



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale  
- Pas de Modification 4.0 France (CC BY-NC-ND 4.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1  
FACULTE DE PHARMACIE  
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Thèse n°003

**T H E S E**

Pour le **DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le

12 Janvier 2026

Par M. OUHBI Ayoub

Né le 4 août 2000 à OUARZAZAT

\*\*\*\*

Détection rapide des *Nocardia* sur prélèvements : mise au point et évaluation  
d'un protocole de PCR « maison » utilisant la technique de séquençage haut  
débit Oxford Nanopore Technologies

\*\*\*\*

**JURY**

Président du jury : Mme. DOLEANS JORDHEIM ANNE, MCU-PH

Directeur de thèse : Mme. HODILLE Elisabeth, PH

Autres membres du jury : Mme. BENITO Yvonne, Dr  
Mme. DUMITRESCU Oana, MCU- PH  
Mme. ROUSSEL-GAILLARD Tiphaine, PH

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

|   |                     |
|---|---------------------|
| Président                                   | Bruno LINA          |
| Vice-Président en charge de la Recherche    | Arnaud BRIOUDE      |
| Vice-Présidente du Conseil d'Administration | Sandrine CHARLES    |
| Vice-Présidente de la Commission Formation  | Julie-Anne CHEMELLE |
| Directeur général des services              | Pierre ROLLAND      |

## SECTEUR SANTE

|  |                        |
|--|------------------------|
| Doyen de l'UFR de Médecine Lyon-Est                                      | Gilles RODE            |
| Doyen de l'UFR de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux   | Philippe PAPAREL       |
| Doyen de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB)   | Claude DUSSART         |
| Doyen de l'UFR d'Odontologie   | Jean-Christophe MAURIN |
| Directeur de l'Institut des Sciences & Techniques de Réadaptation (ISTR) | Jacques LUAUTÉ         |
| Présidente du Comité de Coordination des Études Médicales                | Philippe PAPAREL       |

## SECTEUR SCIENCES ET TECHNOLOGIE

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Directrice de l'UFR Biosciences   | Kathrin GIESELER      |
| Directeur de l'UFR Faculté des Sciences   | Bruno ANDRIOLETTI     |
| Directeur de l'UFR Sciences & Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Guillaume BODET       |
| Directeur de Polytech Lyon  | Emmanuel PERRIN       |
| Directeur de l'Institut Universitaire de Technologie Lyon 1 (IUT)                     | Michel MASSENZIO      |
| Directeur de l'Institut des Science Financière & Assurances (ISFA)                    | Nicolas LEBOISNE      |
| Directeur de l'Observatoire de Lyon   | Bruno GUIDERDONI      |
| Directeur de l'Institut National Supérieur du Professorat & de l'Éducation (INSPÉ)    | Pierre CHAREYRON      |
| Directrice du Département-composante Génie Électrique & des Procédés (GEP)            | Rosaria FERRIGNO      |
| Directrice du Département-composante Informatique                                     | Saida BOUAZAK BRONDEL |
| Directeur du Département-composante Mécanique   | Marc BUFFAT           |

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**  
**ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon**

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET PHARMACIE  
GALENIQUE**

- **CHIMIE GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**  
Monsieur Raphaël TERREUX (PR) Madame  
Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
- **CHIMIE ANALYTIQUE**  
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (PR-HDR)  
Madame Anne DENUZIERE (MCU)  
Madame Christelle MACHON (MCU-PH-HDR)  
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)
- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**  
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)  
Madame Stéphanie BRIANCON (PR) Monsieur  
Fabrice PIROT (PU-PH)  
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU) Madame  
Sandrine BOURGEOIS (MCU) Madame Danielle  
CAMPIOL ARRUDA (MCU)  
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)  
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)  
Madame Giovanna LOLLO (MCU-HDR)  
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU) Madame  
Eloïse THOMAS (MCU)  
Monsieur Thomas BRIOT (MCU-PH)  
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
- **BIOPHYSIQUE**  
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)  
Madame Laurence HEINRICH (MCU) Monsieur  
David KRYZA (MCU-PH-HDR) Madame Sophie  
LANCELOT (MCU-PH-HDR) Madame Elise  
LEVIGOUREUX (MCU-PH) Madame Sarah  
CHAIB (AHU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**  
Madame Valérie SIRANYAN (PR)  
Madame Maud CINTRAT (MCU)  
Monsieur Hojjat VAHIDI (ATER)
- **ECONOMIE DE LA SANTE**  
Madame Nora FERDJAQUI MOUMJID (PR)  
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)
- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**  
Madame Maryem RHANOUI (MCU)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**  
Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)  
Madame Claire GAILLARD (MCU)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**  
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (PU)  
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (PU-PH)  
Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel) Madame  
Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)  
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)
- **SANTE PUBLIQUE**  
Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)  
Monsieur Matthieu LEBRAT (AHU)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT**

- **CHIMIE ORGANIQUE**  
Monsieur Pascal NEBOIS (PR) Madame  
Amanda GARRIDO (MCU) Madame  
Christelle MARMINON (MCU) Madame  
Sylvie RADIX (MCU-HDR)  
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**  
Monsieur Marc LE BORGNE (PR) Monsieur  
Thierry LOMBERGET (PR) Monsieur  
Laurent ETTOUATI (MCU-HDR) Monsieur  
François HALLE (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**  
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)  
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU-HDR) Madame  
Isabelle KERZAON (MCU)  
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**  
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH) Madame  
Catherine RIOUFOL (PU-PH)  
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)  
Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH) Madame  
Florence RANCHON (MCU-PH) Madame  
Delphine HOEGY (MCU-PH) Madame Céline  
PRUNET-SPANNO (MCU) Madame Chloë  
HERLEDAN (AHU)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE**

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)  
Madame Léa PAYEN (PU-PH) Madame  
Francesca ANGILERI (MCU) Monsieur  
David BARTHELEMY(AHU)

- **PHYSIOLOGIE**

Madame Elise BELAIDI (PU)  
Madame Kiao Ling LIU (MCU)  
Monsieur Ming LO (MCU-HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Laurent BOURGUIGNON (PU-PH)  
Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)  
Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)  
Monsieur Roger BESANCON (MCU)  
Madame Evelyne CHANUT (MCU)  
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)  
Monsieur Romain GARREAU (AHU)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**

Monsieur Sylvain BERTRAND (MCU-enseignant contractuel temps partiel) Madame  
Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel) Monsieur Vincent  
LESCURE (MCU-enseignant contractuel temps partiel) Madame Hortense PRELY  
(MCU-enseignant contractuel temps partiel) Madame Aurélie SANDRE (MCU-  
enseignant contractuel temps partiel)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A**

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)  
Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)  
Madame Anaïs NOMBEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)  
Madame Sarah HUET (MCU-PH)  
Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE  
AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)  
Madame Florence MORFIN (PU-PH) Madame  
Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR) Monsieur  
Didier BLAHA (MCU-HDR) Madame  
Ghislaine DESCOURS (MCU-PH) Monsieur  
Alexandre GAYMARD (MCU-PH)  
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)  
Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)  
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)  
Madame Floriane LAUMAY (MCU)  
Monsieur Matthieu CURTIL DIT GALIN (AHU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**  
Monsieur Philippe LAWTON (PR)  
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)  
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (PU-PH)  
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)  
Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU-HDR)  
Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU) Monsieur  
Jordan TEOLI (AHU)
- **BIOLOGIE CELLULAIRE**  
Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

## **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)  
Monsieur Philippe LAWTON (PR)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel) Madame  
Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

**PR :** Professeur des Universités  
**PU-PH :** Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
**PHU :** Praticien hospitalo-universitaire  
**MCU :** Maître de Conférences des Universités  
**MCU-PH :** Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier  
**HDR :** Habilitation à Diriger des Recherches  
**AHU :** Assistant Hospitalier Universitaire  
**ATER :** Attaché temporaire d'enseignement et de recherche



## ***Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,***

*En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :*

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- *De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- *De coopérer avec les autres professionnels de santé.*

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

## Remerciements

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide, les conseils et le soutien de nombreuses personnes, que je souhaite aujourd'hui remercier sincèrement.

### **À Madame le professeur Anne DOLEANS JORDHEIM**

Je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury. Je vous suis reconnaissant pour le temps que vous avez consacré à l'examen de ce travail et pour l'attention bienveillante que vous lui avez portée.

### **À Madame Yvonne BENITO**

Un immense merci pour votre gentillesse, bienveillance et surtout votre patience à mon égard. Merci de m'avoir initié à la biologie moléculaire. Votre rigueur, votre intelligence et votre humanité font de vous un véritable modèle. Je vous suis profondément reconnaissant pour votre accompagnement et votre confiance tout au long de ce travail.

### **À Madame le Docteur Oana DUMITRESCU**

Je vous exprime toute ma gratitude pour votre présence au sein de ce jury et pour l'intérêt que vous avez manifesté à l'égard de cette thèse. Votre disponibilité et vos remarques constructives ont grandement contribué à enrichir ce travail.

### **À Madame le Docteur Tiphaine ROUSSEL-GAILLARD**

Je tiens à vous remercier chaleureusement d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je vous suis très reconnaissant pour le temps et l'attention que vous y avez consacrés.

### **À Madame le Docteur Élisabeth HODILLE**

Je vous adresse mes remerciements les plus sincères pour votre accueil, votre disponibilité, votre écoute et vos conseils précieux. Votre expertise, votre bienveillance et la qualité de nos échanges ont été pour moi d'une aide précieuse, tant sur le plan scientifique qu'humain.

Mille Merci pour votre accompagnement attentif et pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ce projet.

### **À l'équipe de l'IAI**

Je remercie toutes les personnes qui ont travaillé à mes côtés pendant mon stage à l'hôpital de la Croix-Rousse, merci pour mon apprentissage et pour votre aide quotidienne dans la réalisation de ce travail de cette thèse. Merci à Madame Yvonne Benito, et à Madame le Docteur Oana Dumitrescu pour leur temps et leur aide colossale dans ce travail.

Un énorme merci à mes co-externes Éléonore, Noëlie et aux internes des services présents à l'hôpital. Merci beaucoup aux techniciens de laboratoire, surtout ceux du 4<sup>e</sup> étage, et aux professeurs et docteurs de l'IAI.

À Oumar,

Mon grand ami, mon parrain dans la pharmacie – merci pour tout. Ton soutien, tes conseils, ta patience et ton amitié sans faille. Tu as toujours été là, et cela a compté bien plus que tu ne peux l'imaginer.

À mes amis :

Zaid, Aloïs, Jarrel-William, Nil-Seveda, Salima, Throng-Thi, Slimane, Badr, Amir, Clément, Mathéo, Yasmine, Bryan, Abdellah, Pierre-Antoine, Aimée, Mouhamed-Amine, Oussama – merci de m'avoir accompagné tout au long de ces années, de m'avoir accepté comme ami.

Vos encouragements, vos rires et votre présence ont rendu ce parcours bien plus lumineux.

À mes enseignants,

Je tiens à remercier toute l'équipe pédagogique de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon, et de CPE Lyon. Merci

à toute personne qui m'a instruit et partagé son savoir avec moi, à tous les profs de mon enseignement supérieur et même avant. Un grand merci à tous mes coachs, spécialement à monsieur Hamou et à maître LEE Yong-Seon.

À Monsieur et Madame **FOURNEL**,

Merci infiniment pour votre présence constante, votre bienveillance et vos encouragements tout au long de ces années.

Votre accompagnement, à la fois humain et professionnel, a profondément marqué mon parcours et nourri mon amour du métier de pharmacien.

À mes collègues de Pharmacie,

Merci à tous ceux qui m'ont aidé et côtoyé lors de mon exercice en tant qu'étudiant en pharmacie. Vous êtes tous, sans exception, géniaux et exceptionnels. Merci pour ma formation, merci pour vos sourires.

À mes collègues du **CBS**,

Je tiens à remercier le Professeur Rachid DAOUD, pour son accueil, sa bienveillance et son implication dans mon parcours professionnel. Nos échanges comptaient beaucoup pour moi, au plaisir de vous revoir.

Un énorme merci à Salah-Eddine, pour sa patience et sa formation de qualité, grâce à ton accompagnement j'ai pu acquérir des bases solides en bio-informatique et en drug design.

Je remercie également toute l'équipe de l'UM6P : Zakaria, Abdelaziz, Suleiman, Karim, Oumar, Ola... Merci pour votre sympathie et pour tous les moments de joie et de fousrises que nous avons partagés.

**À ma famille :**

Merci pour votre soutien, votre confiance. Mon devoir de vous rendre fier de moi et de ne pas vous décevoir est ma plus grande force et ma raison d'avancer.

À mes frères,

**Mehdi, Youssef et Mouhamed-Ali**, je vous aime et je vous souhaite tout le succès du monde.

À mes tantes et oncles,

Un grand merci à ma tante Asmae, mon oncle Jacques pour votre accueil, votre bienveillance et les soins attentifs que vous m'avez apportés tout au long de ce parcours. Votre présence a été un véritable soutien.

Merci mes tantes Souad, Maha, Yamina, Rajae, Karima, Lamiae. Et à mes oncles Nabil, Mouard, Jamal et Mouhamed.

À mes grands-parents,

Merci Bajadi pour ton sens de l'humour et tes serments, et je m'excuse pour toutes les fois où je t'ai contrarié. Mille mercis à Papy Lahcen pour ses encouragements, sa gentillesse et ses blagues, bien qu'elles insupportent quelques-uns, moi je les apprécie beaucoup.

Merci mémé Aicha, pour ta bienveillance, tes plats et pour tout. Merci d'être là pour nous.

Mamy elhaja Zouina, paix à ton âme, je te dédie ce travail. Je m'efforcerai chaque jour de te rendre fier, afin de pouvoir te regarder en face le jour où nous nous reverrons.

Enfin, à mes parents.

À vous deux, papa et maman, je dédie tous mes accomplissements. Vous êtes ma force, ma motivation, ma raison d'être et d'avancer chaque jour.

Si je me tiens aujourd'hui devant ce travail accompli, c'est grâce à la rigueur, à la patience et aux autres valeurs que vous m'avez transmises.

Je vous aime profondément. Et je vous remercie, pour tout. Ce travail, comme ceux qui viendront, est et restera pour vous.

Merci **PAPA**.

## Table des matières

|   |    |
|---|----|
| Remerciements .....   | 8  |
| Liste des tableaux et des figures .....                                       | 16 |
| 1. Liste des Tableaux : .....   | 13 |
| 2. Liste des Figures : .....  | 14 |
| Abréviations et nomenclature .....  | 15 |
| Introduction .....  | 16 |
| Partie 1 : Fondements théoriques .....  | 18 |
| I. Présentation générale des <i>Nocardia</i> .....                            | 19 |
| Histoire de la taxonomie et caractéristiques biologiques .....                | 19 |
| II. Sémiologie des infections causées par les <i>Nocardia</i> .....           | 21 |
| 1. Nocardioses pulmonaires .....  | 21 |
| 2. Nocardioses à localisations extra-pulmonaires .....                        | 22 |
| Formes sous-cutanées et cutanées .....  | 22 |
| Formes neuroméningées .....   | 23 |
| Formes disséminées .....  | 24 |
| III. Epidémiologie de la maladie .....  | 25 |
| IV. Traitement antibiotique des Nocardioses .....                             | 27 |
| 1. Traitement curatif des nocardioses .....                                   | 27 |
| 2. Traitement antibio-prophylactique des nocardioses .....                    | 27 |
| V. Méthode de diagnostic actuelle des Nocardioses .....                       | 29 |
| VI. Apport de la PCR dans le diagnostic microbiologique des Nocardioses ..... | 31 |
| 1. Historique de la Polymerase chain reaction « PCR » .....                   | 31 |
| 2. Principe de la PCR : .....   | 31 |
| 3. Les variantes de PCR : Approches et applications : .....                   | 33 |
| RT-PCR (Reverse Transcription PCR) : .....                                    | 33 |
| qPCR (PCR en temps réel) : .....  | 33 |
| Comparaison entre la qPCR basée sur SYBER Green et TaqMan .....               | 35 |
| 4. Résultat qPCR .....  | 35 |
| 5. Autres techniques de PCR .....   | 36 |
| • PCR Nichée : .....  | 36 |
| • PCR multiplex : .....   | 37 |
| 6. Revue des PCR <i>Nocardia</i> dans la littérature .....                    | 37 |
| Partie 2 : Partie expérimentale .....   | 38 |
| I. Objectifs .....  | 39 |
| II. Matériels et Méthodes .....   | 39 |
| 1. Isolats étudiés et conservation .....                                      | 39 |
| 2. Préparation des suspensions bactériennes .....                             | 40 |
| 3. Préparation de la matrice respiratoire .....                               | 40 |
| 4. Mise en culture et contrôles microbiologiques .....                        | 41 |

|   |    |
|---|----|
| 5. Extraction de l'ADN .....                              | 41 |
| 6. Protocoles de PCR maison .....                         | 42 |
| PCR 20X .....   | 42 |
| PCR 12X .....   | 42 |
| Conditions d'amplification .....                          | 43 |
| 7. Validation des produits.....                           | 43 |
| 8. Contrôles et reproductibilité .....                    | 44 |
| 9. Analyse statistique .....                              | 44 |
| 10. Résumé du protocole expérimental .....                | 44 |
| III. Résultats.....                                       | 46 |
| 1. Croissance sur géloses.....                            | 46 |
| 2. Résultats de la PCR 20X et 12X par espèce.....         | 46 |
| 2.1 <i>Nocardia farcinica</i> .....                       | 46 |
| a. PCR 20X .....  | 46 |
| b. PCR 12X.....   | 47 |
| 2.2 <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> .....                 | 47 |
| a. PCR 20X.....   | 47 |
| b. PCR 12X.....   | 47 |
| 2.3 <i>Nocardia wallacei</i> .....                        | 47 |
| a. PCR 20X .....  | 48 |
| c. PCR 12X.....   | 48 |
| 2.4 <i>Nocardia nova</i> .....                            | 48 |
| a. PCR 20X.....   | 48 |
| b. PCR 12X.....   | 49 |
| 2.5 <i>Nocardia abscessus</i> .....                       | 49 |
| a. PCR 20X.....   | 49 |
| b. PCR 12X.....   | 49 |
| 2.6 <i>Nocardia otitidiscavarium</i> .....                | 50 |
| a. PCR 20X.....   | 50 |
| b. PCR 12X.....   | 50 |
| 3. Analyse des résultats.....                             | 50 |
| 4. Comparaison globale de la PCR 20X et 12X.....          | 51 |
| IV. Discussion.....                                       | 53 |
| V. Perspectives .....                                     | 56 |
| Bibliographie.....  | 58 |
| Annexes .....   | 62 |
| Annexe 1 : Cultures <i>Nocardia farcinica</i> .....       | 62 |
| Annexe 2 : Cultures <i>Nocardia ciriacigeorgica</i> ..... | 63 |
| Annexe 3 : Cultures <i>Nocardia wallacei</i> .....        | 64 |
| Annexe 4 : Cultures <i>Nocardia abscessus</i> .....       | 65 |
| Annexe 5 : Cultures <i>Nocardia nova</i> .....            | 66 |

|   |    |
|---|----|
| <i>Annexe 6 : Cultures <i>Nocardia otidiscavarium</i></i> .....   | 68 |
| <i>Annexe 7 : Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques chez 736 isolats de <i>Nocardia</i> selon les espèces (41)</i> ..... | 69 |
| <i>Annexe 8 : Répartition géographique des isolats de <i>Nocardia</i> en France (2010–2015) (41)</i> .....                              | 71 |
| CONCLUSIONS GENERALES.....  | 72 |

## Liste des tableaux et des figures

### 1. Liste des Tableaux :

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1 : Répartition géographique des infections à <i>Nocardia</i> en France.....   | 25 |
| Tableau 2 : Évolution de la proportion des principales espèces de <i>Nocardia</i> en France (2010-2015).....   | 25 |
| Tableau 3 : Sensibilité des souches <i>Nocardia</i> aux antibiotiques (2010-2015) (18) .....   | 27 |
| Tableau 4 : Facteur de risque nécessitant une antibioprophylaxie des nocardioses (18).....   | 27 |
| Tableau 5 : Comparaison TaqMan et SYBR Green (29) .....  | 34 |
| Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR 16S <i>Nocardia</i> .....  | 41 |
| Tableau 7 : Amorces de la PCR 12X.....   | 41 |
| Tableau 8 : Sonde utilisée pour la PCR 16S <i>Nocardia</i> (38) .....  | 44 |
| Tableau 9 : Dernière dilution positive et UFC/mL approximatif pour chaque espèce de <i>Nocardia</i> sur géloses BCYE .....   | 45 |
| Tableau 10 : Les résultats pour <i>N. farcinica</i> (PCR 20X).....   | 46 |
| Tableau 11 : Les résultats pour <i>N. farcinica</i> (PCR 12X).....   | 46 |
| Tableau 12 : Les résultats pour <i>N. cyriacigeorgica</i> (PCR 20X) .....  | 46 |
| Tableau 13 : Les résultats pour <i>N. cyriacigeorgica</i> (PCR 12X) .....  | 47 |
| Tableau 14 : Les résultats pour <i>N. wallacei</i> (PCR 20X).....  | 47 |
| Tableau 15 : Les résultats pour <i>N. wallacei</i> (PCR 12X).....  | 47 |
| Tableau 16 : Les résultats pour <i>N. nova</i> (PCR 20X).....  | 48 |
| Tableau 17 : Les résultats pour <i>N. nova</i> (PCR 12X).....  | 48 |
| Tableau 18 : Les résultats pour <i>N. abscessus</i> (PCR 20X).....   | 48 |
| Tableau 19 : Les résultats pour <i>N. abscessus</i> (PCR 12X).....   | 49 |
| Tableau 20 : Les résultats pour <i>N. otitidiscavarium</i> (PCR 20X) .....   | 49 |
| Tableau 21 : Les résultats pour <i>N. otitidiscavarium</i> (PCR 12X) .....   | 49 |
| Tableau 22 : Comparaison des performances de détection (sensibilité) et limites de détection (LOD) des PCR 20X et 12X selon les espèces de <i>Nocardia</i> . ..... | 51 |

## 2. Liste des Figures :

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Arbre phylogénétique des actinomycètes nocardioformes (7).....  | 19 |
| Figure 2 : Radiographie thoracique : adénopathies médiastinales et hilaires, opacités excavées paramédiastinales gauche et masse pulmonaire droite (9).....  | 20 |
| Figure 3 : Tomodensitométrie thoracique en fenêtre parenchymateuse : Masses pulmonaires bilatérales dont une est excavée à gauche, clarté médiastinale latéro-aortique gauche et clarté sous-carénaire communiquant avec la bronche souche(10).....              | 20 |
| Figure 4 : Nocardiose cutanée, Abscess dorsal fistulisé (11) .....   | 21 |
| Figure 5 : observation visuelle de la jambe gauche du patient montrant une lésion infiltrée de type ulcère avec de multiples nodules excoriés. Infection à la <i>Nocardia brasiliensis</i> (11) .....  | 21 |
| Figure 6 : Images cérébrales pré- et postopératoires à l'imagerie par résonance magnétique. (A) Lésion rolandique droite, (B) important œdème périlésionnel, (C) signal hypo-intense se rehaussant en corolle après injection du produit de contraste. (12)..... | 23 |
| Figure 7 : Colonie <i>Nocardia</i> sur gélose Sang (COS), concentration bactérienne théorique 1500 UFC.....  | 29 |
| Figure 8 : <i>Nocardia</i> en coloration Ziehl- Neelsen (18).....  | 29 |
| Figure 9 : <i>Nocardia</i> en coloration Gram (18) .....   | 29 |
| Figure 10 : Les étapes de la PCR (21) .....  | 31 |
| Figure 11 : Résultats de migrations d'amplicons sur gel d'agarose 1%, M : marqueur de taille, colonnes 1 à 4, colonies +. Les témoins + et - n'apparaissent pas sur la figure.....   | 31 |
| Figure 12 : Gel d'agarose pour la migration des amplicons .....  | 31 |
| Figure 13 : Schéma simplifié du principe de la réaction de transcription inverse en présence d'amorce polyT (26).<br>.....   | 32 |
| Figure 14 : Principe de détection de la sonde TaqMan : Hybridation spécifique et dégradation par Taq polymérase (27).....  | 33 |
| Figure 15 : Aperçu étape par étape de la réaction de qPCR basée sur le SYBR Green (29).....  | 33 |
| Figure 16 : Illustration de l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycles et du calcul du point de passage du seuil (Cp/Ct/Cq (28).).....   | 34 |
| Figure 17 : Schéma simplifié du principe de la PCR nichée (29).....  | 35 |
| Figure 18 : Schéma simplifié du principe de la PCR multiplex (33).....   | 36 |
| Figure 19 : Schéma des amorces et sondes utilisées pour la PCR combinée 17S-NG ciblant le gène 16S rDNA<br>.....   | 42 |
| Figure 20 : Workflow expérimental pour l'évaluation des PCR maison (20X et 12X) dans la détection de <i>Nocardia</i> spp.....  | 44 |
| Figure 21 : Perspectives et applications de la PCR 12X pour la détection de <i>Nocardia</i> spp.....   | 56 |

## Abréviations et nomenclature

PCR : Polymerase chain reaction

LCS : Liquide cérebrospinal

TDM : Tomodensitométrie

IRM : Imagerie par résonance magnétique magnétique

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience acquise

GS : Gélose au Sang de mouton à 5%

BCP : gélose lactosé Pourpre Bromocrésol

LBA : Lavage bronchoalvéolaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ta : Annealing temperature

Tm : Melting temperature (La température à laquelle 50 % des molécules d'ADN double brin deviennent simple brin, c'est-à-dire que les deux brins de l'ADN se séparent)

ADNdb : ADN double brin

C3G : Céphalosporine de 3<sup>ième</sup> génération

ATB : Antibiotique

TMP-SMX : Triméthoprime-Sulfaméthoxazole

dNTPs : désoxyribonucléotides triphosphates — Mélange des quatre nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Ils servent de substrats à l'ADN polymérase lors des réactions de polymérisation, notamment en PCR, où ils permettent l'élongation du brin d'ADN en cours de synthèse

Ct : Cycle threshold ; nombre de cycles de PCR nécessaires pour que le signal fluorescent dépasse le seuil de détection

UND : UNDetected / non détecté ; mention utilisée lorsque la PCR ne produit pas de signal détectable (absence de valeur de Ct). Cela correspond à un échantillon considéré comme négatif pour la cible recherchée ou à une charge en ADN inférieure à la limite de détection de la méthode

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

IAI : Institut des agents infectieux

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

BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract

CI : Contrôle interne

LOD : Limite de détection

## Introduction

Parmi les infections opportunistes attendues en milieu hospitalier, la nocardiose occupe une place particulière. C'est une infection rare, mais elle est grave et redoutée. Rare, car elle ne concerne qu'un petit nombre de patients chaque année. Grave, car elle survient presque toujours dans des contextes fragiles : greffe d'organe, traitement immunosuppresseur, corticothérapie prolongée, infection par le VIH... Dans ces conditions, un retard diagnostique peut avoir des conséquences lourdes, parfois fatales (1).

