
ISOLATS

Première partie : PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ETUDE DES ISOLATS

Globalement, on peut les diviser en deux grands groupes :

- Celles fondées sur le phénotype ;
- Celles fondées sur le génotype.

Les premières ont été disponibles plus précocement que les secondes.

A - ETUDE DU PHENOTYPE

Ces méthodes font appel à divers caractères, différents selon la nature de l'agent (bactérie, virus, etc.), et aboutissent à plusieurs niveaux de précision : espèce, biotype, sérotype, lysotype, etc.

1. MORPHOLOGIE

Elle est très utilisée pour la classification *préliminaire* des différents groupes de micro-organismes.

Exemples :

- Bactéries : coques/bacilles ;
spore +/-, déformante ou non ;
Gram +/Gram - ;
- Virus : symétrie cubique/hélicoïdale/complexe ;
enveloppe +/-

2. CARACTERES CULTURAUX

Ils sont également mis à profit pour la caractérisation des isolats.

Exemples :

- Bactéries : croissance sur milieux « ordinaires » et/ou « spéciaux » ;
pouvoir hémolytique ;
température(s) de croissance ;
- Virus : type(s) de substrats cellulaires ;
température(s) et atmosphère de croissance ;
effet cytopathique.

3. CARACTERES BIOCHIMIQUES

Ils sont très utilisés dans le cas des bactéries douées de métabolisme propre ; ils permettent classiquement, selon les éléments étudiés, de définir des caractères de famille, de genre, d'espèce et même de type.

Exemples:

- *Caractères de famille* : ceux définissant, avec les caractères morphologiques et culturels, la famille des Enterobacteriaceae ;
- *Caractères de genre* : différenciation des genres au sein des Enterobacteriaceae (Escherichia, Salmonella, Yersinia, etc.) ;
- *Caractères d'espèce* : différentes espèces de Yersinia ;
- *Caractères de type* : « chimiotypes » ou « chémotypes » : différents chimiotypes de Brucella.

4. CARACTERES ANTIGENIQUES

Ils sont exploités pour la différenciation de genres, d'espèces et de types, selon les antigènes auxquels on s'intéresse.

Le plus souvent, les antigènes internes sont spécifiques de famille ou de genre, alors que les antigènes les plus exposés à la surface du micro-organisme permettent de définir des espèces ou des types (sérovirs ou sérotypes).

Exemples :

- *Bactéries* : antigènes O (somatiques = antigènes des chaînes polysaccharidiques du LPS de la paroi permettant de définir l'appartenance à un groupe) ; antigènes H (flagellaires) : permettant la différenciation de plus de 5 000 sérovirs au sein de la sous-espèce Salmonella enterica enterica ;
- *Virus* : antigène VP2 de la capside externe : 9 sérotypes du virus de la peste équine.

5. CARACTERES LYSOTYPIQUES

Leur détermination est basée sur l'étude de la sensibilité ou non des bactéries à l'action lytique de bactériophages. En raison de la spécificité souvent stricte entre une bactérie et un bactériophage donnés, ces caractères servent en général à différencier des types (lysotypes).

Exemples :

Lysotypes de Brucella melitensis, Brucella abortus, etc.

6. CARACTERES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Ils sont très utiles comme éléments de traçabilité de la diffusion de certaines souches bactériennes, lorsque la résistance aux antibiotiques considérés est un élément peu fréquent dans l'espèce bactérienne en cause.

Exemple :

Souches de Mycobacterium bovis multirésistantes aux anti-tuberculeux majeurs.

B. ETUDE DU GENOTYPE

De très nombreuses méthodes d'étude moléculaire des isolats se sont développées et continuent de se développer, permettant une différenciation de plus en plus fine des isolats à des fins épidémiologiques ou d'expertise. Elles sont basées sur l'étude directe de l'ADN ou de l'ARN génomique.

Les plus utilisées sont brièvement décrites ci-dessous.

