

## MISE AU POINT

# Diagnostic des infections bactériennes par les puces à ADN

—E. Donatin<sup>1</sup>, M. Drancourt<sup>2</sup>

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UMR CNRS 6236 IRD 3R198, IFR 48 Institut Hospitalier Universitaire POLMIT, Université de la Méditerranée, Marseille, France

<sup>1</sup> PhD student, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UMR CNRS 6236 IRD 3R198, IFR 48 Institut Hospitalier Universitaire POLMIT, Université de la Méditerranée, Marseille, France. E-mail : emilie.donatin@gmail.com

<sup>2</sup> Unité des Rickettsies, Faculté de Médecine, 27, Boulevard Jean Moulin, cedex 5- France. E-mail: Michel.Drancourt@univmed.fr

**Résumé :** Le diagnostic des infections bactériennes repose sur l'isolement du pathogène, qui ne peut pas être réalisé dans le temps du soin. Egalement, la culture est mal adaptée au diagnostic des infections polymicrobiennes. Une alternative est la détection de séquences ADN spécifiques dans l'échantillon clinique par les puces à ADN. La première utilisation des puces à ADN en tant qu'outil diagnostique date de 1995. Cette revue porte sur la mise au point de différentes puces à ADN pour la détection des bactéries pathogènes au cours des infections respiratoires, digestives et systémiques. Ces études ont permis de montrer que les puces à ADN sont un outil fiable, rapide et reproductible pour le diagnostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Le coût et la technicité demeurent deux freins au déploiement en routine de cette technologie pour le diagnostic des infections bactériennes.

**Mots clés :** Infections bactérienne, diagnostic, puce ADN

## Diagnosis of bacterial infections by DNA microarray

**Abstract:** The diagnosis of bacterial infections relies on isolation of the pathogen, which cannot be achieved in the time of care. Also, culture is poorly suited to the diagnosis of polymicrobial infections. An alternative is the detection of specific DNA sequences in clinical specimen by DNA microarrays. The first use of microarrays as a diagnostic tool dates from 1995. This review focuses on the development of different DNA chips for diagnosing bacterial infections such as respiratory, digestive or systemic diseases. These studies demonstrated that DNA microarrays are a reliable, rapid and reproducible for the diagnosis of infectious diseases caused by bacteria. High cost and technicity are two limits for the actual use of DNA microarray for the routine diagnosis of bacterial infections.

**Keywords:** Bacterial infections, diagnosis, DNA microarray

## INTRODUCTION

Le diagnostic des infections bactériennes est essentiellement basé sur l'isolement du pathogène puis son identification et des tests de sensibilité aux antibiotiques. Cette approche du

diagnostic est limitée par le délai d'obtention d'une culture, parfois au-delà du temps du soin ; la présence de bactéries non-cultivables dans le prélèvement du fait de la présence d'inhibiteurs tels que les antibiotiques ou de conditions de culture inappropriées ; et par la capacité à isoler les unes des autres les différentes colonies d'un prélèvement polymicrobien. On estime qu'environ 75 % des espèces colonisant notre tube digestif ne peuvent pas être identifiées grâce à des techniques de culture [1]. Une évolution pour le diagnostic des maladies infectieuses est le développement d'outils de biologie moléculaire permettant la détection de séquences ADN spécifiques, notamment le gène 16S rDNA codant pour une sous-unité ribosomale [2, 3]. Cette détection peut reposer sur l'amplification de l'ADN par la technique polymérase chain reaction (PCR) suivie par l'hybridation d'une sonde oligonucléotidique fluorescente, dans la technique dite PCR-temps réel [4]. Alternativement, le produit d'amplification PCR peut être hybridé sur un support solide fixant un grand nombre de sondes oligonucléotidiques, dans la technique puce ADN qui est l'objet de cette revue. Les puces à ADN sont de plus en plus utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses puisqu'elles permettent une détection multiplexée. En effet, il est possible de cibler en même temps un très grand nombre de pathogènes

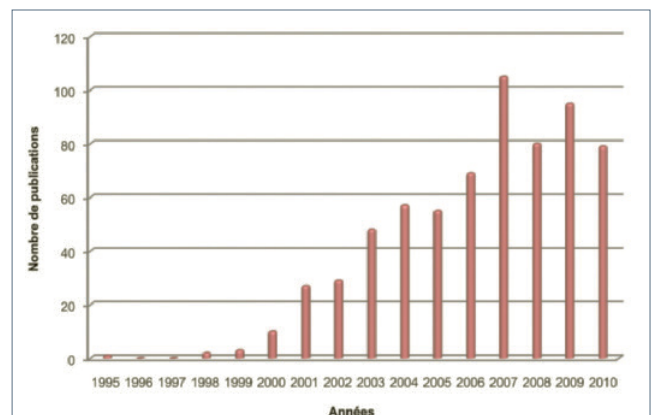


Figure 1 : Articles publiés concernant le sujet « DNA microarray and infectious diseases » dans la banque de donnée NCBI (Juin 2011).

différents ou même un nombre important de gènes. La recherche « DNA microarray » dans le moteur de recherche du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) donne plus de 54 000 références différentes (Juin 2011), témoignant de l'importance de cet outil de biologie moléculaire décrit pour la première fois en 1995 [5]. En ce qui concerne les publications sur les publications sur le sujet « les puces à ADN et les maladies infectieuses », le nombre de références est plus faible (619 publications, Juin 2011) mais ne cesse de progresser au fur et à mesure des années (figure 1).

#### LA TECHNOLOGIE DES PUCES À ADN

La technique de microarray est dérivée de celle du Southern blot dans laquelle le support nylon est remplacé par un support

solide en silicium ou une lame de verre, permettant la fixation covalente de plusieurs milliers de sondes oligonucléotidiques. Les sondes correspondent à des gènes d'identification des bactéries comme les gènes universels 16S rRNA [6] ou *rpoB* [7], ou des gènes d'identification spécifiques de genre ou d'espèce bactérienne pouvant coder la résistance à certains antibiotiques ou encore des gènes de toxines. La technique des puces ADN comporte l'extraction des acides nucléiques contenus dans l'échantillon. La méthode d'extraction ayant le meilleur rendement est l'extraction phénol-chloroforme qui est relativement longue mais qui permet d'obtenir des concentrations élevées en acides nucléiques, de l'ordre de plusieurs centaines de nanogrammes d'ADN par microlitre [8, 9, 10]. On peut également choisir d'utiliser des automates (tableau I) afin de réduire

**Tableau I : AUTOMATES POUVANT ÊTRE UTILISÉS POUR LES EXTRACTIONS D'ACIDES NUCLÉIQUES À PARTIR DE CELLULES BACTÉRIENNES (Barken KB et al. (2007)).**