Le problème, c'est que la nocardiose est trompeuse. Sur le plan clinique et radiologique, elle ressemble à bien d'autres maladies : tuberculose, infections fongiques, voire pathologies tumorales. Sur le plan microbiologique, elle est tout aussi difficile à diagnostiquer : les cultures sont longues, parfois négatives, et les colonies ne sont pas toujours évocatrices. Le diagnostic repose alors sur une succession de doutes, de délais et parfois d'erreurs. Pendant ce temps, le patient attend, et chaque jour qui passe peut aggraver son pronostic (2).

Le développement des techniques de biologie moléculaire, telles que la PCR, a constitué une avancée déterminante dans le diagnostic des infections à *Nocardia*. En quelques heures, elle peut confirmer ou écarter une nocardiose, alors que la culture demande parfois plusieurs jours. Mais dans la vraie vie hospitalière, les choses ne sont pas si simples. Les kits commerciaux, souvent cités comme la solution idéale, sont chers, pas toujours disponibles, et couvrent parfois un spectre limité d'espèces. Dans un laboratoire polyvalent, où les ressources sont contraintes et où l'on doit répondre à une multitude de besoins, ces obstacles sont majeurs.

C'est pour cette raison que de nombreux services ont choisi une autre voie : développer leurs propres protocoles de PCR, dits « maison ». Ces méthodes, mises au point localement, sont adaptées aux besoins du service et aux moyens disponibles. Mais avant de les intégrer à la routine, il faut les tester, les éprouver et surtout les valider. On ne peut pas se contenter d'un résultat approximatif quand il s'agit de patients immunodéprimés.

## Problématique

Le véritable enjeu est donc le suivant :

Comment fournir un diagnostic fiable et rapide de la nocardiose dans un contexte hospitalier, en dépassant les limites des cultures longues, tout en s'assurant que les PCR maison soient validées et robustes ?

Cette question n'est pas théorique. Elle reflète le quotidien de nombreux laboratoires hospitaliers : d'un côté, des patients en danger qui ont besoin d'un résultat rapide ; de l'autre, des outils disponibles mais

perfectibles. Entre ces deux réalités, il y a un besoin urgent de solutions pragmatiques.

### Objectifs du travail

Ce travail, mené au laboratoire de microbiologie de l'hôpital de la Croix-Rousse, avait pour objectif d'évaluer deux PCR développées en interne, nommées 20X et 12X, destinées à la détection des espèces de *Nocardia* directement dans les prélèvements cliniques.

L'étude visait à confronter ces outils aux méthodes conventionnelles de référence, telles que la culture et l'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, tout en examinant leur sensibilité, leur spécificité et leur reproductibilité dans des conditions expérimentales strictes. Elle cherchait également à déterminer leur faisabilité dans un contexte hospitalier, notamment à travers l'analyse de matrices respiratoires volontairement enrichies, afin de reproduire des situations proches de la pratique clinique.

### Intérêt du travail

L'intérêt est double. D'un point de vue clinique, réduire le délai diagnostique d'une nocardiose peut faire la différence entre une évolution favorable et un pronostic sombre. Proposer une technique plus rapide qui donne un résultat en quelques heures au lieu de plusieurs jours, et permet ainsi d'optimiser la prise en charge du patient. D'un point de vue organisationnel, valider des PCR maison revient à revendiquer que nos solutions proposées, peu coûteuses et mieux adaptées aux conditions locales, peuvent être mises en place efficacement, sans dépendre exclusivement de kits commerciaux onéreux.

Au-delà de la nocardiose, cette étude illustre aussi un enjeu plus large : celui de l'innovation pragmatique en microbiologie hospitalière. Développer, tester et valider des outils diagnostiques « faits maison », c'est donner plus de souplesse et d'autonomie aux laboratoires, au service direct des patients.

## **Partie 1 : Fondements théoriques**

Jusqu'au milieu du XVIII<sup>e</sup> l'espérance de vie en Europe était de 25 ans. A cette époque la principale cause de mortalité était les maladies infectieuses (3). En effet, quand nos ancêtres ne succombaient pas à cause de fléaux critiques tel que les guerres, les famines et les catastrophes climatiques, la plupart d'entre eux étaient emportés par une infection à germe bactérien, virale, fongique ou parasitaire. Certains de ces maladies peuvent apparaître anodines de nos jours, grâce aux avancées stratosphériques de la science et de la microbiologie (diagnostic très fiable, vaccination, antibiothérapie efficaces...)

Cependant, Les maladies infectieuses sont toujours à l'origine de plus de 14 millions de décès par an, dont la majorité survient dans l'hémisphère sud de la planète (à cause de plusieurs facteurs climatiques, sanitaires, économiques et sociales). La découverte de nouveaux microbes continue toujours, notamment avec le SARS-COV-2, et de nouvelles difficultés voient le jour entre autres l'apparition de nouveaux agents pathogènes, la résistance aux traitements anti-infectieux, recrudescence saisonnière de certaines pathologies, le vieillissement de la population et la concentration démographique.

Pour mieux comprendre tout cela, nous nous attarderons sur l'exemple de la *Nocardia*. Dans le prochain paragraphe, nous allons présenter cette bactérie, ses effets, les méthodes de sa détection ainsi que les traitements qui permettent de traiter les nocardioses.

## I. Présentation générale des *Nocardia*

### Histoire de la taxonomie et caractéristiques biologiques

Le genre *Nocardia* regroupe un groupe d'organismes très complexe faisant partie des actinomycètes aérobies stricts (4). Son histoire taxonomique est très conflictuelle et déroutante. En 1888 Edmond Nocard, un vétérinaire français, a isolé un germe Gram positif responsable d'un cas de farcin chez des bovins. Il nomme ce microbe *Streptothrix farcinica*, renommé ultérieurement *Nocardia farcinica* en mémoire du docteur Nocard par Vittore Benedetto Antonio Trevisan de Saint-Léon (botaniste italien 1818-1897). Ainsi un nouveau genre bactérien a été décrit. En 1896, Hans Eppinger (médecin autrichien 1879-1946) a isolé à partir d'un abcès cérébral humain, un organisme filamenteux ramifié, qu'il nommera *Cladothrix asteroides* ; cette souche sera renommée postérieurement *Nocardia asteroides*. Par la suite, d'autres espèces viendront renforcer les rangs du genre *Nocardia*, dont la *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia otitidiscavarium* et *Nocardia transvalensis* ainsi que d'autres espèces qui forment un mycélium fragmenté pour dépasser de nos jours les 200 espèces (5).

La classification des actinomycètes s'appuie sur le système chimio-taxonomique de

LECHEVALIER qui permet de discriminer les différents chimio-types (6). Ce système est basé sur la présence de certains acides aminés pariétaux, lipides ainsi que des sucres cellulaires ; la prédominance d'un de ces composants ou d'un autre élément (voire plusieurs) permet de caractériser un genre particulier et définissant ainsi un profil saccharidique, lipidique ou pariétal spécifique.

L'addenda des caractéristiques phylogénétiques et biochimique a permis de jumeler le genre *Nocardia* avec d'autres genres bactériens tels que *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Dietzia*, *Skermania*, *Mycobacterium* et *Corynebacterium* au sein d'un même bloc taxonomique supra- génétique d'actinomycètes nocardioformes (7).

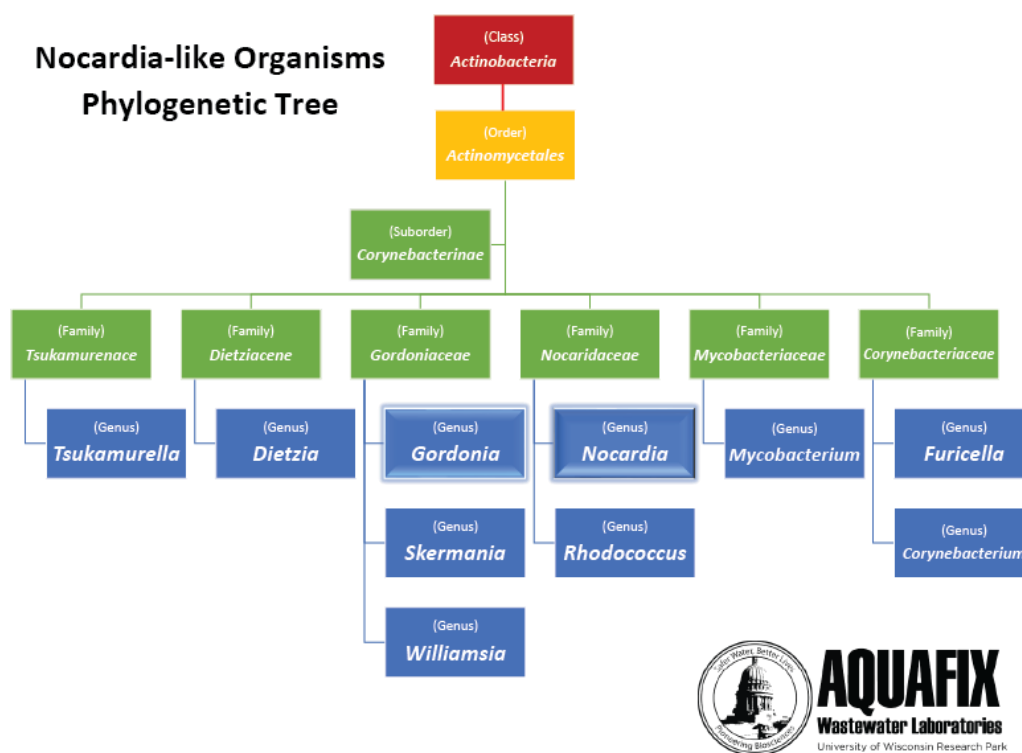


Figure 1 : Arbre phylogénétique des actinomycètes nocardioformes (7)

## II. Sémiologie des infections causées par les *Nocardia*

### 1) Nocardioses pulmonaires

L'organe le plus souvent touché par les *Nocardia* est le poumon, la fréquence des nocardioses pulmonaires est estimée entre 60% et 80% (8) de l'ensemble des nocardioses. Ces infections se présentent habituellement en tant que pneumopathie chronique mais des formes aiguës avec une évolution rapide sont possible.

Les manifestations cliniques sont polymorphes, évoquant un syndrome bronchique, une dyspnée, douleur thoracique d'origine pleurale et même parfois une détresse respiratoire. D'autres symptômes plus généraux pas spécialement évocateurs d'une infection pulmonaire sont observés : fièvre, frisson, asthénie, anémie, anorexie, sueurs nocturnes et une altération de l'état général (9).

Le tableau biologique est celui d'une maladie infectieuse et ne permet pas l'orientation vers un germe précis. Une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles est retrouvée, dont l'accentuation n'est pas corrélée à la sévérité de l'infection. En outre, l'association d'un syndrome inflammatoire à une anémie modérée est couramment remarquée.

Les images radiologiques des nocardioses pulmonaires sont polymorphes, et pas du tout spécifiques du genre *Nocardia*. Elles ne permettent donc pas d'émettre un diagnostic. L'atteinte pulmonaire peut-être uni- ou bilatérale, à localisation majoritairement apicale : pneumopathie nécrosante, abcès de petite ou de grande taille, épanchements pleuraux... et plus rarement une atteinte hilare, adénopathies ou calcifications (10).

La présentation clinique et radiologique des nocardioses pulmonaires peut également orienter le diagnostic vers une tuberculose. Le diagnostic est donc difficile d'autant plus que l'isolement bactérien est tardif, il faut donc savoir évoquer cette piste sur un terrain immunodéprimé car la rapidité de la mise en place d'une antibiothérapie peut avoir un effet positif sur le pronostic vital du patient (11).



Figure 2 : Radiographie thoracique : adénopathies médiastinales et hilaires, opacités excavées paramédiastinales gauches et masse pulmonaire droite (10)



Figure 3 : Tomodensitométrie thoracique en fenêtre parenchymateuse : Masses pulmonaires bilatérales dont une est excavée à gauche, clarté médiastinale latéro-aortique gauche et clarté sous-carénaire communiquant avec la bronche souche(11)

## 2) Nocardioses à localisations extra-pulmonaires

### Formes sous-cutanées et cutanées

Les formes cutanées des nocardioses s'observent essentiellement dans deux états cliniques et épidémiologiques différentes :

- ❖ Une nocardiose cutanée primitive qui survient à la suite d'un traumatisme chez des patient initialement sains. Elle touche généralement les parties découvertes. Les plaies sont aiguës ou subaiguës et peuvent s'apparenter à une cellulite, une pyodermite, une lymphangite ou à un abcès sous-cutané. On n'observe pas de dissémination systémique de l'infection et la guérison spontanée des lésions est probable.
- ❖ Une nocardiose cutanée secondaire, survient essentiellement sur des terrains immunodéprimés. Les lésions s'apparentent à des abcès sous-cutanés uniques ou multiples pouvant se fistuliser à la peau, ou à des cellulites. Elle découle, dans 10% à 15%, de la dissémination par voie hématogène depuis un foyer infectieux, le plus souvent pulmonaire. Dans de rares cas, elle peut découler d'une extension directe d'un foyer pulmonaire à travers la paroi thoracique (8).



Figure 4 : Nocardiose cutanée, Abcès dorsal fistulisé (8)



Figure 5 : observation visuelle de la jambe gauche du patient montrant une lésion infiltrée de type ulcère avec de multiples nodules excoriés. Infection à la *Nocardia brasiliensis* (8)

### Formes neuroméningées

Les nocardioses cérébrales sont majoritairement secondaires à une infection pulmonaire préalable. Cependant des cas de nocardioses neuroméningées peuvent être observées indépendamment d'aucun site d'infection primaire. Pour éviter tous les risques, lors du diagnostic d'une nocardiose pulmonaire, un bilan d'extension doit impérativement être prescrit, même en l'absence de signes neurologiques.

L'atteinte cérébrale se présente habituellement sous la forme d'un ou de plusieurs abcès qui peuvent se trouver dans n'importe quel endroit du crâne (cerveau, cervelet, pont, bulbe rachidien, ganglion de Gasser). L'infection est portée à former des extensions satellites.

Le tableau clinique résulte d'un processus expansif intracérébral, avec des signes et des symptômes focaux variables en fonction de la région du cerveau atteinte : céphalées (le symptôme le plus fréquent, souvent chronique précédant les autres signes cliniques), nausées et vomissements, raideur de la nuque, photophobie, déficit sensitif et/ou moteur, vertiges, instabilité, troubles du comportement (irritabilité, syndrome frontal)

...

Il est à noter que certains cas de nocardiose cérébrale ne présentent aucun signe neurologique (plus d'un tiers des cas des nocardioses cérébrales). Seule l'imagerie peut mettre en évidence la localisation neuroméningée de la nocardiose, d'où l'importance de l'entreprise d'un bilan d'extension.

Le liquide cébrospinal (LCS) est habituellement normal dans l'infection cérébrale à la *Nocardia*. Toutefois, en cas de méningite, le LCS peut révéler une hyperleucocytose, principalement une polynucléose neutrophile, une hypoglycorachie et une hyperprotéinorachie.

L'examen tomodensitométrique (TDM) du cerveau permet d'émettre un diagnostic du processus expansif intracérébrale et de déterminer la localisation, le nombre et les dimensions des abcès. L'administration d'un produit de contraste est indispensable pour la réalisation d'image par TDM ; dans 80% des cas, les abcès cérébraux sont visualisés par le biais de cercles concentriques avec une zone centrale hypodense et un halo périphérique également de basse densité.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de confirmer la nature liquidienne de l'abcès intracrânien (12).

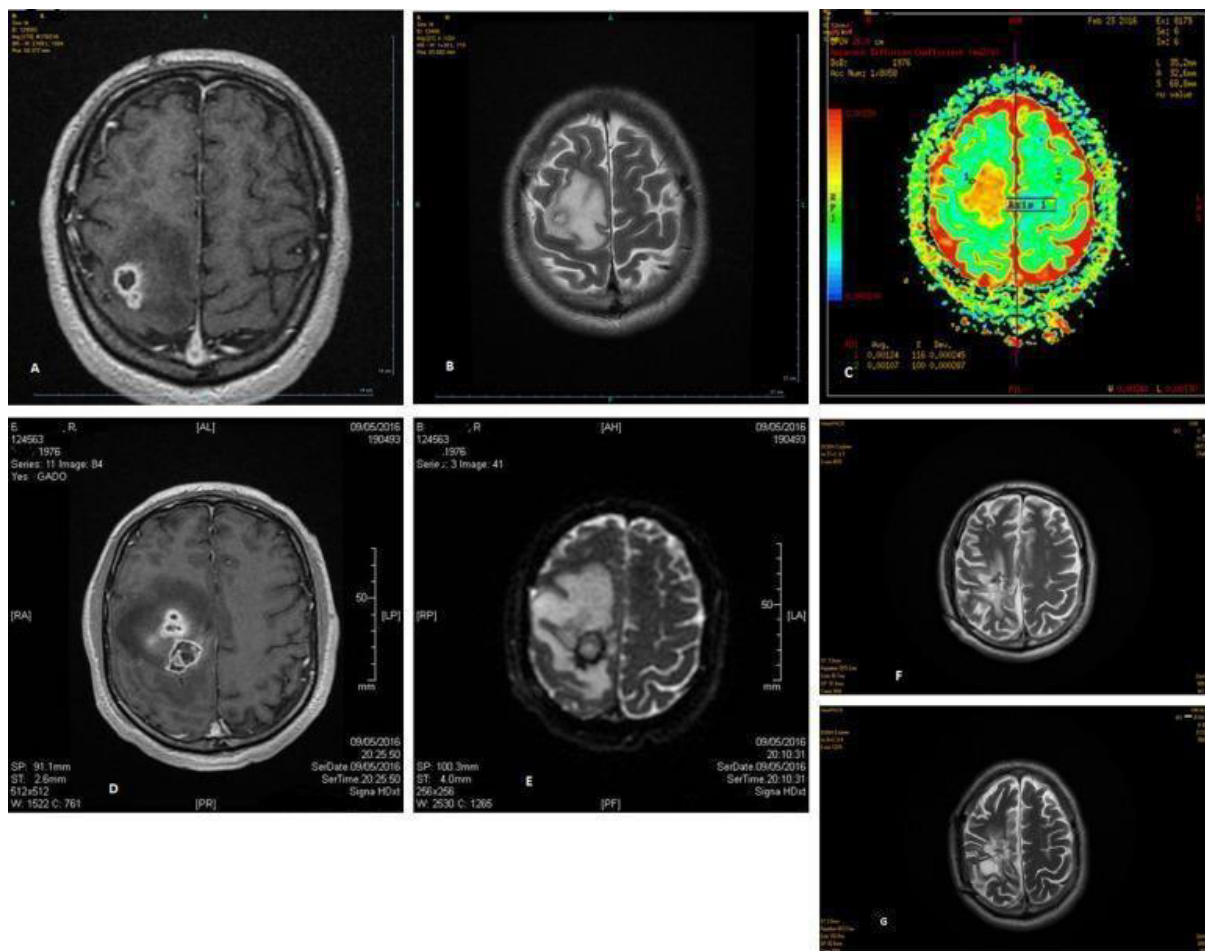


Figure 6 : Images cérébrales pré- et postopératoires à l'imagerie par résonance magnétique. (A) Lésion rolandique droite, (B) important œdème périlésionnel, (C) signal hypo-intense se rehaussant en corolle après injection du produit de contraste. (12)

### Formes disséminées

La nocardiose disséminée se définit classiquement comme une infection touchant au moins deux sites anatomiques non contigus, souvent avec bactériémie ou atteinte systémique. Selon une étude multicentrique française, 34,5 % des patients infectés par *Nocardia* présentaient une forme disséminée, et cette dissémination était associée à des conditions d'immunosuppression, notamment des maladies auto-immunes, la corticothérapie à haute dose, et la lymphopénie ( $< 1 \text{ G/L}$ ) (13). Dans cette cohorte, l'espèce *Nocardia farcinica* ressortait non seulement comme la plus fréquemment isolée, mais aussi comme celle présentant le plus haut taux de dissémination (36,8 %) (13). Cependant, l'impact de la dissémination sur le pronostic reste débattu. Une large analyse de 374 patients répartis sur plusieurs centres aux États-Unis a indiqué que l'infection disséminée, prise isolément, ne prédisait pas significativement la mortalité à un an (HR 1,16, IC 95 % 0,62-2,16,  $p = 0,650$ ), tandis qu'un concept composite dit d'« infection avancée » — qui inclut la dissémination, la cavitation pulmonaire ou une atteinte pleurale — était, lui, un prédicteur indépendant de décès (HR 2,48, IC 95 % 1,37-4,49,  $p = 0,003$ ) (14). Enfin, une étude coréenne comparant les présentations radiologiques des formes localisées et disséminées de nocardiose pulmonaire a montré que la dissémination s'accompagnait plus souvent de cavitations (64,3 % vs 32,8 %,  $p = 0,029$ ) et d'épanchements pleuraux (64,3 % vs 29,5 %,  $p = 0,014$ ) ; néanmoins, la dissémination en

tant que tel n'était pas un facteur de mortalité significatif dans ce modèle (HR 0,80, IC 95 % 0,23-2,75, p = 0,724) (15). Ces résultats soulignent que, si la dissémination est un critère clinique important à rechercher, ce sont souvent les autres caractéristiques de l'infection (cavitation, atteinte pleurale, comorbidités, espèce infectante) qui influencent réellement le pronostic.

### **III. Épidémiologie de la maladie**

Le nombre des sujets atteints d'une infection à *Nocardia* est en constante augmentation dans le monde. L'identification rapide et spécifique des *Nocardia* est indispensable à cause des risques graves qu'elle peut engendrer sur le pronostic vital du patient (16).

Il est important de rappeler que les *Nocardia* sont des saprophytes ubiquitaires de l'environnement et qu'elles ne font pas partie du microbiote naturel de l'Homme (la flore microbienne normalement présente dans le corps humain qui est estimé à 3 kilogrammes). La voie majoritaire de contamination est respiratoire, par inhalation de la bactérie, mais plus rarement la contamination peut être suite à un traumatisme.