❑ Etude des profils électrophorétiques de restriction du génome

Il s'agit d'une méthode consistant à hydrolyser (ou digérer, par abus de langage) le génome par une **enzyme de restriction**¹ puis à séparer les différents segments obtenus en fonction de leur masse moléculaire, par migration sur un gel d'agarose.

L'ensemble des fragments de restriction obtenus à partir d'un génome digéré définit un profil de restriction. Pour étudier et comparer les profils de restriction d'isolats différents, on peut utiliser deux grandes techniques en fonction de l'emploi ou non d'une sonde² spécifique.

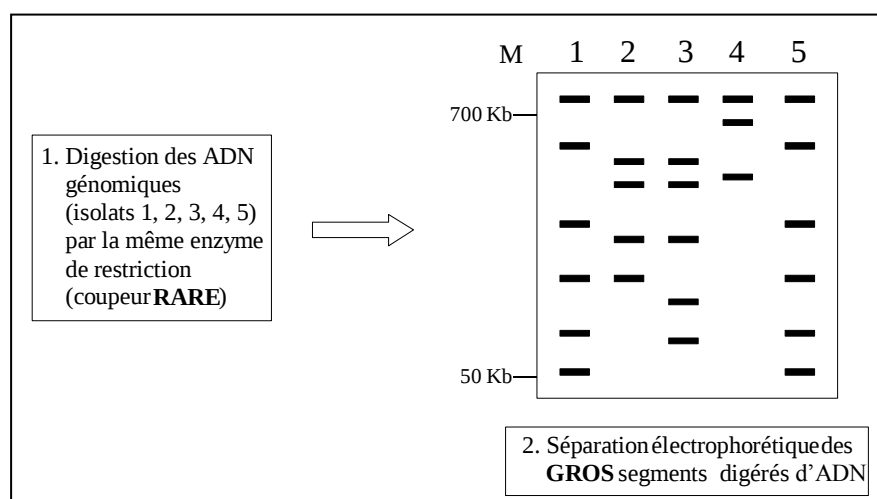
- *Sans utilisation d'une sonde spécifique* : **électrophorèse en champ pulsé** (figure Isolats.1) : dans ce cas, on utilise une enzyme de restriction qui coupe les génomes à étudier à un petit nombre d'endroits, de façon à obtenir des segments d'ADN de grande taille (> 50 Kb). Les **fragments de restriction** sont alors directement visualisables, après migration à l'aide d'un appareil spécial, appelé appareil à champ pulsé. Cette technique est appliquée à de très nombreux agents en bactériologie et en virologie.

Figure Isolats.1

Electrophorèse en champ pulsé

D'après les profils électrophorétiques obtenus, on peut distinguer les isolats 1 et 5 (non différenciables entre eux, tout au moins avec l'enzyme utilisée) des isolats 2, 3 et 4, eux-mêmes différenciables entre eux.

M = marqueur de poids moléculaire (ici : 50 Kb à 700 Kb). Il est important de remarquer la grande différence d'échelle entre les segments de restriction obtenus par les deux techniques (figures Isolats.1 et 2).



- *Avec utilisation d'une sonde spécifique* : ex. : **RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism** (ou étude du polymorphisme des fragments de restriction) (figure Isolats.2).

Cette technique consiste à :

- Couper le génome avec une enzyme de restriction qui le coupe à un grand nombre d'endroits ;

¹ Enzymes de restriction : enzymes coupant spécifiquement les deux brins d'ADN à l'endroit d'une séquence parfaitement définie de bases (quatre à huit bases en général). On les appelle aussi « ciseaux moléculaires ».

² Sonde : séquence d'acide nucléique, souvent oligonucléotidique (d'au moins 15 nucléotides), homologue de la séquence d'ADN ou d'ARN à laquelle elle s'hybride de façon stable et spécifique, par réassociation des bases complémentaires. La finalité de l'utilisation d'une sonde est de révéler la présence d'une telle séquence complémentaire sur l'acide nucléique étudié.

