour la culture standard.

Concernant les liquides de sonication de prothèse, les vrais positifs peuvent être difficiles à différencier des contaminations, les infections sur prothèse articulaire pouvant être de diagnostic difficile (102). Certaines études ont néanmoins réussi à calculer les sensibilité et

spécificité de la PCR 16 sur ces types de prélèvements. Les infections de prothèse étaient définies par la présence d'une fistule, d'un liquide articulaire ou périarticulaire purulent, ou une analyse histopathologique des tissus péri prothétiques montrant une réaction inflammatoire. Les performances de la PCR 16S étaient similaires à celles de la culture standard avec une sensibilité de 70,4% et une spécificité de 97,8%. D'autres études rapportaient la bonne rentabilité diagnostique de cet examen en cas de culture négative.

Les performances de la PCR 16S sur sang périphérique sont rapportées par une méta-analyse incluant 28 études. Une grande partie des études s'intéressait aux bactériémies néonatales. La PCR 16S était plus fréquemment positive que les hémocultures, et, comparée au résultat des hémocultures, sa sensibilité était de 87 % avec une spécificité de 94 %. Concernant les adultes uniquement, les performances de la PCR 16S étaient moins bonnes, avec une sensibilité et une spécificité respectivement de 79 et 77 %. Fournier et col. décrivaient une sensibilité plus faible de la PCR 16S sur sang total par rapport à la PCR 16S sur valve cardiaque pour le diagnostic d'endocardite infectieuse (13,6 % contre 66,1 %) (103).

Les résultats sont difficilement comparables d'une étude à l'autre. D'une part les amorces choisies sont variables, ce qui modifie les performances du test, et il n'existe pas de Gold Standard idéal comme comparateur. Les vrais positifs et faux négatifs sont généralement définis selon les résultats de la culture standard ou selon le diagnostic final du clinicien. Ces comparateurs sont pourtant imparfaits. En effet, un des objectifs de la PCR est d'être positive quand la culture est négative, situation où le résultat de la PCR peut être interprété comme un faux positif. De même, le jugement du clinicien n'étant pas indépendant du résultat de la PCR, celui-ci introduit un biais dans la mesure de sensibilité et spécificité.

### **3.3 Problématique**

Même si les performances diagnostiques de la PCR 16S semblent séduisantes, l'impact clinique de cette technique n'a été que peu évalué.

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'impact d'une PCR 16S positive sur la prise en charge des patients sur différents types de prélèvement.

Les objectifs secondaires étaient d'analyser l'intérêt diagnostique de notre PCR 16S, l'effet d'une antibiothérapie préalable et la gestion de résultats discordants avec la culture standard.

### **3.4 Matériel et méthodes**

#### **3.4.1 Design de l'étude et considérations éthiques**

Il s'agit d'une étude monocentrique rétrospective. Nous avons inclus les patients ayant bénéficié d'une PCR 16S au laboratoire des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) de 2014 à 2018, à l'exclusion de ceux ayant exprimé leur opposition à participer à l'étude, ou aux enfants pour lesquels les parents auraient refusé la participation à l'étude, et les patients pour lesquels les données médicales étaient incomplètes.

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital de Strasbourg (référence FC/dossier 2019-27), et inscrite sur *ClinicalTrials.gov* (NCT03915275). Cette étude a été menée en accord avec les règles de bioéthique Françaises (loi Jardé, 2016-800).

#### **3.4.2 Recueil de données**

Les résultats des PCR 16S dans les différents types de prélèvement étaient rétrospectivement recueillis ainsi que d'autres données microbiologiques et cliniques pour les PCR positives en utilisant les logiciels Glims (résultats microbiologiques) et DxCare (dossiers cliniques). Les

données collectées comprenaient les résultats des hémocultures, l'examen direct du prélèvement, la culture de l'échantillon, la ou les bactérie(s) identifiée(s), la présence d'une antibiothérapie préalable, l'impact clinique du résultat de la PCR 16S et le diagnostic final du clinicien. Quand la PCR 16S était réalisée sur différents fragments d'un même prélèvement, seul un résultat était inclus dans l'étude. Le résultat était considéré comme positif si au moins un des échantillons était positif. Quand la PCR 16S était négative sur tous les échantillons analysés seul un résultat négatif était retenu. Si plusieurs bactéries étaient identifiées par la PCR 16S sur un même prélèvement et que plus d'une bactérie modifiait la prise en charge du patient, seul un résultat était pris en compte pour le critère de jugement principal.

L'impact clinique du résultat de la PCR 16S était défini suivant trois groupes. Le groupe « rationalisation » du traitement correspondant à une antibiothérapie à spectre plus étroit, à posologie plus faible ou à durée plus courte (groupe R, « rationing »). Le groupe « antibiothérapie élargie » correspondant à un élargissement du spectre, une augmentation de la posologie ou de la durée de l'antibiothérapie (groupe E, « extended antibiotic therapy »). Finalement, le groupe « intervention » dans lequel le résultat de la PCR 16S induisait une prise en charge chirurgicale ou interventionnelle (groupe I, « intervention »). Les PCR 16S négatives étaient considérées comme n'ayant pas d'impact clinique. Une antibiothérapie préalable était prise en compte si elle avait été administrée pendant plus de 24 heures et si la bactérie identifiée était comprise dans son spectre d'activité.

### **3.4.3 Analyse des échantillons**

Les flacons d'hémocultures étaient incubés (BD BACTEC™ FX, Becton Dickinson) pendant 5 jours, 10 jours en cas de suspicion d'endocardite.

Les valves cardiaques, prélèvements osseux et les abcès étaient disséqués dans un mortier stérile contenant 3 mL de bouillon cœur-cerveille BD BBL™ Brain heart infusion (Becton Dickinson). Notre protocole de sonication de prothèse a déjà été décrit (104). Les prothèses articulaires étaient transférées stérilement sous PSM dans des boîtes de sonication stériles. Du sérum physiologique stérile était ajouté de façon à immerger à mi-hauteur la prothèse. La boîte était ensuite fermée et agitée manuellement pendant 30 secondes, puis mise dans un bain de sonication (BactoSonic®, Bandelin). La sonication se déroulait pendant 1 minute à 100 % de puissance. Après une nouvelle agitation manuelle de quelques secondes, le liquide obtenu était ensemencé dans le flacon pédiatrique, et transféré dans des tubes stériles (10 ml par tube). Ces derniers étaient centrifugés pendant 10 minutes à 5000 tours par minute. Le culot était récupéré et trois gouttes étaient ensemencées au râteau pour chaque gélose.

Après examen direct à la coloration de Gram, les échantillons étaient ensemencés dans des milieux de culture standards. Les liquides pleuraux, abcès, valves cardiaques, liquides articulaires, prélèvements osseux et liquides de sonication étaient ensemencés sur des géloses Columbia avec 5 % de sang de mouton (Biomérieux), des géloses chocolat PolyViteX (Biomérieux), des géloses lactosées de Drigalski (Becton Dickinson) et des géloses Schaedler avec 5 % de sang de mouton (Biomérieux). Les liquides articulaires, prélèvements osseux et liquides de sonication étaient également ensemencés dans des flacons BD BACTEC™ Peds Plus™ (105) avec 2 ml de Fructooligosaccharides (FOS™) alors que les liquides pleuraux, abcès et valves cardiaques étaient ensemencés dans des bouillons cœur-cerveille BD BBL™ Brain heart infusion (Becton Dickinson). Des bouillons au Thioglycolate avec Résazurine (Biomérieux) étaient également utilisés pour les abcès, valves cardiaques et liquides de sonication. Les liquides cérébro-spinaux étaient ensemencés sur des géloses chocolat PolyViteX (Biomérieux), dans des bouillons cœur-cerveille BD BBL™ Brain heart infusion (Becton Dickinson), et en complément dans des flacons BD BACTEC™ Peds Plus™ avec 2

ml de Fructooligosaccharides (FOS<sup>TM</sup>) quand une infection bactérienne était suspectée, et sur des géloses Schaedler avec 5 % de sang de mouton (Biomérieux) avec bouillon au Thioglycolate avec Résazurine (Biomérieux) en contexte neurochirurgical. Les humeurs aqueuses étaient ensemencées sur des géloses chocolat PolyViteX (Biomérieux), des bouillons au Thioglycolate avec Résazurine (Biomérieux), des géloses Sabouraud Chloramphénicol et dans des flacons BD BACTEC<sup>TM</sup> Peds Plus<sup>TM</sup> avec 2 ml de Fructooligosaccharides (FOS<sup>TM</sup>). Les géloses étaient incubées à 35 °C, sous une atmosphère comprenant 5 % de CO<sub>2</sub> pour les géloses chocolat PolyViteX (Biomérieux). Les bactéries étaient habituellement identifiées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) (11), en utilisant le Microflex LT couplé à l'algorithme MALDI Biotyper (Bruker) comme décrit précédemment (106).

#### **3.4.4 Protocole de PCR 16S**

La PCR ADNr 16S était réalisée à la demande du clinicien ou sur l'initiative du biologiste quand une infection bactérienne était suspectée sur un site habituellement stérile. Elle était faite à titre systématique sur les valves cardiaques en cas de suspicion d'endocardite avec culture de valve négative. Notre méthodologie a été précédemment décrite (chapitre 2.5) (42). L'ADN purifié était obtenu en utilisant le MagNA Pure (Roche) après prédigestion enzymatique par des tampons de lyse. Ensuite, les extraits d'ADN étaient dilués si nécessaire avec de l'eau PCR grade pour obtenir une concentration en ADN de 30 ng/μl mesurée par le NanoDrop<sup>®</sup> (Thermo Fischer). Notre PCR en temps réel avec révélation par agent intercalant était réalisée sur le LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Roche) en utilisant les amorces 27F/16S1RRB et le TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II. De l'ADN purifié de *Legionella* était utilisé pour mettre en évidence un éventuel effet inhibiteur de l'échantillon sur la réaction de PCR. Le séquençage était réalisé par la méthode de Sanger par un prestataire, GATC BIOTECH (Eurofin Genomics), sur un ABI 3730 XL

system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en utilisant le BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) pour la réaction.

Les résultats étaient analysés par un microbiologiste en utilisant l'outil informatique en ligne leBIBI<sup>QBPP</sup> (58) pour comparer les séquences obtenues avec la base de données de GenBank<sup>®</sup> permettant la construction d'arbres phylogénétiques. Les résultats étaient immédiatement transmis au clinicien.

### **3.4.5 Analyses statistiques**

Les variables qualitatives étaient présentées sous forme d'effectifs et de proportions de chaque modalité, puis ont été comparées en utilisant le test exact de Fisher. En cas de comparaisons multiples significatives, des tests *post-hoc* deux à deux ont été réalisés en appliquant une correction de Holm afin de contrôler l'inflation du risque alpha. Une p-valeur <0,05 a été considérée comme statistiquement significative. Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.5.1. R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL, <https://www.R-project.org/>.

## 3.5 Résultats

### 3.5.1 La population

Nous avons réalisé 835 PCR 16S dans notre laboratoire de 2014 à 2018. Nous avons exclu 23 analyses car le type de prélèvement n'était pas clairement identifié. Parmi ces 812 PCR 16S retenues, 197 étaient positives. Encore 6 patients ont été exclus en raison de données médicales incomplètes, et 191 PCR 16S positives étaient finalement retenues pour l'analyse sur 806. Les caractéristiques microbiologiques de notre population précisant le résultat de l'examen direct,

| Culture de l'échantillon |                       | +         | +         | -         | -          | ND          |            |
|--------------------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|------------|
| Examen direct            |                       | +         | -         | +         | -          | ND          | Total      |
| PCR 16S                  |                       | +         | +         | +         | +          | -           |            |
| Echantillons             | Valve cardiaque       | 7         | 7         | 19        | 47         | 93          | <b>173</b> |
|                          | Abcès                 | 2         | 8         | 2         | 17         | 42          | <b>71</b>  |
|                          | Prélèvement osseux    | 2         | 4         | 0         | 8          | 66          | <b>80</b>  |
|                          | Tissu mou             | 3         | 2         | 0         | 6          | 56          | <b>67*</b> |
|                          | Liquide articulaire   | 2         | 9         | 2         | 11         | 154         | <b>178</b> |
|                          | LCS                   | 2         | 1         | 5         | 5          | 106         | <b>119</b> |
|                          | Liquide pleural       | 1         | 0         | 1         | 3          | 22          | <b>27</b>  |
|                          | Liquide de sonication | 1         | 6         | 2         | 1          | 8           | <b>18</b>  |
|                          | Humeur aqueuse        | 0         | 2         | 1         | 2          | 52          | <b>57</b>  |
| Autre                    | 0                     | 0         | 0         | 0         | 16         | <b>16**</b> |            |
| <b>Total</b>             |                       | <b>20</b> | <b>39</b> | <b>32</b> | <b>100</b> | <b>615</b>  | <b>806</b> |

Tableau 2 : Caractéristiques microbiologiques de la population

ND : Non Disponible

\*23 biopsies cérébrales, 15 biopsies synoviales, 13 biopsies ganglionnaires, 4 biopsies cutanées, 3 biopsies médullaires, 2 biopsies vasculaires, 1 biopsie vésicale, œsophagienne, hépatique, musculaire, sous-cutanée, péricardique et ventriculaire

\*\*12 prélèvements sanguins, 2 liquides péricardiques, 1 liquide d'ascite et 1 liquide de dialysat péritonéal

de la culture de l'échantillon et de la PCR 16S en regard des différents types de prélèvements sont présentées dans le Tableau 2.

Les types de prélèvement les plus représentés étaient les liquides articulaires (178 analyses), et les valves cardiaques (173), puis les LCS (119), les prélèvements osseux (80), les abcès (71), les tissus mous (67), et les humeurs aqueuses (57). Les liquides pleuraux (27), les liquides de sonication de prothèse (18) et les autres types de prélèvements (16) étaient moins fréquents.

La PCR 16S était positive pour 10/18 (56 %) liquides de sonication, 80/173 (46 %) valves cardiaques, 29/71 (41 %) abcès, 5/27 (19 %) liquides pleuraux, 14/80 (18 %) prélèvements osseux, 11/67 (16 %) prélèvements de tissus mous, 24/178 (13 %) liquides articulaires, 13/119 (11 %) liquides cérébro-spinaux, et 5/57 (9 %) humeurs aqueuses.

### **3.5.2 L'impact clinique général**

Quand la PCR 16S était positive, son résultat avait un impact clinique pour 62/191 patients (32 %). Elle permettait pour 31/62 (50 %) des patients une « rationalisation » du traitement, pour 24/62 (39 %) des patients une « antibiothérapie élargie » et pour 7/62 (11 %) patients une « intervention ». En considérant toutes les PCR 16S réalisées, cet impact clinique était évalué à 8% (62/806).