La nocardiose est une infection rare, touchant principalement les sujets immunodéprimés. Globalement, l'incidence dans les pays occidentaux est estimée à environ 3.3 à 8.7 cas par million d'habitants par an, bien que cette valeur puisse être sous-estimée à cause des difficultés de diagnostic. L'incidence annuelle aux États-Unis est évaluée à 1/250000 habitants, il y a environ 500 à 1000 nouveaux cas par an (17). L'incidence exact en Europe est inconnue. Les hommes sont plus souvent atteints que les femmes avec un ratio de 3 :1, et les infections surviennent plutôt chez l'adultes âgé de 60 à 80 ans (17).

L'incidence est plus élevée dans les régions tropicales et subtropicales, où les conditions climatiques et environnementales sont plus favorables à la prolifération de la bactérie dans le sol, les eaux...

Les espèces les plus couramment responsables d'infection en France sont la *Nocardia farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. nova complex* et *N. abscessus complex* (17).

En France la nocardiose reste très rare et pas assez documentée. L'âge moyen des patients en France est de 63 ans (aux États-Unis un intervalle très large de 2 à 98 ans), c'est une infection de l'adulte dans la seconde partie de sa vie puisque plus de 79% des patients ont plus de 50 ans (18).

| Région               | Densité des souches isolées |
|----------------------|-----------------------------|
| Sud-Est de la France | ↑ Forte densité             |
| Outre-Mer            | ↑ Forte densité             |
| Nord de la France    | ↓ Faible densité            |

Tableau 1 : Répartition géographique des infections à *Nocardia* en France (18).

| Espèce                      | Proportion (%) | Tendance   |
|-----------------------------|----------------|------------|
| <i>N. farcinica</i>         | 20,2           | ↑ Augmente |
| <i>N. abscessus complex</i> | 19,9           | = Stable   |
| <i>N.nova complex</i>       | 19,5           | = Stable   |
| <i>N. cyriacigeorgica</i>   | 12,9           | = Stable   |

Tableau 2 : Évolution de la proportion des principales espèces de *Nocardia* en France (2010-2015) (18).

## **IV. Traitement antibiotique des nocardioses**

### **1. Traitement curatif des nocardioses**

Les nocardioses sont des infections gravissimes nécessitant une prise en charge précoce, rigoureuse et adaptée. Le traitement des nocardioses repose essentiellement sur l'utilisation d'antibiotiques adaptés à la sensibilité des souches isolées et à la sévérité de l'infection. Une identification de l'espèce de *Nocardia* est cruciale afin de prédire la sensibilité de la souche aux antibiotiques, notamment aux bêta-lactamines. Le triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX) est considéré comme la thérapie de référence grâce à son efficacité sur la majorité des espèces de *Nocardia* cliniques (34). Toutefois, face à la diversité des espèces et aux risques de résistance, une association antibiotique est souvent préconisée, en particulier dans les formes disséminées ou graves.

Dans les cas sévères, l'ajout de carbapénèmes (tels que l'imipénème) ou d'aminosides (comme l'amikacine) permet d'élargir le spectre d'action et d'améliorer les chances de succès thérapeutique (33, 34). De plus, des alternatives telles que les linézolides ont montré des résultats prometteurs *in vitro* et peuvent être envisagées chez les patients présentant des intolérances ou une résistance aux traitements classiques (35).

La durée du traitement est généralement longue, souvent plusieurs mois, en fonction de la localisation de l'infection et de l'évolution clinique. Un suivi attentif est indispensable afin d'adapter la stratégie thérapeutique, éviter les rechutes et gérer les effets indésirables liés aux antibiotiques.

### **2. Traitement antibio-prophylactique des nocardioses**

L'antibioprophylaxie des nocardioses doit être motivée par une connaissance approfondie de la sensibilité de l'espèce infectante aux antibiotiques. Une étude menée en France entre 2010 et 2015 sur 793 souches de *Nocardia* a permis d'infirmier l'utilité des céphalosporines dans l'arsenal thérapeutique, démontrant une résistance élevée aux C3G (~80 % des souches non sensibles) (18). En revanche, des antibiotiques comme le triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX), l'amikacine et le linézolide ont montré une forte activité *in vitro*. Ces résultats confirment le rôle clé du TMP-SMX en prophylaxie chez les patients immunodéprimés, notamment ceux recevant une greffe d'organe ou sous corticothérapie prolongée (36).

| Antibiotique                    | Pourcentage de souches non sensibles | Recommandation en prophylaxie               |
|---------------------------------|--------------------------------------|---|
| Linézolide                      | 0%                                   | Non (toxicité à long terme)                 |
| Amikacine                       | 2,9%                                 | Non (Néphrotoxicité, ototoxicité)           |
| Triméthoprime-Sulfaméthoxazole  | 7%                                   | Oui (ATB de référence)                      |
| Minocycline                     | 9,4%                                 | Alternative en cas d'intolérance au TMP-SMX |
| Imipénem                        | 13,8%                                | Non (usage en traitement curatif)           |
| Céphalosporine de 3e génération | 80%                                  | Non (forte résistance)                      |

Tableau 3 : Sensibilité des souches *Nocardia* aux antibiotiques (2010-2015) (18)

| Facteur de risque  | Indication de prophylaxie | Antibiotique recommandé |
|--|---------------------------|-------------------------|
| Transplantation d'organe                                       | OUI                       | TMP-SMX                 |
| Immunosuppression sévère (chimiothérapie, VIH avancé)          | OUI                       | TMP-SMX                 |
| Traitement prolongé par corticoïdes (> 20mg/j)                 | Cas par cas               | TMP-SMX ou Minocycline  |
| Mucoviscidose avec infections respiratoires chroniques         | Non (sauf cas spécifique) | Autre recommandation    |
| Patients hospitalisés en zones endémiques (Sud-Est, Outre-Mer) | Surveillance              | TMP-SMX                 |

Tableau 4 : Facteur de risque nécessitant une antibioprofylaxie des nocardioses (18)

## V. Méthode de diagnostic actuelle des nocardioses

Comme évoqué précédemment, la sémiologie clinique, radiologique et biologique associée aux nocardioses sont très peu différentielles et peuvent être amalgamées avec d'autres infections bactériennes, fongiques ou avec des tumeurs malignes affectant les poumons, la peau et le cerveau. Il est donc impératif d'identifier la bactérie *Nocardia* à partir d'un prélèvement, pour pouvoir poser le diagnostic de nocardiose.

### 1. Prélèvement

Le diagnostic de la nocardiose repose sur la mise en évidence du germe infectieux, à partir de prélèvements dont l'origine est diverse et variée, nécessitant parfois des méthodes invasives : aspirations, expectorations, lavage bronchoalvéolaire (LBA), pus d'abcès, sang (les hémocultures sont peu utilisées, car rarement positives même en cas de nocardiose disséminée), LCS, liquide pleural, tissu osseux, biopsie cutanée, etc.

En présence de *Nocardia* dans les expectorations pulmonaire, l'hypothèse d'une colonisation ne doit pas être écartée.

### 2. Culture bactérienne

Les bactéries du genre *Nocardia* sont des bactéries aérobies, peu exigeantes. La culture est simple sur des milieux variés sans antibiotiques (Gélose au sang, chocolat, Buffered Charcoal Yeast Extract « BCYE », gélose lactosé Pourpre Bromocrésol « BCP », Middelbrook...), ainsi que sur des milieux de culture pour champignons ou mycobactérie (Sabouraud, Bennett, Löwenstein Jensen).

La vitesse de croissance diffère entre les espèces : *N. farcinica*, *N. otitidiscavarium*, *N. cyriacigeorgica* sont des espèces à croissance rapide (48h à 72h) alors que la croissance de la *N. abscessus* et de la *N. nova* est plus lente (5 à 10 jours). Les géloses sont mises dans un incubateur à 35± 2°C (20).

La morphologie microscopique des colonies de la *Nocardia* est très variable : colonies cérébriformes, La pigmentation des colonies est variable également (certaines sont très blanchâtres alors que d'autres ont un aspect plus matte), des colonies sont incrustées avec un aspect poudré.

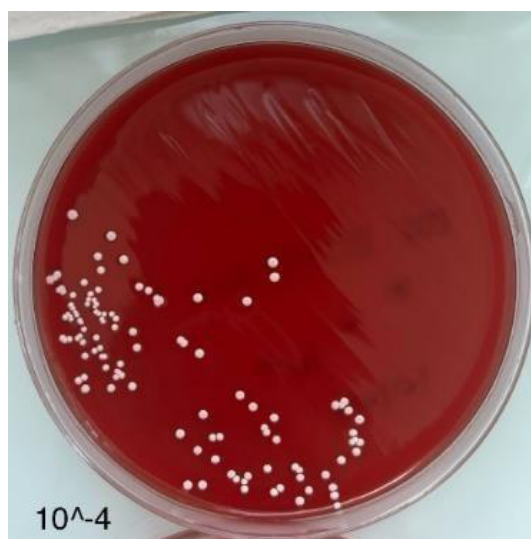


Figure 7 : Colonie *Nocardia farcinica* sur gélose Sang (COS), concentration bactérienne théorique 1500 UFC. Photo personnelle

### 3. Diagnostic microbiologique

- Microscopie :

Coloration de Gram : *Nocardia spp* sont des bacilles Gram positif ramifiés et pointillés (aspect tigré et moucheté)

Coloration spécifique Ziehl, c'est une coloration dite douce et informative pour *Nocardia* (paroi contient des acides mycoliques ; des acides gras ramifiés à longue chaînes carbonée se trouvant dans les parois cellulaires des mycobactéries) (21,22).



Figure 9 : *Nocardia* en coloration Gram (22)



Figure 8 : *Nocardia* en coloration Ziehl-Neelsen (22)

## VI. Apport de la PCR dans le diagnostic microbiologique des nocardioses

### 1. Historique de la Polymerase chain reaction « PCR »

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une méthode de biologie moléculaire mise au point par le biochimiste américain Kary B. MULLIS (1944-2019) dans les années 1980. Le prix Nobel de chimie lui sera décerné en 1993 pour cette invention révolutionnaire, permettant l'amplification rapide et précise de segments spécifiques d'ADN (23).

Avant la PCR, les scientifiques étaient limités dans leurs travaux par des techniques de biologies moléculaires très complexes, coûteuses, chronophages et peu sensibles. La PCR a permis de s'affranchir de ces contraintes en offrant une méthode rapide, robuste et relativement abordable, facilitant ainsi l'avancée scientifique dans plusieurs domaines tels que la microbiologie, la médecine légale, l'histoire, la génétique...

En microbiologie, La PCR a permis l'identification rapide des germes responsables de maladies infectieuses.

C'est devenu une technique d'analyse incontournable dans le diagnostic des infections causées par les micro-organismes.

### 2. Principe de la PCR :

Depuis son invention, la PCR devint une technique incontournable dans la détection et l'amplification des acides nucléiques. C'est une technique de répllication de l'ADN par une ADN polymérase thermostable (25).

#### Composants nécessaires à la PCR

- **ADN matrice** : En théorie toute source d'ADN peut être utilisée comme matrice, Néanmoins une connaissance minimale de la structure de l'acide nucléique est nécessaire pour la conception des amorces.
- **Amorces (primers)** : Séquences spécifiques encadrant la région à amplifier (une Forward et une Reverse). D'une longueur d'une quinzaine de nucléotides. La  $T_m$  des amorces conditionne la  $T_a$ .

$$T_m = 2(a+t) + 4(g+c), T_a = T_m \pm 5^\circ\text{C}$$

- **dNTPs (A, T, C, G)** : Bases nécessaires à la synthèse.
- **ADN polymérase (Taq polymerase)** : Enzyme thermostable. Une activité polymérase et exonucléase  $5' \rightarrow 3'$ . Pas d'activité exonucléase  $3' \rightarrow 5'$  (proofreading), Contrairement à d'autres polymérases, la Taq polymérase ne corrige pas les erreurs d'incorporation de nucléotides, ce qui entraîne un taux d'erreur plus élevé.
- **Tampon de réaction et  $Mg^{2+}$**  : Optimisation de l'activité enzymatique.

## Étapes du cycle de PCR

2. Dénaturation : l'ADN cible (matrice) est séparé en deux brins par chauffage à 95°C.
3. Recrutement des amorces : la température est réduite à  $\approx 55^\circ\text{C}$  pour permettre aux amorces de se recoller  $\rightarrow T_a$ . La  $T_a$  utilisée est  $\approx 5^\circ\text{C}$  en dessous de la température de fusion (C'est la température à laquelle 50 % des molécules d'ADN double brin deviennent simple brin) la plus petite des deux amorces
4. Polymérisation (élongation, extension) : la température est augmentée à 72°C pour une étape de polymérisation optimale qui consomme les désoxynucléoside triphosphate «dNTP» et le  $\text{Mg}^{2+}$  présente dans le mix. La vitesse de polymérisation est approximativement égale à 1 kb/min. Taq polymérase, extraite de *Thermus aquaticus*, synthétise un nouveau brin d'ADN à partir des amorces en incorporant les dNTPs

Ces trois étapes sont répétées de manière cyclique une trentaine de fois, amplifiant exponentiellement le fragment cible.

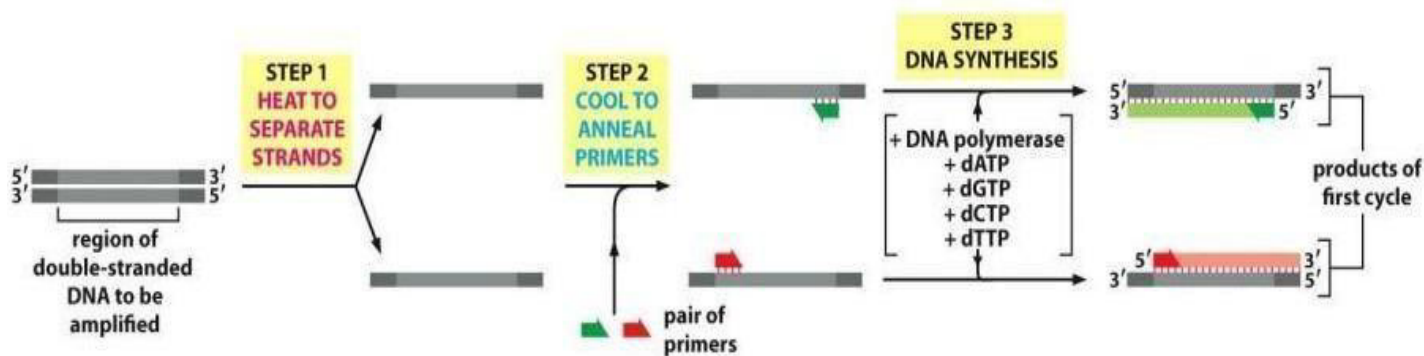


Figure 10 : Les étapes de la PCR (25).

Le résultat de l'amplification par PCR est ensuite analysé par migration électrophorèse sur gel d'agarose, après ajout d'un intercalant de l'ADN dans le gel pour la visualisation des bandes. La concentration en agar-agar dans le gel dépend de la taille du fragment cible.



Figure 12 : Gel d'agarose pour la migration des amplicons. Photo personnelle.



Figure 11 : Résultats de migrations d'amplicons sur gel d'agarose 1%, M : marqueur de taille, colonnes 1 à 4, colonies +. Les témoins + et - n'apparaissent pas sur la figure.

### 3. Les variantes de PCR : Approches et applications :

#### ✓ RT-PCR (Reverse Transcription PCR) :

**Synthèse d'ADNc** : Fabrication d'ADN à partir d'ARN, réalisée grâce à des enzymes appelées transcriptases inverses, qui viennent de certains virus. Pour que cette fabrication commence, une petite séquence d'ADN appelée amorce, avec une extrémité spécifique (3'-OH), est nécessaire. Quand l'ARN a une longue chaîne d'adénine (queue polyA) à son extrémité, on peut utiliser une amorce faite de thymine (polyT) pour lancer la synthèse (26).

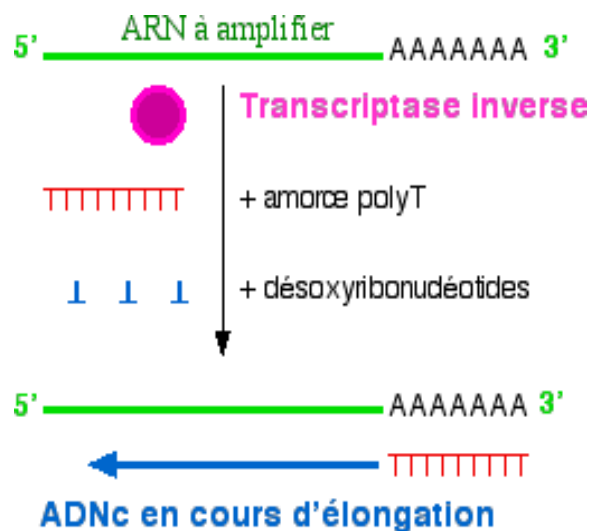


Figure 13 : Schéma simplifié du principe de la réaction de transcription inverse en présence d'amorce polyT (26).

#### ✓ qPCR (PCR en temps réel) :

Quantification de l'ADN avec fluorescence au fur et à mesure du cycle de PCR. Le cycle de la PCR est composé uniquement de deux étapes :

1. Dénaturation
2. Hybridation & Polymérisation

Utilisation d'un fluorophore pour permettre la surveillance en temps réel de la réaction :

## ✚ Sondes TaqMan :

Ces sondes sont conçues pour se lier aux séquences cibles des amplicons. Elles contiennent à leur extrémité 5' un fluorophore, et un inhibiteur de fluorescence à l'extrémité 3'. La proximité des deux fluorophores empêche l'émission d'un signal fluorescent. Grâce à l'activité exonucléase 5' → 3' de l'ADN polymérase Taq la sonde est détruite pendant l'étape de polymérisation libérant un signal lumineux proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée (27).

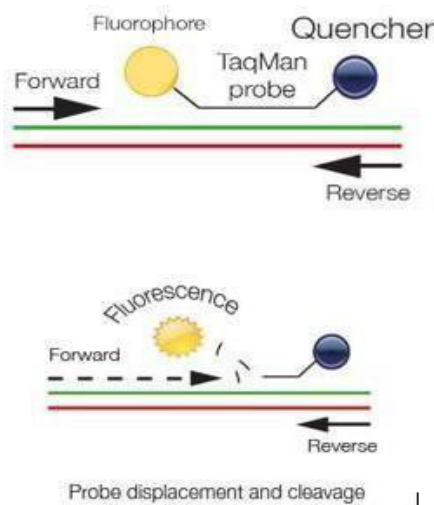


Figure 14 : Principe de détection de la sonde TaqMan : Hybridation spécifique et dégradation par Taq polymérase (27)

- ✚ SYBR® Green (28) : réactif intercalant de l'ADN, de lie au sillon mineur de l'ADNdb. La dénaturation de l'ADN entraîne une libération du SYBER Green et par conséquent une diminution du signal de la fluorescence. Dans le produit final après élongation l'ADNdb réincorpore le SYBER Green et la fluorescence est augmentée (28–30).

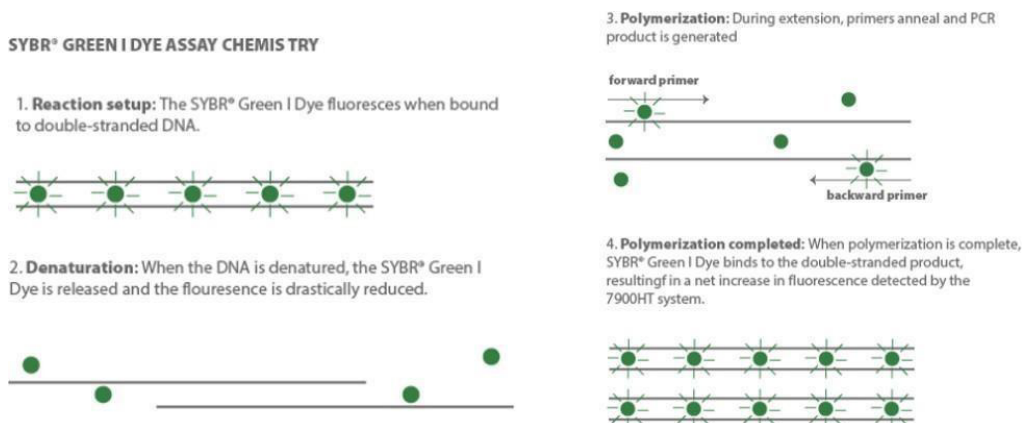


Figure 15 : Aperçu étape par étape de la réaction de qPCR basée sur le SYBR Green (29)

## ✓ Comparaison entre la qPCR basée sur SYBER Green et TaqMan

|                      | TaqMan®  | SYBR®   |
|----------------------|--|---|
| <i>Avantages</i>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Une spécificité accrue</li> <li>• Quantification plus précise</li> <li>• Multiplexage : plusieurs gènes dans le même puits</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Coût relativement faible des amorces</li> <li>• Pas de sondes marquées par fluorescence nécessaires</li> </ul> |
| <i>Inconvénients</i> | Coût relativement élevé de la sonde marquée  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Moins spécifique</li> <li>• Pas de multiplexage</li> </ul>   |

Tableau 5 : Comparaison TaqMan et SYBR Green (29).

## 4. Résultat qPCR

Un tracé de l'amplification est généré au fur à mesure de la réaction de PCR, grâce à la collecte d'information par le logiciel d'analyse. Les courbes d'amplification sont des fonctions logarithmiques représentant le  $\Delta Rn$  en fonction du nombre de cycles.  $\Delta Rn = Rnf - Rnb$ , où  $Rnf$  est l'émission de fluorescence à un moment donné et  $Rnb$  la fluorescence de base. La valeur  $Ct$  correspond au nombre de cycles où la fluorescence ( $\Delta Rn$ ) dépasse un seuil prédéterminé. Cette valeur est inversement proportionnelle à la concentration initiale de l'échantillon en Acide nucléique cible (28,29).

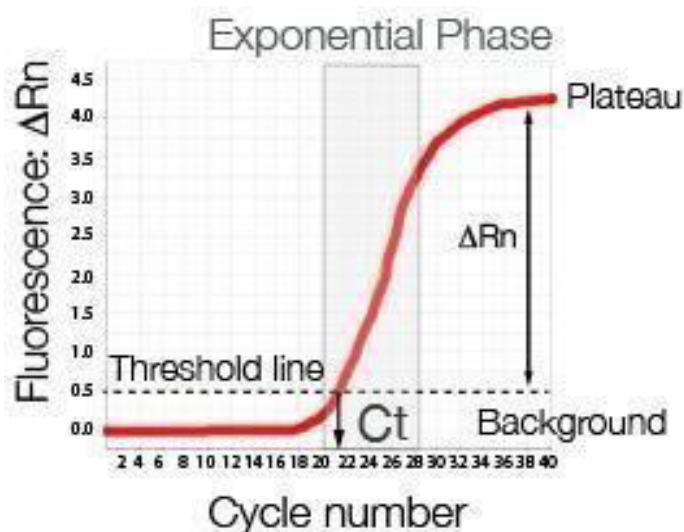


Figure 16 : Illustration de l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycles et du calcul du point de passage du seuil ( $Ct$  : Cycle threshold ;  $Cq$  : Quantification cycle ;  $Cp$  : Crossing point) (28).

## 5. Autres techniques de PCR

- **PCR Nichée :**

PCR en deux étapes, conçue pour améliorer la sensibilité et la spécificité (31). Dans un premier temps, une première amplification est faite (PCR externe), grâce à une première paire d'amorces utilisée pour amplifier une région cible d'ADN assez large, permettant d'obtenir un premier résultat de PCR contenant la séquence d'intérêt. Dans un second temps, une paire d'amorces située à l'intérieur de la séquence amplifiée lors de la première PCR est utilisée pour une seconde amplification (PCR interne). Uniquement le produit amplifié lors de la première étape et contenant la séquence correcte sera de nouveau amplifié, minimisant ainsi le danger d'une amplification non spécifique (29,32).