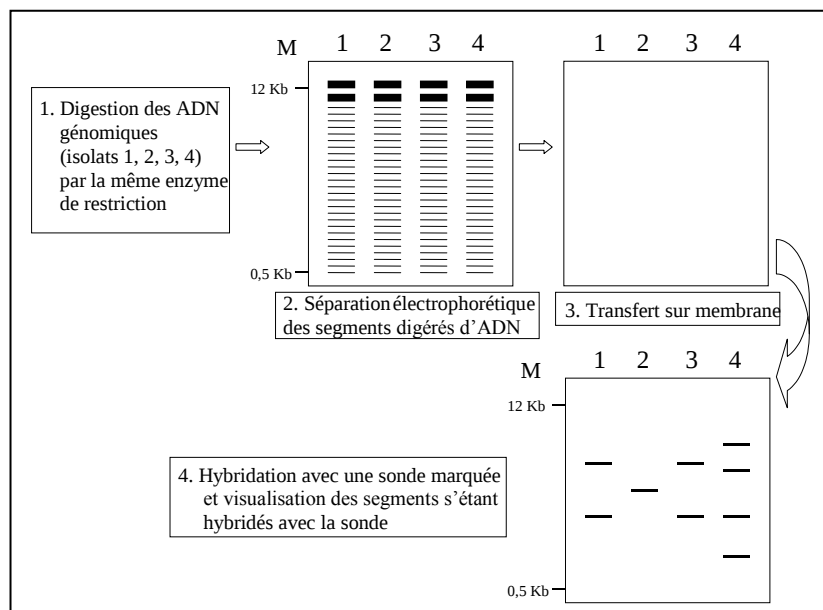
- Puis à différencier les isolats en fonction de la capacité d'un ou de plusieurs de ces fragments à **s'hybrider**³ spécifiquement avec une sonde de séquence connue.

Figure Isolats.2

Etude du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP)

Avec la sonde utilisée, on peut distinguer les isolats 1 et 3 (non différenciables entre eux, tout au moins avec la sonde utilisée) de l'isolat 2 et de l'isolat 4, eux-mêmes différenciables entre eux.

M = marqueur de poids moléculaire (ici : 0,5 Kb à 12 Kb). Remarquer la grande différence d'échelle entre les segments de restriction obtenus à l'aide des deux techniques (figures Isolats.1 et.2).



Cet artifice est nécessaire, car à partir d'un génome, les bandes obtenues sont trop nombreuses et trop denses pour permettre de distinguer aisément les différences de profil électrophorétique entre deux isolats.

Les souches sont donc différenciées en fonction :

- De la présence ou non d'une hybridation avec la sonde ;
- Du nombre et de la taille des segments hybridés, porteurs de la séquence reconnue par la sonde.

Cette technique a connu un très grand nombre d'applications et de très nombreux exemples pourraient être cités.

□ Amplification spécifique de certaines régions ou segments polymorphes

La démarche consiste à amplifier par **PCR**⁴ un segment du génome afin de mettre en évidence, en fonction des isolats :

³ Hybridation : capacité de deux brins d'acide nucléique monocaténares (simple brin) à s'associer en un complexe bicaténaire (double brin). Cette capacité dépend de deux facteurs principaux :
de leur degré d'homologie, c'est-à-dire de la complémentarité de leurs bases (A-T et G-C) ;
des conditions d'hybridation, qui doivent en principe être assez sévères (« stringentes ») pour ne pas occasionner d'hybridation entre deux brins disparates.

⁴ PCR (Polymerase Chain Reaction) : amplification élective d'une séquence d'ADN double brin à l'aide de deux amorces situées aux deux extrémités de cette séquence et d'une polymérase. La répétition des cycles d'amplification (dénaturation/hybridation/extension) permet une duplication exponentielle de cet ADN double brin.

- Sa présence ou son absence ;
- Un polymorphisme de ce segment (c'est-à-dire des variations de séquence et/ou de taille).