Automates	Technologie d'extraction	Nbre d'échantillon	Temps d'extraction (min.)
<b>Extraction d'ADN</b>			
iPrep Purification Instrument (Invitrogen)	Les acides nucléiques sont couplés à des billes magnétiques utilisant la technologie « ChargSwitch® »	≤ 12	18
<b>Extraction d'ADN et d'ARN</b>			
ABI PRISM 6100 Nucleic acid PrepStation (Applied Biosystems)	Utilisation d'une membrane de silice/protocole d'élution utilisant un traitement sous vide	≤ 96	30
ABI PRISM 6700 Automated nucleic acid workstation (Applied Biosystems)	Utilisation d'une membrane de silice/protocole d'élution utilisant un traitement sous vide	≤ 96	90
X-Tractor Gene RNA/DNA Extraction System (Corbett Life Science)	Utilisation d'une membrane de silice/protocole d'élution utilisant un traitement sous vide	8-96	60
BioRobot EZ1 Workstation (QIAGEN)	Utilisation d'une membrane de silice/protocole d'élution utilisant des particules magnétiques	1-6	15-20
KingFisher ML/96 (Thermo Scientific)	Utilisation d'une membrane de silice/protocole d'élution utilisant des particules magnétiques	1-96	20-30
MagNa pure compact/LC (Roche Applied Science)	Utilisation d'une membrane de silice/protocole d'élution utilisant des particules magnétiques	1-32	15-40
Maxwell 16 Instrument (Promega)	Utilisation d'une membrane de silice/protocole d'élution utilisant des particules magnétiques	≤ 16	30
NucliSens miniMAG (BioMérieux)	Utilisation d'une membrane de silice/protocole d'élution utilisant des particules magnétiques	≤ 12	45
QIAcube (QIAGEN)	Utilisation d'une membrane de silice/protocole d'élution par centrifugation	≤ 12	~ 60

▷▷ le temps de l'extraction mais les quantités obtenues sont plus faibles que dans le cas de l'extraction phénol-chloroforme ( $\leq 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ). A partir de l'ADN extrait, il est possible de réaliser une étape d'amplification par PCR avant hybridation [11, 12, 13]. Les acides nucléiques purifiés contenus dans les échantillons à tester sont ensuite marqués avec les cyanines (Cy3 ou Cy5-dCTP) [14]. On utilise le marquage deux couleurs afin d'observer une différence de couleur entre un échantillon témoin marqué avec une couleur et un échantillon test marqué avec une deuxième couleur. Dans le cas du marquage monochrome, on ne peut tester qu'un seul échantillon par lame. Le marquage monochrome diminue le coût de la manipulation mais le marquage deux couleurs permet de réduire les variations expérimentales et donne une meilleure reproductibilité [15]. Les acides nucléiques marqués sont directement mis en contact avec les sondes au cours de l'hybridation, dont la durée varie de quelques heures à quelques jours en fonction de la taille des acides nucléiques. La température d'hybridation dépend de la composition en bases des sondes fixées sur la puce. Lorsqu'on fabrique une puce, on choisit une température d'hybridation quasiment égale pour toutes les sondes garantissant une hybridation spécifique entre les sondes et les acides nucléiques contenus dans l'échantillon à tester. La puce est ensuite scannée et l'image générée permet de mesurer les interactions spécifiques entre sondes et échantillons par une

émission de fluorescence traduite en données numériques via un logiciel adapté (figure 2). Le temps de manipulation va varier en fonction de 2 paramètres différents, à savoir la méthode d'extraction employée et le temps d'hybridation choisi. Entre ces 2 points cruciaux, le temps de manipulation n'excède pas les deux heures. Les puces à ADN ont souvent été reconnues comme un outil à haut débit, rapide, précis et reproductible [16, 17]. Actuellement, deux sociétés se sont intéressées à la technologie des puces à ADN : Agilent (<http://www.agilent.com>) et Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/estore/>). Ces sociétés proposent deux solutions, la production de « puces à façon », c'est-à-dire que le design de la puce est choisi par le demandeur et la société se contente de fixer les sondes sur la puce. La deuxième solution est la commercialisation de puces à ADN préfabriquées par la société. Agilent commercialise notamment une puce spécialisée pour l'étude d'*Escherichia coli*. Actuellement, il existe très peu de puces à ADN commercialisées pour le diagnostic des infections bactériennes. La société CapitalBio Corporation basée à Beijing en Chine (<http://www.capitalbio.com>), a mis au point une biopuce spécialisée dans l'identification de 17 souches de mycobactéries les plus fréquemment isolées dans les laboratoires. La société commercialise également une puce permettant d'étudier les résistances aux antibiotiques de ces souches.

### APPLICATION AU DIAGNOSTIC DES INFECTIONS RESPIRATOIRES

Les infections respiratoires figurent parmi les premières causes de consultation médicale et d'hospitalisation durant la saison hivernale [18]. Le diagnostic par puce ADN permet la détection simultanée de plusieurs pathogènes respiratoires. Une puce ADN ciblant les régions variables des gènes *gyrB* et *parE* de *Corynebacterium diphtheriae*, *Fusobacterium necrophorum*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* a été développée pour le diagnostic des infections respiratoires [19]. Pour chaque bactérie, trois sondes spécifiques d'une longueur variant entre 20 et 24 nucléotides ont été désignées. Un total de 65 échantillons d'oreille moyenne et 29 échantillons de gorge ont été analysés. Les résultats obtenus par la puce ADN ont été comparés à ceux obtenus par des techniques de culture. La sensibilité de détection était de 96 % pour *H. influenzae*, 73 % pour *M. catarrhalis* et 100 % pour *S. pneumoniae* par puce ADN et de 93 %, 93 % et 78 % respectivement par culture. La sensibilité de détection de *S. pyogenes* par la puce était de 93 % contre seulement 80 % dans le cas des techniques de culture. Aucune détection croisée n'a été observée avec des bactéries de la flore commensale lors de l'analyse des échantillons de gorge. L'analyse des données a également permis de mettre en évidence des variations au niveau de l'intensité d'hybridation entre les différentes espèces bactériennes, liées à l'abondance relative des espèces dans l'échantillon, les espèces de la flore commensale étant les plus abondantes. Egalement, l'étape préliminaire de PCR peut entraîner des variations au

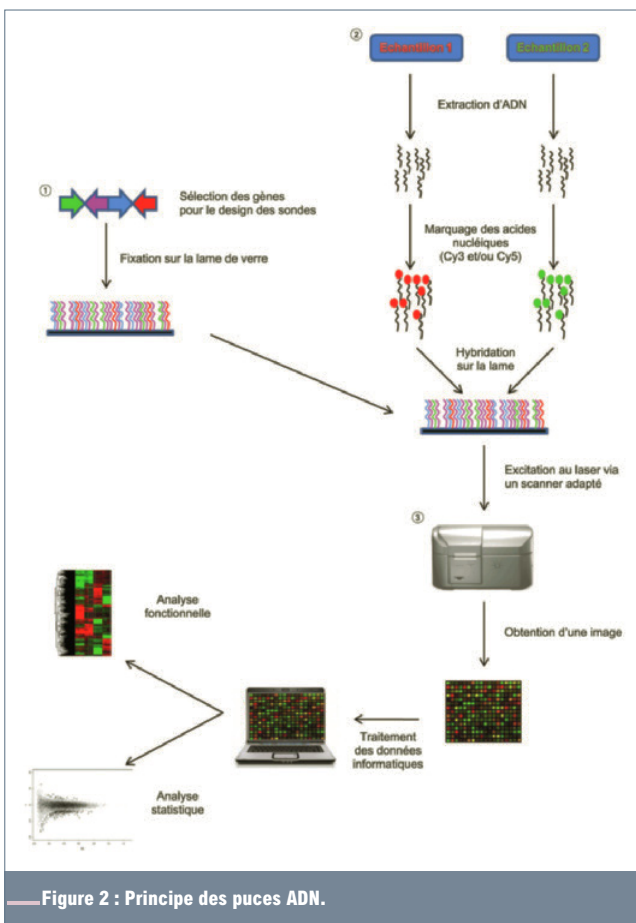


Figure 2 : Principe des puces ADN.