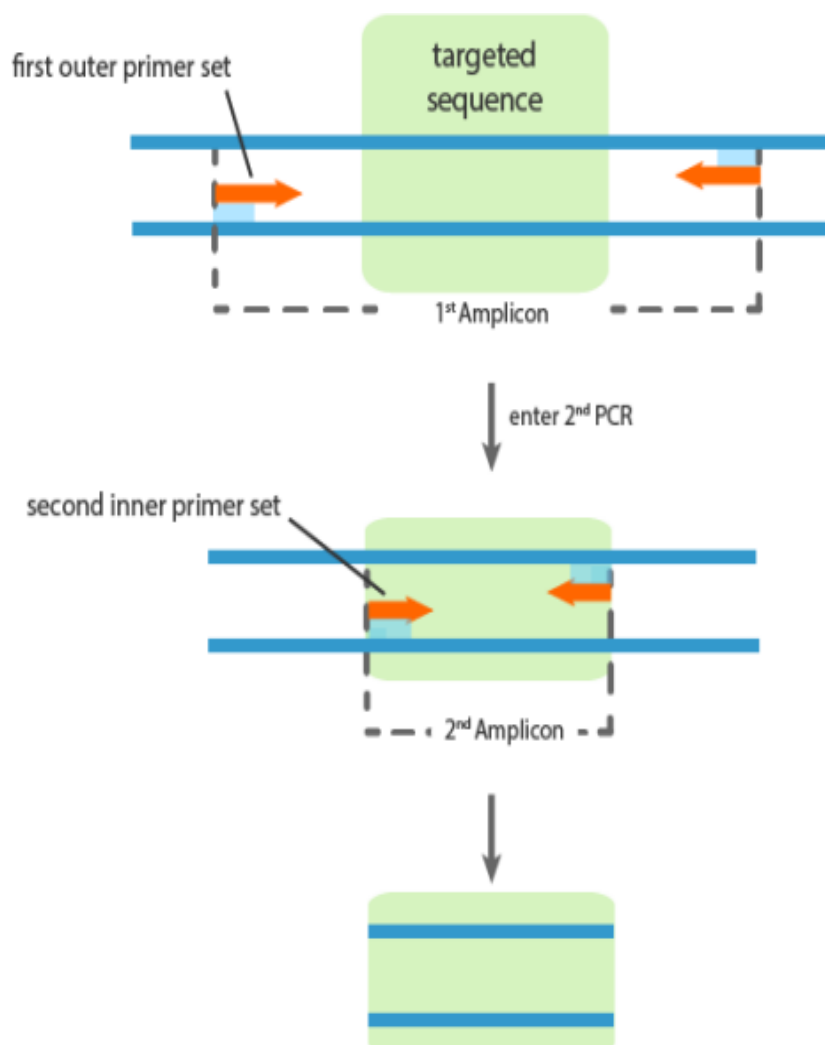


Figure 17 : Schéma simplifié du principe de la PCR nichée (29).

- **PCR multiplex :**

Amplification de plusieurs séquences d'ADNc en même temps (33).

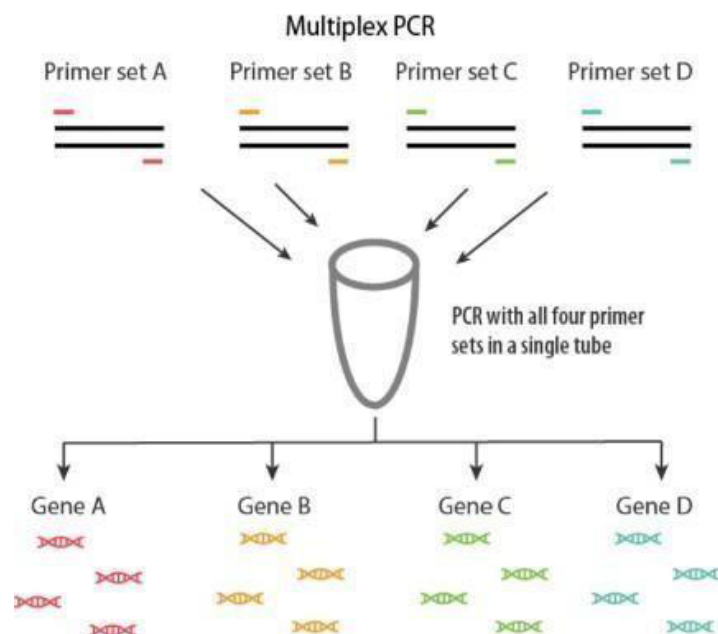


Figure 18 : Schéma simplifié du principe de la PCR multiplex (33).

## 6. Revue des PCR *Nocardia* dans la littérature

Dans une étude multicentrique française, une PCR *Nocardia* « maison » a démontré une sensibilité de 88 % et une spécificité de 74 % dans la détection de *Nocardia* à partir d'échantillons cliniques, ce qui constituait un gain significatif en comparaison des méthodes classiques, souvent longues et peu sensibles (37). La PCR a permis d'identifier des cas dits « probables » non confirmés par la culture, mettant en lumière son intérêt dans le diagnostic précoce, notamment chez les patients immunodéprimés (37).

Par ailleurs, une autre publication rapporte le développement d'une PCR multiplex capable de détecter *Nocardia*, *Streptomyces* et *Rhodococcus* simultanément dans des prélèvements respiratoires. Cette technique a permis la détection d'infections à *Nocardia cyriacigeorgica* et *Nocardia farcinica* là où les cultures étaient négatives, soulignant ainsi la « valeur ajoutée » de la PCR dans la prise en charge des infections à bactéries à croissance lente ou difficiles à cultiver (38).

Les auteurs insistent toutefois sur la nécessité d'une interprétation prudente, particulièrement pour les échantillons respiratoires où « la distinction entre colonisation et infection active peut être difficile » (37).

En somme, la PCR constitue un outil complémentaire important, permettant « un diagnostic plus rapide et une meilleure prise en charge des patients », en particulier ceux immunodéprimés (37,38).

## **Partie 2 : Partie expérimentale**

## I. Objectifs

Ce projet a été réalisé au sein du service de microbiologie de l'Institut des Agents Infectieux (IAI), laboratoire de biologie médicale de référence (LBMR) des nocardioses, rattaché aux Hospices Civils de Lyon, sur le site de l'hôpital de la Croix-Rousse.

Le déroulement des expérimentations s'est étalé sur deux périodes de stage distinctes : de juin à août 2023, puis de juin à août 2024.

L'étude avait pour but principal d'évaluer et de comparer deux protocoles de PCR « maison » développés en interne pour la détection des espèces du genre *Nocardia* : une PCR « maison » dite « 20X », actuellement réalisée en routine, et une PCR « maison » dite « 12X » (20X et 12X).

La PCR *Nocardia* version « 20X » est un protocole en deux étapes : premièrement, une étape de détection par une PCR en temps réel basée sur l'amplification du gène ARN16S utilisant des amorces et une sonde spécifique des *Nocardia* ; dans un deuxième temps, et uniquement pour les prélèvements détectés positifs, une étape d'identification par une PCR d'amplification et séquençage du gène hsp65 (séquençage de type Sanger), permettant une identification à l'espèce des *Nocardia*. Cependant, ces deux PCR peuvent amplifier d'autres bactéries de l'ordre des Actinomycétales, et le résultat du séquençage Sanger peut être ininterprétable.

La PCR version « 12X » est un protocole basé sur une PCR en temps réel amplifiant une partie discriminante pour l'identification à l'espèce des *Nocardia* de l'ARN16S, suivie d'un séquençage haut débit utilisant la technologie ONT (Oxford Nanopore Technologies). Les avantages de la version « 12X » sont un protocole en un seul temps, permettant une disponibilité du résultat plus rapide, et une possibilité d'exploiter toutes les amplifications positives (même en présence de plusieurs bactéries) grâce au séquençage de nouvelle génération.

## II. Matériels et Méthodes

Afin de se rapprocher au mieux des conditions rencontrées en pratique clinique, les deux types de PCR ont été testés dans une matrice respiratoire qui simule la réalité des prélèvements respiratoires. Ce milieu était élaboré à partir de reliquats de prélèvements broncho- alvéolaires (LBA) provenant de patients ayant été dépistés négatifs pour la bactériologie conventionnelle (absence de bactéries aérobies ou culture non significative).

### 1. Isolats étudiés et conservation

Dans ce travail six espèces de *Nocardia* ont été étudiées et sélectionnées en fonction de leur fréquence clinique et de leur disponibilité dans la collection du laboratoire :

- ✓ *Nocardia farcinica*
- ✓ *Nocardia cyriacigeorgica*
- ✓ *Nocardia nova*
- ✓ *Nocardia abscessus*
- ✓ *Nocardia wallacei*
- ✓ *Nocardia otitidiscavarium*

Ces isolats cliniques ont été conservés précédemment par le LBMR des Nocardioses. Ces derniers étaient stockés et préservés à  $-80$  °C dans des congélateurs spécialisés, assurant la constance génétique et phénotypique des souches.

Avant chaque série d'expérimentations, les isolats étaient décongelés puis ensemencés sur une gélose au sang en conditions aseptiques pour réactiver la souche bactérienne et d'obtenir une quantité suffisante de bactéries pour les expériences suivantes.

## 2. Préparation des suspensions bactériennes

À partir de chaque souche, une suspension bactérienne a été préparée dans de l'eau physiologique stérile à une densité équivalente à **0,5 McFarland** et vérifiée par spectrophotomètre, soit environ  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Cette suspension mère a ensuite été diluée en série au 1/10 jusqu'au 1/10 000 000 (soit  $10^{-7}$ ), donnant huit conditions expérimentales :

0,5 McF, 1/10, 1/100, 1/1 000, 1/10 000, 1/100 000, 1/1 000 000 et 1/10 000 000.

Pour chaque dilution, une culture par ensemencement semi-quantitatif de type « urine » sur gélose COS a été préparée, afin d'estimer l'inoculum de départ de *Nocardia* pour chaque dilution.

## 3. Préparation de la matrice respiratoire

Pour reproduire la réalité des conditions rencontrées en milieu hospitalier, une matrice respiratoire a été constituée à partir de reliquats de prélèvements respiratoires (aspiration bronchique ou LBA) négatifs pour la bactériologie conventionnelle (absence de bactéries aérobies ou culture non significative).

Ces prélèvements, conservés en routine jusqu'à J+7, ont été poolés afin d'obtenir une matrice unique d'au moins 7 mL de volume, nécessaire pour réalisation de l'ensemble des étapes du protocole expérimental.

Cette matrice a ensuite été aliquotée en 8 aliquots de 900 µL chacun. 100 µL de chaque dilution de la suspension bactérienne a été ajoutée au 900 µL de matrice unique, correspondant à une dilution finale au 1/10 de la suspension bactérienne dans la matrice unique. Ce protocole a permis de simuler les prélèvements respiratoires, retrouvés en condition clinique, contenant différentes charges bactériennes dont *Nocardia*. Cette série de 8 tubes de prélèvements simulés a été réalisée pour les 6 espèces de *Nocardia* testées.

#### 4. Mise en culture et contrôles microbiologiques

Pour chaque dilution, une culture a été réalisée afin d'évaluer la sensibilité de la culture bactérienne dans la détection de la *Nocardia*.

Les prélèvements surchargés ont été ensemencées sur plusieurs milieux (un réplicat par condition) :

- **Gélose au sang** (COS) : utilisée comme contrôle de croissance et de morphologie coloniale. Elle a également servi à l'estimation de l'inoculum après réalisation de dilutions en eau physiologique.
- **Gélose BCYE** (Buffered Charcoal Yeast Extract) : milieu favorisant la croissance de *Nocardia*, utilisée pour l'ensemencement des *Nocardia* diluées dans les prélèvements respiratoires.
- **Gélose NTM** : testée dans certains cas, pour comparer les performances de croissance d'un milieu utilisé en mycobactériologie.

Toutes ces cultures ont été incubées à  $35 \pm 2$  °C pendant **72 h** pour une première lecture standard, et jusqu'à **10 jours** pour les prélèvements respiratoires surchargés et les espèces à croissance lente, afin de prendre en compte également le temps de croissance nécessaire et propre à chaque espèce.

Lors de l'observation macroscopique, les colonies étaient évaluées selon leur aspect (taille, texture, pigmentation). En cas d'aspect non évocateur sur la gélose sang, une identification complémentaire était réalisée par **spectrométrie de masse MALDI-TOF**, servant de méthode de référence.

#### 5. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir des prélèvements respiratoires surchargés par les suspensions bactériennes préparées à l'étape 3, grâce à l'automate Ingenius (EliTechGroup S.p.A., Torino, Italy) à l'aide des kits SP200. La méthode utilisée pour extraire le matériel génétique des

bactéries est la sonication, couramment employée dans le service. Ce procédé repose sur l'application d'ultrasons, ce qui entraîne une lyse mécanique des parois bactériennes et la libération du génome. Trois extractions indépendantes sur des volumes de 200  $\mu\text{L}$  ont été effectuées pour chacun des 8 prélèvements simulés pour chaque espèce, afin de garantir la fiabilité des résultats. À l'issue de l'extraction, 30  $\mu\text{L}$  d'ADN étaient récoltés.

## 6. Protocoles de PCR maison

### • PCR 20X

La PCR 20X, déjà en usage dans le service, cible une région conservée du gène **16S rRNA** (39). Elle repose sur un panel de cinq amorces :

| Nom de l'amorce | Orientation | Séquence (5' → 3') |
|-----------------|-------------|--------------------|
| NG1             | Forward     | ACCRACCACAAGGGGG   |
| NG2             | Reverse     | GGTTGTAAACCKCTTTCG |
| NGw             | Forward     | ACCAGCCACAAGGGAACC |
| NGi             | Reverse     | GGTTGTAAACCGCTTTTG |
| NGn             | Reverse     | GGTTGTAAACTCCTTTCG |

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR 16S *Nocardia* (R=A+G, K=G+T) (38).

Les amorces NG1 et NG2 sont les amorces utilisées de base. NGw, NGi et NGn sont de amorces spécifiques à la *Nocardia wallacei*, *N.ignorata* et *N.ninae* respectivement.

Ce système permet une détection générique des *Nocardia* avec possibilité de séquençage des produits via NG1.

### • PCR 12X

La PCR 12X représente une évolution utilisant de nouvelles amorces phosphorylées et intégrant un **contrôle interne**, permettant de vérifier la présence d'inhibiteurs et d'assurer la validité de la réaction. Les amorces phosphorylées sont **intéressantes pour le séquençage post-PCR**, car elles permettent, après amplification, de **lier le fragment amplifié à un plasmide ou de circulariser l'ADN** via une ligase.

Elle utilise :

|                   |
|-------------------|
| Pho17S1           |
| Pho17S2           |
| NG4               |
| Amorce + sonde CI |

Tableau 7 : Amorces de la PCR 12X

La sonde utilisée est commune aux deux protocoles de PCR

| Nom de la sonde | Séquence / Marquage (5' → 3')       |
|-----------------|-------------------------------------|
| NG              | FAM-ACGAAGC[+G]NNAGT[+G]ACNGTA-BHQ1 |

Tableau 8 : Sonde utilisé pour la PCR 16S Nocardia (38)

Le volume final de chaque réaction était de **30 µL** (20 µL de mélange pour la PCR et 10 µL d'ADN matrice).

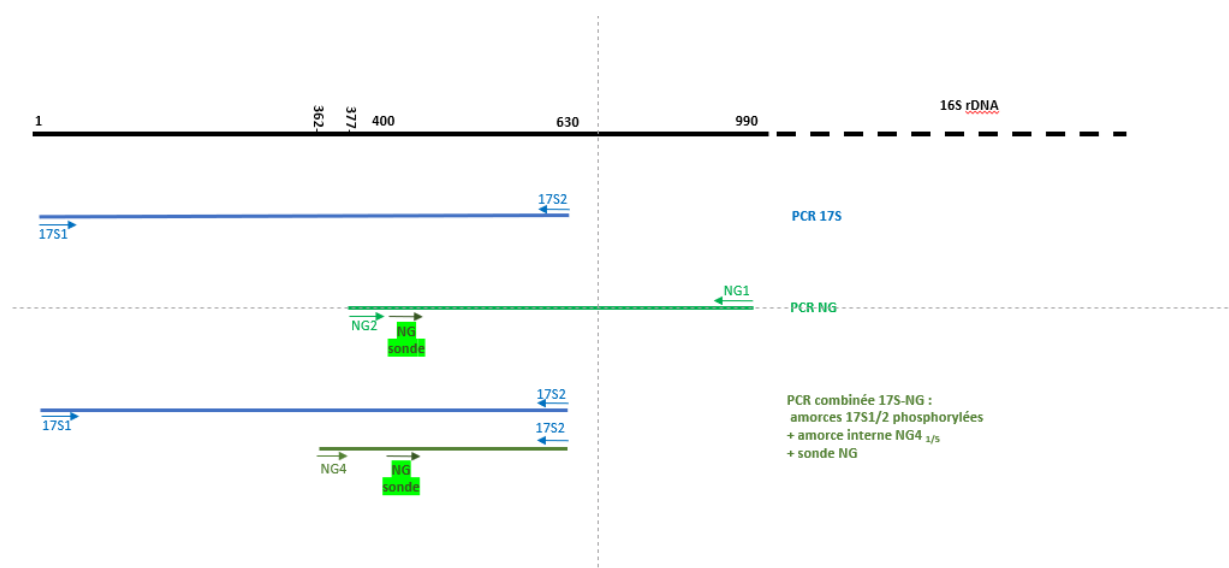


Figure 19 : Schéma des amorces et sondes utilisées pour la PCR combinée 17S-NG ciblant le gène 16S rDNA

### • Conditions d'amplification

Les amplifications ont été réalisées en plaque 96 puits sur le QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher). Le programme comprenait une dénaturation initiale à 95°C, suivie de 45 cycles d'amplification (dénaturation à 95°C, hybridation à 55°C, élongation), puis une élongation finale. La détection se faisait en temps réel par fluorescence.

## 7. Validation des produits

Un sous-ensemble représentatif d'échantillons a été analysé par séquençage nanopore MinION (Oxford Nanopore Technologies). Cette étape, réalisée ponctuellement, a permis de confirmer la spécificité des amplicons générés par la PCR « 12X » et de sécuriser l'interprétation des résultats.

## 8. Contrôles et reproductibilité

Chaque série de PCR incluait :

- Un contrôle positif (ADN extrait d'une souche de référence *Nocardia*),
- Un contrôle négatif (eau stérile),

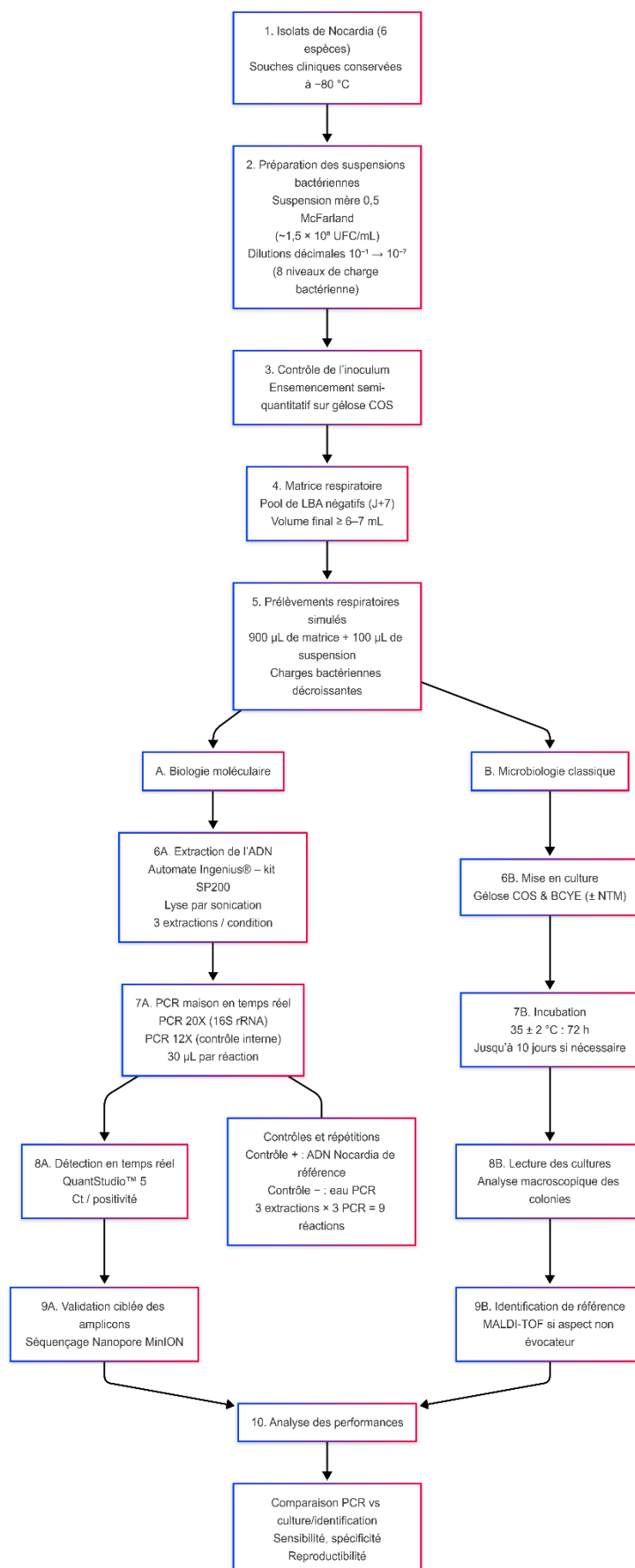
Sur chacun des extraits d'ADN de prélèvements simulés, les deux protocoles de PCR ont été réalisés 3 fois, soit 9 réactions par PCR par condition de prélèvement simulé (3PCR X 3 extraits). Au total, pour les six espèces, 72 réactions de la PCR « 20x » et de la PCR « 12x » ont été effectuées par protocole, en plus des contrôles.

## 9. Analyse statistique

Les performances des PCR ont été évaluées en les confrontant aux méthodes classiques de détection, telles que la culture et l'identification par MALDI-TOF. Différents critères ont été considérés, notamment la capacité des tests à détecter correctement les bactéries, la cohérence des résultats entre méthodes et la fiabilité des mesures. Lorsque cela était pertinent, des analyses supplémentaires ont été réalisées pour apprécier la précision des tests. L'ensemble des traitements statistiques a été mené à l'aide d'outils appropriés, sans entrer dans le détail des calculs.

## 10. Résumé du protocole expérimental

Afin de synthétiser la méthodologie, l'ensemble du protocole est représenté sous forme de workflow. Celui-ci illustre les étapes majeures : préparation des suspensions, surcharge des matrices respiratoires, ensemencements, extraction d'ADN, PCR maison (20X et 12X), contrôles intégrés et analyse statistique

Figure 20 : Workflow expérimental pour l'évaluation des PCR maison (20X et 12X) dans la détection de *Nocardia* spp

### III. Résultats

#### 1. Croissance sur géloses

La croissance des différentes espèces de *Nocardia* a été observée sur géloses COS et BCYE. Les espèces à croissance rapide (*N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. wallacei*) se développaient en 48–72 h, tandis que les espèces à croissance plus lente (*N. nova*, *N. abscessus*) nécessitaient jusqu'à 7–10 jours d'incubation. Les observations sur géloses NTM n'étaient pas concluantes puisqu'aucune souche n'a poussé sur ce milieu de culture même aux dilutions les plus élevées. La gélose BCYE favorisait des colonies plus denses et homogènes que la COS. La limite de détection des *Nocardia* allait de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  selon les espèces.

| Espèce                     | Dernière dilution positive sur BCYE | UFC/mL approximatif |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| <i>N. farcinica</i>        | $10^{-3}$                           | $1,5 \times 10^4$   |
| <i>N. cyriacigeorgica</i>  | $10^{-3}$                           | $1,5 \times 10^4$   |
| <i>N. wallacei</i>         | $10^{-5}$                           | $1,5 \times 10^2$   |
| <i>N. nova</i>             | $10^{-4}$                           | $1,5 \times 10^3$   |
| <i>N. abscessus</i>        | $10^{-4}$                           | $1,5 \times 10^3$   |
| <i>N. otitidiscavarium</i> | $10^{-4}$                           | $1,5 \times 10^3$   |

Tableau 9 : Dernière dilution positive et UFC/mL approximatif pour chaque espèce de *Nocardia* sur géloses BCYE

Les photographies des géloses COS et BCYE, pour toutes les dilutions et les six espèces de *Nocardia* étudiées (*N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. wallacei*, *N. nova*, *N. abscessus* et *N. otitidiscavarium*), sont présentées en annexes.