### **3.5.3 L'impact clinique selon le type de prélèvement**

Au regard de toutes les PCR 16S réalisées, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les différents types des prélèvements sur la prise en charge des patients ( $p=0.078$ ), Tableau 3.

| Type de prélèvement   | PCR 16S | Impact clinique | Impact clinique (%) | p-value |
|-----------------------|---------|-----------------|---------------------|---------|
| Valve cardiaque       | 173     | 13              | 8%                  | 0.078   |
| Abcès                 | 91      | 13              | 14%                 |         |
| Prélèvement osseux    | 80      | 6               | 8%                  |         |
| Tissu mou             | 67      | 2               | 3%                  |         |
| Liquide articulaire   | 178     | 11              | 6%                  |         |
| LCS                   | 119     | 8               | 7%                  |         |
| Liquide pleural       | 27      | 3               | 11%                 |         |
| Liquide de sonication | 18      | 4               | 22%                 |         |
| Humeur aqueuse        | 57      | 2               | 4%                  |         |
| Autre                 | 16      | 0               | 0%                  |         |
| Total                 | 806     | 62              | 8%                  |         |

Tableau 3 : Rentabilité de la PCR 16S selon le type de prélèvement

Test exact de Fisher pour comparaison de proportions multiples,  $p=0.078$

Néanmoins, cet examen semblait plus utile sur les liquides de sonication de prothèse, avec un impact clinique de 22 % (4/18), mais la taille de l'échantillon était faible. Les abcès étaient plus représentés, et la PCR 16S semblait là aussi être plus intéressante, avec un impact clinique de 14 % (13/91). Au contraire, la PCR 16S semblait moins rentable sur les tissus mous et les humeurs aqueuses, avec un impact clinique respectivement de 3 % (2/67) et 4 % (2/57). Sur les liquides pleuraux, les valves cardiaques, les prélèvements osseux, les LCS et les liquides articulaires, l'intérêt de la PCR 16S était intermédiaire, de 11 % à 6 %. Nous n'avons pas mis en évidence d'impact clinique pour les autres types de prélèvements, toutes les PCR 16S étant négatives et considérées comme sans effet dans le cadre de notre hypothèse de travail.

En revanche, en ne considérant que les PCR positives, l'impact sur la prise en charge des patients varie de façon statistiquement significative selon le type de prélèvement, avec un  $p=0.002$  en comparaison multiple, Tableau 4.

| Type de prélèvement    | PCR 16S positive | Impact clinique | Impact clinique (%) | p-value      |
|------------------------|------------------|-----------------|---------------------|--------------|
| <b>Valve cardiaque</b> | <b>80</b>        | <b>13</b>       | <b>16%</b>          |              |
| Abcès                  | 29               | 13              | 45%                 |              |
| Prélèvement osseux     | 14               | 6               | 43%                 |              |
| Tissu mou              | 10               | 2               | 20%                 |              |
| Liquide articulaire    | 25               | 11              | 44%                 | <i>0.002</i> |
| <b>LCS</b>             | <b>13</b>        | <b>8</b>        | <b>62%</b>          |              |
| Liquide pleural        | 5                | 3               | 60%                 |              |
| Liquide de sonication  | 10               | 4               | 40%                 |              |
| Humeur aqueuse         | 5                | 2               | 40%                 |              |
| Total                  | 191              | 62              | 32%                 | -            |

Tableau 4 : Impact clinique d'une PCR 16S positive selon le type d'échantillon

Test exact de Fisher pour comparaison de proportions multiples,  $p=0.002$

Les éléments en gras diffèrent de façon statistiquement significative après comparaison deux à deux avec correction de Holm,  $p=0.044$

Les tests deux à deux corrigés ont permis de mettre en évidence qu'une PCR 16S positive sur un LCS était plus à même de changer la prise en charge du patient qu'une PCR 16S positive sur valve cardiaque ( $p=0.044$ ).

### 3.5.4 Cas particulier des endocardites

Parmi les 80 PCR 16S positives sur valve cardiaque, le pathogène responsable était déjà identifié par les hémocultures dans 50 cas. Dans 28 cas, ces hémocultures étaient réalisées dans un hôpital périphérique, avant le transfert du patient. Le résultat de la PCR 16S n'a eu un impact sur la prise en charge des patients dans aucun de ces 50 cas. Les bactéries identifiées par ces

hémocultures étaient compatibles avec une endocardite : 1 *Aggregatibacter aphrophilus*, 5 *Enterococcus faecalis*, 1 *Gemella haemolysans*, 4 *Granulicatella spp*, 1 *Cutibacterium acnes*, 8 *Staphylococcus aureus*, 2 staphylocoques à coagulase négative, 2 *Staphylococcus lugdunensis* et 26 *Streptococcus spp*.

Sans prendre en compte ces examens pour lesquels le diagnostic microbiologique de l'endocardite était déjà connu, l'impact clinique d'une PCR 16S positive sur valve cardiaque aurait été de 43% (13/30). Ce résultat témoigne du peu d'intérêt de la PCR 16S sur valve cardiaque en cas de bactérie compatible avec une endocardite déjà mise en évidence par les hémocultures.

### 3.5.5 Les bactéries identifiées

A partir des 191 échantillons, 203 bactéries étaient identifiées par notre PCR 16S. Elles sont résumées dans le Tableau 5 et détaillées ci-après.

| Type de bactérie       | Identifiée par PCR 16S | Impact clinique | Impact clinique (%) |
|------------------------|------------------------|-----------------|---------------------|
| Gram + commune         | 125                    | 29              | 23%                 |
| Gram - commune         | 18                     | 8               | 44%                 |
| Anaérobie              | 39                     | 16              | 41%                 |
| Difficile à identifier | 21                     | 12              | 57%                 |
| Total                  | 203                    | 65              | 32%                 |

Tableau 5 : Impact clinique d'une PCR 16S positive selon le type de bactérie

Les bactéries communes à Gram positif étaient largement représentées (125/203, 62 %), venaient ensuite les anaérobies (39/203, 19 %), les bactéries fragiles, à culture fastidieuse ou impossible (21/203, 10 %), puis les bactéries communes à Gram négatif (18/203, 9 %). Les 203 bactéries identifiées par PCR 16S sont détaillées dans l'Annexe 2.

La PCR 16S permettait d'identifier la bactérie au rang d'espèce dans 189/203 cas, soit 93 %. Sur ces 203 bactéries identifiées par PCR 16S, 65 ont eu un impact sur la prise en charge des patients. L'impact clinique paraissait plus important quand la PCR 16S identifiait des bactéries fragiles, à culture fastidieuse ou impossible (57 %), que quand elle mettait en évidence des bactéries communes à Gram négatif (44 %), des anaérobies (41 %) ou des bactéries communes à Gram positif (23 %).

### **3.5.6 Impact clinique de la PCR 16S en cas de culture négative**

L'impact clinique d'une PCR 16S positive était significativement plus important quand les hémocultures étaient négatives (52/107, 49 %) que lorsqu'au moins une hémoculture était positive (10/84, 12 %) ( $p < 0.001$ ).

Quand simultanément les hémocultures et la culture du prélèvement étaient négatives, le résultat d'une PCR 16S positive modifiait la prise en charge du patient dans 44/64 cas (69 %), versus 18/127 cas (14 %) quand au moins une bactérie était mise en évidence ( $p < 0.001$ ).

### **3.5.7 Impact d'une antibiothérapie préalable**

Chez les patients bénéficiant d'une antibiothérapie efficace antérieure au prélèvement, une PCR 16S positive avait une meilleure contribution diagnostic. En effet, la culture de l'échantillon était plus fréquemment négative dans ce groupe (92/118, 78 %) qu'en l'absence d'antibiothérapie (40/73, 55 %) ( $p < 0.001$ ).

La prise en charge des patients avec antibiothérapie préalable était modifiée dans 33/118 cas (28 %) par le résultat d'une PCR 16S positive.

### 3.5.8 Gestion des résultats discordants

La Figure 12 schématise l'intérêt d'une PCR 16S positive en cas de résultat discordant avec la culture de l'échantillon.

Parmi les 191 PCR 16S positives, la culture de l'échantillon identifiait une bactérie dans 59 cas. Ce résultat était discordant avec celui de la PCR 16S dans 22 cas (37 %). Dans 1 cas la PCR 16S identifiait une bactérie supplémentaire prise en compte, et dans 6 cas la culture de l'échantillon mettait en évidence une bactérie supplémentaire considérée par les cliniciens. Dans 1 cas pour la PCR 16S et 2 cas pour la culture, une bactérie supplémentaire était identifiée mais considérée comme une contamination. Dans 1 cas la culture permettait le diagnostic d'une bactérie additionnelle prise en compte mais la PCR 16S identifiait le premier pathogène de façon plus précise avec un impact sur le traitement. Dans les 11 cas restants, les bactéries identifiées étaient différentes. Le résultat de la PCR 16S était dans 4 cas considéré comme une contamination et dans 4 cas c'était le résultat de la culture qui était considéré comme une contamination. Dans 2 cas, chaque bactérie mise en évidence était retenue comme responsable de l'infection. Pour 1 patient les deux bactéries identifiées étaient extrêmement proches.

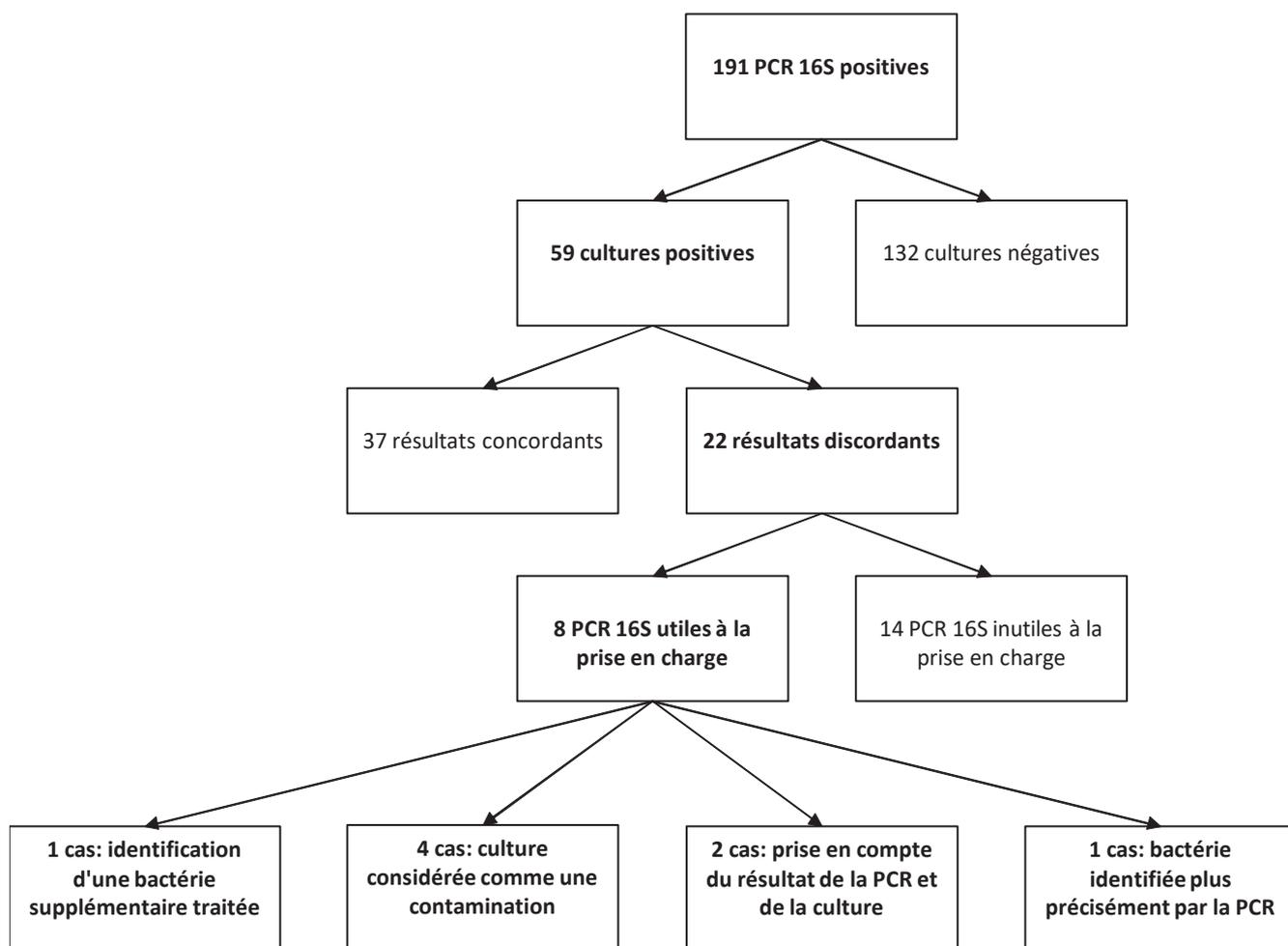


Figure 12 : Gestion des résultats discordants entre PCR 16S et culture de l'échantillon

La Figure 13 schématise l'intérêt d'une PCR 16S positive en cas de résultat discordant avec les hémocultures.

Parmi les 191 PCR 16S positives, au moins une hémoculture était positive dans 84 cas. Ce résultat était discordant avec celui de la PCR 16S dans 16 (19 %) cas. Dans 1 cas la PCR 16S identifiait une bactérie supplémentaire prise en compte, et dans 1 cas les hémocultures mettaient en évidence une bactérie supplémentaire considérée par les cliniciens. Dans 2 cas les hémocultures identifiaient une bactérie additionnelle qui était considérée comme une contamination. Dans les 12 cas restants, les bactéries identifiées étaient différentes. Le résultat

de la PCR 16S était dans 4 cas considéré comme une contamination et dans 3 cas c'était le résultat des hémocultures qui était considéré comme une contamination. Dans 1 cas, chaque bactérie trouvée était retenue comme responsable de l'infection. Dans 2 cas la PCR 16S pouvait identifier plus précisément l'espèce, avec un impact sur l'antibiothérapie. Pour 2 patients les deux bactéries identifiées étaient extrêmement proches.