niveau de la sensibilité de détection des sondes. Une autre puce à ADN permet la détection de 16 virus (Adénovirus, Bocavirus, Coronavirus type 229E, OC43, NL63, HKU1, Metapneumovirus humain types A et B, Influenza A, Influenza B, Influenza C, Parainfluenza 1-4, Virus Syncytial Respiratoire types A et B et Rhinovirus) et des bactéries *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae* responsables d'infections respiratoires [20]. Des sondes spécifiques ayant une taille de 18 à 35 nucléotides ont été désignées à partir de régions génomiques pour présenter une seule température d'hybridation. Les paramètres de la puce ont été validés en utilisant des échantillons contrôles positifs pour chacun des pathogènes. A partir de 50 prélèvements de gorge prélevés chez des adultes durant l'hiver 2007-2008 en Irlande, la puce ADN a détecté 4 virus Influenza A (5,6 %), 3 virus Influenza B (4,2 %), 3 virus Influenza C (4,2 %), 1 parainfluenza-3 virus (1,4 %), 1 parainfluenza-4 virus (1,4 %), 4 Metapneumovirus (5,6 %), 2 *M. pneumoniae* (2,8 %), 1 Coronavirus OC43 (1,4 %), 1 Coronavirus NL63 (1,4 %), 1 Coronavirus HKU1 (1,4 %), 5 positifs pour RSVA (7 %) et 4 prélèvements positifs pour le Rhinovirus (5,6 %). Ce travail a permis de montrer que les puces à ADN permettent un diagnostic fiable et plus rapide, c'est-à-dire dans une même journée de travail, que les techniques de diagnostic conventionnelles telles que la sérologie ou la culture. Les auteurs ont également conclu que les puces à ADN, dans le cas des pathogènes respiratoires, ont un niveau de sensibilité suffisant pour les essais sur des échantillons cliniques et également une forte spécificité afin d'identifier et de différencier un agent pathogène, en un seul test et durant un même run de travail. En 2010, une équipe chinoise a mis au point une puce ADN permettant l'identification des 17 espèces de mycobactéries les plus communes [21] : *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. gilvum*, *M. terrae*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. phlei*, *M. nonchromogenicum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. aurum*, *M. szulgai*, *M. malmoeense*, *M. xenopi*, et *M. smegmatis* directement à partir d'expectorations. Les sondes d'une longueur de 15 à 30 nucléotides ont été désignées sur différentes zones du gène 16S rDNA. La puce a tout d'abord été testée avec des concentrations différentes des 17 mycobactéries diluées dans des expectorations négatives afin d'évaluer la sensibilité. 12 des 17 espèces sont correctement identifiées à des concentrations de 200 Unités Formant Colonie (UFC) par PCR. Seules les espèces *M. gilvum*, *M. terrae*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. phlei*, et *M. smegmatis* ne sont identifiées qu'à partir de  $10^3$  UFC par PCR. En ce qui concerne la spécificité, 64 souches de référence (1 souche de *M. tuberculosis*, 31 souches de mycobactéries non tuberculeuses et 32 souches d'autres espèces bactériennes), ont été analysées. Aucune des 32 souches d'autres bactéries n'ont été identifiées par la puce. Concernant les 32 autres souches testées, elles ont été correctement reconnues par les sondes correspondantes. Les auteurs ont noté une détection croisée entre les souches *M. nonchromogenicum* et *M. fortuitum* pour les inoculums supérieures à  $10^7$  UFC avec la sonde spécifique à *M. gilvum*.

L'analyse de 195 expectorations prélevées chez des patients suspectés de tuberculose pulmonaire, a montré 116 échantillons positifs par la puce également positifs en culture, plus un échantillon positif qui était négatif en culture. Trois patients ont été identifiés comme *M. intracellulare* par la puce, confirmés par le séquençage des souches. Bien que cette biopuce présente un certain nombre d'avantages évidents, les auteurs reconnaissent qu'il est nécessaire d'améliorer leur système. En effet, l'augmentation du nombre de sondes sur la puce paraît inévitable, tout d'abord pour identifier un plus grand nombre d'espèces et également pour résoudre les problèmes de détections croisées.

#### APPLICATION AU DIAGNOSTIC DES INFECTIONS DIGESTIVES

Les diarrhées infectieuses figurent parmi les 5 plus grandes causes de mortalité dans le monde (<http://www.who.int/en/>). Les puces ADN ont été envisagées par plusieurs équipes pour le diagnostic fiable et multiplexé des ces diarrhées infectieuses. Une puce ADN comportant des sondes désignées à partir de 2 régions variables des gènes 16S et 23S rRNA pour l'identification de 15 genres ou espèces bactériens différents incluant *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. et *Vibrio cholerae* [22]. Grâce à une technique de dilution à partir de souches types, la sensibilité a été évaluée à  $10^3$  UFC/ml pour la détection d'une seule espèce bactérienne et  $10^5$  UFC/ml dans le cas de la détection de 6 espèces différentes dans un même prélèvement de selles. L'analyse de 99 échantillons cliniques a donné 80,8 % de résultats concordants avec ceux de la culture, dont 4 prélèvements poly-microbiens. Huit échantillons n'ont pas pu être identifiés, du fait de l'absence de sonde correspondante sur la biopuce. Enfin, 11 échantillons ont été mal identifiés. Cela est dû, selon les auteurs, à la présence dans les échantillons de nombreuses espèces bactériennes « parasites » appartenant à la flore bactérienne commensale qui empêche la bonne identification du pathogène ou encore à une trop faible quantité en pathogène ( $< 10^3$  UFC/ml) dans les échantillons. Cette puce ADN reste une approche innovante qui permet une détection rapide ( $< 3$  h) et reproductible des pathogènes intestinaux dans des prélèvements cliniques. Une autre puce ADN pour le diagnostic des diarrhées infectieuses comporte 34 sondes spécifiques de gènes de virulence permettant l'identification d'*Escherichia coli* (10 sondes), *Vibrio cholerae* (5 sondes), *Vibrio parahaemolyticus* (4 sondes), *Salmonella enterica* (3 sondes), *Campylobacter jejuni* (3 sondes), *Shigella dysenteriae* (1 sonde), *Shigella flexneri* (1 sonde), *Shigella sonnei* (1 sonde), *Yersinia enterocolitica* (3 sondes) et *Listeria monocytogenes* (3 sondes) [12]. La sensibilité de la puce a été évaluée à 58 copies/ $\mu$ l grâce à une technique de PCR en temps réel. La puce a été testée avec 34 échantillons de selles collectés chez des adultes souffrant de diarrhées. 24 échantillons, soit 70,6 %, ont été positifs pour 16 gènes différents. 5 échantillons ont été identifiés comme contenant plusieurs bactéries à la fois. Les auteurs suggèrent que leur puce à ADN peut être utilisée pour la caractérisation des infections virales et bactériennes à partir d'échantillons divers, y compris les ▷▷

▷▷ produits alimentaires et les échantillons environnementaux et cliniques, et peut donc être une plateforme utile pour l'identification et la caractérisation des maladies infectieuses.