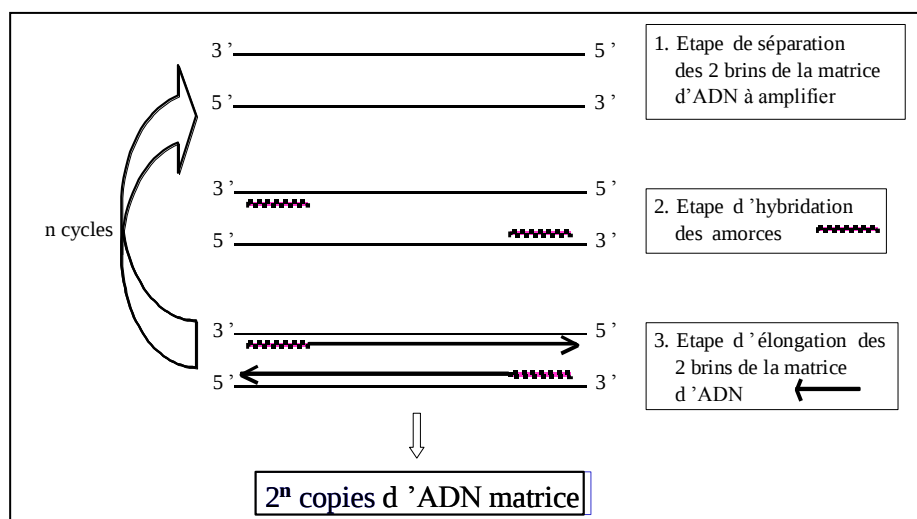
Il y a donc obligatoirement deux étapes successives :

- La PCR (figure Isolats.3) ;
- La mise en évidence et/ou l'analyse de la séquence amplifiée. Cette seconde étape peut faire appel à plusieurs techniques selon le but recherché (avec dans tous les cas de nombreuses applications en bactériologie et en virologie):
 - l'électrophorèse des produits d'amplification ;
 - l'hybridation des produits d'amplification à une ou des sonde(s) supposée(s) homologue(s). Dans l'avenir, la technologie des puces à ADN, qui correspond à une miniaturisation de la technique d'hybridation, devrait permettre d'analyser en même temps de très nombreuses séquences (potentiellement tout le génome) ;
 - le séquençage des produits d'amplification.

Selon la séquence cible, les résultats permettent d'affilier l'isolat testé à une famille, un genre, une espèce ou un type de micro-organisme, comme le montrent les exemples ci-dessous, pris dans le monde bactérien.

Figure Isolats.3

Représentation schématique du principe de l'amplification en chaîne d'une séquence d'ADN (PCR)



Exemples :

- Gènes codant pour l'ARN 16s (zones conservées) : affiliation à une famille ou un genre ;
- Gènes codant pour la protéine de stress HSP 65 : affiliation à une espèce ;
- Gènes codant pour certaines séquences d'insertion (IS), pour les zones variables (ITS) de l'ARN 16s, pour des petites séquences répétitives comme les VNTR (Variable Number Tandem Repeats) : affiliation à un génotype.

En virologie, la détermination de la séquence génétique des produits d'amplification est la méthode la plus fréquemment utilisée. Des méthodes d'amplification et de séquençage de la totalité du génome (séquençage haut débit de plusieurs milliers de nucléotides en une seule fois) sont actuellement en cours de développement (exemple : séquençage de la totalité du génome des isolats du virus de la fièvre aphteuse lors de l'épisode de 2007 en Angleterre).

❑ Amplification aléatoire de séquences génomiques = RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)

Dans ce cas, plusieurs couples d'amorces⁵ de courte taille sont testés, dans des conditions de faible stringence⁶.

Les amorces s'hybrident alors à des séquences variables et de manière aléatoire. Des différences de profil d'amplification entre des génomes proches indiquent un polymorphisme, d'où l'utilisation possible pour le génotypage.

Cette technique a été très utilisée pendant quelques années, mais elle pose de gros problèmes de reproductibilité et de transférabilité d'un laboratoire à l'autre. Elle tend donc actuellement à être délaissée.