Pour les dilutions les plus basses, les colonies initialement suspectées d'être des *Nocardia* ont été vérifiées par MALDI-TOF, et il a été confirmé que certaines d'entre elles n'appartenaient pas à ce genre

#### 2. Résultats de la PCR 20X et 12X par espèce

##### 2.1 *Nocardia farcinica*

##### a. PCR 20X

| Dilution                  | 0,5 mCF           | $10^{-1}$         | $10^{-2}$         | $10^{-3}$         | $10^{-4}$         | $10^{-5}$         | $10^{-6}$ | $10^{-7}$ |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | $1,5 \times 10^7$ | $1,5 \times 10^6$ | $1,5 \times 10^5$ | $1,5 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^3$ | $1,5 \times 10^2$ | 15        | 1,5       |
| PCR                       | 22,401            | 27,86             | 30,034            | 32,181            | 34,427            | 34,673            | 32,581    | 36,854    |
| Duplicata                 | 23,174            | 27,708            | 30,104            | 31,884            | 33,758            | 34,884            | 31,767    | 35,268    |
| Triplicata                | 22,885            | 27,509            | 30,197            | 32,6              | 33,619            | 34,554            | 32,585    | 36,333    |
| Extrait ADN 2             | 23,794            | 27,277            | 29,608            | 31,834            | 32,914            | 33,698            | 33,098    | 35,12     |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 23,274            | 26,563            | 28,729            | 31,702            | 30,537            | 33,381            | 32,659    | 36,484    |
| Extrait ADN 2 Triplicata  | 23,533            | 27,054            | 29,544            | 31,653            | 33,033            | 33,325            | 33,036    | 35,47     |
| Extrait ADN 3             | 29,064            | 32,78             | UND               | 36,897            | 33,349            | 41,08             | 36,586    | 40,607    |
| Extrait ADN 3 Duplicata   | 28,083            | 33,893            | 34,419            | 37,218            | 37,55             | 39,889            | 37,23     | 44,721    |

| Dilution                 | 0,5 mCF | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|--------------------------|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Extrait ADN 3 Triplicata | 28,494  | 32,554           | 34,382           | 36,248           | 38,219           | 33,998           | 36,526           | 44,356           |

Tableau 10 : Les résultats pour *N. farcinica* (PCR 20X)

## b. PCR 12X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 22,292              | 26,303              | 27,754              | 29,614              | 31,183              | 31,887              | 30,102           | 33,418           |
| Duplicata                 | 23,073              | 26,689              | 31,302              | 30,606              | 32,777              | 312,691             | 31,814           | 35,615           |
| Triplicata                | 22,548              | 25,96               | 29,258              | 30,66               | 32,065              | 33,049              | 31,649           | 35,302           |
| Extrait ADN 2             | 23,156              | 25,649              | 28,722              | 30,279              | 31,056              | 31,509              | 30,264           | 33,637           |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 23,591              | 26,749              | 28,516              | 37,853              | 31,447              | 32,222              | 31,122           | 34,155           |
| Extrait ADN 2 Triplicata  | 23,344              | 26,752              | 30,8                | 28,862              | 33,544              | 32,612              | 32,009           | 35,193           |
| Extrait ADN 3             | 21,812              | 25,565              | 28,25               | 29,845              | 30,624              | 31,994              | 29,622           | 32,913           |
| Extrait ADN 3 Duplicata   | 23,31               | 25,987              | 29,185              | 30,368              | 31,85               | 32,44               | 31,307           | 34,237           |
| Extrait ADN 3 Triplicata  | 23,001              | 26,13               | 29,296              | 31,398              | 31,499              | 31,816              | 32,325           | 32,093           |

Tableau 11 : Les résultats pour *N. farcinica* (PCR 12X)

## 2.2 *Nocardia cyriacigeorgica*

### a. PCR 20X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 21,135              | 25,01               | 29,322              | 31,021              | 35,469              | 39,691              | UND              | UND              |
| Duplicata                 | 21,439              | 25,44               | 27,786              | 31,92               | 36,81               | 39,837              | UND              | UND              |
| Triplicata                | 21,477              | 25,182              | 29,123              | 32,141              | 37,821              | 37,954              | 42,722           | UND              |
| Extrait ADN 2             | 21,788              | 25,619              | 29,514              | 33,928              | 39,423              | 42,264              | 44,104           | UND              |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 22,117              | 24,573              | 29,561              | 33,557              | 36,526              | 41,468              | UND              | UND              |
| Extrait ADN 2 Triplicata  | 22,74               | 24,829              | 30,253              | 34,424              | 38,343              | UND                 | 41,2             | UND              |
| Extrait ADN 3             | 21,857              | 25,367              | 28,254              | 31,55               | 37,453              | 41,98               | 40,252           | 42,18            |
| Extrait ADN 3 Duplicata   | 22,353              | 25,153              | 29,023              | 31,104              | 36,015              | 40,309              | UND              | UND              |
| Extrait ADN 3 Triplicata  | 22,972              | 25,274              | 28,06               | 31,47               | 35,815              | 40,227              | UND              | UND              |

Tableau 12 : Les résultats pour *N. cyriacigeorgica* (PCR 20X)

### b. PCR 12X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 20,747              | 22,919              | UND                 | 28,096              | 32,942              | 34,155              | 34,842           | 35,027           |
| Duplicata                 | 20,899              | 24,999              | 26,712              | 30,768              | 34,355              | 36,721              | 37,715           | UND              |
| Triplicata                | 19,88               | 23,361              | 26,426              | 28,766              | 32,412              | 24,278              | 36,474           | 42,082           |
| Extrait ADN 2             | 19,657              | 23,273              | 26,232              | 28,14               | 30,284              | 33,499              | 35,149           | 37,807           |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 21,382              | 24,656              | 27,442              | 30,207              | 20,816              | 36,464              | UND              | 32,406           |
| Extrait ADN 2 Triplicata  | 20,337              | 23,165              | 26,84               | 28,631              | 32,269              | 34,518              | 36,222           | 39,807           |

| Dilution                 | 0,5 mCF | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|--------------------------|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Extrait ADN 3            | 20,285  | 22,758           | 38,939           | 26,502           | 31,892           | 33,838           | 34,218           | 38,479           |
| Extrait ADN 3 Duplicata  | 34,247  | 24,481           | 27,103           | 29,387           | 32,863           | 36,956           | 39,398           | UND              |
| Extrait ADN 3 Triplicata | 20,706  | 22,911           | 26,037           | 27,709           | 33,394           | 34,554           | 36,192           | UND              |

Tableau 13 : Les résultats pour *N. cyriaciageorgica* (PCR 12X)

## 2.3 *Nocardia wallacei*

### a. PCR 20X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 23,25               | 26,325              | 29,168              | 32,663              | 31,986              | 30,257              | 32,205           | 34,12            |
| Duplicata                 | 23,22               | 25,992              | 29,055              | 33,091              | 31,433              | 30,503              | 31,767           | 33,094           |
| Triplicata                | 22,927              | 25,982              | 29,127              | 32,787              | 31,707              | 30,376              | 32,163           | 33,162           |
| Extrait ADN 2             | 22,912              | 26,241              | 29,496              | 31,972              | 31,531              | 29,751              | 31,667           | 34,126           |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 23,097              | 25,886              | 29,796              | 32,184              | 31,525              | 29,079              | 31,207           | 33,728           |
| Extrait ADN 2 Triplicata  | 22,863              | 26,054              | 29,858              | 32,071              | 31,329              | 29,629              | 31,366           | 33,392           |
| Extrait ADN 3             | 23,014              | 26,005              | 28,514              | 32,883              | 31,257              | 29,924              | 31,283           | 32,731           |
| Extrait ADN 3 Duplicata   | 23,4                | 29,975              | 28,77               | 32,811              | 31,406              | 29,811              | 31,708           | 32,847           |
| Extrait ADN 3 Triplicata  |                     |                     |                     |                     |                     | 29,596              | 31,545           | 32,965           |

Tableau 14 : Les résultats pour *N. wallacei* (PCR 20X)

### c. PCR 12X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 22,367              | 25,065              | 27,062              | 30,312              | 29,334              | 28,165              | 29,295           | 30,208           |
| Duplicata                 | 20,94               | 23,386              | 26,177              | 29,264              | 27,79               | 27,502              | 27,955           | 28,767           |
| Triplicata                | 21,156              | 24,121              | 26,036              | 29,82               | 28,09               | 27,085              | 28,685           | 29,507           |
| Extrait ADN 2             | 22,356              | 24,928              | 27,724              | 29,998              | 28,527              | 27,709              | 29,108           | 30,347           |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 20,349              | 23,491              | 26,118              | 28,931              | 27,054              | 26,348              | 27,601           | 30,125           |
| Extrait ADN 2 Triplicata  | 21,306              | 24,279              | 26,848              | 29,017              | 27,96               | 26,795              | 28,269           | 29,315           |
| Extrait ADN 3             | 22,35               | 24,982              | 27,31               | 30,418              | 28,854              | 27,452              | 29,227           | 30,415           |
| Extrait ADN 3 Duplicata   | 21,119              | 24,652              | 25,816              | 29,153              | 27,525              | 26,2                | 28,299           | 28,909           |
| Extrait ADN 3 Triplicata  | 21,116              | 23,79               | UND                 | 29,3                | 27,86               | 26,945              | 27,845           | 29,028           |

Tableau 15 : Les résultats pour *N. wallacei* (PCR 12X)

## 2.4 *Nocardia nova*

### a. PCR 20X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 18,323              | 21,623              | 26,262              | 30,981              | 32,896              | 35,826              | 41,357           | UND              |
| Duplicata                 | 18,048              | 22,196              | 25,258              | 30,187              | 33,973              | 37,539              | 38,977           | UND              |
| Triplicata                | 17,26               | 19,823              | 24,47               | 31,397              | 34,163              | 37,138              | 39,066           | UND              |
| Extrait ADN 2             | 17,061              | 22,269              | 24,735              | 29,414              | 36,6                | 38,094              | UND              | UND              |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 17,285              | 21,528              | 20,802              | 26,892              | 36,026              | 40,648              | UND              | UND              |

| Dilution                 | 0,5 mCF | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|--------------------------|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Extrait ADN 2 Triplicata | 17,727  | 22,009           | 23,591           | 29,93            | 34,694           | UND              | UND              | UND              |
| Extrait ADN 3            | 20,667  | 25,154           | 25,295           | 29,31            | 34,478           | 34,265           | UND              | UND              |
| Extrait ADN 3 Duplicata  | 18,3    | 25,719           | 28,201           | 31,463           | 35,331           | 39,24            | 28,389           | UND              |
| Extrait ADN 3 Triplicata | 17,623  | 24,289           | 28,122           | 17,329           | 35,341           | 38,148           | 37,314           | UND              |

Tableau 16 : Les résultats pour *N. nova* (PCR 20X)

## b. PCR 12X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 19,945              | 19,756              | 29,339              | 26,226              | 29,756              | 30,915              | 32,29            | 31,374           |
| Duplicata                 | 20,372              | 23,303              | 26,354              | 28,874              | 32,206              | 32,839              | 33,46            | 33,423           |
| Triplicata                | 21,931              | 25,388              | 28,806              | 30,88               | 33,701              | 35,034              | 33,27            | 33,134           |
| Extrait ADN 2             | 20,325              | 23,78               | 26,728              | 29,348              | 31,714              | 32,911              | 32,247           | UND              |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 20,56               | 23,481              | 26,994              | 29,408              | 32,08               | UND                 | 36,192           | 35,813           |
| Extrait ADN 2 Triplicata  | 22,397              | 25,763              | 29,323              | 31,406              | 31,972              | UND                 | 34,327           | 33,653           |
| Extrait ADN 3             | 20,308              | 23,524              | 26,526              | 29,408              | 30,976              | 31,718              | 31,725           | 31,707           |
| Extrait ADN 3 Duplicata   | 20,294              | 23,193              | 26,045              | 28,595              | 33,065              | 33,609              | UND              | 32,957           |
| Extrait ADN 3 Triplicata  | 21,999              | 28,513              | 28,989              | 30,292              | 33,236              | 32,417              | 33,514           | 43,036           |

Tableau 17 : Les résultats pour *N. nova* (PCR 12X)

## 2.5 *Nocardia abscessus*

### a. PCR 20X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 18,616              | 23,375              | 25,692              | 25,437              | UND                 | 26,466              | 27,396           | 32,306           |
| Duplicata                 | 18,321              | 17,164              | 22,277              | 20,766              | 26,06               | 21,542              | 28,491           | 31,812           |
| Triplicata                | 17,522              | 24,1                | 25,727              | 24,601              | 29,817              | 27,35               | 27,529           | 31,935           |
| Extrait ADN 2             | 17,503              | 22,544              | 24,219              | 27,609              | 28,959              | 25,351              | 27,752           | 31,852           |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 19,174              | 24,143              | 24,503              | 30,744              | 28,463              | 28,013              | 28,215           | 32,923           |
| Extrait ADN 2 Triplicata  | 18,738              | 22,529              | 24,791              | 28,708              | 30,169              | 28,081              | 27,251           | 32,528           |
| Extrait ADN 3             | 18,468              | 22,428              | 24,073              | 28,065              | UND                 | 22,119              | 24,863           | 31,632           |
| Extrait ADN 3 Duplicata   | UND                 | 21,23               | 24,6                | 25,548              | 27,623              | 24,154              | 24,812           | 31,156           |
| Extrait ADN 3 Triplicata  | 19,35               | 24,708              | 23,613              | 27,602              | 26,62               | 23,577              | 26,183           | 15,969           |

Tableau 18 : Les résultats pour *N. abscessus* (PCR 20X)

### b. PCR 12X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 20,53               | 25,11               | 25,683              | 26,384              | 29,668              | 27,708              | 27,58            | 31,911           |
| Duplicata                 | 20,039              | 25,46               | 25,194              | 26,007              | 29,642              | 27,247              | 27,752           | 31,861           |
| Triplicata                | 21,009              | 25,599              | 26,269              | 26,174              | 30,429              | 28,024              | 28,049           | 32,974           |
| Extrait ADN 2             | 20,032              | 24,599              | 25,41               | 27,746              | 29,307              | 27,514              | 27,523           | 32,113           |

| Dilution                 | 0,5 mCF | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|--------------------------|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Extrait ADN 2 Duplicata  | 20,378  | 24,539           | 25,409           | 27,294           | 29,516           | 27,328           | 27,536           | 32,209           |
| Extrait ADN 2 Triplicata | 20,957  | 24,789           | 24,155           | 28,398           | 29,559           | 28,494           | 27,99            | 32,974           |
| Extrait ADN 3            | 20,978  | 24,931           | 25,34            | 27,478           | 28,885           | 27,399           | 27,758           | 31,936           |
| Extrait ADN 3 Duplicata  | 20,5    | 25,201           | 24,693           | 27,847           | 29,015           | 28,13            | 27,618           | 22,37            |
| Extrait ADN 3 Triplicata | 21,233  | 26,455           | UND              | 28,665           | 29,393           | 28,274           | 27,943           | 32,35            |

Tableau 19 : Les résultats pour *N. abscessus* (PCR 12X)

## 2.6 *Nocardia otitidiscavarium*

### a. PCR 20X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 26,82               | 28,98               | 32,614              | 33,686              | 35,636              | 37,52               | 37,969           | 34,694           |
| Duplicata                 | 26,835              | 29,149              | 32,347              | 33,65               | 35,368              | 37,515              | 38,374           | 34,766           |
| Triplicata                | 26,576              | 29,01               | 32,252              | 34,297              | 35,421              | 37,35               | 37,825           | 34,914           |
| Extrait ADN 2             |                     |                     |                     |                     | 35,498              | 37,901              | 38,763           | 35,725           |
| Extrait ADN 2 Duplicata   |                     |                     |                     |                     | 35,457              | 37,881              | 37,563           | 35,662           |
| Extrait ADN 2 Triplicata  |                     |                     |                     |                     | 35,369              | 37,94               | 39,05            | 36,042           |
| Extrait ADN 3             |                     |                     |                     |                     | 35,699              | 37,715              | 38,031           | 34,824           |
| Extrait ADN 3 Duplicata   |                     |                     |                     |                     | 35,939              | 37,514              | 36,811           | 34,719           |
| Extrait ADN 3 Triplicata  |                     |                     |                     |                     | 35,625              | 37,791              | 37,927           | 35,355           |

Tableau 20 : Les résultats pour *N. otitidiscavarium* (PCR 20X)

### b. PCR 12X

| Dilution                  | 0,5 mCF             | 10 <sup>-1</sup>    | 10 <sup>-2</sup>    | 10 <sup>-3</sup>    | 10 <sup>-4</sup>    | 10 <sup>-5</sup>    | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Valeurs théoriques UFC/mL | 1,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>6</sup> | 1,5×10 <sup>5</sup> | 1,5×10 <sup>4</sup> | 1,5×10 <sup>3</sup> | 1,5×10 <sup>2</sup> | 15               | 1,5              |
| PCR                       | 24,475              | 26,894              | 29,654              | 30,548              | 32,369              | 33,649              | 34,114           | 31,847           |
| Duplicata                 | 24,224              | 26,866              | 29,683              | 30,639              | 32,346              | 3,855               | 34,406           | 31,856           |
| Triplicata                | 24,714              | 26,878              | 29,781              | 30,766              | 31,986              | 34,715              | 34,497           | 31,834           |
| Extrait ADN 2             | 24,408              | 26,913              | 29,191              | 30,666              | 32,079              | 34,114              | 34,455           | 32,558           |
| Extrait ADN 2 Duplicata   | 24,443              | 26,855              | 29,143              | 30,965              | 31,772              | 33,812              | 34,269           | 32,373           |
| Extrait ADN 2 Triplicata  | 24,597              | 26,945              | 29,153              | 30,953              | 31,892              | 33,9                | 34,571           | 32,233           |
| Extrait ADN 3             |                     |                     |                     |                     | 32,967              | 34,466              | 34,82            | 33,533           |
| Extrait ADN 3 Duplicata   |                     |                     |                     |                     | 33,739              | 34,59               | 34,922           | 33,451           |
| Extrait ADN 3 Triplicata  |                     |                     |                     |                     | 32,863              | 34,835              | 35,027           | 33,511           |

Tableau 21 : Les résultats pour *N. otitidiscavarium* (PCR 12X)

## 3. Analyse des résultats

Le temps de croissance sur les géloses (COS ou BCYE) à 35°C diffère d'une espèce à l'autre. En effet, les espèces à croissance rapide poussent en 48-72 heures (*N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. wallacei*), alors que

pour d'autres espèces, le temps nécessaire dans l'incubateur est plus long (5-7 jours), c'est notamment le cas de *N. nova* et *N. abscessus*.

Les colonies bactériennes apparaissent pour presque toutes les dilutions (jusqu'au 1/10 000 000) sur la gélose sang, ce qui correspond à une culture pure de *Nocardia*. L'identification des colonies est visuelle : le caractère poudreux, ressemblant à un volcan, est aisément observé sur ces cultures.

Cependant, l'observation sur gélose BCYE devient difficile à partir des dilutions 1/10 000 à 1/100 000, à cause des bactéries de la matrice surchargée qui dépassent en nombre les bactéries de *Nocardia* aux faibles dilutions. Cependant, ces conditions expérimentales sont celles qui reflètent le plus fidèlement les conditions réelles des prélèvements cliniques, car elles contiennent d'autres bactéries respiratoires en plus de *Nocardia*.

De plus, aucune croissance n'est observée sur gélose NTM, même aux dilutions les plus élevées, ce qui suggère son inadéquation pour la culture de ces *Nocardia* dans les conditions testées.

Ainsi, la croissance sur géloses reste une technique très chronophage et peu sensible dans les conditions cliniques (BCYE), mais qui reste indispensable pour l'isolement de la souche et la réalisation de son antibiogramme.

Pour les résultats PCR et la cohérence des inocula :

*N. farcinica* : l'inoculum est globalement cohérent pour toutes les dilutions. Les variations observées sur certains échantillons reflètent des variations expérimentales normales et ne suggèrent pas de problème majeur.

*N. cyriacigeorgica* : les valeurs montrent une perte de détection pour les dernières dilutions ( $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ), ce qui pourrait être dû à une erreur de manipulation ou une perte bactérienne. Les dilutions intermédiaires restent correctes et cohérentes.

*N. wallacei*, *N. abscessus* : les dernières dilutions sont trop chargées par rapport aux valeurs attendues, ce qui indique un inoculum initial un peu trop concentré pour ces dilutions, mais la tendance générale reste interprétable.

*N. nova*, *N. otitidiscavarium* : toutes les dilutions sont cohérentes et suivent la décroissance attendue des colonies, ce qui reflète une préparation de l'inoculum fiable et régulière.

#### 4. Comparaison globale de la PCR 20X et 12X

Afin de quantifier la performance des deux protocoles testés, nous avons comptabilisé, pour chaque PCR, l'ensemble des lectures « détectées » (valeurs de Ct mesurées) et « non détectées » (mentionnées *UND* dans les tableaux de résultats).

L'analyse a porté sur l'ensemble des dilutions et répétitions (extractions indépendantes, duplicata/triplicata) reportées dans les tableaux 9 à 20.

La **PCR 20X** a fourni un total de 355 lectures, dont 323 détectées et 32 non détectées, soit un taux global de détection de **90,99 %**.

La **PCR 12X** a produit 264 lectures, dont 258 détectées et 6 non détectées, correspondant à un taux global de détection de **97,73 %**.

Ce taux de détection global correspond à la sensibilité de la technique de PCR, et calculé par la formule suivante :

$$Se = \text{Détectés} / \text{Total} (\%)$$

| Espèce ( <i>Nocardia</i> ) | Sensibilité PCR 20X (%) | LOD PCR 20X      | Sensibilité PCR 12X (%) | LOD PCR 12X      |
|----------------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| <i>N. farcinica</i>        | 71 / 72 (98,6 %)        | 10 <sup>-7</sup> | 36 / 36 (100,0 %)       | 10 <sup>-7</sup> |
| <i>N. cyriacigeorgica</i>  | 38 / 48 (79,2 %)        | 10 <sup>-5</sup> | 12 / 12 (100,0 %)       | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>N. wallacei</i>         | 20 / 24 (83,3 %)        | 10 <sup>-5</sup> | 72 / 72 (100,0 %)       | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>N. nova</i>             | 67 / 67 (100,0 %)       | 10 <sup>-6</sup> | 37 / 40 (92,5 %)        | 10 <sup>-6</sup> |
| <i>N. abscessus</i>        | 58 / 72 (80,6 %)        | 10 <sup>-5</sup> | 30 / 32 (93,8 %)        | 10 <sup>-5</sup> |
| <i>N. otitidiscavarium</i> | 69 / 72 (95,8 %)        | 10 <sup>-6</sup> | 71 / 72 (98,6 %)        | 10 <sup>-6</sup> |

Tableau 22 : Comparaison des performances de détection (sensibilité) et limites de détection (LOD) des PCR 20X et 12X selon les espèces de *Nocardia*.

La PCR 12X semble plus performante avec un seuil de détection supérieur à celui de la PCR 20X (97,7 % contre 91,0 %).

Les écarts de détection apparaissent aux faibles dilutions. En effet, la PCR 20X a du mal à détecter les échantillons à faible concentration, ce qui peut traduire une limite analytique pour cette technique. Cette limite dépend grandement de l'espèce détectée mais peut être établie à la dilution 10<sup>-5</sup>.

La PCR 12X s'avère ainsi plus robuste et reproductible, notamment pour les échantillons à faible charge bactérienne.

## IV. Discussion

Afin de faciliter l'interprétation, il convient de rappeler que la performance de détection correspond en réalité à la sensibilité analytique des deux protocoles. En épidémiologie et en microbiologie, la sensibilité ( $Se$ ) est définie comme la capacité d'un test à identifier correctement les échantillons réellement positifs (40).

Elle s'exprime selon la formule :

$$Se = \frac{Vrais\ positifs(VP)}{Vrais\ positifs + Faux\ négatif(VP + FN)} \times 100 (\%)$$

Dans notre étude, les lectures classées « détectées » (valeurs de Ct mesurées) correspondent aux vrais positifs (VP), tandis que les lectures « non détectées » (UND) représentent les faux négatifs (FN).

Par conséquent, le taux global de détection obtenu pour chaque protocole équivaut directement à sa sensibilité.

Nos résultats expérimentaux mettent en évidence une sensibilité analytique très élevée, particulièrement pour la PCR 12X (97,7 %), qui surpasse celle du protocole 20X (90,9 %).

La différence de sensibilité observée reflète les performances intrinsèques des protocoles, et non un effet lié aux échantillons, puisque ceux-ci sont identiques pour les deux méthodes. Ainsi, les petites erreurs de dilution ont peu d'impact sur la comparaison directe entre la PCR 12X et la PCR 20X. La supériorité apparente de la PCR 12X pourrait s'expliquer par sa conception optimisée grâce à l'utilisation d'amorce phosphorylées et la robustesse de sa détection à faibles concentrations d'ADN. Cependant, cette approche ne permet pas de déterminer une limite de détection absolue. Pour y parvenir, il serait nécessaire de réaliser davantage de tests, en utilisant plusieurs séries indépendantes de dilutions standardisées et en incluant un plus grand nombre d'espèces de *Nocardia*, ce qui reste actuellement difficile. La dilution des espèces de *Nocardia* dans une matrice issue de prélèvement respiratoire avait pour but de se rapprocher des conditions expérimentales de la réalité clinique.

Parallèlement au travail dans une matrice respiratoire, l'avantage du protocole 12X par rapport au 20X pourrait aussi être dû à la conception des amorces employées.