Nous avons développé une puce ADN ciblant 35 bactéries responsables d'infections digestives [23]. Nous avons choisi de désigner des sondes spécifiques basées sur le gène 16S pour chacune de ces bactéries. Toutes les sondes ont une longueur de 30 nucléotides et une température d'hybridation de 60 °C. Nous avons également décidé de fixer sur la lame des sondes spécifiques permettant d'identifier les principaux virus responsables d'entérite aigüe chez l'homme : Adénovirus, Astrovirus, Bocavirus, Coronavirus, Hépatite A, Norovirus, Rotavirus et Calicivirus. Enfin comme contrôle interne, nous avons fixé une sonde spécifique à l'Archaea *Methanobrevibacter smithii* retrouvée dans la flore digestive chez plus de 95 % des individus [24]. Afin de régler les paramètres de la puce, nous avons choisi de travailler à partir d'une selle moulée provenant d'un individu sain dans laquelle nous avons ajouté artificiellement 4 bactéries pathogènes à savoir *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Tropheryma whipplei*. Cette puce ADN est actuellement en cours de tests et d'amélioration afin d'obtenir une méthode de diagnostic la plus fiable possible.

Il existe d'autres infections digestives comme les intoxications alimentaires qui sont fréquentes en France et dans le monde. On estime que chaque année aux Etats-Unis, environ 76 millions de personnes déclarent une intoxication alimentaire et 5 000 patients décèdent des suites de ces infections [25]. Les bactéries les plus souvent responsables de ces intoxications sont *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter jejuni*. L'équipe de Hong *et al.* en 2004 figure parmi les premières à avoir mis au point une biopuce pour le diagnostic des infections d'origine alimentaire [26]. Cette puce consiste en une membrane de nylon sur laquelle ont été fixées 21 sondes ADN correspondant à des régions du gène 23S rRNA. Ces sondes permettent la détection de 14 espèces bactériennes responsables d'infection alimentaire : *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni*. *Streptococcus pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, et ont une taille qui varie entre 18 et 30 nucléotides. Les auteurs ont également choisi de fixer sur la lame une sonde universelle, correspondant à une région conservée du gène 23S rRNA, permettant la détection de toutes les bactéries. Pour tester la puce, 16 souches bactériennes pures ont été utilisées. Pour 9 espèces bactériennes, les résultats obtenus présentent une forte sensibilité et une forte spécificité puisque les identifications de la puce sont en accord avec celles de la culture. Une réaction croisée a été observée dans le cas de *S. enterica* et *Y. enterocolitica* qui s'hybrident de manière non spécifique à la sonde espèce-spécifique *E. coli*, mais cela n'a pas d'incidence sur la distinction entre les 2. Pour valider leur biopuce, les auteurs ont choisi d'utiliser 2 échan-

tillons artificiels, c'est-à-dire des échantillons qu'ils ont eux même enrichis avec des mélanges de bactéries : le premier contient *E. coli* et *S. dysenteriae*, le deuxième contient *P. vulgaris*, *B. cereus* et *V. cholerae*. 8 échantillons d'infection alimentaire avérée collectés dans des centres de la province de Guangdong en Chine ont également été testés. Les échantillons « artificiels » ont permis de déterminer la sensibilité de la puce qui est de 10<sup>2</sup> UFC/ml. En ce qui concerne les échantillons cliniques, 5 échantillons ont obtenus des résultats concordants entre la puce à ADN et la culture. Pour 3 échantillons, les résultats obtenus étaient discordants et notamment pour *Salmonella* spp. qui a une réaction croisée avec *E. coli*. La puce à ADN permet l'identification pour *Salmonella* uniquement au niveau du genre, alors que la technique plus classique permet de distinguer les espèces. Les auteurs émettent une réserve sur l'utilisation de cette puce pour l'étude du microbiote intestinal car il est composé d'un grand nombre de bactéries qui pourraient gêner la bonne identification des pathogènes. Selon eux, le choix des sondes, la technique de marquage ainsi que la qualité des échantillons sont les clés essentielles pour l'obtention de résultats fiables. Ils concluent en ajoutant que leur puce à ADN peut être utilisée de manière fiable pour l'analyse d'échantillons cliniques et que la supériorité des biopuces repose sur la rapidité, la précision et l'efficacité dans le diagnostic, le traitement et le contrôle des infections d'origine alimentaire.

En 2010 une équipe a mis au point une puce à ADN permettant la détection de pathogènes à partir d'échantillons alimentaires frais [13]. Au total, 14 sondes d'une longueur moyenne de 70 nucléotides ont été désignées pour cibler les 4 bactéries différentes : *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter jejuni*. Pour chaque espèce bactérienne ciblée, 2 à 6 sondes ciblant des gènes de virulence ont été désignées et fixées en triplicata sur la lame. Afin de diminuer le coût par analyse, 12 zones d'hybridation identiques ont été fixées sur la lame de verre, ce qui permet l'analyse de 12 échantillons différents en même temps. La sensibilité de la puce a été évaluée grâce à des dilutions d'ADN amplifié à partir des 4 souches bactériennes ciblées et a été estimée à approximativement 20 copies. 39 échantillons alimentaires ont ensuite été analysés parmi lesquels figuraient du poulet, du bœuf, du porc et de la dinde. Un enrichissement des échantillons a été réalisé avant l'hybridation afin de pouvoir détecter également les pathogènes présents en faible quantité. 16 échantillons se sont révélés positifs. Dans la plupart des cas, une seule bactérie a été détectée dans les échantillons, mais une barquette de porc haché et un échantillon de bœuf contenaient *Salmonella* et *E. coli* O157:H7, et un morceau de poulet était contaminé par *Salmonella* et *L. monocytogenes* en même temps. 2 morceaux de bœuf provenant d'un même colis ont été testés et 1 des 2 échantillons était contaminé par *E. coli* O157:H7 et *Salmonella*, alors que le deuxième était seulement contaminé par *E. coli*. Les 2 souches ont été génotypées et il s'agissait bien des mêmes génotypes, ce qui indique que la source de contamination est la même pour les 2 échantillons. 8 échantillons de poulet étaient positifs à *C. jejuni*. *Salmonella* à éga-

lement été retrouvée dans les morceaux de poulet. Après analyse des résultats, les auteurs estiment que la sensibilité de leur puce, et des puces à ADN en général, dépend beaucoup des cibles choisies et des sondes désignées. De plus le problème majeur est la qualité et la nature des échantillons testés qui pour certains sont très faiblement contaminés par le pathogène recherché. Cette étude a tout de même permis de prouver que les puces à ADN peuvent être utilisées de manière fiable pour une détection simplexe mais aussi multiplexe de bactéries y compris à partir d'échantillons d'origine alimentaire.