Deuxième partie :

L'INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'ETUDE DES ISOLATS

1. LES QUESTIONS

Globalement, en présence d'un nouvel isolat, les questions posées peuvent appartenir à l'une ou l'autre de deux grandes catégories.

➤ **Première catégorie** : il s'agit de situer le nouvel isolat au sein des isolats de la même espèce pathogène. En effet, pour beaucoup d'espèces d'agents pathogènes, les centres de référence disposent à l'heure actuelle de banques de données où sont conservées les caractéristiques d'isolats de provenances très diverses.

- Pour de nombreux agents pathogènes, on dispose de « *marqueurs de distribution spatiale* ». Ainsi pour le virus rabique, des techniques de biologie moléculaire permettent de caractériser l'origine géographique des isolats. Ceci permet de déterminer l'origine géographique vraisemblable d'un isolat donné : pour le cas de rage identifié sur un chien errant du département du Gard en 1998, il a été possible au centre de référence de l'Institut Pasteur de Paris de conclure que les caractéristiques de cet isolat étaient semblables à celles d'isolats habituellement rencontrés en Egypte.
- On dispose également, parfois de « *marqueurs temporels* ». En effet, les caractéristiques des isolats peuvent changer au cours du temps et un isolat peut alors être situé au cours de cette évolution. Parmi les exemples que l'on peut citer, il y a celui des isolats du virus grippal humain dont les caractéristiques de neuraminidase et d'hémagglutinine ont évolué au cours du temps :

à partir de 1918, il s'agissait de souches H₁N₁

à partir de 1957, de souches H₂N₂

à partir de 1968, de souches H₃N₂ et à partir de 1977, de souches H₁N₁

- Un autre type de marqueur peut correspondre à des « *marqueurs d'espèce zoologique* ». Ceux-ci permettent d'identifier l'espèce animale à l'origine de la contamination du cas ayant fourni l'isolat.

Ainsi, dans un pays où coexistent rage vulpine et rage canine, l'étude d'un isolat en provenance d'un chien permet de conclure à une contamination d'origine vulpine ou canine.

De même, l'étude d'un isolat de virus de la maladie d'Aujeszky provenant d'un chien permet de confirmer l'origine porcine ou sauvage (sanglier) de sa contamination.

⁵ Amorce (= primer) : courte séquence d'ADN ou d'ARN, complémentaire de l'extrémité d'un ADN simple brin, et servant de point de départ à son recopiage, dans le cadre d'une PCR.

⁶ Stringence : sévérité des conditions d'hybridation, qui contribue à garantir la spécificité de l'hybridation entre deux acides nucléiques simple brin.

➤ **Deuxième catégorie** : il s'agit cette fois de comparer deux (ou plusieurs) isolats, en vue de tenter d'établir un **lien épidémiologique** entre les sujets et/ou objets d'origine.

Exemples :

Isolats d'une même espèce pathogène chez un animal familial et son propriétaire atteint d'une zoonose ;

*Isolats de *Listeria monocytogenes* à partir de différentes personnes et d'un même aliment.*

Les questions rencontrées lors de l'étude de tels liens épidémiologiques (ou hypothèses de liens) en amont et en aval sont essentiellement :

- Peut-on affirmer que ces deux isolats **sont identiques** ?

Si oui, dans quelles conditions et sous quelles réserves ?

Si oui, quels types de conclusion de lien épidémiologique peut-on tirer entre les objets et sujets à l'origine des isolats considérés comme identiques ?

Quelle est la « fiabilité » de ces conclusions ?

- Quelles sont les conditions pour affirmer que deux isolats **sont différents** ?

Cette « différence » permet-elle d'exclure l'existence d'un lien épidémiologique entre les sujets et/ou objets d'origine ?

Quel est le degré de « changement » d'un isolat au sein d'un sujet ou d'un sujet à un autre ?

Les questions sont donc nombreuses et portent, en fait sur trois types de domaines :

- Les caractéristiques des « marqueurs » des isolats et leur changement (ou leur stabilité) au cours du temps ;
- Les caractéristiques des techniques d'étude des isolats, conditionnant la fiabilité de leurs performances ;
- Les conditions et précautions d'interprétation des résultats de l'étude des isolats.