Effectivement, le design perfectionné des amorces 12X, qui cible des zones plus spécifiques et conservées du génome, favorise une hybridation plus efficace tout en diminuant le danger d'une non-amplification à de faibles niveaux d'ADN. De plus, la PCR 12X tend à donner des valeurs de Ct plus basses que la PCR 20X

pour les mêmes dilutions, ce qui illustre sa sensibilité améliorée.

Cette divergence technique se manifeste par une meilleure capacité de détection et une robustesse analytique améliorée, notamment dans les contextes pauci-bacillaires où la PCR 20X présente ses restrictions.

Un point central soulevé par Rouzaud et al. concerne la spécificité de la méthode. Dans leur série, elle n'atteignait que 74 %, en raison de résultats positifs observés dans des échantillons respiratoires considérés comme négatifs par la culture (37). Comme le rappellent les auteurs, « la détection de *Nocardia* par PCR dans les prélèvements respiratoires peut refléter une colonisation plutôt qu'une infection active », ce qui impose une grande prudence dans l'interprétation. Cette problématique n'a pas pu être explorée dans notre travail, faute d'inclusion de contrôles négatifs cliniques, ce qui constitue une limite importante de notre analyse.

Par ailleurs, la PCR 12X présente certaines anomalies possibles : les témoins négatifs peuvent parfois devenir positifs, donnant un Ct très élevés mais détectables. Cependant, le protocole 12X, permet un séquençage complet des produits amplifiés par ONT, offrant un contrôle plus strict de la spécificité. Cette différence méthodologique illustre que la supériorité analytique de la 12X doit être nuancée par les capacités complémentaires de séquençage ONT. Enfin, il est important de rappeler que cette discussion reste centrée sur la comparaison méthodologique des protocoles et ne préjuge pas de leur performance en conditions cliniques réelles.

Nos résultats représentent également une variabilité de détection liée à l'espèce, due aux différences génétiques entre les espèces de la *Nocardia*. Dans le cadre du protocole PCR 20X, toutes les souches, y compris *N. abscessus* et *N. cyriacigeorgica*, ont été amplifiées avec succès, confirmant une sensibilité élevée de cette méthode. Cependant, comme montré par des travaux précédents portant sur la PCR 20X (39), l'identification à l'espèce après séquençage peut parfois être difficile, notamment pour *N. abscessus*, ce qui reflète une limitation de la précision du séquençage plutôt qu'une baisse de sensibilité.

*N. farcinica* et *N. nova* ont également été détectées systématiquement, montrant la robustesse du protocole 20X pour un large panel d'espèces. Néanmoins, les Ct de la PCR 12X ont été plus bas affirmant sa supériorité analytique.

Rouzaud et al. affirment que des divergences entre culture et PCR sont fréquentes, suggérant que des facteurs liés à l'espèce bactérienne et à la qualité de l'ADN extrait peuvent influencer la sensibilité (37).

Enfin, il convient de souligner que l'apport principal de la PCR dans le diagnostic de la nocardiose réside dans sa capacité à identifier des cas où la culture échoue. Rouzaud et al. rapportent que « dans trois cas classés comme probables, la PCR était positive alors que la culture était négative », renforçant l'idée que la PCR peut constituer une aide précieuse, en particulier chez les patients immunodéprimés ou dans les infections à faible inoculum (37). Dans ce contexte, la supériorité analytique de la PCR 12X par rapport au protocole 20X suggère

qu'elle pourrait constituer un outil de confirmation pertinent, en complément de la culture et des données cliniques.

En définitive, la comparaison de nos résultats avec ceux de Rouzaud et al. met en évidence deux enseignements principaux : d'une part, l'intérêt d'un protocole optimisé et hautement sensible comme la PCR 12X pour améliorer la détection des infections pauci-bacillaires ; d'autre part, la nécessité de nuancer l'interprétation des résultats positifs, en particulier dans les prélèvements respiratoires, afin d'éviter tout surdiagnostic lié à une simple colonisation (37).

## V. Perspectives

Les résultats obtenus dans cette étude montrent la supériorité de la PCR 12X par rapport aux autres techniques de PCR utilisées dans la détection de *Nocardia spp.* Cependant, plusieurs axes d'amélioration et de développement sont à envisagés afin de renforcer la pertinence de notre étude.

### 1. Etude de la spécificité :

La **spécificité (Sp)**, correspond à la capacité d'un test à identifier correctement les échantillons négatifs, c'est-à-dire la probabilité d'obtenir un résultat négatif (T-) chez des patients réellement exempts de la maladie (M-). Elle est également appelée taux de vrais négatifs (40).

$$\text{Spécificité (Sp)} = \frac{\text{Vrais négatifs (VN)}}{\text{Vrais négatifs (VN)} + \text{Faux positifs (FP)}}$$

Ce paramètre statistique n'a pas été évalué dans le cadre de ce travail. Des études futures devraient inclure des tests sur de vrais patients, en comparant la PCR 12X et la PCR 20X sur un certain nombre d'échantillons pour déterminer la sensibilité et la spécificité en contexte clinique. Des contrôles cliniques négatifs, des échantillons contenant des bactéries apparentées (*Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Actinomyces*) afin de déterminer la spécificité de la technique de PCR.

De plus, le manque éventuel de spécificité peut être compensé grâce au séquençage ONT MinION, qui permet d'identifier toutes les séquences amplifiées et d'obtenir une identification fiable des espèces.

### 2. Extension à d'autres espèces de *Nocardia*

Notre panel expérimental a été limité aux six espèces les plus fréquentes de *Nocardia spp.* Il serait pertinent d'étendre la PCR à d'autres espèces cliniquement significatives (*N.brasiliensis*, *N.transvalensis*...) pour valider la performance de la PCR 12X sur l'ensemble du genre *Nocardia*. En incluant plus d'espèces une optimisation des amorces utilisées devrait être faite.

### 3. Optimisation de la technique PCR et optimisation de la robustesse analytique

Le choix calculé des amorces de la PCR 12X (Ces amorces ciblent des zones spécifiques et conservées du génome bactérien des *Nocardia spp.*), explique sa supériorité par rapport à la PCR 20X.

Les améliorations à venir pourraient se baser sur l'utilisation de multiples cibles génomiques et/ou de nouveaux assortiments d'amorces pour augmenter encore plus la sensibilité et la spécificité.

#### 4. Applications cliniques et perspectives de recherche

La PCR 12X est bien parti pour devenir un outil de confirmation rapide dans le diagnostic des nocardioses. Combinée au séquençage ou au typage moléculaire (par exemple, le séquençage MinION), elle permettrait l'identification précise de l'espèce *Nocardia* responsable de l'infection, ce qui est essentiel pour guider l'antibiothérapie et déterminer le traitement adéquat au patient. Combinée au séquençage MinION, elle permettrait l'identification précise de l'espèce *Nocardia* responsable de l'infection, ce qui est essentiel pour guider l'antibiothérapie et déterminer le traitement adéquat au patient.

Plus d'études multicentriques seraient impératives pour valider cette technique et explorer la corrélation entre charge bactérienne (valeurs de Ct) et sévérité du cas clinique, ainsi que de d'examiner l'impact des co-infections sur la détection.

En résumé, ces perspectives visent à pouvoir bénéficier d'un usage plus large et optimisé de la PCR 12X, tout en insistant sur l'importance d'une validation rigoureuse dans un contexte clinique réel. Ils assurent également une excellente sensibilité, spécificité et une pertinence diagnostique. Elles assurent également une excellente sensibilité, spécificité et une pertinence diagnostique renforcée grâce à l'intégration possible du séquençage MinION.

#### Perspectives pour la PCR 12X

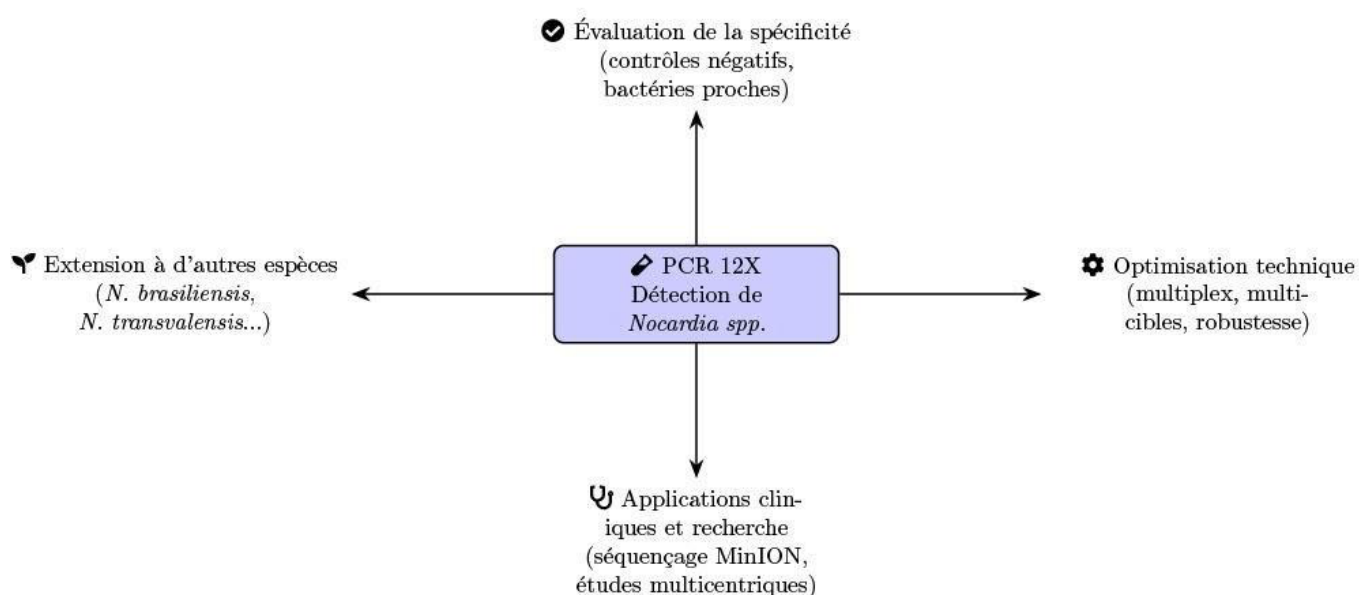


Figure 21 : Perspectives et applications de la PCR 12X pour la détection de *Nocardia spp*

## Bibliographie

1. Observatoire Français des Nocardioses [Internet]. 2024 [cité 4 août 2024]. Activités (expertises et recherche) dans le cadre de l'Observatoire Français des Nocardioses. Disponible sur: [https://ofn.univ-lyon1.fr/presentation\\_et\\_fiches.htm](https://ofn.univ-lyon1.fr/presentation_et_fiches.htm)
2. Canada A de la santé publique du. Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – *Nocardia* spp. [Internet]. 2011 [cité 18 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/Nocardia.html>
3. Debré P. Épidémies: Leçons d'Histoire. Med Sci Paris 2020 36 642–646 [Internet]. 12 juin 2020;Volume 36:642-6. Disponible sur: <https://doi.org/10.1051/medsci/2020111>
4. Patricia S. Conville, Barbara A. Brown-Elliott, Terry Smith, Adrian M. Zelaznyc. The Complexities of *Nocardia* Taxonomy and Identification. J Clin Microbiol [Internet]. janv 2018 [cité 5 août 2024];Volume 56(Issue 1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5744224/>
5. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [Internet]. 2024 [cité 25 juill 2024]. Genus: *Nocardia*. Disponible sur: <https://lpsn.dsmz.de/genus/Nocardia>
6. Activités (expertises et recherche) dans le cadre de l'Observatoire Français des Nocardioses [Internet]. [cité 18 août 2024]. [ofn.univ-lyon1.fr/presentation\\_et\\_fiches.htm](https://ofn.univ-lyon1.fr/presentation_et_fiches.htm). Disponible sur: [https://ofn.univ-lyon1.fr/presentation\\_et\\_fiches.htm](https://ofn.univ-lyon1.fr/presentation_et_fiches.htm)
7. walton N. Aquafix Microscopist, wastexater laboratories. 2022 [cité 4 août 2024]. Nocardioforms vs *Nocardia* Like Organisms. Disponible sur: <https://teamaquafix.com/nocardioform-Nocardia-like-organisms/>
8. Rhofir Y, Zahraoui R, Tiress N, Naji-Amrani H, Soualhi M, Bourkadi JE. Nocardiose pulmonaire sur un terrain immunocompétent: à propos de 2 cas. Pan Afr Med J [Internet]. 2017 [cité 12 févr 2025];27. Disponible sur: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/27/149/full/>
9. V. Rodriguez-Nava, D. Blaha, A. Zoropogui, P. Boiron. *Nocardia* et nocardiose. 10 sept 2014 [cité 4 août 2024]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/922115/Nocardia-et-nocardiose>
10. Luketombunga JC, Virally J, Jagot JL, Elhadad A, Lebarbier C, Mathieu M. Nocardiose pulmonaire et fistule broncho-œsophagienne chez un patient infecté par le VIH. Rev Mal Respir [Internet]. févr 2004 [cité 5 oct 2025];21(1):147-51. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0761842504712474>
11. Fourrier A, Kerjouan M, Piau C, Lentz PA, Ricordel C, Léna H, et al. Nocardiose pulmonaire avec abcès cérébraux mimant un cancer bronchique métastatique : trois cas et revue de la littérature. Rev Mal Respir [Internet]. nov 2017 [cité 12 févr 2025];34(9):1016-21. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0761842517302267>
12. Arrache D, Zait H, Rodriguez-Nava V, Bergeron E, Durand T, Yahiaoui M, et al. Nocardiose cérébrale et pulmonaire à *Nocardia* abscessus chez un patient algérien immunocompétent. J Mycol Médicale [Internet]. sept 2018 [cité 12 févr 2025];28(3):531-7. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1156523318300179>

13. Soueges S, Bouiller K, Botelho-Nevers E, Gagneux-Brunon A, Chirouze C, Rodriguez-Nava V, et al. Prognosis and factors associated with disseminated nocardiosis: a ten-year multicenter study. *J Infect* [Internet]. août 2022 [cité 1 oct 2025];85(2):130-6. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445322003383>
14. Yetmar ZA, Khodadadi RB, Chesdachai S, McHugh JW, Challener DW, Wengenack NL, et al. Mortality After Nocardiosis: Risk Factors and Evaluation of Disseminated Infection. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 1 août 2023 [cité 1 oct 2025];10(8):ofad409. Disponible sur: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofad409/7234451>
15. Lee HN, Do KH, Kim EY, Choe J, Sung H, Choi SH, et al. Comparative Analysis of CT Findings and Clinical Outcomes in Adult Patients With Disseminated and Localized Pulmonary Nocardiosis. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2024 [cité 1 oct 2025];39(11):e107. Disponible sur: <https://jkms.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2024.39.e107>
16. Rodriguez-Nava V, Laurent F, Couble A, Boiron P. Identification phénotypique et moléculaire des bactéries appartenant au genre *Nocardia*. *Rev Francoph Lab* [Internet]. avr 2007 [cité 20 déc 2024];2007(391):49-56. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773035X07801298>
17. Orphanet: Nocardiose [Internet]. [cité 12 févr 2025]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/fr/disease/detail/31204#:~:text=La%20nocardiose%20est%20une%20infection,po umons%2C%20cerveau\)%20ou%20diss%C3%A9min%C3%A9e.&text=L'incidence%20annuelle%20au x%20Etats,Europe%20n'est%20pas%20connue](https://www.orpha.net/fr/disease/detail/31204#:~:text=La%20nocardiose%20est%20une%20infection,po umons%2C%20cerveau)%20ou%20diss%C3%A9min%C3%A9e.&text=L'incidence%20annuelle%20au x%20Etats,Europe%20n'est%20pas%20connue)
18. Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, Djadi-Prat J, Mouniée D, Boiron P, et al. Sensibilité aux antibiotiques et typage moléculaire d'espèce de 793 souches de *Nocardia* : une étude rétrospective (2010–2015). *Médecine Mal Infect* [Internet]. juin 2018 [cité 12 févr 2025];48(4):S125. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0399077X18305079>
19. Nocardiose - Infections - Manuels Merck pour le grand public [Internet]. [cité 5 oct 2025]. Disponible sur: [https://www.merckmanuals.com/fr-ca/accueil/infections/infections-bact%C3%A9riennes-bact%C3%A9ries-gram-positives/nocardiose?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.merckmanuals.com/fr-ca/accueil/infections/infections-bact%C3%A9riennes-bact%C3%A9ries-gram-positives/nocardiose?utm_source=chatgpt.com)
20. Rémic: référentiel en microbiologie médicale. 7e édition, 2022. Paris: Société française de microbiologie; 2022. 3 p.
21. DUMITRESCU oana. Nocardioses : aspects pratiques du diagnostic biologique et prestation de conseil [Internet]. [cité 3 juill 2024]. Disponible sur: [https://www.chu-lyon.fr/sites/default/files/NOCWebSFM\\_Dumitrescu.pdf](https://www.chu-lyon.fr/sites/default/files/NOCWebSFM_Dumitrescu.pdf)
22. E.M.Le Coustumier, E.Denes, C.Martin, P.Weinbreck. infectiologie.com. Nocardiose : analyse de 18 cas. Disponible sur: [https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/JNI15/posters/2015-poster-JNI-BACT\\_02.pdf](https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/JNI15/posters/2015-poster-JNI-BACT_02.pdf)
23. NobelPrize.org [Internet]. [cité 12 févr 2025]. Nobel Prize in Chemistry 1993. Disponible sur: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/summary/>
24. Mullis KB, Faloona FA. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1987 [cité 12 févr 2025]. p. 335-50. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687987550236>
25. Alberts, Bruce et al. Figure 10-14. 4th éd. Garland Science; 2014. 860 p. (Essential Cell Biology).

26. Présentation RT PCR [Internet]. [cité 20 nov 2024]. Disponible sur: [https://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects\\_techniques/rtpcr/rtpcr02.htm](https://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/rtpcr/rtpcr02.htm)
27. Payne susan. Viruses: Biology, Applications, and Control. 1st éd. Garland Science; 2012. figure 10-11.
28. Real Time Quantitative PCR - Technical details | Scientific services | Cogentech [Internet]. [cité 10 nov 2024]. Disponible sur: <https://www.cogentech.it/realtime-pcr-eng-technical-details.php>
29. Sharon,abm. Polymerase Chain Reaction (PCR) – Reverse Transcription [Internet]. [cité 6 oct 2024]. Disponible sur: <https://info.abmgood.com/polymerase-chain-reaction-pcr-reverse-transcription>
30. Sharon,abm. Polymerase Chain Reaction (PCR) – Real-Time PCR/Quantitative PCR (qPCR) [Internet]. [cité 6 oct 2025]. Disponible sur: <https://info.abmgood.com/polymerase-chain-reaction-pcr-rt-pcr-real-time-pcr-quantitative-pcr-qpcr>
31. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). Cold Spring Harb Protoc [Internet]. févr 2019 [cité 20 févr 2024];2019(2):pdb.prot095182. Disponible sur: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot095182>
32. Shen CH. Amplification of Nucleic Acids. In: Diagnostic Molecular Biology [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 6 oct 2025]. p. 215-47. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028230000092>
33. Sharon,abm. Polymerase Chain Reaction (PCR) – Variations to the System [Internet]. [cité 6 oct 2025]. Disponible sur: <https://info.abmgood.com/polymerase-chain-reaction-pcr-variations>
34. Yang J, Ren H tao, Wang J, Dong A ying, Chen Y lan, Hu D xia, et al. Clinical characteristics, susceptibility profiles, and treatment of nocardiosis: a multicenter retrospective study in 2015-2021. Int J Infect Dis [Internet]. mai 2023 [cité 1 oct 2025];130:136-43. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971223000723>
35. Nocardiosis Medication: Antibiotics [Internet]. [cité 6 oct 2025]. Disponible sur: <https://emedicine.medscape.com/article/224123-medication?form=fpf#2>
36. Haussaire D, Fournier PE, Djiguiba K, Moal V, Legris T, Purgus R, et al. Nocardiosis in the south of France over a 10-years period, 2004–2014. Int J Infect Dis [Internet]. avr 2017 [cité 20 déc 2024];57:13-20. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971217300085>
37. Rouzaud C, Rodriguez-Nava V, Catherinot E, Méchaï F, Bergeron E, Farfour E, et al. Clinical Assessment of a *Nocardia* PCR-Based Assay for Diagnosis of Nocardiosis. Forbes BA, éditeur. J Clin Microbiol [Internet]. juin 2018 [cité 6 oct 2025];56(6):e00002-18. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.00002-18>
38. Ali Rahdar H, Reza Salehi M, Bahador A, Jasemi S, Karami-Zarandi M, Hasan Nejad M, et al. Detection of *Nocardia*, *Streptomyces* and *Rhodococcus* from bronchoalveolar lavage specimens of patients with HIV by Multiplex PCR Assay. Ethiop J Health Sci [Internet]. 1 janv 1970 [cité 6 oct 2025];29(6). Disponible sur: <https://www.ajol.info/index.php/ejhs/article/view/191323>
39. Fabre M. Évaluation de la PCR 16S en temps réel pour le diagnostic de *Nocardia* directement sur prélèvement, utilisée au laboratoire de l'IAI Hôpital de la Croix Rousse Lyon. IAI, Hôpital de la croix rousse, Lyon; 2023 avr p. 43.
40. Rodondi N, Cornuz J, Ghali WA. Evaluation d'un nouveau test diagnostique par les outils de l'épidémiologie clinique: quels sont les apports d'Evidence-Based Medicine ? Rev Médicale Suisse [Internet]. 2004 [cité 6 oct 2025];62(2506):2349-53. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/revue->

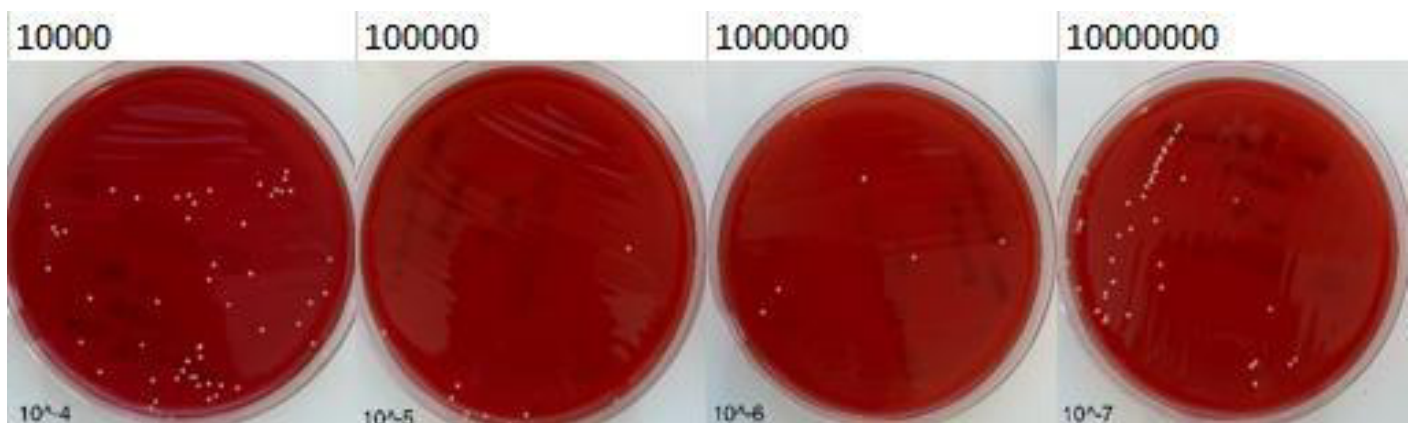
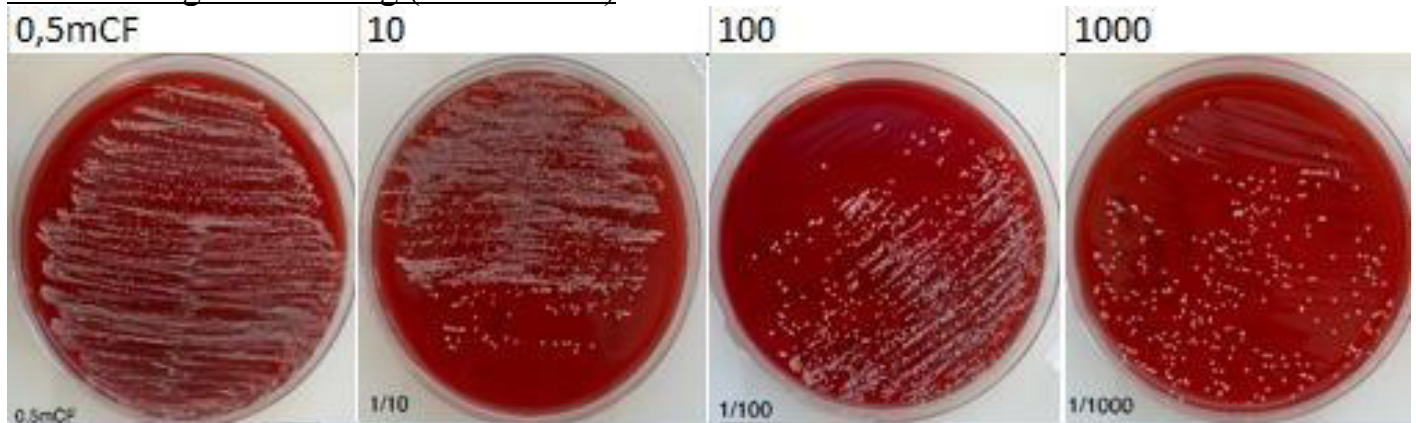
medicale-suisse/2004/revue-medicale-suisse-2506/evaluation-d-un-nouveau-test-diagnostique-par-les-outils-de-l-epidemiologie-clinique-quels-sont-les-apports-d-evidence-based-medicine.

41. Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, Boiron P, Lortholary O, Rodriguez-Nava V. Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010–2015. Clin Microbiol Infect. 2019;25(4):489–495.

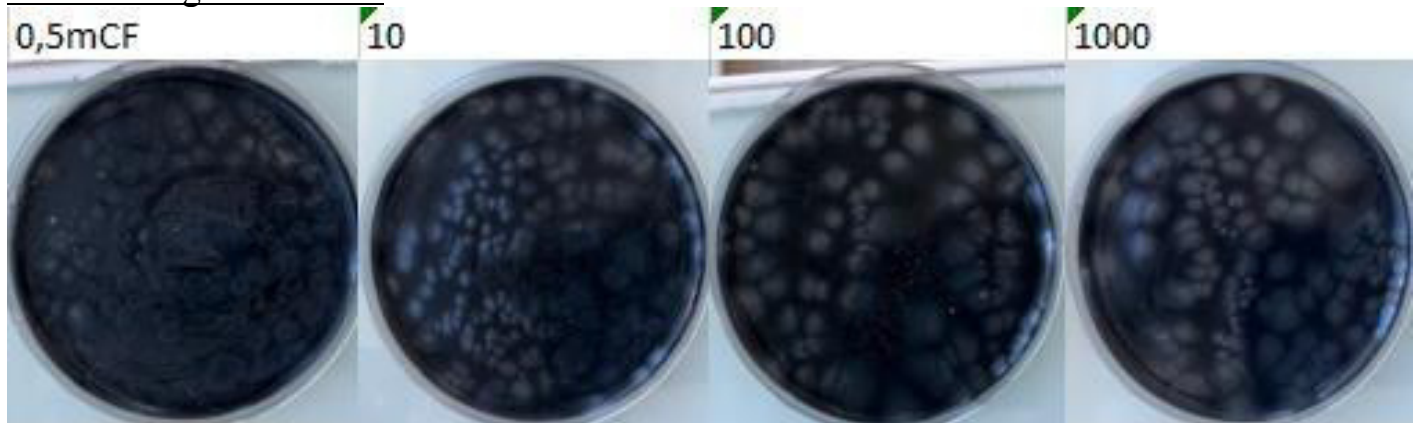
## Annexes

### Annexe 1 : Cultures *Nocardia farcinica*

#### Culture sur gélose au sang (Gélose COS)



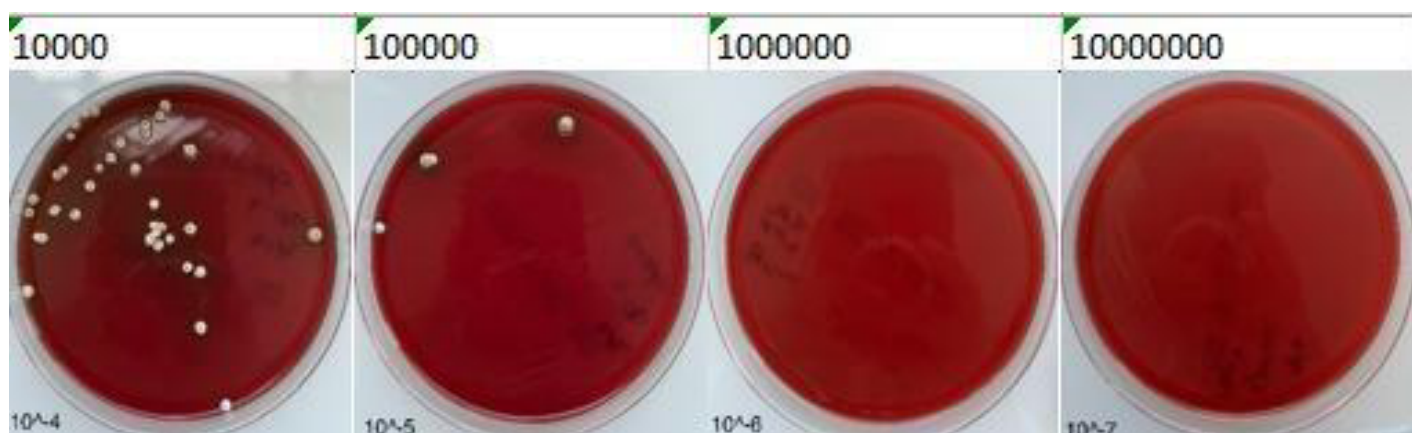
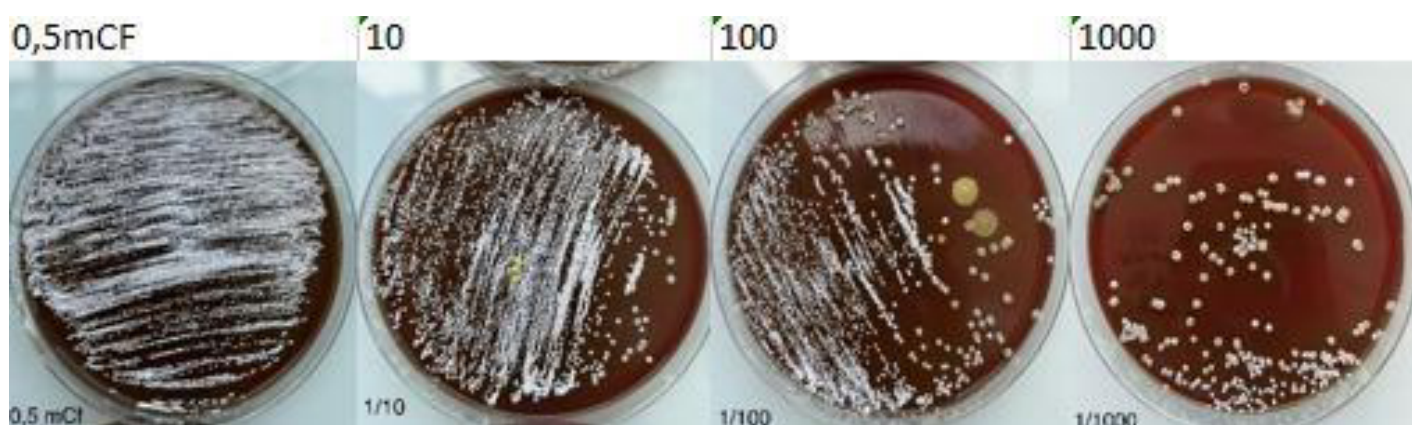
#### Culture sur gélose BCYE



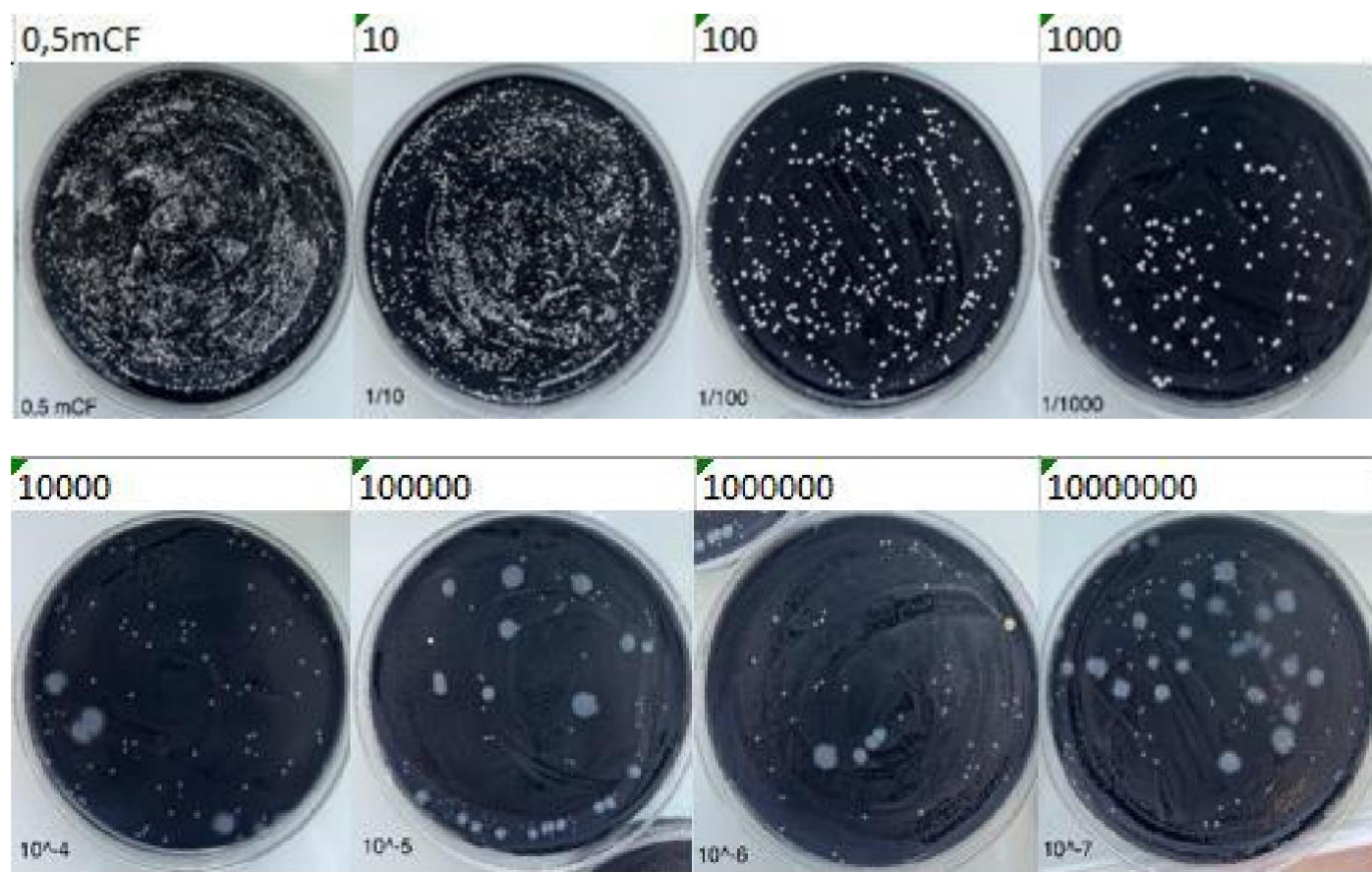


## Annexe 2 : Cultures *Nocardia cyriacigeorgica*

### Culture sur gélose au sang (Gélose COS)

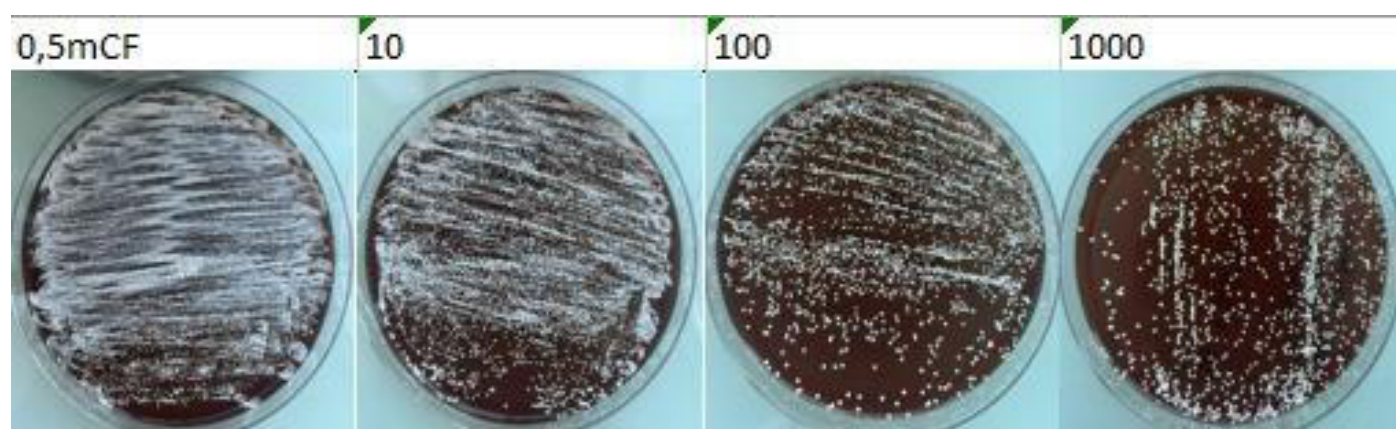


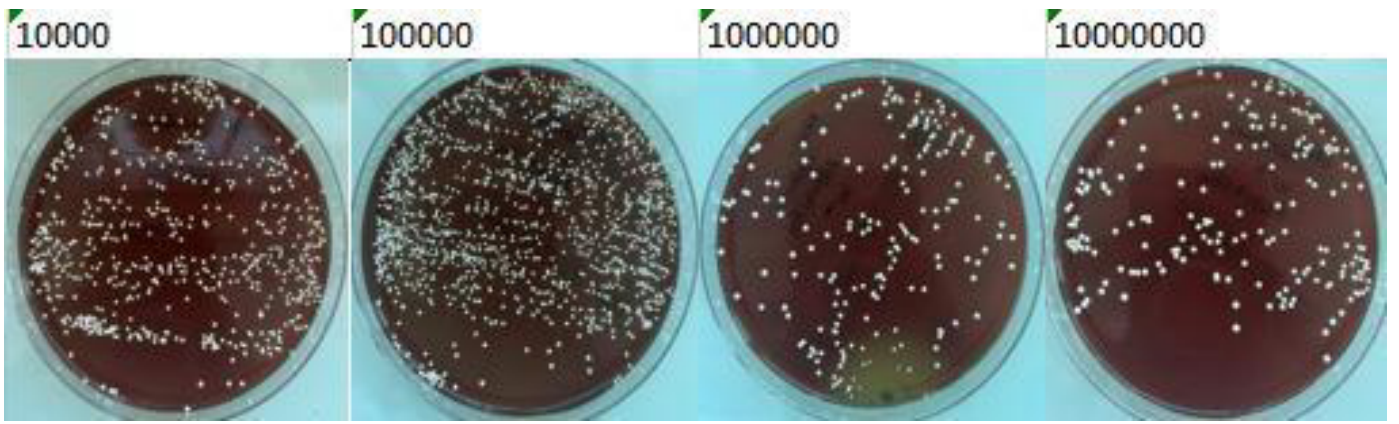
Culture sur gélose BCYE



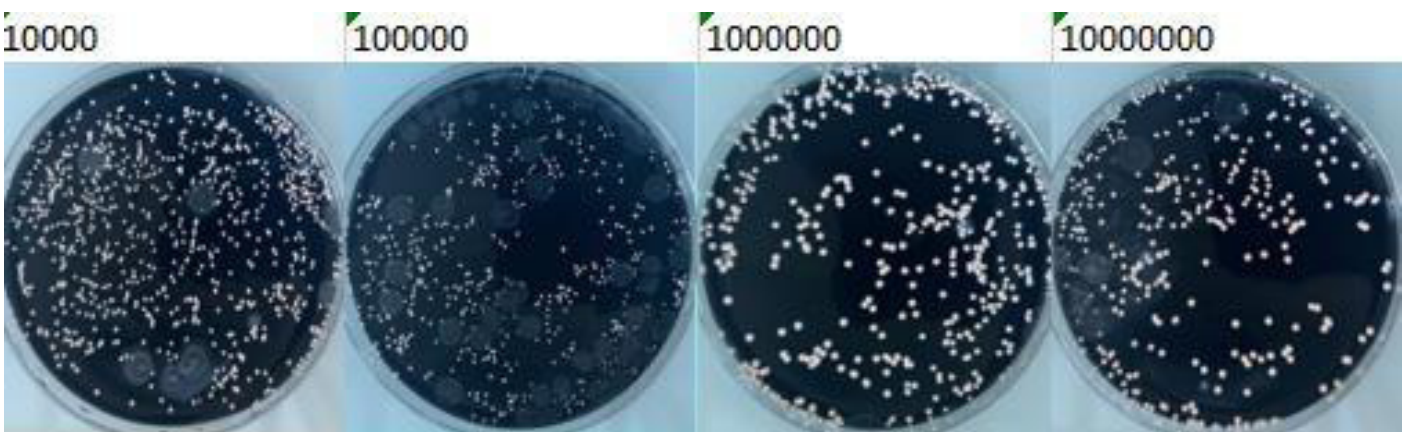
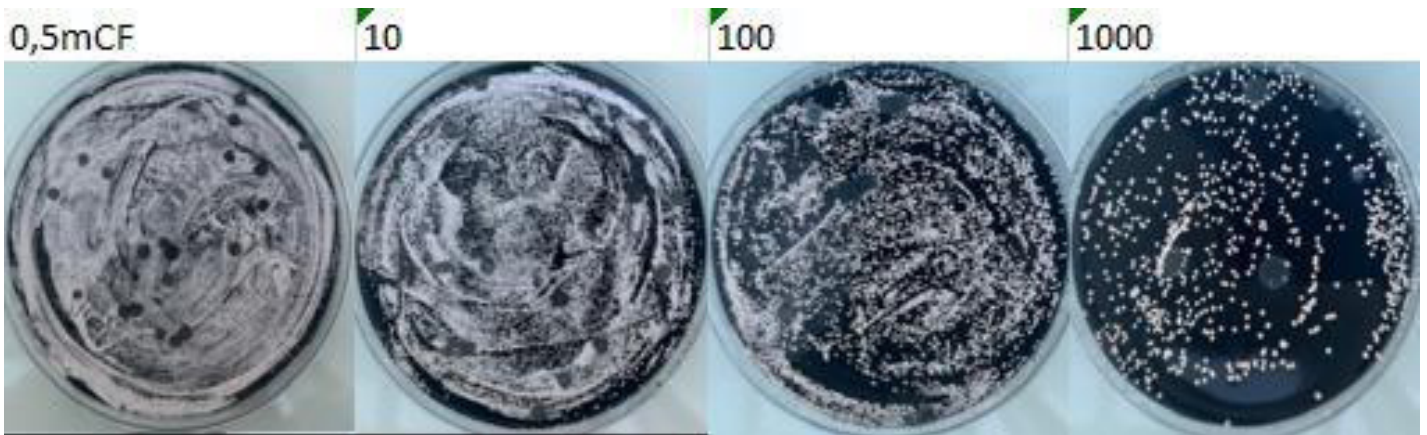
Annexe 3 : Cultures *Nocardia wallacei*

Culture sur gélose au sang (Gélose COS)