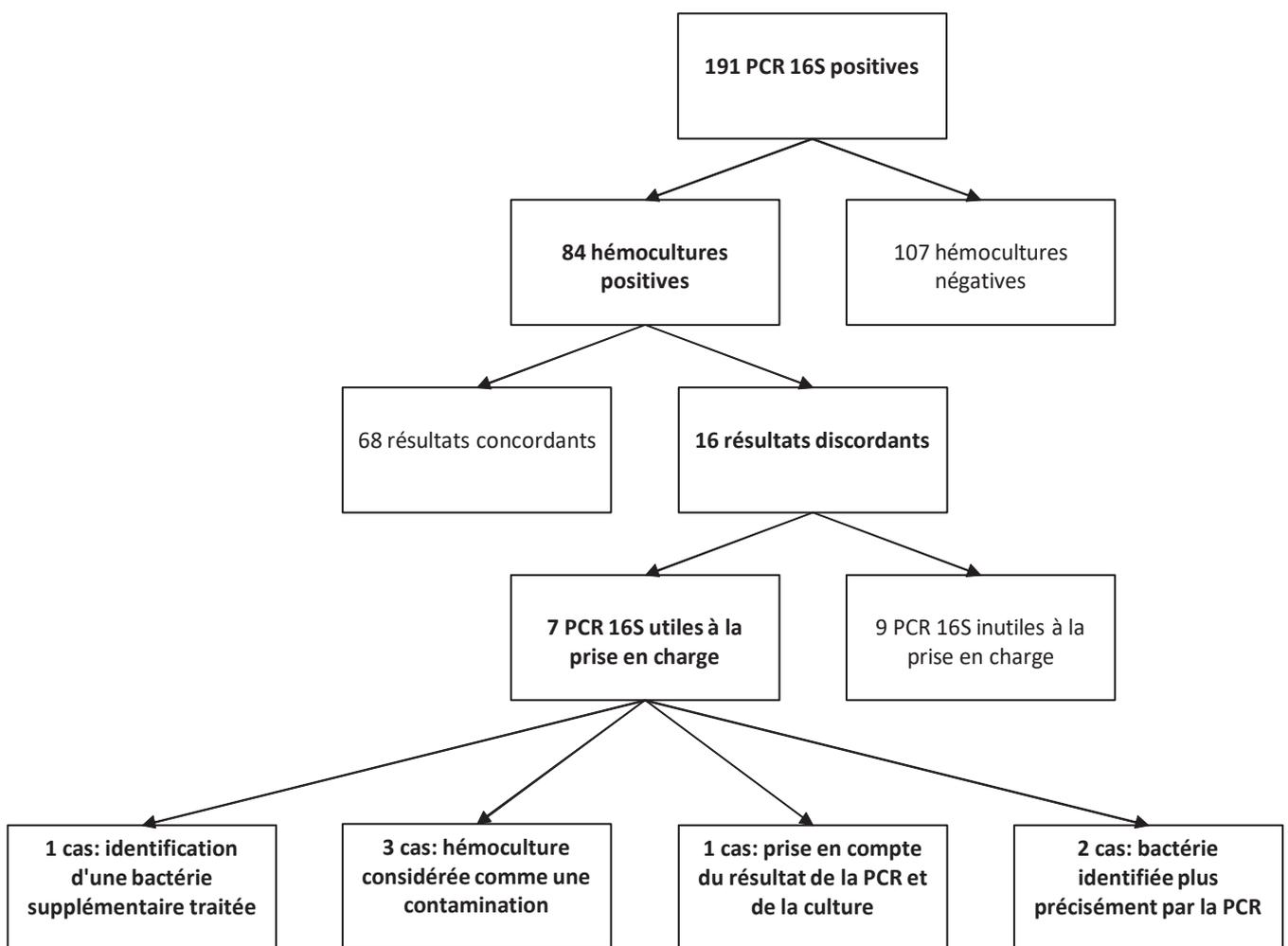


Figure 13 : Gestion des résultats discordants entre PCR 16S et hémocultures

## **3.6 Discussion**

Notre étude a montré que 62/191 (32 %) de nos PCR 16S positives sur 5 ans avaient eu un impact sur la prise en charge des patients. En considérant toutes les PCR 16S réalisées, cet impact clinique était estimé à 8 %.

La PCR 16S semblait plus fréquemment positive pour les liquides de sonication, les valves cardiaques et les abcès (respectivement 56, 46 et 41 %) que pour les autres types de prélèvement où elle était positive dans moins de 20 % des cas.

### **3.6.1 Comparaison des résultats aux données de la littérature**

En comparaison avec les nombreuses études évaluant les performances diagnostiques de la PCR16S, peu d'auteurs ont évalué son impact sur la prise en charge des patients.

#### **3.6.1.1 Données de la littérature sur des prélèvements d'origine variée**

O'Donnell et col. ont inclus rétrospectivement en 2018 76 PCR 16S réalisées sur différents types de prélèvements provenant de 60 patients (107). Les données étaient disponibles pour 49 patients, et le traitement était modifié pour 7/49 (14 %) patients. L'antibiothérapie avait pu être plus ciblée dans 5 cas et arrêtée dans 2 cas. Un impact clinique plus important pour les prélèvements neurochirurgicaux (4/27, 15 %) était souligné par les auteurs. Dans cette étude, l'impact clinique d'une PCR 16S positive était de 21 % (5/24). Dans une étude rétrospective d'Akram et col. en 2017, l'impact clinique de la PCR 16S, qu'elle soit positive ou négative, était retrouvé dans 9/32 cas (28 %) sur différents types de prélèvements (108). L'antibiothérapie était plus ciblée dans 5 cas et arrêtée dans 4 cas. Dans ces deux articles, l'impact clinique de la PCR 16S semblait plus important que ce qui est décrit dans notre étude (respectivement 14 %

et 28 % contre 8 %). Les effectifs de ces études étaient faibles, rendant l'interprétation des résultats limitée. Nous avons choisi de ne pas considérer les PCR16S négatives comme pouvant avoir un impact sur la prise en charge des patients. Dans notre expérience, un résultat négatif ne permet pas d'arrêter une antibiothérapie quand une infection bactérienne est fortement suspectée. Contrairement aux PCR spécifiques, la PCR 16S n'a pas une excellente valeur prédictive négative, la sensibilité étant plus faible. La limite de détection de notre technique était évaluée à 250 fg/ $\mu$ L, soit 226 équivalents-génomiques de *Klebsiella pneumoniae* lors de sa mise en place en 2014. La PCR 16S ne devrait pas être réalisée pour éliminer une infection bactérienne en cas de faible probabilité clinique.

Une étude rétrospective de Gilbert et col. en 2017 décrivait une durée d'antibiothérapie plus courte chez 45 patients ayant une PCR 16S négative appariés à 45 patients avec PCR 16S positive (33 jours contre 43 jours,  $p=0.02$ ) (109). Cette diminution de la durée du traitement n'était cependant pas directement liée au résultat de la PCR16S. En effet, les patients avec PCR 16S négative avaient moins fréquemment des résultats de culture standard positifs (18.2 % contre 34.9 %) et étaient donc vraisemblablement moins souvent atteints d'infection bactérienne, expliquant donc en partie les arrêts d'antibiothérapie.

### **3.6.1.2 Données de la littérature sur les valves cardiaques**

Notre étude retrouvait un impact clinique pour 16 % des PCR 16S positive sur valve cardiaque. En considérant à la fois les PCR 16S positives et négatives, cet impact sur la prise en charge des patients était estimé à 8 %.

Ces résultats sont en accord avec une étude prospective de Peeters et col. en 2017, qui a inclus 127 valves cardiaques chez des patients suspects d'endocardite infectieuse (110). Le traitement antibiotique était modifié chez 12/127 patients (10 %). L'antibiothérapie était arrêtée pour 5

patients, plus ciblée pour 6 patients, et le spectre était élargi pour 1 patient. Dans une étude rétrospective de Marsch et col. en 2015, les PCR 16S et 18S étaient positifs pour 28/46 (61 %) valves opérées, et le traitement antibiotique était modifié pour 7/46 (15 %) patients (111). Les PCR étaient réalisées à la fois chez les patients chez qui une endocardite était suspectée sans lésion per opératoire visualisée, chez les patients avec hémocultures négatives ou chez qui un pathogène peu probable était identifié, et les patients sans diagnostic d'endocardite mais avec découverte de lésions suspectes en per opératoire.

### **3.6.1.3 Données de la littérature sur les prélèvements ostéoarticulaires**

Dans notre étude, une PCR 16S positive changeait la prise en charge du patient dans 44 % (11/25) des cas pour les liquides articulaires, 43 % (6/14) des cas pour les biopsies osseuses, et 40 % (4/10) des cas pour les liquides de sonication de prothèse. Cet impact clinique était respectivement estimé à 6 %, 8 % et 22 % des cas quand on considérait également les PCR 16S négatives.

Dans une étude rétrospective d'Alraddadi et col. en 2013 évaluant les infections ostéoarticulaires, le résultat de la PCR 16S était concordant avec le traitement finalement administré au patient dans 26/36 (72 %) cas (112). Les antibiotiques étaient arrêtés dans 19 cas à la suite d'une PCR 16S négative, et dans 7 cas les antibiotiques étaient modifiés ou maintenus de manière cohérente avec les résultats de la PCR 16S. La modification de prise en charge n'était pas directement liée au résultat de la PCR 16S, mais d'autres facteurs entraient en compte, notamment cliniques. Seuls 20 patients étaient en fait suspects d'infection ostéoarticulaire lors de la visite avec l'infectiologue qui précédait le résultat de la PCR 16S. Pour 9 patients, l'antibiothérapie était maintenue malgré une PCR 16S négative.

Dans une large revue de la littérature par Saeed et col. en 2015, 3840 infections de prothèses articulaires à culture négative étaient incluses (113). La PCR 16S apportait un diagnostic microbiologique dans 141 cas (4 %), et aurait pu dans ces situations changer la prise en charge des patients. Ce résultat est en accord avec nos données.

### **3.6.2 Analyse des résultats**

Cette étude n'a pas pu prouver qu'un type de prélèvement bénéficiait plus qu'un autre de la PCR 16S pour la prise en charge des patients d'un point de vue statistique. Néanmoins, la PCR 16S semblait plus intéressante sur les liquides de sonication de prothèse que sur les tissus mous, les humeurs aqueuses et les autres types de prélèvements moins souvent réalisés. Un manque de puissance pourrait expliquer l'absence de différence significative, et d'autres études sont nécessaires pour confirmer nos résultats.

Bien que moins fréquemment positive, une PCR 16S positive sur LCS changeait plus souvent la prise en charge des patients que sur les valves cardiaques. Ce résultat peut s'expliquer par le faible rendement des hémocultures et des cultures sur LCS, et par la fréquence des infections en contexte neurochirurgical à la fois difficiles à diagnostiquer (114), possiblement plurimicrobiennes et impliquant des pathogènes nosocomiaux. Dans ce contexte, une antibiothérapie mal conduite peut rapidement avoir des conséquences néfastes, et le résultat de la PCR 16S permet dans de nombreux cas d'orienter le traitement. De l'autre côté, une antibiothérapie probabiliste ciblant les pathogènes habituellement impliqués est très fréquemment débutée avant la chirurgie cardiaque pour endocardite. De plus, les hémocultures apportent un diagnostic microbiologique dans de nombreux cas, permettant d'adapter le traitement antibiotique. En cas d'endocardite, les valves cardiaques sont systématiquement envoyées au PTM pour analyse microbiologique. La PCR 16S est actuellement

systématiquement réalisée à l'initiative du microbiologiste quand la culture de valve est négative. En tant que centre régional de référence de chirurgie cardiaque, nous admettons un grand nombre de patient avec indication opératoire (115). Une partie de ces patients bénéficie déjà d'une antibiothérapie adaptée aux résultats des hémocultures réalisées dans les hôpitaux périphériques. Le résultat de ces hémocultures n'est pas connu par le microbiologiste, et la communication entre clinicien et bactériologistes est fondamentale pour éviter de réaliser cet examen inutilement.

Cette étude a pu montrer qu'une PCR 16S positive avait moins d'intérêt quand au moins une hémoculture était positive que quand les hémocultures étaient négatives. C'est une situation pour laquelle la PCR 16S ne devrait, dans la majorité des cas, pas être réalisée. La PCR 16S était le plus souvent utile à la prise en charge des patients quand aucune bactérie n'était mise en évidence par les cultures standards, c'est dans cette situation qu'elle est le plus clairement indiquée (77).

Toutefois, la PCR 16S peut aussi être utile en cas de culture positive. En effet, l'identification d'une espèce peut être plus précise par analyse phylogénétique, ce qui peut être important pour adapter le traitement contre certaines bactéries. De plus, il existe des résultats discordants entre la culture et la PCR 16S, cette dernière permettant dans certains cas d'identifier des bactéries supplémentaires ou d'identifier un pathogène plus vraisemblable. Dans tous les cas, ces techniques restent complémentaires. Harris et Hartley décrivaient déjà en 2003 l'intérêt potentiel de la PCR 16S en cas de résultat discordant avec la culture (116). Sur un total de 382 prélèvements d'origine variée 133 PCR 16S étaient positives. La culture de l'échantillon était alors positive dans 63 cas. Il y avait un résultat discordant dans 29 cas (46 %), contre 22/59 (37 %) dans notre étude. Pour 6 cas une bactérie supplémentaire était identifiée (4 par la PCR 16S et 2 par la culture). Dans 13 cas la bactérie identifiée par culture était considérée comme

une contamination au regard de celle identifiée par PCR 16S. La bactérie identifiée par culture était considérée comme cliniquement significative dans les 10 dernières situations.

La contribution diagnostique de la PCR 16S était plus importante chez les patients bénéficiant d'une antibiothérapie adéquate avant le prélèvement. Effectivement, la PCR 16S est capable de détecter l'ADN de bactéries non viables contrairement à la culture. La modification de prise en charge des patients dans ce sous-groupe était plus faible, de 28 %, car les antibiothérapies probabilistes ciblaient dans un certain nombre de cas directement le pathogène. Cet impact d'une antibiothérapie préalable était déjà décrit par Rantakokko-Jalava et col. qui évaluait à la fois la PCR 16S et 23S sur différents types d'échantillons cliniques (117). En cas d'antibiothérapie préalable efficace, le microorganisme n'était plus fréquemment identifié que par les techniques de biologie moléculaire.

Un large panel de bactéries a pu être identifié par notre PCR 16S, correspondant à l'épidémiologie des infections étudiées. Une grande majorité de bactéries communes à Gram positif étaient mises en évidence suivies par des bactéries anaérobies, des bactéries difficiles à identifier par culture et des bactéries communes à Gram négatif. L'identification était précise, au rang d'espèce, dans la grande majorité des cas (93 %). La prise en charge des patients était plus fréquemment modifiée quand une bactérie à croissance difficile était identifiée, situation où la culture standard est prise en défaut. L'analyse phylogénétique est aussi utile pour identifier des bactéries en cas d'échec des méthodes habituelles comme la spectrométrie de masse.