2. UTILISATION DES REPONSES

L'utilisation des réponses de l'étude d'isolats par des laboratoires passe par le triple préalable de connaissance et d'analyse des données portant sur :

- Le(s) marqueur(s) étudié(s) et leurs changements ;
- La/les technique(s) d'analyse utilisée(s) ;
- Les conditions et précautions d'interprétation des résultats.

2.1. CARACTERISTIQUES DU MARQUEUR ETUDIE

La stabilité du marqueur étudié est tributaire :

- De la stabilité de l'expression du caractère, dans le cas de l'étude du phénotype.

Exemple :

*Expression irrégulière in vitro des antigènes K99 chez certains *E. coli* entéropathogènes du veau, du fait de l'expression irrégulière des gènes responsables de la production des pili porteurs de ces antigènes ;*

- De la stabilité de la zone correspondante du génome, en particulier lors de l'étude du génotype.

La stabilité du génome est très variable d'un agent pathogène à l'autre.

Certains agents pathogènes ont un génome doté d'une grande instabilité, conduisant à d'importantes variations, au point que l'on utilise l'expression de « quasi espèces » : il s'agit de divers virus à ARN comme ceux de la fièvre aphteuse, de l'artérite équine, de la grippe et de divers rétrovirus.

Au sein d'un même agent pathogène, la stabilité peut être très différente d'une région à l'autre du génome. Ainsi, par exemple, pour le virus de l'anémie infectieuse des équidés, l'antigène p26 utilisé pour le dépistage et le diagnostic sérologiques de cette maladie (test de Coggins) semble correspondre à une région très stable du génome puisque l'on ne connaît pas de différence de cet antigène d'un pays à un autre ni, pour une même souche, au cours du temps. En revanche, les régions codant pour les antigènes gp45 et gp90 font preuve d'une remarquable instabilité puisque ces antigènes subissent des variations au cours du temps chez une même souche :

les isolats obtenus chez un même cheval, au cours des crises successives, diffèrent par leurs antigènes gp45 et gp90.

Aucune conclusion de lien (ou d'absence de lien) épidémiologique ne peut donc être tirée, en l'absence d'une connaissance précise sur la stabilité (ou l'instabilité) du marqueur étudié.

2.2. CARACTERISTIQUES DE LA TECHNIQUE D'ANALYSE UTILISEE

Deux caractéristiques essentielles conditionnent la qualité de la technique d'analyse :

- La constance (ou l'inconstance) du résultat obtenu lors de répétition de la technique d'analyse sur le même isolat, dans les mêmes conditions ou dans des conditions variables ; les résultats obtenus lors de répétition de l'analyse dans des conditions strictement identiques correspondent à la **répétabilité** (*même lieu, même matériel, même manipulateur*) et ceux dans des conditions différentes (*autre lieu, autre matériel, autre manipulateur*) à la **reproductibilité** ;
- Le pouvoir de discrimination de la technique d'analyse ; le degré du pouvoir discriminant de la technique conditionne sa **sensibilité**, c'est-à-dire sa capacité à différencier des isolats différents (ou son incapacité à le faire : faux négatifs) et sa **spécificité**, c'est-à-dire sa capacité à ne pas différencier des isolats identiques (ou ses erreurs par excès : faux positifs).

Aucune conclusion de nature épidémiologique ne devrait être tirée sans connaître les niveaux de répétabilité, reproductibilité, sensibilité et spécificité de la technique utilisée.

2.3. CONDITIONS ET PRECAUTIONS D'INTERPRETATION DES RESULTATS

La difficulté et les risques découlant de l'interprétation des résultats d'étude d'isolats par rapport à des hypothèses de liens épidémiologiques varient en fonction de la conclusion du laboratoire.