En 2010, l'équipe de Kim *et al.* [27] a également mis au point une puce à ADN adaptée à l'étude des 10 principales bactéries entéropathogènes : *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* entérotoxigène, *Escherichia coli* entérohémorragique et *Yersinia enterocolitica*. Les sondes choisies ont une longueur de 20 nucléotides et sont spécifiques à un gène de virulence pour chaque bactérie. L'efficacité et la sensibilité de la puce ont été évaluées en hybridant des dilutions d'ADN génomique des différentes bactéries (100 ng à 1 fg) sur la lame. La limite de détection de l'ADN génomique d'une souche est d'approximativement 10 fg. Dans le cas d'un mélange d'ADN plus complexe, la sensibilité baisse alors à 100 fg. 82 échantillons de selles provenant de patients atteints d'entérite d'origine alimentaire ont ensuite été analysés. Les résultats obtenus étaient en accord total avec ceux obtenus par PCR et/ou par culture. Les auteurs précisent qu'il est important de disposer de plusieurs sondes identiques pour le même pathogène afin de pouvoir éliminer les faux positifs. Les auteurs concluent en disant que le temps de manipulation (10 heures) est supérieur à celui de la PCR mais reste bien inférieur au temps d'analyse des approches traditionnelles de culture. Selon eux, l'avantage majeur de cette puce à ADN est la sensibilité élevée de la méthode par rapport à la PCR. Quelques investissements dans les laboratoires d'analyse seraient alors suffisants pour utiliser cette puce à ADN pour l'identification des bactéries entéropathogènes.

D'autres équipes ont décidé de ne cibler qu'un seul pathogène pouvant être responsable d'infection digestive. C'est le cas de l'équipe de Wang *et al.* en 2010 qui a mis au point une puce à ADN focalisée sur la détection des souches d'*E. coli* entérotoxigènes [28]. *E. coli* entérotoxigène (ETEC) est la principale cause de diarrhée infectieuse dans le monde et plus particulièrement dans les pays en voie de développement, entraînant des maladies infantiles ou le choléra [29]. Classiquement, la détection des ETEC se fait par des méthodes immunologiques qui ciblent les entérotoxines LT et/ou ST. Il existe également des techniques de sérotypage qui utilisent de l'antisérum spécifique à l'antigène O de la bactérie. L'inconvénient de ces méthodes est qu'elles sont longues et nécessitent une main d'œuvre qualifiée. Cette équipe a donc développé une puce à ADN permettant la détection des gènes codant pour les toxines LT et ST. La puce permet également la détection des gènes *wzx* et *wzy* qui sont utilisés pour le typage des 19 sérogroupes O les

plus fréquents chez les ETEC. Toutes les sondes ont été fixées en dupliqua sur la lame et les auteurs ont choisi d'ajouter une sonde 16S rRNA en tant que témoin positif ainsi qu'une sonde poly-T comme contrôle négatif. Au total, 51 sondes spécifiques ont été fixées sur la puce correspondant à 40 sondes spécifiques au séro-groupe O, 8 sondes ciblant les gènes de virulence, 1 sonde contrôle positif, 1 sonde contrôle négatif et une sonde marquée à la cyanine-3 pour le contrôle des positions. Pour tester la sensibilité et la spécificité de leur outil, ils ont analysé 223 souches : 28 étaient des souches types et 19 des souches cliniques ciblées par leur puce, 150 souches d'*E. coli* appartenant à d'autres sérogroupes non détectés par la biopuce, 13 souches de *Shigella* appartenant au séro-groupe O, et enfin 10 autres espèces bactériennes comme des *Salmonella*. Toutes les souches testées appartenant à un des 19 sérogroupes ciblés ont été correctement identifiées. En ce qui concerne les souches n'appartenant pas aux sérogroupes ciblés, et les souches de *Salmonella* et *Shigella*, seules les sondes contrôle positif et marquée à la cyanine se sont allumées. Quelques souches d'*E. coli* ne devant normalement pas hybrider sur la puce ont été reconnues par une sonde spécifique aux gènes de virulence. La sensibilité de la puce a été définie grâce à l'hybridation de différentes dilutions d'ADN génomique de souches d'*E. coli* est à été fixée à 50 ng d'ADN génomique ou 10<sup>8</sup> UFC/ml. Il s'agit donc d'une puce à ADN qui allie la détection de gènes de virulence au typage des ETEC de manière spécifique, reproductible et avec une sensibilité élevée. L'avantage est de diminuer le temps de travail et donc de pouvoir diagnostiquer la pathologie plus rapidement que dans le cas des techniques plus conventionnelles. Les auteurs qualifient leur travail de « prometteur dans le diagnostic clinique et la surveillance épidémiologique ». Ils envisagent quelques améliorations en ajoutant de nouvelles sondes sur leur puce afin de cibler d'avantage de sérogroupes différents.

#### APPLICATION AU DIAGNOSTIC DES SEPTICÉMIES

En 2009, une équipe finlandaise a mis au point une puce ADN permettant la détection de 12 espèces bactériennes responsables de septicémie comprenant *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* [30]. Les sondes spécifiques ont été désignées sur les gènes *gyrB* et *parE*. Les auteurs ont également fixé des sondes permettant de mettre en évidence la résistance de *S. aureus* à la méthicilline. L'analyse de 146 hémocultures positives et 40 hémocultures négatives a montré une sensibilité de 96 % et une spécificité de 98 % par rapport à la culture. Le temps de manipulation était de 3 heures. En 2010, une autre équipe a mis au point une biopuce ciblant la région ITS située entre le gène 16S et le gène 23S rRNA pour la détection des micro-organismes responsables de septicémie chez l'homme [31]. Pour cela, les auteurs ont choisi de désigner 43 sondes différentes, à savoir une sonde universelle, >>

▷▷ deux sondes pour les bactéries Gram positif, une sonde pour les bactéries Gram négatif, neuf sondes spécifiques de genre (*Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Enterobacter/Klebsiella*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* et *Serratia*) et 30 sondes spécifiques d'espèce. Toutes les sondes ont une taille qui varie entre 18 et 27 nucléotides et ont été fixées de manière covalente sur la lame grâce à l'ajout d'une séquence poly-T à leur extrémité 5'. L'analyse de 825 échantillons de sang positifs en culture a été réalisée, 85,8 % des échantillons ont été correctement analysés par la puce à ADN. La majorité des pathogènes retrouvés dans les échantillons (75,7 %) ont été identifiés comme *Staphylococcus*, *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae*. 62 échantillons, soit 7,5 %, n'ont pas été identifiés par la puce en raison de l'absence de sondes correspondantes sur la lame. Les auteurs ont évalué leur biopuce pour l'identification de microorganismes directement à partir de milieu de culture et ont démontré que 94 % des espèces pour lesquelles les sondes ont été incluses ont été correctement identifiées dans un délai inférieur à une heure. Cependant, 99 souches n'ont pas été identifiées par la puce, dont 62 souches pour lesquelles il n'y avait pas de sondes spécifiques. Pour les 37 autres souches, les sondes spécifiques étaient présentes mais n'ont pas permis une identification. Les auteurs expliquent ce problème par un manque de spécificité de leur puce puisque ces 37 souches sont détectées par d'autres méthodes d'identification. Un autre problème est que dans 1,5 % des cas (12 isolats), la puce a donné des résultats erronés. En effet, les résultats de la culture n'étaient pas toujours en accord avec ceux de la puce ADN ou les résultats du séquençage. Selon les auteurs, cela est sans doute dû à une erreur d'identification par la méthode de culture ou à des prélèvements contenant plusieurs bactéries à la fois.