### **3.6.3 Limites et forces de l'étude**

Notre étude a plusieurs limites. Il s'agit d'une étude monocentrique, et les résultats sont difficiles à extrapoler à d'autres centres. De plus, les données ont été recueillies

rétrospectivement, ce qui ne peut pas remplacer un recueil prospectif systématique malgré la quasi-exhaustivité de notre recueil.

Nous n'avons pas pu étudier les performances diagnostiques en vie réelle de notre PCR 16S en ce qui concerne la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative. L'étude n'était pas destinée à ce type d'analyse, tous les patients inclus ayant une forte probabilité d'infection bactérienne. Il n'existait pas de groupe contrôle de patients indemnes d'infection pour pouvoir définir des vrais négatifs. De plus, il n'existe pas de Gold Standard adapté vu la multiplicité des échantillons. La PCR 16S est généralement comparée aux résultats de la culture, ce qui est inadéquat car le principal objectif de la PCR 16S est d'être positive quand la culture est négative, résultats pouvant être interprétés comme des faux positifs avec mauvaise évaluation de la spécificité de la technique. Le diagnostic final du clinicien n'est pas non plus un Gold Standard idéal car il n'est pas indépendant du résultat de la PCR 16S. Dans notre laboratoire, la PCR 16S est réalisée systématiquement sur valve cardiaque en cas de suspicion d'endocardite et de culture de valve négative, même en cas de diagnostic déjà établi par les hémocultures. Ce biais de sélection participe au faible impact clinique des PCR 16S sur valve cardiaque dans notre étude, mais révèle l'éventualité d'une meilleure prescription de cet examen.

La PCR 16S a elle-même des limites. Même si on la nomme habituellement « PCR universelle », certaines bactéries peuvent ne pas être amplifiées. Le choix des amorces et de leurs bases dégénérées détermine la sensibilité de détection pour différentes espèces (37,39). Il n'existe pas de méthode standardisée, et chaque laboratoire doit choisir, tester et évaluer son couple d'amorces. Une PCR 16S négative n'est pas toujours synonyme de l'absence d'infection bactérienne (14,118–120).

Plusieurs études ont montré la possible persistance d'ADN bactérien au sein du tissu plusieurs années après l'infection, notamment pour les endocardites (121,122), ce qui pourrait conduire

à de faux positifs. La PCR 16S n'est pas exempte du risque de contamination, majoré par les différentes étapes de manipulation au laboratoire. L'interprétation des résultats doit toujours prendre en compte les données cliniques. On pourra à l'avenir bénéficier de systèmes unitaires clos combinant le préparateur d'ADN et le cycleur pour PCR en temps réel. Ceci permettra de limiter les risques de contamination au laboratoire.

Les autres microorganismes potentiellement responsables d'infections profondes ou de co-infections, comme les virus, parasites ou champignons ne sont pas détectés par la PCR 16S. Cette technique ne permet de séquencer que l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S, et il n'est pas possible de détecter des mutations de résistance acquises, ou des facteurs de virulence. L'analyse de chromatogrammes provenant d'échantillons plurimicrobiens est délicate si on utilise la méthode de Sanger pour le séquençage (60), et la PCR 16S reste actuellement indiquée sur des prélèvements de sites habituellement stériles.

Concernant l'identification bactérienne, il n'existe pas de seuil clairement établi permettant de rattacher une séquence à une espèce ou à un genre donné. Plusieurs seuils de similarité ont été proposés, de 97 % à plus de 99,5 % (64). Dans certains cas, il est difficile voire impossible de différencier deux espèces via l'ADN ribosomal 16S et l'analyse d'autres gènes est nécessaire comme celui codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (*rpoB*), pour la sous unité  $\beta$  de l'ADN gyrase (*gyrB*) ou pour la protéine du choc thermique 60 (*hsp60*). Ces difficultés ont été décrites pour certaines espèces des genres *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Neisseria*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et pour quelques espèces de mycobactéries et de streptocoques (groupe *mitis*) (123). De plus, la qualité de l'analyse phylogénétique dépend de l'exactitude des séquences présentes dans la base de données interrogée (63).

L'ADN ribosomal 16S peut être présent en plusieurs copies chez une même bactérie. Les variations de séquence entre ces différentes copies risquent de conduire à l'identification de plusieurs ribotypes pour un même microorganisme (36). Cet inconvénient a peu d'impact pour la pratique clinique, surtout déroutant pour l'identification de sous-espèces, et peut être rectifié par l'analyse de gènes présent en une seule copie comme *rpoB*.

La PCR 16S est un examen plus onéreux que la culture classique, et tous les laboratoires ne sont pas équipés de tels dispositifs limitant son utilisation en pratique. Même si les techniques de biologie moléculaire sont capables en théorie de rendre très rapidement des résultats, nous sommes limités dans notre centre à une série de PCR 16S par semaine. De plus, le séquençage n'étant pas réalisé sur place, et tous les chromatogrammes étant interprétés par un seul microbiologiste, le rendu des résultats peut être retardé de plus d'une semaine.

Les forces de cette étude sont d'avoir recruté toutes les PCR 16S faites dans notre laboratoire, ce qui reflète le bénéfice en vie-réelle de cet examen sur cinq ans. Chaque échantillon a été analysé avec la même technique rendant nos données comparables. C'est à notre connaissance la première étude capable d'évaluer sur une cohorte considérable l'utilité de la PCR 16S sur la prise en charge des patients sur différents types de prélèvements.

### **3.6.4 Perspectives en microbiologie clinique, la métagénomique**

Le séquençage massif parallèle, encore appelé séquençage de nouvelle génération (Next-Generation sequencing, NGS), permettra bientôt de révolutionner le diagnostic moléculaire en microbiologie (124). Ces techniques sont capables de séquencer sur un même prélèvement le génome entier d'un ou de plusieurs pathogènes, ainsi que l'ADN des éléments génétiques mobiles comme les plasmides.

On distingue la métagénomique globale, qui vise à séquencer l'ensemble des génomes présents dans l'échantillon, et la métagénomique ciblée, encore appelée métagénétique, qui se focalise sur une séquence d'ADN particulière pouvant être présente chez plusieurs microorganismes, comme l'ADN ribosomal 16S.

Ces techniques ont déjà démontré leur potentiel dans plusieurs études. Wilson et col. décrivaient en 2019 dans une étude prospective multicentrique l'apport diagnostique du NGS sur LCS en cas de méningite, encéphalite et myélite aiguës (125). Sur 204 échantillons, une cause infectieuse était retenue dans 57 cas. Dans 13 cas, seul le NGS permettait un diagnostic microbiologique, avec dans 8 cas un impact sur la prise en charge du patient. C'est également dans le LCS que nos PCR 16S positives avaient l'impact clinique le plus important. Plusieurs publications ont décrit l'apport de ces techniques sur les abcès (126), les valves cardiaques (127), les prélèvements ostéoarticulaires (128,129), les liquides de sonication de prothèse (130), les prélèvements ophtalmologiques (131), les tissus mous (132,133), les prélèvements sanguins (134) et même sur les prélèvements urinaires (135), les plaies (136) les diarrhées infectieuses (137) et les liquides de lavage broncho-alvéolaires (138) avec un intérêt particulier pour *Mycobacterium tuberculosis* (139).

Ces nouvelles techniques permettent un diagnostic microbiologique plus complet. Elles peuvent par exemple augmenter le nombre de bactéries identifiées dans les infections profondes comme les abcès dont on sait que la culture n'est pas exhaustive. Non seulement les bactéries, mais aussi les virus, les parasites et les champignons peuvent être mis en évidence en cas de co-infection, avec de possibles implications thérapeutiques.

Elles peuvent être réalisées sur des échantillons de sites non stériles, d'une part pour s'enquérir d'une infection mais aussi pour l'analyse du microbiote, comme pour évaluer l'impact des antibiothérapies sur le résistome intestinal en détectant les bactéries multirésistantes colonisantes. La détection de gènes de virulence est une clef pour prédire la gravité d'une

infection et son pronostic. Le séquençage de mutations chromosomiques et des éléments génétiques mobiles (140), supports de la résistance aux antibiotiques, est un atout majeur pour guider les antibiothérapies.

Un des écueils de ces démarches de biologie moléculaire est l'incertitude quant à l'expression phénotypique du génotype (141). Ces techniques ne sont pas encore disponibles en routine, mais la diminution de leur coût, leur automatisation, leur validation par plusieurs études et le développement de la bio-informatique les rendront accessibles très prochainement (142). La métagénomique ciblée sur l'ADN ribosomal 16S est une autre approche, plus simple, rapide et moins coûteuse pour la détection et l'identification de bactéries issues d'échantillons cliniques polymicrobiens et pourra probablement être plus aisément implémentée dans les laboratoires pour la pratique quotidienne.

## 4 Conclusion

Un diagnostic microbiologique est fondamental pour une antibiothérapie adaptée. Il permet d'augmenter les chances de guérison du patient, de réduire les risques d'effets secondaires d'une antibiothérapie probabiliste, et enfin d'en réduire le spectre dans un contexte d'émergence de bactéries multirésistantes. La culture bactérienne standard reste nécessaire pour tester la sensibilité aux antibiotiques, mais les techniques d'identification moléculaire occupent une place centrale pour les espèces de culture et d'identification difficile.

La PCR 16S amplifie l'ADN des bactéries en utilisant des amorces se fixant sur des régions conservées au sein du règne bactérien situées sur le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S. Le produit amplifié comporte des régions variables au sein des différentes espèces. Le séquençage de ce produit permet de réaliser une analyse phylogénétique avec identification du microorganisme.

Notre étude confirme l'intérêt de la PCR 16S pour la prise en charge des patients suspectés d'infection bactérienne sur différents types de prélèvements normalement stériles. Elle permet d'élargir ou de mieux déterminer le spectre d'une antibiothérapie, d'augmenter ou de réduire la posologie utilisée, de prolonger ou de diminuer la durée du traitement, et dans certains cas d'indiquer la réalisation d'un geste invasif. Cette technique ne semble pas plus rentable en ce qui concerne l'impact clinique sur l'un ou l'autre des différents types d'échantillons, même si elle pourrait être plus intéressante sur les liquides de sonication de prothèse. Une PCR 16S positive a en revanche un impact clinique significativement plus fréquent pour les méningites que pour les endocardites. Il ressort de notre analyse que la prise en charge des patients est plus fréquemment modifiée quand une bactérie à croissance difficile est identifiée par la PCR 16S, quand les hémocultures sont négatives, et surtout quand la culture standard ne permet pas de diagnostic microbiologique.

La PCR 16S peut tout de même s'avérer utile quand une bactérie est identifiée par hémoculture ou par culture de l'échantillon. L'analyse des résultats discordants révèle l'intérêt de cette technique pour mettre en évidence une contamination du prélèvement et pour identifier plus précisément les pathogènes.

En cas d'antibiothérapie préalable au prélèvement, la PCR 16S a un intérêt diagnostique au vu de la fréquence des cultures négatives.

Ainsi, la PCR 16S est un examen utile à la prise en charge des patients. Elle ne se substitue pas à la culture mais trouve particulièrement sa place quand celle-ci fait défaut. La discussion au cas par cas entre cliniciens et microbiologistes est essentielle pour déterminer au mieux ses indications et pour l'interprétation des résultats.

Dans un avenir proche, les techniques de séquençage à haut débit devraient considérablement modifier les pratiques de diagnostic moléculaire et remplacer dans certaines situations la PCR 16S, en apportant des informations plus larges que la simple identification microbiologique comme les profils de résistance aux antibiotiques, la présence d'éléments génétiques mobiles ou encore de facteurs de virulence.

VU et approuvé  
Strasbourg, le... **19 JUIN 2019** .....  
Le Doyen de la Faculté de Médecine de Strasbourg  
Professeur Jean SIBIN



VU  
Strasbourg, le... **18-06-19** .....  
Le président du Jury de Thèse  
Professeur Yves HANSMANN

Yves HANSMANN  
Professeur  
HOPITAUX UNIVERSITAIRES DE STRASBOURG  
Nouvel Hôpital Civil  
Maladies Infectieuses et Tropicales  
Médecine Interne  
Tél : 03 69 55 05 45  
67 10 7216 8

**Bibliographie :**

1. Gumerlock PH, Tang YJ, Weiss JB, Silva J. Specific detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* mars 1993;31(3):507-11.
2. He Y-H, Ruan G-J, Hao H, Xue F, Ma Y-K, Zhu S-N, et al. Real-time PCR for the rapid detection of *vanA*, *vanB* and *vanM* genes. *J Microbiol Immunol Infect.* 13 mars 2019;
3. Dubnau D, Smith I, Morell P, Marmur J. Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proc Natl Acad Sci USA.* août 1965;54(2):491-8.
4. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* juin 1987;51(2):221-71.
5. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA.* nov 1977;74(11):5088-90.
6. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* déc 1977;74(12):5463-7.
7. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
8. Chen K, Neimark H, Rumore P, Steinman CR. Broad range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. *FEMS Microbiol Lett.* 1 janv 1989;48(1):19-24.
9. Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, Moss CW, Hollis DG, Weyant RS, et al. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol.* avr 1993;31(4):872-81.
10. Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. *Int J Syst Bacteriol.* oct 1993;43(4):777-86.
11. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015;6:791.
12. Rolain JM, Lecom C, Raoult D. Simplified serological diagnosis of endocarditis due to *Coxiella burnetii* and *Bartonella*. *Clin Diagn Lab Immunol.* nov 2003;10(6):1147-8.
13. Harris KA, Yam T, Jalili S, Williams OM, Alshafi K, Gouliouris T, et al. Service evaluation to establish the sensitivity, specificity and additional value of broad-range 16S rDNA PCR for the diagnosis of infective endocarditis from resected endocardial material in patients from eight UK and Ireland hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* nov 2014;33(11):2061-6.

14. Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol.* mars 2006;44(3):1018-28.
15. Rafi W, Chandramuki A, Mani R, Satishchandra P, Shankar SK. Rapid diagnosis of acute bacterial meningitis: role of a broad range 16S rRNA polymerase chain reaction. *J Emerg Med.* févr 2010;38(2):225-30.
16. Insa R, Marín M, Martín A, Martín-Rabadán P, Alcalá L, Cercenado E, et al. Systematic use of universal 16S rRNA gene polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for processing pleural effusions improves conventional culture techniques. *Medicine (Baltimore).* mars 2012;91(2):103-10.
17. Joseph CR, Lalitha P, Sivaraman KR, Ramasamy K, Behera UC. Real-time polymerase chain reaction in the diagnosis of acute postoperative endophthalmitis. *Am J Ophthalmol.* juin 2012;153(6):1031-1037.e2.
18. Kommedal Ø, Wilhelmsen MT, Skrede S, Meisal R, Jakovljevic A, Gaustad P, et al. Massive parallel sequencing provides new perspectives on bacterial brain abscesses. *J Clin Microbiol.* juin 2014;52(6):1990-7.
19. Millar B, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, McClurg R, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis--a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis.* 2001;33(9):673-80.
20. Lang S, Watkin RW, Lambert PA, Bonser RS, Littler WA, Elliott TSJ. Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis. *J Infect.* avr 2004;48(3):269-75.
21. Syed FF, Millar BC, Prendergast BD. Molecular technology in context: a current review of diagnosis and management of infective endocarditis. *Prog Cardiovasc Dis.* déc 2007;50(3):181-97.
22. Vondracek M, Sartipy U, Aufwerber E, Julander I, Lindblom D, Westling K. 16S rDNA sequencing of valve tissue improves microbiological diagnosis in surgically treated patients with infective endocarditis. *J Infect.* juin 2011;62(6):472-8.
23. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):1584-91.
24. Schmetterer J, Gorvetzian J, Yang S. *Robinsoniella peoriensis* infection related to right femoral hardware. *IDCases.* 2017;10:115-6.
25. Giannella M, Valerio M, Franco JA, Marin M, Bouza E, Muñoz P. Pacemaker infection due to *Mycobacterium fortuitum*: the role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mars 2007;57(3):337-9.
26. Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, Falkow S. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med.* 30 juill 1992;327(5):293-301.

27. Wang Y, Hoenig JD, Malin KJ, Qamar S, Petrof EO, Sun J, et al. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J.* août 2009;3(8):944-54.
28. Palade GE. A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol.* janv 1955;1(1):59-68.
29. Bremer H, Dennis PP. Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates. *EcoSal Plus.* sept 2008;3(1).
30. Ban N, Freeborn B, Nissen P, Penczek P, Grassucci RA, Sweet R, et al. A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell.* 26 juin 1998;93(7):1105-15.
31. Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vornrhein C, et al. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature.* 21 sept 2000;407(6802):327-39.
32. Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science.* 4 mai 2001;292(5518):883-96.
33. Shepherd J, Ibba M. Bacterial transfer RNAs. *FEMS Microbiol Rev.* mai 2015;39(3):280-300.
34. Steitz TA. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2008;9(3):242-53.
35. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn.* déc 2001;6(4):313-21.
36. Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol.* janv 2007;73(1):278-88.
37. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods.* déc 2003;55(3):541-55.
38. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* mai 2007;69(2):330-9.
39. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* avr 2008;74(8):2461-70.
40. Waters DLE, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol.* 2014;1099:65-75.
41. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques.* juin 1998;24(6):954-8, 960, 962.

42. Meddeb M, Koebel C, Jaulhac B, Schramm F. Comparison between a Broad-Range Real-Time and a Broad-Range End-Point PCR Assays for the Detection of Bacterial 16S rRNA in Clinical Samples. *Ann Clin Lab Sci.* 2016;46(1):18-25.
43. Schabereiter-Gurtner C, Nehr M, Apfalter P, Makristathis A, Rotter ML, Hirschl AM. Evaluation of a protocol for molecular broad-range diagnosis of culture-negative bacterial infections in clinical routine diagnosis. *J Appl Microbiol.* avr 2008;104(4):1228-37.
44. Rosey A-L, Abachin E, Quesnes G, Cadilhac C, Pejtin Z, Glorion C, et al. Development of a broad-range 16S rDNA real-time PCR for the diagnosis of septic arthritis in children. *J Microbiol Methods.* janv 2007;68(1):88-93.
45. Ferroni A, Al Khoury H, Dana C, Quesne G, Berche P, Glorion C, et al. Prospective survey of acute osteoarticular infections in a French paediatric orthopedic surgery unit. *Clin Microbiol Infect.* sept 2013;19(9):822-8.
46. Jordan JA, Durso MB. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn.* nov 2005;7(5):575-81.
47. Poppert S, Essig A, Stoehr B, Steingruber A, Wirths B, Juretschko S, et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol.* juill 2005;43(7):3390-7.
48. P Szabó R, Kertész A, Szeráfin T, Fehérvári I, Zsom L, Balla J, et al. [Infective endocarditis caused by *Chlamydia pneumoniae* after liver transplantation. Case report]. *Orv Hetil.* 31 mai 2015;156(22):896-900.
49. Bomb K, Arora A, Trehan N. Endocarditis due to *Chryseobacterium meningosepticum*. *Indian J Med Microbiol.* avr 2007;25(2):161-2.
50. Stephens JL, Boulemden A, Richens D, Turner DPJ. Prosthetic Valve Endocarditis Following Dental Extractions. *J Card Surg.* mai 2016;31(5):321-3.
51. Hidri N, Barraud O, de Martino S, Garnier F, Paraf F, Martin C, et al. Lyme endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* déc 2012;18(12):E531-532.
52. Maor Y, Sternik L, Orlov B, Rahav G, Keller N, Raanani E, et al. *Coxiella burnetii* Endocarditis and Aortic Vascular Graft Infection: An Underrecognized Disease. *Ann Thorac Surg.* janv 2016;101(1):141-5.
53. Cofsky RD, Seligman SJ. *Peptococcus magnus* endocarditis. *South Med J.* mars 1985;78(3):361-2.
54. Rodrigues C, Siciliano RF, Zeigler R, Strabelli TMV. *Bacteroides fragilis* endocarditis: a case report and review of literature. *Braz J Infect Dis.* févr 2012;16(1):100-4.
55. Sandoe JAT. *Capnocytophaga canimorsus* endocarditis. *J Med Microbiol.* mars 2004;53(Pt 3):245-8.

56. Sharara SL, Tayyar R, Kanafani ZA, Kanj SS. HACEK endocarditis: a review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(6):539-45.
57. Sontakke S, Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PPVP, Breitschwerdt EB. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods.* mars 2009;76(3):217-25.
58. lebib Quick BioInformatic Phylogeny of Prokaryotes [Internet]. [cité 22 janv 2019]. Disponible sur: <https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebib/lebib.cgi>
59. Flandrois J-P, Perrière G, Gouy M. leBIBIQBPP: a set of databases and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 12 août 2015 [cité 18 août 2019];16(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531848/>
60. Kommedal O, Karlsen B, Saebø O. Analysis of mixed sequencing chromatograms and its application in direct 16S rRNA gene sequencing of polymicrobial samples. *J Clin Microbiol.* nov 2008;46(11):3766-71.
61. Kommedal Ø, Lekang K, Langeland N, Wiker HG. Characterization of polybacterial clinical samples using a set of group-specific broad-range primers targeting the 16S rRNA gene followed by DNA sequencing and RipSeq analysis. *J Med Microbiol.* juill 2011;60(Pt 7):927-36.
62. Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Ostell J, Pruitt KD, Karsch-Mizrachi I. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 8 janv 2019;47(Database issue):D94-9.
63. Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ, Weightman AJ. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol.* déc 2005;71(12):7724-36.
64. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* oct 2008;14(10):908-34.
65. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 5 oct 1990;215(3):403-10.
66. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 15 juill 2002;30(14):3059-66.
67. Criscuolo A, Gribaldo S. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol.* 13 juill 2010;10:210.
68. Fitch WM, Margoliash E. Construction of phylogenetic trees. *Science.* 20 janv 1967;155(3760):279-84.

69. Waddell PJ, Steel MA. General time-reversible distances with unequal rates across sites: mixing gamma and inverse Gaussian distributions with invariant sites. *Mol Phylogenet Evol.* déc 1997;8(3):398-414.
70. Kessler HH, Mühlbauer G, Stelzl E, Daghofer E, Santner BI, Marth E. Fully automated nucleic acid extraction: MagNA Pure LC. *Clin Chem.* juin 2001;47(6):1124-6.
71. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* nov 2012;113(5):1014-26.
72. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques.* janv 1997;22(1):176-81.
73. Cherkaoui A, Emonet S, Ceroni D, Candolfi B, Hibbs J, Francois P, et al. Development and validation of a modified broad-range 16S rDNA PCR for diagnostic purposes in clinical microbiology. *J Microbiol Methods.* nov 2009;79(2):227-31.
74. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest.* févr 1999;115(2):462-74.
75. Lodise TP, Patel N, Kwa A, Graves J, Furuno JP, Graffunder E, et al. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2007;51(10):3510-5.
76. Medina E, Pieper DH. Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;398:3-33.
77. Rampini SK, Bloemberg GV, Keller PM, Büchler AC, Dollenmaier G, Speck RF, et al. Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* déc 2011;53(12):1245-51.
78. Cunha BA. Antibiotic side effects. *Med Clin North Am.* janv 2001;85(1):149-85.
79. Talpaert MJ, Gopal Rao G, Cooper BS, Wade P. Impact of guidelines and enhanced antibiotic stewardship on reducing broad-spectrum antibiotic usage and its effect on incidence of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.* sept 2011;66(9):2168-74.
80. Garbee DD, Pierce SS, Manning J. Opportunistic Fungal Infections in Critical Care Units. *Crit Care Nurs Clin North Am.* mars 2017;29(1):67-79.
81. Gyssens IC. Antibiotic policy. *Int J Antimicrob Agents.* déc 2011;38 Suppl:11-20.
82. Greub G, Lepidi H, Röver C, Casalta J-P, Habib G, Collard F, et al. Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. *Am J Med.* mars 2005;118(3):230-8.

83. Breitkopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. *Circulation*. 22 mars 2005;111(11):1415-21.
84. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine (Baltimore)*. juill 2007;86(4):195-202.
85. Voldstedlund M, Nørum Pedersen L, Baandrup U, Klaaborg KE, Fuursted K. Broad-range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis. *APMIS*. mars 2008;116(3):190-8.
86. Miller RJH, Chow B, Pillai D, Church D. Development and evaluation of a novel fast broad-range 16S ribosomal DNA PCR and sequencing assay for diagnosis of bacterial infective endocarditis: multi-year experience in a large Canadian healthcare zone and a literature review. *BMC Infect Dis*. 12 avr 2016;16:146.
87. Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AMD, van Zwet AA. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol*. févr 2004;42(2):734-40.
88. Welinder-Olsson C, Dotevall L, Hogevik H, Jungnelius R, Trollfors B, Wahl M, et al. Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-acquired bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect*. sept 2007;13(9):879-86.
89. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, et al. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol*. mars 2011;95(3):345-9.
90. Maskell NA, Batt S, Hedley EL, Davies CWH, Gillespie SH, Davies RJO. The bacteriology of pleural infection by genetic and standard methods and its mortality significance. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 oct 2006;174(7):817-23.
91. Song YG, Shim SG, Kim KM, Lee D-H, Kim D-S, Choi S-H, et al. Profiling of the bacteria responsible for pyogenic liver abscess by 16S rRNA gene pyrosequencing. *J Microbiol*. juin 2014;52(6):504-9.
92. Sheikh AF, Khosravi AD, Goodarzi H, Nashibi R, Teimouri A, Motamedfar A, et al. Pathogen Identification in Suspected Cases of Pyogenic Spondylodiscitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:60.
93. Gomez E, Cazanave C, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, Steckelberg JM, Uhl JR, et al. Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. *J Clin Microbiol*. nov 2012;50(11):3501-8.

94. Bereza P, Ekiel A, Auguściak-Duma A, Aptekorz M, Wilk I, Kusz D, et al. Comparison of cultures and 16S rRNA sequencing for identification of bacteria in two-stage revision arthroplasties: preliminary report. *BMC Musculoskelet Disord*. 25 mars 2016;17:138.
95. Johnson KE, Kiyatkin DE, An AT, Riedel S, Melendez J, Zenilman JM. PCR offers no advantage over culture for microbiologic diagnosis in cellulitis. *Infection*. oct 2012;40(5):537-41.
96. Rudkjøbing VB, Thomsen TR, Xu Y, Melton-Kreft R, Ahmed A, Eickhardt S, et al. Comparing culture and molecular methods for the identification of microorganisms involved in necrotizing soft tissue infections. *BMC Infect Dis*. 08 2016;16(1):652.
97. Su G, Fu Z, Hu L, Wang Y, Zhao Z, Yang W. 16S Ribosomal Ribonucleic Acid Gene Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0127195.
98. Tattevin P, Watt G, Revest M, Arvieux C, Fournier P-E. Update on blood culture-negative endocarditis. *Med Mal Infect*. févr 2015;45(1-2):1-8.
99. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta J-P, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J*. 21 nov 2015;36(44):3075-128.
100. Duan Q-J, Shang S-Q, Wu Y-D. Rapid diagnosis of bacterial meningitis in children with fluorescence quantitative polymerase chain reaction amplification in the bacterial 16S rRNA gene. *Eur J Pediatr*. févr 2009;168(2):211-6.
101. Durand ML. Bacterial and Fungal Endophthalmitis. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(3):597-613.
102. Gomez-Urena EO, Tande AJ, Osmon DR, Berbari EF. Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: Cultures, Biomarker and Criteria. *Infect Dis Clin North Am*. 2017;31(2):219-35.
103. Fournier P-E, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta J-P, Arzouni J-P, et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis*. 15 juill 2010;51(2):131-40.
104. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 16 août 2007;357(7):654-63.
105. Velay A, Schramm F, Gaudias J, Jaulhac B, Riegel P. Culture with BACTEC Peds Plus bottle compared with conventional media for the detection of bacteria in tissue samples from orthopedic surgery. *Diagn Microbiol Infect Dis*. sept 2010;68(1):83-5.

106. Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, et al. Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative Staphylococci and Reveals the Pathogenic Role of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol*. juill 2015;53(7):2030-6.
107. O'Donnell S, Gaughan L, Skally M, Baker Z, O'Connell K, Smyth E, et al. The potential contribution of 16S ribosomal RNA polymerase chain reaction to antimicrobial stewardship in culture-negative infection. *J Hosp Infect*. juin 2018;99(2):148-52.
108. Akram A, Maley M, Gosbell I, Nguyen T, Chavada R. Utility of 16S rRNA PCR performed on clinical specimens in patient management. *Int J Infect Dis*. avr 2017;57:144-9.
109. Gilbert EM, Yucebay F, Malczynski M, Smith D, Esterly JS, Qi C, et al. Use of organism identification by 16S ribosomal RNA polymerase chain reaction to shorten antimicrobial length of therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. juin 2017;88(2):163-7.
110. Peeters B, Herijgers P, Beuselinck K, Verhaegen J, Peetermans WE, Herregods M-C, et al. Added diagnostic value and impact on antimicrobial therapy of 16S rRNA PCR and amplicon sequencing on resected heart valves in infective endocarditis: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect*. nov 2017;23(11):888.e1-888.e5.
111. Marsch G, Orszag P, Mashaqi B, Kuehn C, Haverich A. Antibiotic therapy following polymerase chain reaction diagnosis of infective endocarditis: a single centre experience. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. mai 2015;20(5):589-93.
112. Alraddadi B, Al-Azri S, Forward K. Influence of 16S ribosomal RNA gene polymerase chain reaction and sequencing on antibiotic management of bone and joint infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2013;24(2):85-8.
113. Saeed K, Ahmad-Saeed N. The impact of PCR in the management of prosthetic joint infections. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(7):957-64.
114. Hussein K, Bitterman R, Shofty B, Paul M, Neuberger A. Management of post-neurosurgical meningitis: narrative review. *Clin Microbiol Infect*. sept 2017;23(9):621-8.
115. Ruch Y, Mazzucotelli J-P, Lefebvre F, Martin A, Lefebvre N, Douiri N, et al. Impact of Setting up an 'Endocarditis Team' on the Management of Infective Endocarditis. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. [cité 17 juill 2019]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofz308/5532524>
116. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol*. août 2003;52(Pt 8):685-91.
117. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol*. janv 2000;38(1):32-9.

118. Morel A-S, Dubourg G, Prudent E, Edouard S, Gouriet F, Casalta J-P, et al. Complementarity between targeted real-time specific PCR and conventional broad-range 16S rDNA PCR in the syndrome-driven diagnosis of infectious diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* mars 2015;34(3):561-70.
119. Fihman V, Hannouche D, Bousson V, Bardin T, Lioté F, Raskine L, et al. Improved diagnosis specificity in bone and joint infections using molecular techniques. *J Infect.* déc 2007;55(6):510-7.
120. Jenkins C, Ling CL, Ciesielczuk HL, Lockwood J, Hopkins S, McHugh TD, et al. Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *J Med Microbiol.* avr 2012;61(Pt 4):483-8.
121. Lang S, Watkin RW, Lambert PA, Littler WA, Elliott TSJ. Detection of bacterial DNA in cardiac vegetations by PCR after the completion of antimicrobial treatment for endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* juin 2004;10(6):579-81.
122. Branger S, Casalta JP, Habib G, Collard F, Raoult D. *Streptococcus pneumoniae* endocarditis: persistence of DNA on heart valve material 7 years after infectious episode. *J Clin Microbiol.* sept 2003;41(9):4435-7.
123. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* sept 2007;45(9):2761-4.
124. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, García-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol.* 10 févr 2017;243:16-24.
125. Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, Arevalo S, Yu G, Neuhaus J, et al. Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. *N Engl J Med.* 13 2019;380(24):2327-40.
126. Hu H-L, Guo L-Y, Wu H-L, Feng W-Y, Chen T-M, Liu G. Evaluation of next-generation sequencing for the pathogenic diagnosis of children brain abscesses. *J Infect.* avr 2019;78(4):323-37.
127. Oberbach A, Schlichting N, Feder S, Lehmann S, Kullnick Y, Buschmann T, et al. New insights into valve-related intramural and intracellular bacterial diversity in infective endocarditis. *PLoS ONE.* 2017;12(4):e0175569.
128. Ruppé E, Lazarevic V, Girard M, Mouton W, Ferry T, Laurent F, et al. Clinical metagenomics of bone and joint infections: a proof of concept study. *Sci Rep.* 10 2017;7(1):7718.
129. Ivy MI, Thoendel MJ, Jeraldo PR, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Abdel MP, et al. Direct Detection and Identification of Prosthetic Joint Infection Pathogens in Synovial Fluid by Metagenomic Shotgun Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2018;56(9).

130. Street TL, Sanderson ND, Atkins BL, Brent AJ, Cole K, Foster D, et al. Molecular Diagnosis of Orthopedic-Device-Related Infection Directly from Sonication Fluid by Metagenomic Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2017;55(8):2334-47.
131. Doan T, Wilson MR, Crawford ED, Chow ED, Khan LM, Knopp KA, et al. Illuminating uveitis: metagenomic deep sequencing identifies common and rare pathogens. *Genome Med* [Internet]. 25 août 2016 [cité 25 juill 2019];8(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4997733/>
132. Birdsell DN, Özsürekci Y, Rawat A, Aycan AE, Mitchell CL, Sahl JW, et al. Coinfections identified from metagenomic analysis of cervical lymph nodes from tularemia patients. *BMC Infect Dis.* 11 2018;18(1):319.
133. Zhao-Fleming HH, Wilkinson JE, Larumbe E, Dissanaïke S, Rumbaugh K. Obligate anaerobes are abundant in human necrotizing soft tissue infection samples - a metagenomics analysis. *APMIS.* août 2019;127(8):577-87.
134. Grumaz S, Stevens P, Grumaz C, Decker SO, Weigand MA, Hofer S, et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Med.* 01 2016;8(1):73.
135. Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, Doumith M, Munroe D, Pires C, et al. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(1):104-14.
136. Be NA, Allen JE, Brown TS, Gardner SN, McLoughlin KS, Forsberg JA, et al. Microbial profiling of combat wound infection through detection microarray and next-generation sequencing. *J Clin Microbiol.* juill 2014;52(7):2583-94.
137. Joensen KG, Engsbro ALØ, Lukjancenko O, Kaas RS, Lund O, Westh H, et al. Evaluating next-generation sequencing for direct clinical diagnostics in diarrhoeal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2017;36(7):1325-38.
138. Leo S, Gaïa N, Ruppé E, Emonet S, Girard M, Lazarevic V, et al. Detection of Bacterial Pathogens from Broncho-Alveolar Lavage by Next-Generation Sequencing. *Int J Mol Sci.* 20 sept 2017;18(9).
139. Jeanes C, O'Grady J. Diagnosing tuberculosis in the 21st century - Dawn of a genomics revolution? *Int J Mycobacteriol.* 2016;5(4):384-91.
140. von Wintersdorff CJH, Wolffs PFG, van Niekerk JM, Beuken E, van Alphen LB, Stobberingh EE, et al. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in faecal metagenomes of Dutch travellers. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(12):3416-9.
141. Karr JR, Sanghvi JC, Macklin DN, Gutschow MV, Jacobs JM, Bolival B, et al. A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype. *Cell.* 20 juill 2012;150(2):389-401.

142. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet.* 2019;20(6):341-55.

## 5 Annexes

### 5.1 Annexe 1 : Article original soumis

#### **Clinical Impact of 16S rDNA sequencing: a monocentric retrospective study**

Axel Ursenbach<sup>1#</sup>, Frédéric Schramm<sup>1</sup>, François Séverac<sup>2</sup>, Yvon Ruch<sup>3</sup>, Yves Hansmann<sup>3</sup>, Nicolas Lefebvre<sup>3</sup>,  
Xavier Argemi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

<sup>2</sup>Service de Santé Publique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

<sup>3</sup>Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

#Corresponding author: [axel.ursenbach@chru-strasbourg.fr](mailto:axel.ursenbach@chru-strasbourg.fr)

Laboratoire de bactériologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg

3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

Phone: 33 3 69 55 14 11; Fax: 33 3 69 55 16 98

#### **Acknowledgements**

No funds were received for the realisation of this work.

**Abstract**

**PURPOSE:** PCRs targeting 16S ribosomal DNA (16S PCR) followed by Sanger's sequencing can identify bacteria from normally sterile sites and complement standard analyses, but the analyses are expensive. We conducted a retrospective study in the Strasbourg University Hospital to assess the clinical impact of 16S PCR sequencing on patients' treatments according to different sample types. **METHODS:** From 2014 to 2018, 806 16S PCR samples were processed, and 191 of those were positive. **RESULTS:** Overall, the test impacted the treatment of 62 of the 191 patients (32%). The antibiotic treatment was rationed in 31 patients (50%) and extended in 24 patients (39%), and an invasive procedure was chosen for 7 patients (11%) due to the 16S PCR sequencing results. We found the impact of the test was similar regardless of the sample type ( $p = 0.078$ ). However, positive 16S PCR sequencing results on cerebrospinal fluid (CSF) were more likely to impact management than positive ones on cardiac valves ( $p = 0.044$ ). The clinical impact of positive 16S PCR sequencing results were significantly higher when blood cultures were negative ( $p < 0.001$ ), and this difference appeared larger when both blood and sample cultures were negative ( $p < 0.001$ ). The diagnostic contribution of 16S PCR was higher in patients with previous antibiotic treatment ( $p < 0.001$ ). **CONCLUSION:** In all, 16S PCR analysis has a significant clinical impact on patient management (particularly for suspected CSF infections), for patients with culture-negative samples and for those with previous antibiotic treatments.

**Keywords**

16S PCR; Clinical significance; Polymerase chain reaction; Antibiotic therapy

## Introduction

Bacterial infections in hospitalised patients can lead to sepsis and death [1], particularly when the diagnosis is delayed [2]. But antimicrobial stewardship with fast and accurate bacterial identifications can improve patients' outcomes.

Direct examination of biological samples can offer a first guidance, but usually, clinicians have to wait for standard culture results for final bacterial species identification with the help of matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and for secondary antimicrobial susceptibility testing. However, standard cultures have limitations regarding fastidious or even non-cultivable bacteria [3], and false negative results can be obtained following antibiotic treatments [4]. Empirical antibiotic therapies present various pitfalls: Broad spectrum or prolonged antibiotic treatments increase the risks of drug toxicity [5], of *Clostridioides difficile* infections [6], of opportunistic fungal infections [7] and of multidrug-resistant bacteria selection [8]. Also, erroneous antibiotic therapies due to the lack of bacterial identification preclude patient recovery. Thus, complementary methods have emerged to improve microbiological diagnoses.

16S rDNA PCR sequencing, a commonly used broad range PCR analysis, has demonstrated its diagnostic performance on various samples: cardiac valves [9–11], abscesses [12], cerebrospinal fluids (CSFs) [13], bone and joint samples [14], sonication fluids [15], pleural fluids [16] and eye samples [17]. Different primers targeting conserved regions of 16S ribosomal DNAs are used to amplify nucleic acids via PCR, followed by sequencing. Variable regions of this gene allow identification to the species level, especially using phylogenetic tree reconstructions [18]. This method has multiple advantages including large implementation in the routine workflow of clinical laboratories and the possibility to detect non-cultivable bacteria or not viable bacteria following antibiotic therapy [3], but it is also expensive.

The clinical impact of this method on the patients' treatments in real clinical settings has been rarely studied. Our main objective was to assess the impact of positive 16S rDNA PCR analyses in various patient samples at diagnostic and therapeutic levels. The secondary objectives were to evaluate the bacterial identification performance and the effect of a previous antibiotic therapy on the results and to analyse the management of discordant results between 16S PCR and culture identification.

## Materials and methods

**Study design and ethical considerations:** This was a monocentric retrospective study. We included data from all patients with positive 16S PCR results in the Strasbourg University Hospital laboratory from 2014 to 2018. According to the French legislation (Jardé law, N°2016-800), we sought for the non-opposition of all patients. The Strasbourg Hospital Ethic Committee approved this study (reference FC/dossier 2019-27).

**Data collection:** We collected all positive 16S PCR results from the microbiological laboratory information system and recovered clinical and paraclinical data from the electronic medical records of the relevant patients. We removed all duplicated results. We collected data on the results of blood cultures, the samples' Gram stains and cultures, the bacteria identified, the presence of previous antibiotic treatments, the clinical impact of the 16S PCR results and the final diagnoses.

We defined the notion of clinical impact of the 16S PCR as a rationing of the antibiotic therapy ('R', lower dose, shorter or more targeted antibiotic therapy), an extended antibiotic therapy ('E', higher dose, longer or extended spectrum antibiotic therapy) or an intervention ('I', invasive procedures). We considered previous antibiotic treatments as significant when given for more than 24 h before the sample collection and when being effective against the identified pathogen.

**Sample analyses:** We analysed blood cultures using the BD BACTEC™ FX instrument (Becton Dickinson). Cardiac valves, bone samples and abscesses were grinded in brain heart infusion broth. We used a published sonication protocol [19]. Samples were cultivated using standard media after Gram-stained standard identifications. According to the sample type, the cultures were incubated under both aerobic (35 °C for Columbia agar +5% sheep blood and Drigalski, 35 °C in 5% CO<sub>2</sub> for chocolate agar) and anaerobic conditions (Schaefer agar +5% sheep blood and thioglycolate broth). Joint fluids, bone samples and sonication fluids were also incubated in BD BACTEC™ Peds Plus™ vials, as described [20]. Bacteria were usually identified with MALDI-TOF MS [21] using the Microflex LT coupled to the MALDI Biotyper algorithm (Bruker) as described [22].

**16S rDNA PCR protocol:** 16S rDNA PCRs were performed at the request of clinicians or by microbiologists' initiative and systematically on cardiac valve samples with suspected endocarditis when the sample's cultures were negative. Briefly, purified DNA was extracted from clinical samples using MagNA Pure (Roche), PCR were performed with the LightCycler® 2.0 (Roche) instrument with 27F/16S1RRB primers and sequencing

reactions were realised by the Sanger method on an ABI 3730 XL system (Applied Biosystems) as described in detail [23]. A microbiologist analysed the results using the online tool leBIBI<sup>QBPP</sup> (<https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) to compare the sequences to the GenBank<sup>®</sup> database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), allowing construction of phylogenetic unrooted trees and bacterial final identifications. Conclusions were transmitted to the clinicians.

**Statistical analysis:** We presented categorical variables as numbers and percentages and performed comparisons between groups using Fisher's exact tests. In case of significant differences between multiple groups, we carried out pairwise post hoc tests. Adjusted p-values were calculated using the 'Holm' method to account for multiple comparisons. We considered p-values < 0.05 as statistically significant. We performed all statistical analyses using the R software version 3.5.1 R core team 2018 (Vienna, Austria; <https://www.R-project.org/>).

## Results

From 2014 to 2018, 835 16S rDNA PCR were performed in our laboratory, and 197 (24%) were positive with a final bacterial identification. Among these results, we excluded 23 because we could not determine their type of sample precisely and 6 due to incomplete clinical records. In the end, we analysed data from 191 positive 16S PCR results from the initial 806 tests. Table 1 shows detailed results from Gram stain direct examinations, cultures and 16S rDNA PCR results. In all, 16S PCRs were positive in 80/173 (46%) cardiac valve, 29/71 (41%) abscess, 14/80 (18%) bone, 11/67 (16%) soft tissue, 24/178 (13%) synovial fluid, 13/119 (11%) CSF, 5/27 (19%) pleural fluid, 10/18 (56%) sonication fluid and 5/57 (9%) aqueous humour samples.