- **Pour des isolats jugés « différents »**, dans la mesure où sont connues les caractéristiques du marqueur ainsi que celles de la technique d'analyse utilisée, et où la « distance » entre les deux isolats est jugée significative (c'est-à-dire supérieure à celle que l'on peut s'attendre à trouver pour une même « souche » ayant subi un petit nombre de passages chez différents sujets), il est possible d'exclure l'existence d'un lien épidémiologique direct, ou indirect court, entre les deux isolats.
- **Pour des isolats jugés « non distinguables »** par la/les technique(s) utilisée(s), le doute persiste quant à la réalité de la liaison épidémiologique proposée, pour différentes raisons. Et cette incertitude ne doit pas être oubliée.
 - En effet, à un moment donné de l'évolution des techniques, les outils disponibles peuvent ne pas être capables de différencier deux isolats réellement différents et non reliés entre eux au plan épidémiologique. L'incertitude peut être liée au nombre de caractères étudiés et ayant conduit à la conclusion que les deux isolats ne sont pas distinguables. En cas d'association de plusieurs techniques relatives à des caractères génétiquement indépendants, et de convergence des résultats concernant l'identité de chaque caractère étudié pour les deux isolats, la probabilité d'identité des isolats est fortement augmentée.
 - Deux isolats non distinguables peuvent ne pas être reliés épidémiologiquement. Un lien épidémiologique est défini par la situation sur la même chaîne de transmission. Or, des chaînes indépendantes de transmission d'isolats non distinguables peuvent coexister dans une même zone ou dans un même pays. La figure Isolats.4 en donne un exemple : deux isolats obtenus à la même période, dans une même zone, non distinguables par les techniques disponibles peuvent néanmoins appartenir à deux chaînes épidémiologiques indépendantes (chaînes 1 et 2 de la figure Ann.10.4).
 - Par ailleurs, au sein d'une même chaîne épidémiologique, le lien supposé peut être erroné (cf. figure Isolats.5). L'hypothèse peut être en effet l'existence d'un lien direct (situation 1), alors qu'il s'agit d'un lien indirect (situations 2 et 3 : maillon manquant, ou origine commune).
 - La probabilité de justesse de la conclusion en matière de lien épidémiologique est fonction du degré de diversité des isolats dans une zone géographique.

Soit deux agents pathogènes dont on a obtenu pour chacun 100 isolats pendant une période donnée et dans un territoire donné.

Pour le premier, la diversité des isolats est très grande : 98 isolats différents (n° 1 à 98) et deux isolats « non distinguables », n°s 99 et 100.

Pour le second, 50 isolats de type 1 et 50 isolats de type 2.

La probabilité d'un lien épidémiologique entre les deux isolats 99 et 100 du premier agent pathogène est plus élevée que celle de deux isolats donnés de type 1 (ou 2) du second agent pathogène.

Figure Isolats.4

**Représentation schématique de deux chaînes indépendantes
de transmission d'isolats non distinguables dans une même population**