## DÉTECTION DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

### 1 Exemple de la tuberculose

Le traitement de première intention de la tuberculose comporte la rifampicine et l'isoniazide. *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent de la tuberculose, présente une émergence de la résistance à ces molécules, compliquant le traitement de la tuberculose. La résistance de *M. tuberculosis* à la rifampicine est due à une ou plusieurs mutations localisées sur une région de 81 paires de bases du gène *rpoB* qui code pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase [32, 33]. La résistance à l'isoniazide est en partie liée à une mutation sur le gène *katG* [34], qui code pour une catalase-peroxydase. Également, une mutation du gène qui code pour la régulation de l'enzyme *inhA* est impliquée dans la résistance à l'isoniazide [35]. Une puce ADN comportant 25 sondes de 14 à 20 nucléotides pour la détection des mutations sur les gènes *rpoB* (20 sondes), *katG* (3 sondes) et *inhA* (2 sondes) [36] a été testée sur une collection de 115 souches de *M. tuberculosis* résistantes à la rifampicine et 119 souches résistantes à l'isoniazide. Sur les 115 souches résistantes à la rifampicine, 107 portaient une mutation sur le gène *rpoB*, 8 avaient un profil sauvage après analyse par la puce, c'est-à-dire sensible à la rifampicine. Ces souches ont été séquencées et ne présentaient

effectivement aucune mutation au niveau de leur gène *rpoB*. Les auteurs ont évalués la sensibilité et la spécificité de la puce à 93,0 % et 98,4 % respectivement, pour l'étude de la résistance à la rifampicine. Dans le cas de l'isoniazide, 85 souches portaient une mutation au niveau du gène *katG* et/ou *inhA*. La mutation la plus fréquemment retrouvée (31,1 %) se trouve sur le codon 315 du gène *katG*. Pour cette deuxième étude, les auteurs ont évalués la sensibilité de la technique à 71,4 % et la spécificité à 97,6 %. Certains résultats ne sont cependant pas en accord avec ceux obtenus par la technique de test aux antibiotiques sur disques : 2 des 5 souches présentant une mutation située au niveau du codon 533 du gène *rpoB* se sont avérées être sensibles à la rifampicine. De plus, 3 des 46 souches présentant une mutation ponctuelle sur le gène *katG* et/ou *inhA* étaient malgré tout sensibles à l'isoniazide. Mais les auteurs expliquent cela en se basant sur une étude précédente qui a montré que les souches présentant ces 2 types de mutations possèdent des niveaux de résistance très faible [37]. Cela suggère que cette puce à ADN est un système de détection plus précis que le test de sensibilité aux antimicrobiens conventionnels.

### 2 Détection des *Staphylococcus aureus* multirésistants

*Staphylococcus aureus* est retrouvé chez 15 à 30 % des individus porteurs au niveau des fosses nasales et de la gorge [38]. Une puce ADN qui permet l'identification de *S. aureus* grâce à l'identification de 38 gènes différents : 5 gènes spécifiques de genre et d'espèces, 23 gènes de résistance aux antibiotiques et 10 gènes codant des toxines [38]. La sensibilité de la puce à été évaluée par l'analyse de différentes dilutions d'ADN génomique de souches de *S. aureus* multirésistantes (MRSA) est à été établie à 0,05  $\mu\text{g}$  soit  $1,7 \times 10^7$  copies d'ADN. Des contrôles positifs ont été testés, à savoir des souches types correspondant à chacune des sondes présentes sur la puce, et les résultats obtenus étaient bien ceux attendus. La puce a été validée en utilisant 100 souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline. Ils ont pu identifier 40 % des souches porteuses du gène *ermA* et 32 % des souches porteuses du gène *ermC* qui codent pour la résistance aux macrolides. 57 % des souches étudiées étaient porteuses du gène *aphA3* qui code la résistance aux aminoglycosides. La puce ADN a permis la détection de toxines chez 27 % des souches. Quelques résultats atypiques ont tout de même été observés : certains isolats ont donné des signaux d'hybridation pour le gène *blaZ*, bien qu'aucune activité  $\beta$ -lactamase n'ait été détectée pour ces souches. Cela peut être expliqué par le fait que les souches peuvent posséder ce gène sans qu'il soit forcément exprimé. Un autre isolat était négatif pour le gène *blaZ*, mais avait malgré tout une activité  $\beta$ -lactamase. Les auteurs expliquent ce problème par une variation de séquence certaine au niveau du gène *blaZ*. Ils concluent en recommandant leur puce à ADN comme un outil permettant une détection fiable et rapide des toxines et des gènes de résistance chez *S. aureus*. Une autre puce ADN détecte les gènes impliqués dans la résistance à la pénicilline, la méthicilline, les aminoglycosides, les macrolides, le lincosamide et la streptogramine B [39]. Les gènes ciblés sont les

suivants : *mecA* et *blaZ* pour la résistance à la méthicilline et la pénicilline, *aac* (6')-Ie-*aph* (2'') pour la résistance aux aminoglycosides, *ermA* et *ermC* pour la streptogramine, et enfin le gène *msrA* pour la résistance aux macrolides. La puce permet de différencier *Staphylococcus aureus* des autres espèces de *Staphylococcus* grâce à une sonde désignée sur une région hypervariable du gène 16S rRNA. La spécificité de la puce a été testée en hybridant 5 souches types qui ne possédaient qu'un seul gène de résistance à la fois. Toutes les souches ont été identifiées correctement, et il n'y a pas eu de réactions croisées. L'hybridation d'un contrôle négatif n'a donné aucun résultat positif. La puce s'est révélée être efficace pour la détection d'un gène de résistance à partir d'une seule colonie, c'est-à-dire  $10^7$  à  $10^8$  cellules. Les auteurs ont noté que le signal de fluorescence est légèrement diminué (20 à 30 %) si le mélange réactionnel n'est pas dénaturé avant hybridation. Ils ont également constaté que le temps d'hybridation réduit de 90 à 30 minutes diminue l'intensité du signal de 10 à 30 %, mais n'empêche pas l'identification des pathogènes. Pour valider la puce, 415 souches cliniques ont été testées et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par les antibiogrammes standards. Tout d'abord, la puce ADN a permis de différencier les *Staphylococcus aureus* des autres espèces de staphylocoques. La sensibilité de la puce varie de 94,8 % à 99,0 % alors que la spécificité varie entre 69,3 % et 99,2 %. Les auteurs ont comparé les résultats obtenus avec les 2 techniques et ont trouvé des similitudes dans plus de 90 % des cas pour la détection des gènes de résistance et 100 % au niveau de la différenciation des espèces. Les différences qui existent entre les deux méthodes sont significatives et sont certainement dues, d'après leur conclusion, à certaines souches qui auraient un phénotype sensible à un antibiotique mais qui posséderait malgré tout le gène de résistance pour cet antibiotique. Par exemple, ils ont retrouvé 17 souches sensibles à l'oxacilline mais possédant le gène *mecA*, vraisemblablement en raison de l'expression hétérogène du gène *mecA* chez les *S. aureus in vitro* [42]. Ces résultats permettent quand même aux auteurs de recommander leur outil pour le diagnostic des résistances aux antibiotiques chez *S. aureus*. Le temps d'analyse est inférieur à 5 h, simple et fiable et permet aux cliniciens d'éviter de donner au patient un traitement inapproprié.