We found clinical impacts of the 16S PCR results in 62/191 (32%) patients, consisting of 31 (50%) 'Rationing', 24 (39%) 'Extended spectrums' and 7 (11%) 'Interventions'. Considering all 16S PCR performed in our laboratory during the study period, we estimated the clinical impact to be 8% (62 patients over 806).

In terms of only samples with positive 16S PCR results, the clinical impact differed amongst the various samples ( $p = 0.002$ ) (Table 2). Our pairwise analysis showed that positive 16S PCR results were more likely to change patients' treatments if they had CSF samples than if they had cardiac valve samples ( $p = 0.044$ ). Contrariwise, the patients' managements were similar when considering all the 16S PCR results according to sample types ( $p = 0.078$ ) (Table 3). The clinical impact was highest for patients with sonication fluid samples (22%), but this population was small (18 patients). Conversely, 16S PCR results on soft tissue and aqueous humour samples were less likely to change the patients' treatments (2/67 or 3% and 2/57 or 4% of clinical impact, respectively).

On synovial fluids, CSF, bone, cardiac valve, pleural fluid and abscess samples, the impact of a 16S PCR result was intermediary, ranging from 6% to 14%. We did not find any clinical impact on other sample types.

Table 4 lists all the pathogens identified by 16S PCR. The most frequently identified pathogens were Gram-positive bacteria 125/203 (62%), but the identification of difficult to grow bacteria was more likely to change a patient's treatment 12/21 (57%). Bacteria were identified to the species level in 189/203 cases (93%).

The proportion of clinical impacts of positive 16S PCR results was significantly superior when blood cultures were negative (52/107, 49%) than when they were positive (10/84, 12%) ( $p < 0.001$ ). This difference was enlarged in cases of simultaneously negative blood culture and sample's culture, where positive 16S PCR results changed the patients' treatments in 44/64 (69%) of cases versus changing only 18/127 (14%) of treatment when at least a bacterium had grown ( $p < 0.001$ ).

In patients with previous antibiotic therapy, positive 16S PCR results had a high clinical impact. In this subgroup, 92/118 (78%) samples had negative cultures, whereas only 40/73 (55%) samples had negative cultures in patients without previous efficient antibiotic treatments ( $p < 0.001$ ). We found a clinical impact for the positive 16S PCR results in 33/118 (28%) patients undergoing an efficient antibiotic therapy.

We found 22/59 (37%) of positive culture cases had discordant 16S PCR test results (Table S1): an additional pathogen was identified by one or another technique in 10 cases, the bacteria identified were different in 11 cases, and in 1 situation, 16S PCR gave a more precise identification, but the sample's culture identified another pathogen considered by the clinicians. The 16S PCR result was clinically relevant in 36% of those situations (8/22).

The corresponding 16S PCR results of the 84 positive blood cultures were discordant in 16 (19%) of the cases. One more pathogen was identified by another technique in 4 situations, and the bacteria identified were different in 12. The 16S PCR result had an impact on the patients' treatments in 44% of these situations (7/16).

## **Discussion**

This study showed that 32% of our positive 16S rDNA PCR results (62/191) over 5 years had clinical impacts on the patients' treatment, and this ratio reached 8% when considering all 16S rDNA PCR tests performed (62/806). Sonication fluid, cardiac valve and abscess samples were more likely to lead to positive 16S DNA PCR results than other sample types.

Few studies have evaluated the global clinical impact of 16S PCR: In 2018, O'Donnell et al. found in a retrospective analysis that 16S PCR results modified patients care in 7 of 49 patients (14%); the antibiotic

treatments were narrowed in 5 patients and stopped in 2, particularly in those with neurosurgical samples [24]. In another small patient cohort, Akram et al. found in 2017 that 16S PCR results changed patients' treatments in 9/32 cases (28%); antibiotic therapies were narrowed in 5 cases and stopped in 2. [25].

Considering patients with cardiac valve samples, we found a clinical impact for 16% of the patients with positive 16S PCR results. Regarding every 16S PCR test, the clinical impact was limited to 8% cases. This result is consistent with those of two other studies where 16S PCR results modified patients' treatments in 10% [26] and 15% [27] of the patients in a prospective cohort of 127 patients and a retrospective cohort of 46 patients, respectively. Conversely, regarding bone and joint infections, we found that positive 16S PCR results greatly led to patients' treatment modifications in cases with positive synovial fluid (44%, 11/25), bone (43%, 6/14) and sonication fluid (40%, 4/10). Those may be explained by the frequent negativity of cultures in cases of bone and joint samples than in cases of intravascular infections, highlighting the importance of molecular analyses like the 16S PCR sequencing. Among the 16S PCR results, the clinical impact for synovial fluid, bone and sonication fluid samples were respectively 6%, 8% and 22% and higher than expected by a literature review from Saeed et al., where the 16S PCR results provided a microbiological diagnosis in 141/3840 culture-negative prosthetic joint infections (3.7%) [28]. With regard to abscesses, positive 16S PCR results had clinical impacts in 45% cases, even though this technique is theoretically limited when identifying bacteria from polymicrobial samples [29].

Considering only the positive 16S PCR results, we showed that the clinical impact was significantly superior for patients with CSF samples than for those with cardiac valve samples. This can be explained by the low rate of positive cultures and blood cultures in cases of meningitis and the high frequency of neurosurgical infections that can be tough to diagnose and can involve nosocomial pathogens. On the other side, an empirical antibiotic treatment is often started prior to surgery for endocarditis. The lower clinical impact of a 16S PCR-positive result for the management of endocarditis may also be related to the more frequent positivity of blood cultures before any surgical procedures. As a regional reference centre for cardiac surgery [30], we admit numerous patients who have had positive blood cultures in peripheral hospitals, but we performed 16S PCR tests systematically in our laboratory for patients with cardiac valves when the sample's cultures are negative despite previous documentation of infection.

As expected, we found that overall, changes in the patients' treatments were most frequent for patients with negative culture samples, and this may remain the first indication for 16S PCR tests considering the cost of this time-consuming analysis. This is particularly expected in patients pre-treated with empirical antibiotic therapies

or in cases of difficult to grow bacteria. More rarely, 16S PCR tests can be helpful even when blood or culture samples are positive to provide a more accurate species identification and to produce phylogenetic data.

We are aware of our study's limitations. This was a monocentric and retrospective study for which bacteriological data were limited to a specific hospital; thus, potentially relevant biases are unavoidable. Secondly, we did not calculate sensitivity, specificity or predictive positive and predictive negative values of our 16S PCR tests because the study design did not allow it. Our patients had a high probability of presenting bacterial infections, and we did not have a control group representing true negatives. In our laboratory, 16S PCR is currently performed in every cardiac valve with negative cultures when endocarditis is suspected, which may introduce a selection bias decreasing its clinical impact.

The 16S rDNA PCR test has several limitations itself. Even if using a broad range PCR, the primers are not universal; the choice in the primers and their degenerate oligonucleotides determines the sensitivity for different species [31]. Studies have described a possible persistence of bacterial DNA (especially in cases with previous endocarditis) that could lead to false-positive results [32, 33]. The test's interpretation should always consider concomitant clinical data. The analysis of chromatograms from polymicrobial infections can reveal itself difficult using Sanger's sequencing [29], and samples should always be collected from normally sterile sites only.

To conclude, 16S PCR is a useful tool for managing patients with infections, particularly when standard cultures are negative and for those with CSF samples, bone and joint infections or abscesses. This tool is probably cost-effective and clinically relevant if patients and samples are carefully selected.

### **Compliance with Ethical Standards**

#### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### **Informed consent**

According to the French legislation (Jardé law, N°2016-800), the non-opposition of all patients was sought.

#### **Ethical approval**

The Strasbourg Hospital Ethic Committee approved this study (reference FC/dossier 2019-27).

**References**

1. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ (1999) Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 115:462-474.  
<https://doi.org/10.1378/chest.115.2.462>
2. Lodise TP, Patel N, Kwa A, Graves J, Furuno JP, Graffunder E, Lomaestro B, McGregor JC (2007) Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3510-3515.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00338-07>
3. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y (2008) Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 14:908-934.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>
4. Rampini SK, Bloemberg GV, Keller PM, Buehler AC, Dollenmaier G, Speck RF, Böttger EC (2011) Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 53:1245-1251.  
<https://doi.org/10.1093/cid/cir692>
5. Cunha BA (2001) Antibiotic side effects. *Med Clin North Am* 85:149-185  
[https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(05\)70309-6](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(05)70309-6)
6. Talpaert MJ, Gopal Rao G, Cooper BS, Wade P (2011) Impact of guidelines and enhanced antibiotic stewardship on reducing broad-spectrum antibiotic usage and its effect on incidence of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 66:2168-2174.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkr253>
7. Garbee DD, Pierce SS, Manning J (2017) Opportunistic fungal infections in critical care units. *Crit Care Nurs Clin North Am* 29:67-79.  
<https://doi.org/10.1016/j.cnc.2016.09.011>
8. Gyssens IC (2011) Antibiotic policy. *Int J Antimicrob Agents* 38 Suppl:11-20.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.002>
9. Greub G, Lepidi H, Rovey C, Casalta J-P, Habib G, Collard F, Fournier P-E, Raoult D (2005) Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. *Am J Med* 118:230-238.  
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.12.014>
10. Voldstedlund M, Nørum Pedersen L, Baandrup U, Klaaborg KE, Fuursted K (2008) Broad-range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis. *APMIS* 116:190-198.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.00942.x>

11. Miller RJH, Chow B, Pillai D, Church D (2016) Development and evaluation of a novel fast broad-range 16S ribosomal DNA PCR and sequencing assay for diagnosis of bacterial infective endocarditis: multi-year experience in a large Canadian healthcare zone and a literature review. *BMC Infect Dis* 16:146.  
<https://doi.org/10.1186/s12879-016-1476-4>
12. Kommedal Ø, Wilhelmsen MT, Skrede S, Meisal R, Jakovljević A, Gaustad P, Hermansen NO, Vik-Mo E, Solheim O, Ambur OH, Sæbø Ø, Høstmælingen CT, Helland C (2014) Massive parallel sequencing provides new perspectives on bacterial brain abscesses. *J Clin Microbiol* 52:1990-1997.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00346-14>
13. Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AMD, van Zwet AA (2004) Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 42:734-740.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.734-740.2004>
14. Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D (2006) Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol* 44:1018-1028.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1018-1028.2006>
15. Gomez E, Cazanave C, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, Steckelberg JM, Uhl JR, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Osmon DR, Berbari EF, Mandrekar J, Patel R (2012) Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. *J Clin Microbiol* 50:3501-3508.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00834-12>
16. Insa R, Marín M, Martín A, Martín-Rabadán P, Alcalá L, Cercenado E, Calatayud L, Liñares J, Bouza E (2012) Systematic use of universal 16S rRNA gene polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for processing pleural effusions improves conventional culture techniques. *Medicine (Baltimore)* 91:103-110.  
<https://doi.org/10.1097/MD.0b013e31824dfdb0>
17. Joseph CR, Lalitha P, Sivaraman KR, Ramasamy K, Behera UC (2012) Real-time polymerase chain reaction in the diagnosis of acute postoperative endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 153:1031-1037.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2011.12.007>
18. Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271.  
<https://mbr.asm.org/content/51/2/221.long>
19. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R (2007) Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 357:654-663.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa061588>
20. Velay A, Schramm F, Gaudias J, Jaulhac B, Riegel P (2010) Culture with BACTEC Peds Plus bottle compared with conventional media for the detection of bacteria in tissue samples from orthopedic surgery. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68:83-85.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.04.010>

21. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 6:791.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
22. Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, Jaulhac B, Prévost G, Schramm F (2015) Implementation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative Staphylococci and reveals the pathogenic role of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* 53:2030-2036.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00177-15>
23. Meddeb M, Koebel C, Jaulhac B, Schramm F (2016) Comparison between a Broad-Range Real-Time and a Broad-Range End-Point PCR Assays for the detection of bacterial 16S rRNA in clinical samples. *Ann Clin Lab Sci* 46:18-25  
<http://www.annclinlabsci.org/content/46/1/18.long>
24. O'Donnell S, Gaughan L, Skally M, Baker Z, O'Connell K, Smyth E, Fitzpatrick F, Humphreys H (2018) The potential contribution of 16S ribosomal RNA polymerase chain reaction to antimicrobial stewardship in culture-negative infection. *J Hosp Infect* 99:148-152.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.08.016>
25. Akram A, Maley M, Gosbell I, Nguyen T, Chavada R (2017) Utility of 16S rRNA PCR performed on clinical specimens in patient management. *Int J Infect Dis* 57:144-149.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.02.006>
26. Peeters B, Herijgers P, Beuselinck K, Verhaegen J, Peetermans WE, Herregods M-C, Desmet S, Lagrou K (2017) Added diagnostic value and impact on antimicrobial therapy of 16S rRNA PCR and amplicon sequencing on resected heart valves in infective endocarditis: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* 23:888.e1-888.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.008>
27. Marsch G, Orszag P, Mashaqi B, Kuehn C, Haverich A (2015) Antibiotic therapy following polymerase chain reaction diagnosis of infective endocarditis: a single centre experience. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 20:589-593.  
<https://doi.org/10.1093/icvts/ivv006>
28. Saeed K, Ahmad-Saeed N (2015) The impact of PCR in the management of prosthetic joint infections. *Expert Rev Mol Diagn* 15:957-964.  
<https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1046437>
29. Kommedal O, Karlsen B, Saebo O (2008) Analysis of mixed sequencing chromatograms and its application in direct 16S rRNA gene sequencing of polymicrobial samples. *J Clin Microbiol* 46:3766-3771.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00213-08>
30. Ruch Y, Mazzucotelli J-P, Lefebvre F, Martin A, Lefebvre N, Douiri N, Riegel P, Hoang Minh T, Petit-Eisenmann H, Hansmann Y, Argemi X Impact of Setting up an 'Endocarditis Team' on the Management of Infective Endocarditis. *Open Forum Infect Dis*.  
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofz308>

31. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 74:2461–2470.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
32. Branger S, Casalta JP, Habib G, Collard F, Raoult D (2003) *Streptococcus pneumoniae* endocarditis: persistence of DNA on heart valve material 7 years after infectious episode. *J Clin Microbiol* 41:4435–4437.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4435-4437.2003>
33. Lang S, Watkin RW, Lambert PA, Littler WA, Elliott TSJ (2004) Detection of bacterial DNA in cardiac vegetations by PCR after the completion of antimicrobial treatment for endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 10:579–581.  
<https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00821.x>