Chaque rond correspond à un sujet ayant fourni un isolat

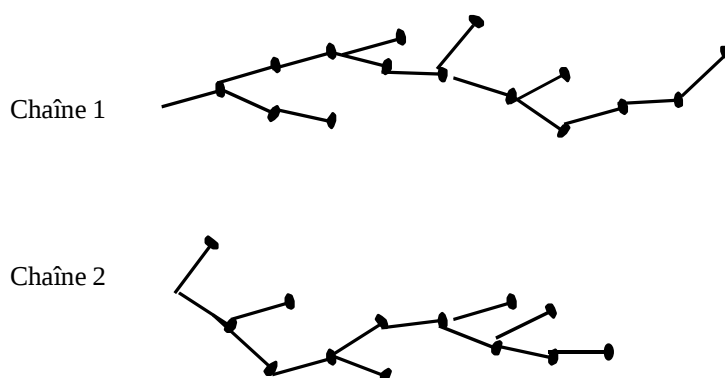
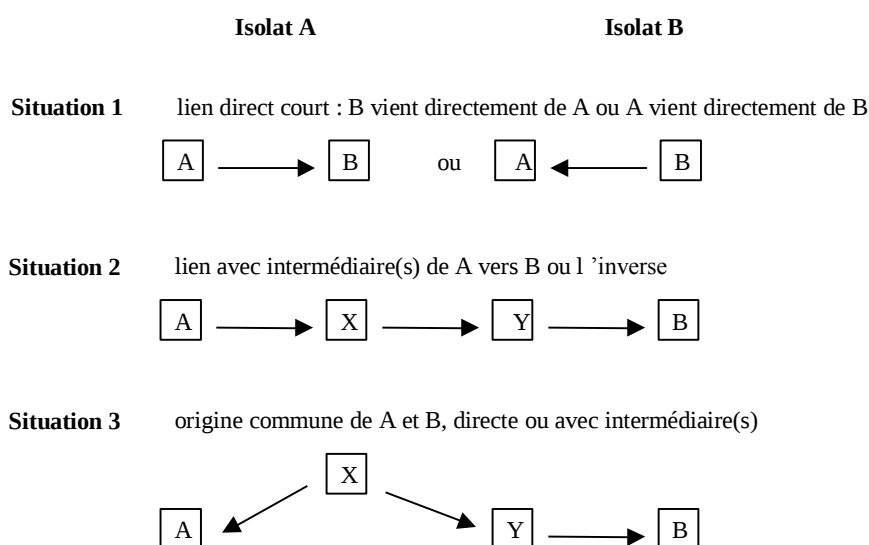


Figure Isolats.5

**Liens épidémiologiques possibles entre deux isolats non distinguables provenant de sujets (ou objets)
A et B appartenant à une même chaîne épidémiologique**



- Tout dépend également de la complexité (ou de la simplicité) du cheminement épidémiologique, c'est-à-dire si le cheminement est à ramifications multiples, successives (maladie contagieuse) (cf. figure Ann.10.6) ou au contraire du type anadémique ou anazootique avec parfois beaucoup de cas, mais en une seule étape (cf. figure Isolats.6).

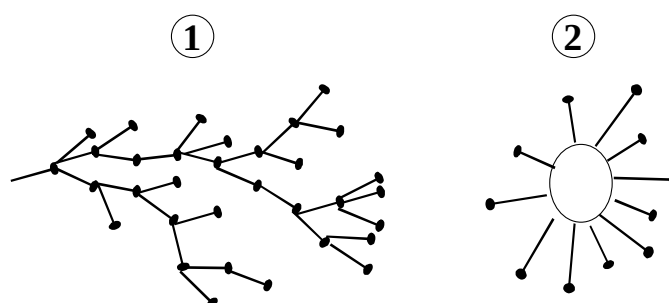
Pour une anadémie ou une anazootie, la question du lien épidémiologique est plus simple car ne reposant que sur un seul maillon.

Pour une maladie transmissible en série, la question est plus complexe.

Pour toutes ces raisons, les conclusions relatives à deux (ou plusieurs) isolats « non distinguables » devraient toujours rester prudentes dans le domaine des relations épidémiologiques et prendre en compte l'inévitable incertitude.

Figure Isolats.6

Représentation schématique d'un cheminement épidémiologique complexe (1) (maladie contagieuse) et d'un cheminement épidémiologique simple (2) (anadémie ou anazootie)



En résumé,

L'utilisation à des fins épidémiologiques de résultats de l'étude au laboratoire d'isolats :

- *Bénéficie grandement de la collaboration entre spécialistes de laboratoire et épidémiologistes ;*
- *Exige une prise en compte de la connaissance du(des) marqueur(s) étudié(s) et de la (des) technique(s) d'analyse employée(s) ;*
- *Doit rester prudente et faire apparaître l'incertitude inévitable pour toute hypothèse de lien épidémiologique :*

Isolats distinguables :

absence de lien épidémiologique direct, ou indirect court, entre les sources des deux isolats ;

Isolats non distinguables :

lien épidémiologique absent (chaînes différentes)

ou présent : direct

ou indirect

ou d'origine commune.