## DISCUSSION

Les puces ADN ont été décrites pour la première fois en 1995 [5] et le nombre de travaux publiés utilisant cette technologie ne cesse d'augmenter (figure 3). Le nombre de publications sur le sujet dans la base de données du NCBI dépasse les 54 000 résultats (juin 2010) ce qui témoigne de l'importance de l'utilisation de cette technique. Les puces ADN ont prouvé leur efficacité dans beaucoup de domaines comme la génétique, le diagnostic des maladies infectieuses virales, parasitaires et bactériennes. Dans cette revue, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au diagnostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Le diagnostic des maladies infectieuses reste relativement compliqué puisqu'il repose sur des techniques

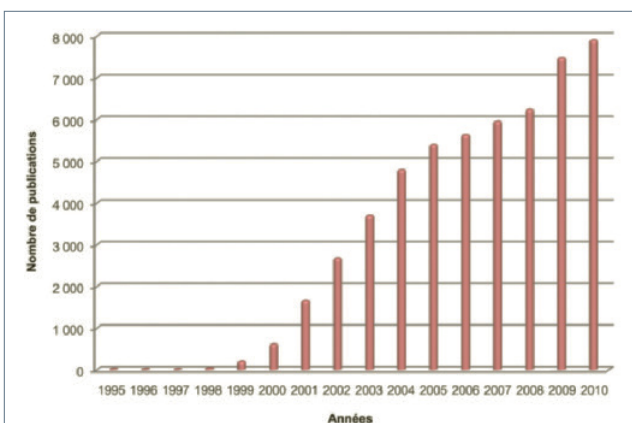


Figure 3 : Articles publiés concernant le sujet « DNA microarray » dans la banque de donnée NCBI (Juin 2011).

de culture, hors plusieurs papiers rapportent qu'une grande majorité des espèces bactériennes connues ne sont pas des espèces cultivables [1]. Il était donc important de pouvoir disposer d'un outil diagnostic permettant de contourner ce problème. Les puces ADN ont alors été qualifiées de technique fiable, rapide et reproductible pour le diagnostic des maladies infectieuses, tous les auteurs ayant travaillé sur le sujet et cités dans cette revue sont unanimes sur le sujet. Il est indéniable que la technologie de puces à ADN permet une réduction du temps de l'analyse ce qui est un atout majeur dans le diagnostic des maladies infectieuses. En effet, les techniques actuellement utilisées pour le diagnostic des infections bactériennes reposent sur la mise en culture du prélèvement sur des milieux spécifiques ou non dans le but d'isoler le pathogène. Dans le cas où l'isolement est possible, un test de sensibilité aux antibiotiques est ensuite réalisé en utilisant des disques de papier imprégnés d'antibiotiques. Le problème est que ces 2 techniques sont relativement longues et que le résultat n'est parfois obtenu que 72 heures après le début de l'analyse (dans le cas des germes à croissance lente). De plus la détection multiplexe autorisée par cette technologie est un véritable atout dans le cas d'un grand nombre d'infections bactériennes qui sont causées par plusieurs bactéries simultanément. Plusieurs papiers cités dans cette revue ont prouvé que la détection de plusieurs pathogènes en même temps est tout à fait possible avec les puces à ADN et que cela ne complique en rien la manipulation, ce qui n'est pas le cas avec les techniques conventionnelles. En effet, les milieux utilisés pour l'identification des pathogènes seront différents selon l'espèce ciblée. Il faudra donc ensemencer plusieurs géloses différentes et avec des conditions et des temps d'incubation différents. Les puces à ADN ont l'avantage de s'affranchir de ces problèmes de culture et permettent avec une seule température d'hybridation la détection simultanée de plusieurs bactéries. La sensibilité d'un outil diagnostic peut être définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif lors du test d'un échantillon infecté. La spécificité de ce même outil peut être définie comme la probabilité d'obtenir un test négatif lors de l'analyse d'un



▷▷ échantillon stérile [40]. Dans tous les papiers cités, des tests de sensibilité et de spécificité sont réalisés. Les résultats sont alors comparés à ceux obtenus pour les techniques conventionnelles d'identification. Dans une grosse majorité des cas, les puces à ADN se révèlent être plus sensibles et plus spécifiques que les techniques classiques. Parfois les résultats obtenus sont discordants entre les 2 méthodes mais après séquençage de la région ciblée pour vérification, il s'avère que les résultats de la puce sont validés. Dans d'autres cas, comme la résistance à certains antibiotiques, la puce identifie la présence d'un gène de résistance à l'oxacilline chez une souche qui est pourtant sensible à ce même antibiotique. La différence entre les 2 techniques s'explique par un papier [41] qui dit que ce gène peut être présent mais n'est pas forcément exprimé. Cette observation montre la spécificité de cet outil.

Il est vrai que les biopuces ont beaucoup d'avantages mais elles comportent également des limites qui sont reprises dans la plupart des papiers cités dans cette revue. En effet, le design de la puce est une étape cruciale pour l'obtention de résultats fiables. Les sondes choisies doivent avoir une longueur et une température de fusion très proches afin que les conditions d'hybridation soient optimales. Les cibles doivent également être choisies de manière très judicieuse. Il est important que la spécificité des sondes désignées soit la plus haute possible et cela dans le but d'éviter les réactions croisées. Plusieurs équipes ont solutionné ce problème de réaction croisée en fixant sur les lame plusieurs sondes spécifiques au même pathogène. Pour éviter les faux positifs, il est également important de spotter sur la lame plusieurs fois la même sonde, le dépôt en triplicata semble être une bonne solution.

Cette revue a donc permis de mettre en évidence l'intérêt des puces à ADN pour le diagnostic des maladies respiratoires, des infections digestives ou encore des maladies liées à l'enfant. La détection de bactéries résistantes aux antibiotiques a également été développée grâce aux biopuces ce qui a permis un progrès considérable dans le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Le développement de ces puces à ADN ne cesse d'évoluer chaque jour et de plus en plus d'équipes cherchent à augmenter la puissance de cette technique. En effet, la véritable évolution dans la fabrication des puces à ADN est la fixation sur la lame de verres de sondes permettant la détection de bactéries, de virus, de parasites, de champignons ou encore de gènes codant pour des facteurs de virulence ou de résistance aux antibiotiques, simultanément. De plus en plus de travaux rapportent qu'un grand nombre de maladies infectieuses sont en fait le résultat d'interactions complexes entre les différents habitants d'un microbiote. Le fait de ne pas se limiter à une seule catégorie de pathogènes fixés sur la biopuce permet donc l'étude de ces interactions et augmente la compréhension d'une maladie. La prochaine étape est maintenant de mettre au point des puces à ADN pouvant être utilisées en routine dans les laboratoires de bactériologie. La préparation de l'échantillon et le marquage des acides nucléiques devront être simplifiés au maximum pour réduire le temps et le coût d'une analyse. Dans ce cas, les puces ADN

pourraient être intégrées parmi les techniques disponibles pour le diagnostic point-of-care des maladies infectieuses [42], à côté des techniques basées sur la PCR en temps-réel et des méthodes immunochromatographiques.