Table 1. Microbiological characteristics of the population

| Sample's culture   | +                | +  | –  | –   | N/A | Total |      |
|--------------------|------------------|----|----|-----|-----|-------|------|
| Direct examination | +                | –  | +  | –   | N/A |       |      |
| 16S PCR            | +                | +  | +  | +   | –   |       |      |
| Samples            | Cardiac valve    | 7  | 7  | 19  | 47  | 93    | 173  |
|                    | Abscess          | 2  | 8  | 2   | 17  | 42    | 71   |
|                    | Bone sample      | 2  | 4  | 0   | 8   | 66    | 80   |
|                    | Soft tissue      | 3  | 2  | 0   | 6   | 56    | 67*  |
|                    | Synovial fluid   | 2  | 9  | 2   | 11  | 154   | 178  |
|                    | CSF              | 2  | 1  | 5   | 5   | 106   | 119  |
|                    | Pleural fluid    | 1  | 0  | 1   | 3   | 22    | 27   |
|                    | Sonication fluid | 1  | 6  | 2   | 1   | 8     | 18   |
|                    | Aqueous humour   | 0  | 2  | 1   | 2   | 52    | 57   |
|                    | Other            | 0  | 0  | 0   | 0   | 16    | 16** |
| Total              | 20               | 39 | 32 | 100 | 615 | 806   |      |

\* 23 cerebral biopsies, 15 synovial biopsies, 13 lymph nodes, 3 bone marrows, 4 skin biopsies, 2 vascular biopsies, 1 bladder, 1 oesophageal, 1 hepatic, 1 muscular, 1 subcutaneous, 1 pericardial and 1 ventricular biopsy

\*\* 12 EDTA blood, 2 pericardial fluids, 1 ascitic fluid and 1 peritoneal dialysate samples

Table 2. Efficiency of a positive 16S PCR on the patient's management regarding samples analysed

| Type of sample       | Positive 16S PCR | Clinical impact | Clinical impact (%) | p-value |
|----------------------|------------------|-----------------|---------------------|---------|
| <b>Cardiac valve</b> | <b>80</b>        | <b>13</b>       | <b>16*</b>          | 0.002   |
| Abscess              | 29               | 13              | 45                  |         |
| Bone sample          | 14               | 6               | 43                  |         |
| Soft tissue          | 10               | 2               | 20                  |         |
| Synovial fluid       | 25               | 11              | 44                  |         |
| <b>CSF</b>           | <b>13</b>        | <b>8</b>        | <b>62*</b>          |         |
| Pleural fluid        | 5                | 3               | 60                  |         |
| Sonication fluid     | 10               | 4               | 40                  |         |
| Aqueous humour       | 5                | 2               | 40                  |         |
| Total                | 191              | 62              | 32                  |         |

\*Significant pairwise comparison ( $p = 0.044$ )

Table 3. Efficiency of a 16S PCR on the patient's management regarding samples analysed

| Type of sample   | 16S PCR | Clinical impact | Clinical impact (%) | p-value |
|------------------|---------|-----------------|---------------------|---------|
| Cardiac valve    | 173     | 13              | 8                   | 0.078   |
| Abscess          | 91      | 13              | 14                  |         |
| Bone sample      | 80      | 6               | 8                   |         |
| Soft tissue      | 67      | 2               | 3                   |         |
| Synovial fluid   | 178     | 11              | 6                   |         |
| CSF              | 119     | 8               | 7                   |         |
| Pleural fluid    | 27      | 3               | 11                  |         |
| Sonication fluid | 18      | 4               | 22                  |         |
| Aqueous humour   | 57      | 2               | 4                   |         |
| Other            | 16      | 0               | 0                   |         |
| Total            | 806     | 62              | 8                   | -       |

Table 4. Clinical impact regarding bacteria identified by 16S PCR

| Type of bacterium | Identified by 16S PCR | Clinical impact | Clinical impact (%) |
|-------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|
| Common Gram +     | 125                   | 29              | 23                  |
| Common Gram -     | 18                    | 8               | 44                  |
| Anaerobe          | 39                    | 16              | 41                  |
| Fastidious*       | 21                    | 12              | 57                  |
| Total             | 203                   | 65              | 32                  |

\*containing 9 group HACEK bacteria, 1 *Bartonella* sp., 1 *Bordetella holmesii*, 2 *Nocardia* spp., 1 *Mycobacterium genavense*, 1 *Mycobacterium leprae*, 1 *Neisseria gonorrhoeae*, 2 *Tropheryma whippelli*, 2 *Mycoplasma salivarium* and 1 *Francisella tularensis*

Table S1 Management of discordant positive results between 16S PCR and culture

| Type of analysis  | Type of discordance           | Details   |
|---|-------------------------------|---|
| Positive sample culture (22)  | More pathogen identified (10) | <b>Result of 16S PCR considered (1)</b>                     |
|   |                               | Result of sample culture considered (6)                     |
|   |                               | 16S PCR considered as a contamination (1)                   |
|   |                               | Sample culture considered as a contamination (2)            |
|   | Different pathogens (11)      | 16S PCR considered as a contamination (4)                   |
|   |                               | <b>Sample culture considered as a contamination (4)</b>     |
|   |                               | <b>Results of sample culture and 16S PCR considered (2)</b> |
|   |                               | Much closed bacteria identified (1)                         |
| <b>More pathogen identified by culture but better identification with 16S PCR (1)</b> |                               |   |
| Positive blood cultures (16)  | More pathogen identified (4)  | <b>Result of 16S PCR considered (1)</b>                     |
|   |                               | Result of blood cultures considered (1)                     |
|   |                               | Blood cultures considered as a contamination (2)            |
|   | Different pathogens (12)      | 16S PCR considered as a contamination (4)                   |
|   |                               | <b>Blood cultures considered as a contamination (3)</b>     |
|   |                               | <b>Identification was more precise with 16S PCR (2)</b>     |
|   |                               | <b>Results of blood cultures and 16S PCR considered (1)</b> |
|   |                               | Much closed bacteria identified (2)                         |

Situations where 16S PCR was clinically relevant are in **bold text**

## 5.2 Annexe 2 : Liste des bactéries identifiées par PCR 16S

|  |   |   |
|--|---|---|
| Bactéries communes à Gram + (125)      | <i>Staphylococcus spp</i> (36)              | <i>Staphylococcus aureus</i> (20)         |
|  |   | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> (4)     |
|  |   | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (8)     |
|  |   | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (1)    |
|  |   | <i>Staphylococcus sp</i> (2)              |
|  |   | Staphylocoque à coagulase négative (1)    |
|  | <i>Streptococcus spp</i> et apparentés (78) | <i>Streptococcus gallolyticus</i> (16)    |
|  |   | <i>Streptococcus mitis/oralis</i> (13)    |
|  |   | <i>Streptococcus agalactiae</i> (10)      |
|  |   | <i>Streptococcus pneumoniae</i> (6)       |
|  |   | <i>Streptococcus anginosus</i> (5)        |
|  |   | <i>Streptococcus intermedius</i> (4)      |
|  |   | <i>Streptococcus pyogenes</i> (4)         |
|  |   | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (3)     |
|  |   | <i>Streptococcus gordonii</i> (2)         |
|  |   | <i>Streptococcus mutans</i> (2)           |
|  |   | <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> (1) |
|  |   | <i>Streptococcus canis</i> (1)            |
|  |   | <i>Streptococcus infantarius</i> (1)      |
|  |   | <i>Streptococcus pasteurianus</i> (1)     |
|  |   | <i>Streptococcus sinensis</i> (1)         |
|  |   | <i>Streptococcus tigurinus</i> (1)        |
|  |   | <i>Granulicatella adiacens</i> (4)        |
|  | <i>Granulicatella elegans</i> (1)           |   |
|  | <i>Gemella haemolysans</i> (1)              |   |
|  | <i>Gemella morbillorum</i> (1)              |   |
|  | <i>Enterococcus spp</i> (7)                 | <i>Enterococcus faecalis</i> (6)          |
|  |   | <i>Enterococcus sp</i> (1)                |
|  | Bacilles à Gram + (4)                       | <i>Rothia aeria</i> (1)                   |
|  |   | <i>Corynebacterium amycolatum</i> (1)     |
|  |   | <i>Corynebacterium simulans</i> (1)       |
|  |   | <i>Corynebacterium sp</i> (1)             |
|  | Anaérobies (39)                             | <i>Cutibacterium acnes</i> (14)           |
| <i>Cutibacterium granulosum</i> (2)    |   |   |
| <i>Cutibacterium avidum</i> (1)        |   |   |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> (5)     |   |   |
| <i>Fusobacterium sp</i> (1)            |   |   |
| <i>Parvimonas micra</i> (2)            |   |   |
| <i>Parvimonas sp</i> (2)               |   |   |
| <i>Peptoniphilus harei</i> (2)         |   |   |
| <i>Peptoniphilus sp</i> (1)            |   |   |
| <i>Clostridium perfringens</i> (2)     |   |   |
| <i>Flavonifactor plautii</i> (2)       |   |   |
| <i>Peptostreptococcus stomatis</i> (1) |   |   |
| <i>Peptostreptococcus sp</i> (1)       |   |   |
| <i>Atopobium rima</i> (1)              |   |   |
| <i>Fingoldia magna</i> (1)             |   |   |
| <i>Jonquetella anthropi</i> (1)        |   |   |
| Bactéries difficiles à cultiver (21)   |   | <i>Kingella kingae</i> (8)                |
|  |   | <i>Tropheryma whipplei</i> (2)            |
|  |   | <i>Nocardia sp</i> (2)                    |
|  |   | <i>Mycoplasma salivarium</i> (2)          |
|  | <i>Aggregatibacter aphrophilus</i> (1)      |   |
|  | <i>Bartonella sp</i> (1)                    |   |
|  | <i>Bordetella holmesii</i> (1)              |   |
|  | <i>Mycobacterium genavense</i> (1)          |   |
|  | <i>Mycobacterium leprae</i> (1)             |   |
|  | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (1)            |   |
|  | <i>Francisella tularensis</i> (1)           |   |
|  | Bactéries communes à Gram - (18)            | <i>Escherichia coli</i> (3)               |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (2)     |   |   |
| <i>Acinetobacter sp</i> (1)            |   |   |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (2)        |   |   |
| <i>Moraxella osloensis</i> (2)         |   |   |
| <i>Morganella morganii</i> (2)         |   |   |
| <i>Citrobacter koseri</i> (1)          |   |   |
| <i>Citrobacter sp</i> (1)              |   |   |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> (1)          |   |   |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)       |   |   |
| <i>Proteus vulgaris</i> (1)            |   |   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)      |   |   |

Université

de Strasbourg

Faculté  
de médecine**DECLARATION SUR L'HONNEUR**

**Document avec signature originale devant être joint :**  
 - à votre mémoire de D.E.S.  
 - à votre dossier de demande de soutenance de thèse

Nom : Ursenbach

Prénom : Axel

Ayant été informé(e) qu'en m'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans mon propre mémoire de spécialité ou dans mon mémoire de thèse de docteur en médecine, je me rendrais coupable d'un délit de contrefaçon au sens de l'article L335-1 et suivants du code de la propriété intellectuelle et que ce délit était constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics,

Ayant été avisé(e) que le président de l'université sera informé de cette tentative de fraude ou de plagiat, afin qu'il saisisse la juridiction disciplinaire compétente,

Ayant été informé(e) qu'en cas de plagiat, la soutenance du mémoire de spécialité et/ou de la thèse de médecine sera alors automatiquement annulée, dans l'attente de la décision que prendra la juridiction disciplinaire de l'université

J'atteste sur l'honneur

Ne pas avoir reproduit dans mes documents tout ou partie d'œuvre(s) déjà existante(s), à l'exception de quelques brèves citations dans le texte, mises entre guillemets et référencées dans la bibliographie de mon mémoire.

**A écrire à la main** : « J'atteste sur l'honneur avoir connaissance des suites disciplinaires ou pénales que j'encours en cas de déclaration erronée ou incomplète ».

*J'atteste sur l'honneur avoir connaissance des suites disciplinaires ou pénales que j'encours en cas de déclaration erronée ou incomplète.*

Signature originale :

A Strasbourg, le 11/06/2019

**Photocopie de cette déclaration devant être annexée en dernière page de votre mémoire de D.E.S. ou de Thèse.**

---

**RESUME :**

Un diagnostic microbiologique est fondamental pour adapter l'antibiothérapie des patients à la fois pour augmenter les chances de guérison, réduire les effets secondaires et la sélection de bactéries multirésistantes, ce qui est un enjeu actuel de santé publique. La culture standard a des limites et une méthode de biologie moléculaire, la PCR 16S, est une alternative intéressante. Notre étude incluait rétrospectivement 806 PCR 16S. Les résultats confirmaient l'intérêt de cet examen pour la prise en charge des patients suspectés d'infection bactérienne sur différents types de prélèvements habituellement stériles. Cette technique ne semblait pas plus rentable en ce qui concerne l'impact clinique sur l'un ou l'autre des différents types d'échantillons, même si elle semblait plus intéressante sur les liquides de sonication de prothèse. Une PCR 16S positive avait en revanche un impact clinique significativement plus fréquent pour les méningites que pour les endocardites (62% versus 16%,  $p < 0.001$ ). La prise en charge des patients était plus fréquemment modifiée quand une bactérie à croissance difficile était identifiée par la PCR 16S, quand les hémocultures étaient négatives, et surtout quand la culture standard ne permettait pas de diagnostic microbiologique. La PCR 16S pouvait tout de même s'avérer utile quand une bactérie était identifiée par hémoculture ou par culture de l'échantillon. Elle permettait en cas de résultat discordant de mettre en évidence une contamination ou d'identifier plus précisément un pathogène. En cas d'antibiothérapie préalable au prélèvement, la PCR 16S avait un intérêt diagnostique au vu de la fréquence des cultures négatives. Dans un avenir proche, les techniques de séquençage à haut débit devraient considérablement modifier les pratiques de diagnostic moléculaire et remplacer dans certaines situations la PCR 16S, en apportant des informations plus larges que la simple identification microbiologique comme les profils de résistance aux antibiotiques, la présence d'éléments génétiques mobiles ou encore de facteurs de virulence.

---

**Rubrique de classement**

Médecine interne

---

**Mots-clés :**

PCR 16S, impact clinique, antibiothérapie

---

**Président :**

Pr Yves HANSMANN

**Assesseurs :**

Dr Xavier ARGEMI, directeur

Dr Frédéric SCHRAMM

Pr Emmanuel ANDRES

---

**Adresse de l'auteur :**

Axel URSENBACH  
12 rue du commissaire divisionnaire Becker  
67100 STRASBOURG