Tous les articles analysés dans cette revue tirent la même conclusion de l'utilisation des puces à ADN pour le diagnostic des infections bactériennes. Il s'agit d'un outil présentant beaucoup d'avantages pour l'utilisation en routine dans les laboratoires de diagnostic : rapidité, fiabilité, automatisation possible et reproductibilité. Cependant il est important de verrouiller un certain nombre de paramètres (préparation de l'échantillon, spécificité des sondes, température d'hybridation) afin de pouvoir valider les résultats dans la perspective d'une utilisation en routine. ●

#### /+ / Références.

- ① Candela M, Consolandi C, Severgnini M et al. (2010) High taxonomic level fingerprint of the human intestinal microbiota by Ligase Detection Reaction – Universal Array approach. *BMC Microbiology* 10: 116
- ② Zoetendal EG, Akkermans AD, de Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64: 3854-3859
- ③ Suau A, Bonnet R, Sutren M et al. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 65: 4799-4807
- ④ Heid CA, Stevens J, Livak K et al. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994
- ⑤ Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470
- ⑥ Wilson KH, Blichington RB, Greene RC (1990) Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28: 1942-1946
- ⑦ Adékambi T, Drancourt M, Raoult D (2009) The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol* 17: 37-45
- ⑧ Chomezynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- ⑨ Zoetendal EG, Heilig HGHJ, Klaassens ES et al. (2006) Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. *Nature Protocols* 1: 870-873
- ⑩ Zoetendal EG, Booiijk CCGM, Klaassens ES et al. (2006) Isolation of RNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. *Nature Protocols* 1: 954-959
- ⑪ Stabler RA, Marsden GL, Witney AA et al. (2005) Identification of pathogen-specific genes through microarray analysis of pathogenic and commensal *Nesseiria* species. *Microbiology* 151: 2907-2922
- ⑫ You Y, Fu C, Zeng X et al. (2008) A novel DNA microarray for rapid diagnosis of enteropathogenic bacteria in stool specimens of patients with diarrhea. *J Microbiol Methods* 75: 566-571
- ⑬ Suo B, He Y, Paoli G et al. (2010) Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens. *Mol Cell Probes* 24: 77-86
- ⑭ Jaluria P, Konstantopoulos K, Betenbaugh M, Shiloach J (2007) A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses. *Microb Cell Fact* 6: 4

- 15 **Leroy Q, Raoult D (2010)** Review of microarray studies for host-intracellular pathogen interactions. *J Microbiol Methods* 81: 81-95
- 16 **Huyghe A, Francois P, Schrenzel J (2009)** Characterization of microbial pathogens by DNA microarray. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 987-995
- 17 **Min YS, Choi JH, Lee SY, Yoo NC (2009)** Applications of DNA microarray in disease diagnostics. *J Microbiol Biotechnol* 19: 635-646
- 18 **Elliot AJ, Cross KW, Fleming DM (2008)** Acute respiratory infections and winter 390 pressures on hospital admissions in England and Wales 1990–2005. *J. Public Health (Oxf)* 30: 91–98
- 19 **Roth SB, Jalava J, Ruuskanen O et al. (2004)** Use of an oligonucleotide array for laboratory diagnosis of bacteria responsible for acute upper respiratory infections. *J Clin Microbiol* 42: 4268-4274
- 20 **Cannon GA, Carr MJ, Yandle Z et al. (2010)** A low density oligonucleotide microarray for the detection of viral and atypical bacterial respiratory pathogens. *J Virol Methods* 163: 17-24
- 21 **Zhu L, Jiang G, Wang S et al. (2010)** Biochip system for rapid and accurate identification of *Mycobacterial* species from isolates and sputum. *J Clin Microbiol* 48: 3654-3660
- 22 **Jin DZ, Wen SY, Chen SH et al. (2006)** Detection and identification of intestinal pathogens in clinical specimens using DNA microarrays. *Mol Cell Probes* 20: 337-347
- 23 **Drancourt M (2011)** Chapter 35: Acute Diarrhea In: Cohen J, Opal SM, Powderly WG, *Infectious Diseases*. Elsevier
- 24 **Dridi B, Henry M, El Khéchine A, Raoult D, Drancourt M (2009)** High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS One* 4: e7063
- 25 **Mead PS, Slutsker L, Dietz V et al. (1999)** Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607–625
- 26 **Hong BX, Jiang LF, Hu YS et al. (2004)** Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of food-borne infections. *J Microbiol Methods* 58: 403-411
- 27 **Kim DH, Lee BK, Kim YD et al. (2010)** Detection of representative enteropathogenic bacteria, *Vibrio* spp., pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *Yersinia enterocolitica*, using a virulence factor gene-based oligonucleotide microarray. *J Microbiol* 48: 682-688
- 28 **Wang Q, Wang S, Beutin L et al. (2010)** Development of a DNA microarray for detection and serotyping of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 48: 1066-2074
- 29 **Black RE (1993)** Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. *Vaccine* 11: 100–106
- 30 **Järvinen AK, Laakso S, Piiparinen P et al. (2009)** Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. *BMC Microbiology* 9: 161
- 31 **Kim CM, Song ES, Jang HJ et al. (2010)** Development and evaluation of oligonucleotide chip based on the 16S-23S rRNA gene spacer region for detection of pathogenic microorganisms associated with sepsis. *J Clin Microbiol* 48: 1578-1583
- 32 **Musser JM (1995)** Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 8: 496-514
- 33 **Ramaswamy S, Musser JM (1998)** Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 79: 3-29
- 34 **Rattan A, Kalia A, Ahmad N (1998)** Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis* 4: 195-209
- 35 **Mdluli K, Sherman DR, Hickey MJ et al. (1996)** Biochemical and genetic data suggest that *inhA* is not the primary target for activated isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 174: 1085-1090
- 36 **Park H, Ju Song E, Sil Song E et al. (2006)** Comparison of a conventional antimicrobial susceptibility assay to an oligonucleotide chip system for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 44: 1619-1624
- 37 **Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H et al. (1998)** Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis*. 79: 111-118
- 38 **Monecke S, Ehrlich R (2005)** Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturized oligonucleotide arrays. *Clin Microbiol Infect* 11: 825-833
- 39 **Zhu LX, Zhang ZW, Wang C et al. (2007)** Use of a DNA microarray for simultaneous detection of antibiotic resistance genes among *Staphylococcal* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 45: 3514-3521
- 40 **Barken KB, Haagensen JAJ, Tolker-Nielsen T (2007)** Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clinica Chimica Acta* 384: 1-11
- 41 **Chambers HF (1997)** Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10: 781-791
- 42 **Ninove L, Nougairede A, Gazin C et al. (2010)** POC tests: from antigen detection to molecular methods. *Future trends. J Clin Virol* 4: 304-305