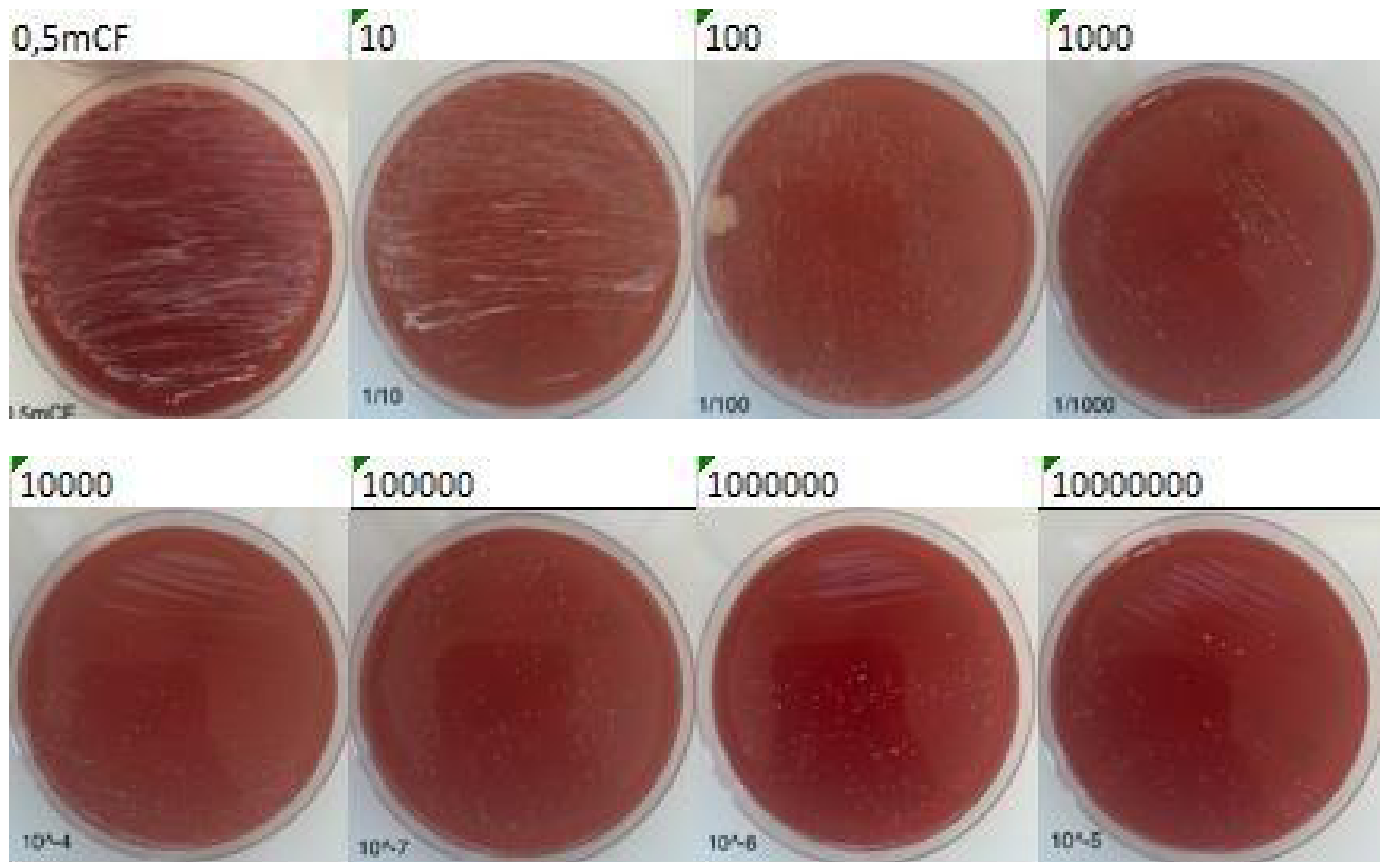


Culture sur gélose BCYE

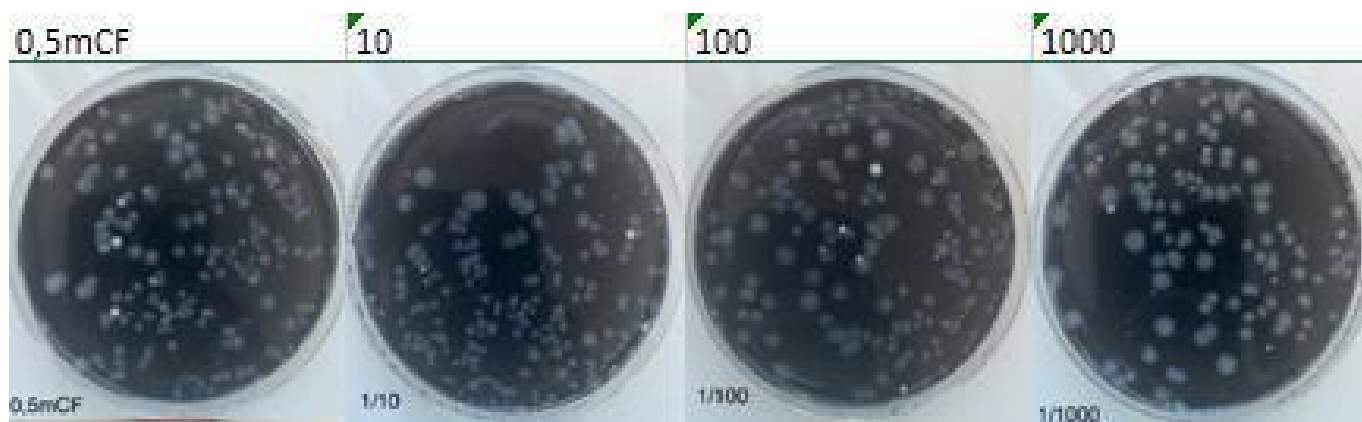


## Annexe 4 : Cultures *Nocardia abscessus*

### Culture sur gélose au sang (Gélose COS)



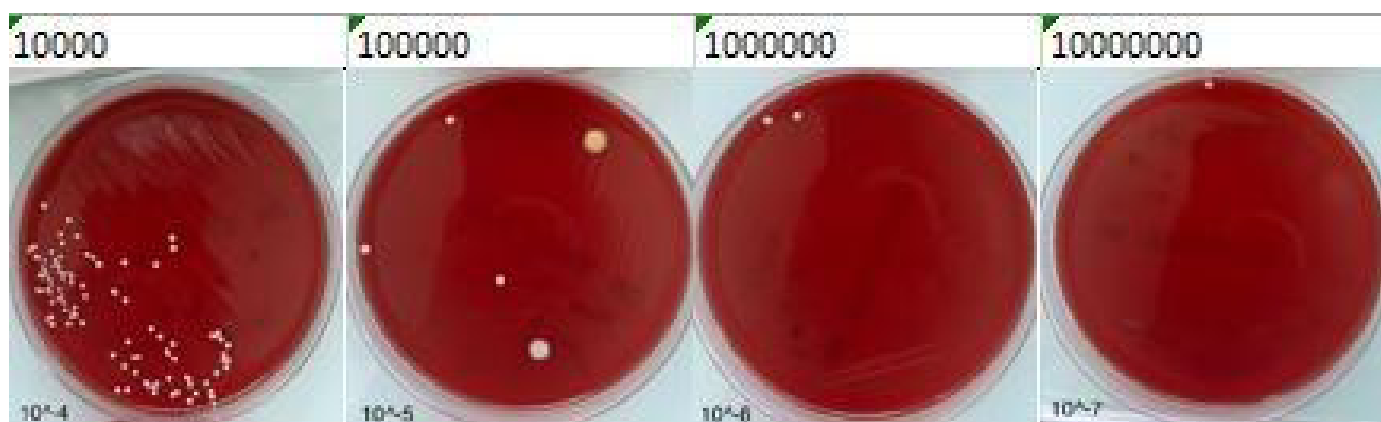
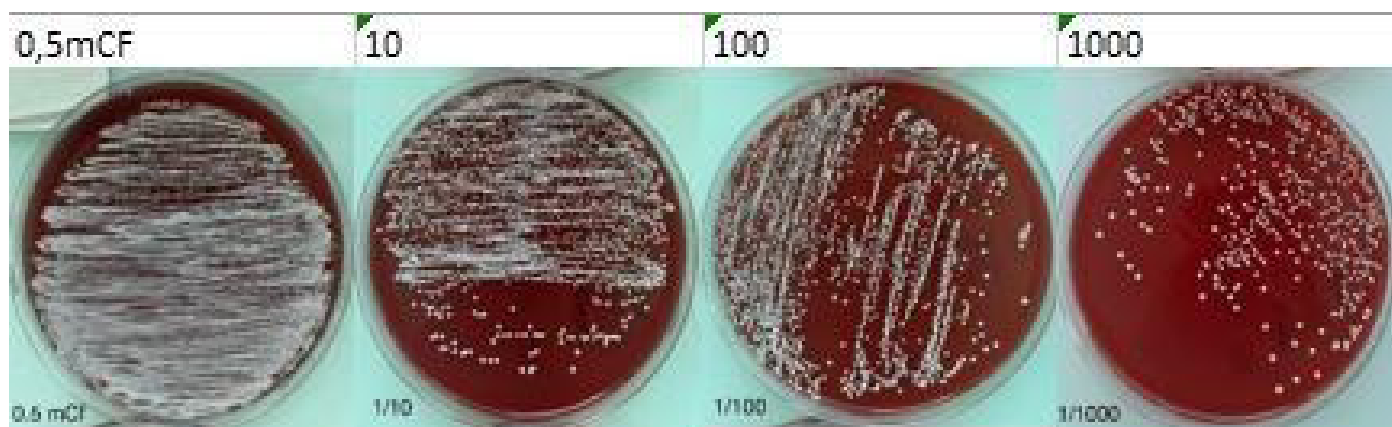
### Culture sur gélose BCYE



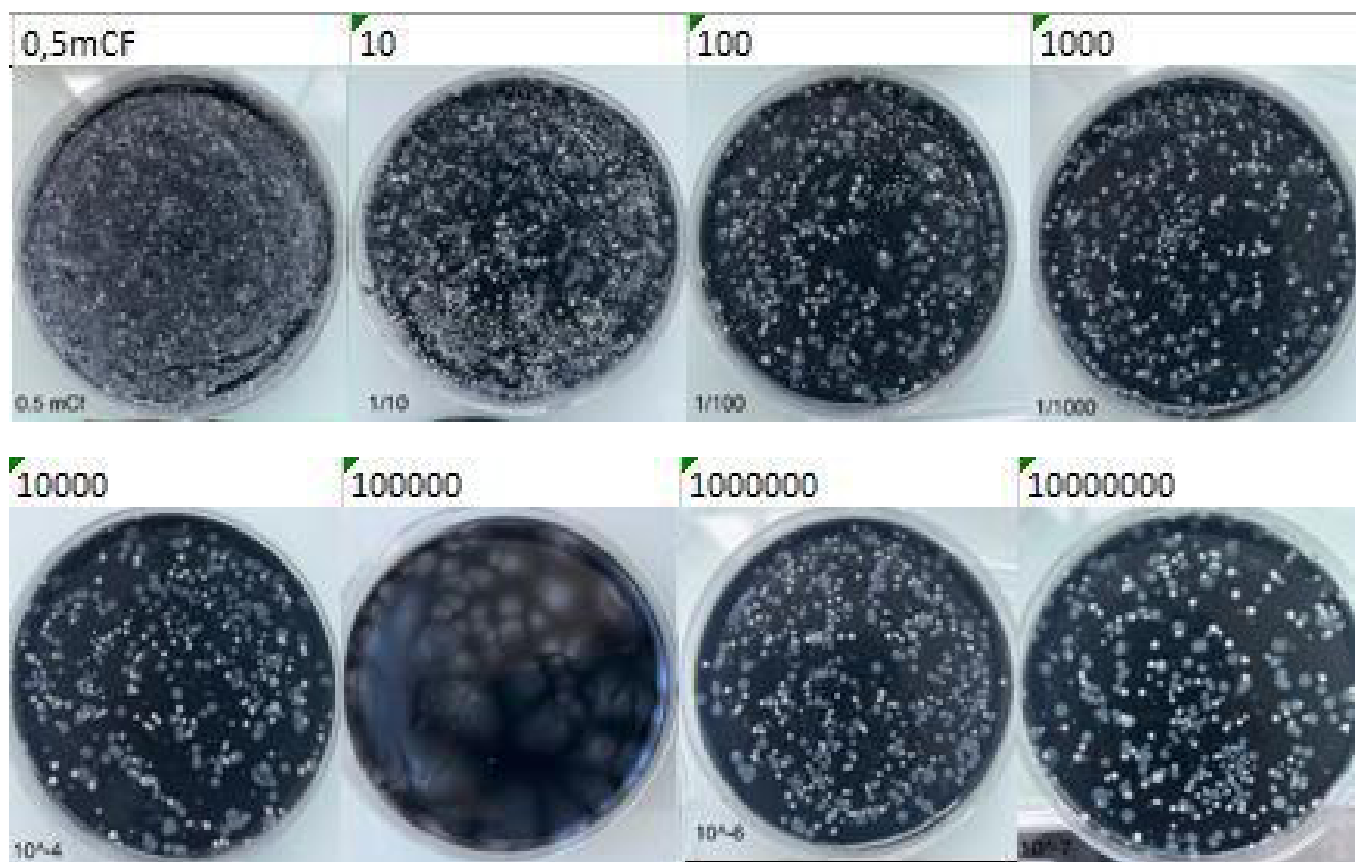


## Annexe 5 : Cultures *Nocardia nova*

### Culture sur gélose au sang (Gélose COS)



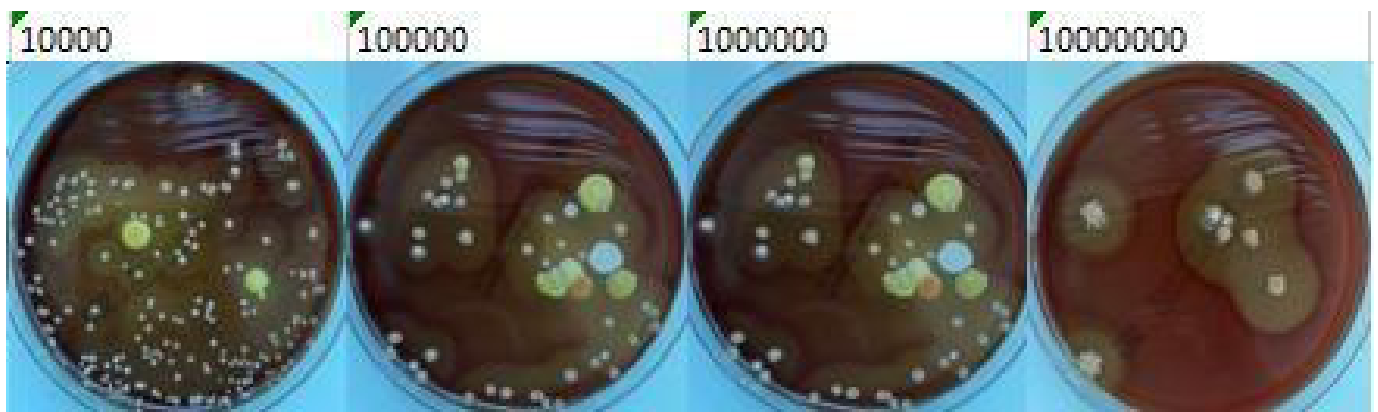
## Culture sur gélose BCYE



## Annexe 6 : Cultures *Nocardia otitidiscavarium*

### Culture sur gélose au sang (Gélose COS)





Culture sur gélose BCYE



Annexe 7 : Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques chez 736 isolats de *Nocardia* selon les espèces (41)

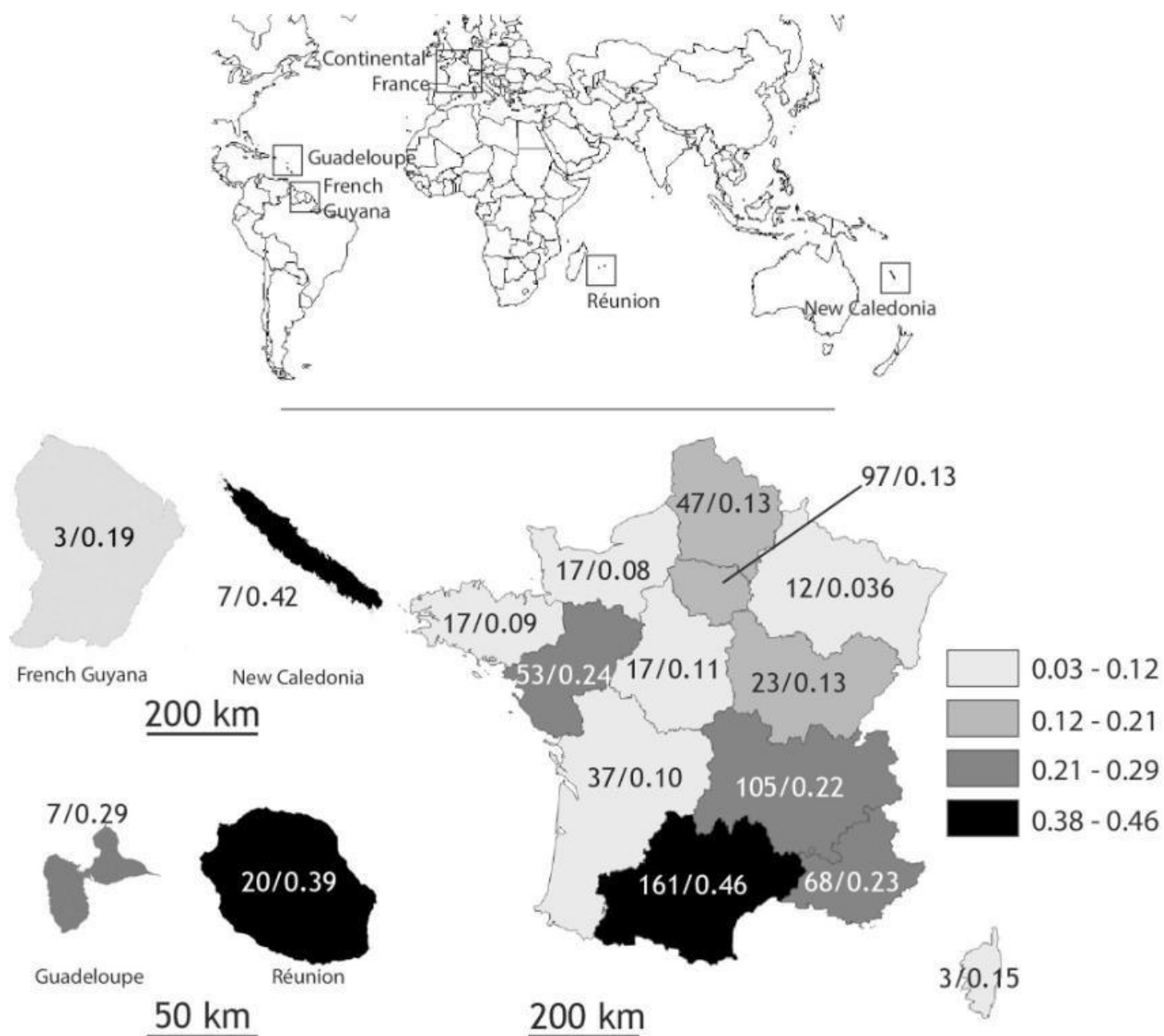
**Table 3**  
Results of antibiotic susceptibility testing among 736 *Nocardia* isolates according to species

| Antibiotic; n (%) of non-susceptible <sup>a</sup> isolates | All <i>Nocardia</i> isolates. (n = 736) | <i>Nocardia abscessus</i> complex (n = 152) | <i>Nocardia farcinica</i> (n = 149) | <i>Nocardia nova</i> complex (n = 145) | <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> (n = 95) | <i>Nocardia transvalensis</i> complex (n = 49) | <i>Nocardia brasiliensis</i> (n = 48) |
|--|---|---|-------------------------------------|--|--|--|---------------------------------------|
| Amoxicillin  | 394 (53.8)                              | 37 (24.3)                                   | 137 (91.9)                          | 33 (23.1)                              | 82 (87.2)                                | 29 (59.2)                                      | 32 (66.7)                             |
| Amoxicillin-clavulanic acid                                | 365 (49.7)                              | 40 (26.3)                                   | 30 (20.1)                           | 131 (91.6)                             | 86 (90.5)                                | 6 (12.2)                                       | 4 (8.3)                               |
| Ticarcillin-clavulanic acid                                | 372 (53.8)                              | 42 (27.6)                                   | 58 (43.6)                           | 131 (94.2)                             | 82 (93.2)                                | 5 (10.9)                                       | 5 (10.9)                              |
| Piperacillin-tazobactam                                    | 457 (66.0)                              | 39 (26.7)                                   | 129 (97.0)                          | 103 (74.1)                             | 83 (93.3)                                | 31 (67.4)                                      | 17 (37.0)                             |
| Imipenem   | 143 (19.5)                              | 18 (11.8)                                   | 34 (23.0)                           | 1 (0.7)                                | 10 (10.5)                                | 18 (36.7)                                      | 40 (85.1)                             |
| Meropenem  | 227 (31.2)                              | 11 (7.3)                                    | 108 (73.0)                          | 6 (4.2)                                | 41 (43.6)                                | 8 (16.7)                                       | 28 (58.3)                             |
| Doripenem  | 119 (29.1)                              | 8 (9.4)                                     | 68 (68.7)                           | 4 (5.1)                                | 11 (25.0)                                | 2 (6.9)  | 16 (76.2)                             |
| Ertapenem  | 303 (42.7)                              | 17 (11.6)                                   | 123 (89.8)                          | 18 (12.7)                              | 59 (62.8)                                | 23 (48.9)                                      | 31 (64.6)                             |
| Cefotaxime   | 193 (26.4)                              | 4 (2.7)                                     | 118 (79.7)                          | 29 (20.3)                              | 7 (7.4)                                  | 0 (0.0)  | 11 (22.9)                             |
| Ceftriaxone  | 209 (28.5)                              | 4 (2.6)                                     | 120 (80.5)                          | 42 (29.4)                              | 4 (4.2)                                  | 2 (4.1)  | 15 (31.3)                             |
| Cefepime   | 281 (38.9)                              | 12 (7.9)                                    | 134 (91.2)                          | 33 (23.4)                              | 33 (35.1)                                | 8 (17.0)                                       | 27 (56.3)                             |
| Cefuroxime   | 98 (25.0)                               | 3 (3.8)                                     | 64 (69.6)                           | 7 (9.1)                                | 1 (2.2)                                  | 1 (3.6)  | 9 (42.9)                              |
| Pristinamycin  | 82 (94.3)                               | 22 (88.0)                                   | 19 (95.0)                           | 13 (100.0)                             | 7 (87.5)                                 | 7 (100.0)                                      | 2 (100.0)                             |
| Gentamicin   | 224 (30.7)                              | 2 (1.3)                                     | 136 (91.9)                          | 22 (15.5)                              | 1 (1.1)                                  | 45 (95.7)                                      | 1 (2.1)                               |
| Tobramycin   | 333 (45.6)                              | 2 (1.3)                                     | 143 (96.6)                          | 11 (7.9)                               | 1 (1.1)                                  | 46 (95.8)                                      | 0 (0.0)                               |
| Amikacin   | 21 (2.9)                                | 1 (0.7)                                     | 2 (1.4)                             | 0 (0.0)                                | 1 (1.1)                                  | 15 (30.6)                                      | 0 (0.0)                               |
| Minozocline  | 69 (9.4)                                | 2 (1.3)                                     | 19 (12.8)                           | 10 (6.9)                               | 18 (18.9)                                | 2 (4.1)  | 6 (12.5)                              |
| Doxycycline  | 176 (42.8)                              | 4 (4.8)                                     | 63 (63.6)                           | 54 (67.5)                              | 10 (21.7)                                | 14 (48.3)                                      | 14 (66.7)                             |
| Tigecycline  | 202 (27.9)                              | 11 (7.4)                                    | 66 (45.2)                           | 66 (46.5)                              | 15 (15.8)                                | 23 (47.9)                                      | 2 (4.3)                               |
| Erythromycin   | 463 (64.1)                              | 88 (58.7)                                   | 143 (97.3)                          | 6 (4.3)                                | 90 (95.7)                                | 44 (91.7)                                      | 41 (85.4)                             |
| Linezolid  | 0 (0.0)                                 | 0 (0.0)                                     | 0 (0.0)                             | 0 (0.0)                                | 0 (0.0)                                  | 0 (0.0)  | 0 (0.0)                               |
| Vancomycin   | 465 (63.8)                              | 91 (60.7)                                   | 46 (31.1)                           | 108 (76.1)                             | 81 (85.3)                                | 43 (87.8)                                      | 45 (93.8)                             |
| Trimethoprim   | 530 (76.5)                              | 63 (43.4)                                   | 125 (94.0)                          | 137 (97.9)                             | 47 (52.8)                                | 46 (100.0)                                     | 43 (93.5)                             |
| Trimethoprim-sulfamethoxazole                              | 40 (5.4)                                | 2 (1.3)                                     | 6 (4.0)                             | 12 (8.3)                               | 3 (3.2)                                  | 6 (12.2)                                       | 2 (4.2)                               |
| Ciprofloxacin  | 520 (71.4)                              | 131 (86.8)                                  | 62 (41.9)                           | 139 (97.9)                             | 95 (100.0)                               | 5 (10.2)                                       | 42 (89.4)                             |
| Levofloxacin   | 409 (56.2)                              | 105 (69.5)                                  | 41 (27.7)                           | 128 (90.1)                             | 81 (86.2)                                | 3 (6.1)  | 18 (37.5)                             |
| Moxifloxacin   | 264 (36.4)                              | 73 (48.7)                                   | 14 (9.5)                            | 90 (63.8)                              | 58 (61.7)                                | 3 (6.4)  | 1 (2.0)                               |
| Rifampin   | 505 (73.0)                              | 88 (60.7)                                   | 121 (91.0)                          | 106 (76.3)                             | 56 (62.9)                                | 43 (93.5)                                      | 40 (87.0)                             |

Other *Nocardia* species that underwent antibiotic susceptibility testing were: *N. orhidiscavitarum* (n = 11), *N. brevicatena/paucivorans* complex (n = 9), *N. pseudobrasiliensis* (n = 8), *N. flavorosea* (n = 7), *N. cetradoensis* (n = 4), *N. mexicana* (n = 4), *N. carnea* (n = 3), *N. jiangyuetensis* (n = 2), *N. asteroides* (n = 2), *N. higoensis* (n = 2), *N. mikami* (n = 2), *N. pneumoniae* (n = 2), *N. goodii/fellowii* (n = 1), *N. puris* (n = 1), *N. couleaze* (n = 1), *N. altamirensis* (n = 1), *N. elegans* (n = 1), *N. neocaledoniensis* (n = 1), *N. concava* (n = 1), *N. rhinosiphilia* (n = 1), *N. takekensis* (n = 1), *N. uniformis* (n = 1), *N. vinacea* (n = 1), *Nocardia* spp. (n = 31).

<sup>a</sup> Non-susceptible strains were defined as resistant or intermediate.

## Annexe 8 : Répartition géographique des isolats de *NOCARDIA* en France (2010– 2015) (41)



## CONCLUSIONS GENERALES

THESE SOUTENUE PAR M. OUHBI Ayoub

La nocardiose reste aujourd'hui une infection aussi rare que redoutée. Elle touche surtout des patients fragiles, souvent immunodéprimés, pour lesquels un diagnostic rapide peut réellement changer le pronostic. Pourtant, identifier le germe responsable demeure une tâche difficile : la culture est longue, l'aspect des colonies parfois trompeur, et les signes cliniques peu spécifiques. Dans ce contexte, pouvoir détecter et identifier au niveau de l'espèce les *Nocardia* directement sur les prélèvements cliniques par une technique de biologie moléculaire fiable et sensible, peut accélérer le diagnostic et améliorer la prise en charge des patients.

C'est dans cette logique qu'a été développée au sein du laboratoire de biologie médicale de référence des nocardioses de l'hôpital de la Croix-Rousse, une PCR *Nocardia* « maison » (PCR dite version « 20X »). Sa conception s'inscrit dans une démarche pragmatique : proposer un outil accessible, fiable et adapté aux moyens du service, sans dépendre de kits commerciaux coûteux. Actuellement, la PCR *Nocardia* version « 20X » est un protocole en deux étapes : premièrement, une étape de détection par une PCR en temps réel basée sur l'amplification du gène ARN16S utilisant des amorces et une sonde spécifique des *Nocardia* ; dans un deuxième temps, et uniquement pour les prélèvements détectés positifs, une étape d'identification par une PCR d'amplification et séquençage du gène *hsp65* (séquençage de type Sanger), permettant une identification à l'espèce des *Nocardia*. Cependant, ces deux PCR peuvent amplifier d'autres bactéries de l'ordre des Actinomycétales et le résultat du séquençage Sanger peut être ininterprétable.

L'objectif de cette thèse était d'évaluer les performances d'un nouveau protocole de PCR développé en interne (PCR dite version « 12X »), basé sur une PCR en temps réel amplifiant une partie discriminante pour l'identification à l'espèce des *Nocardia* de l'ARN16S, suivie d'un séquençage haut débit utilisant la technologie ONT (Oxford Nanopore Technologies). Les avantages de la version « 12X » sont un protocole en un seul temps, permettant une disponibilité du résultat plus rapide, et une possibilité d'exploiter toutes les amplifications positives (même en présence de plusieurs bactéries) grâce au séquençage de nouvelle génération.

Pour évaluer ce protocole, six espèces de *Nocardia* ont été étudiées : *Nocardia farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. wallacei*, *N. abscessus*, *N. nova* et *N. otitidiscavarium*. Des isolats de ces espèces conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  ont été préparés en suspensions diluées (8 échantillons par espèce d'un facteur de 10 à chaque dilution) dans une matrice respiratoire simulant les prélèvements cliniques. Ces prélèvements surchargés ont été analysés d'une part par les deux versions de PCR *Nocardia* « maison » et d'autre part mis en culture sur milieux COS et BCYE.

La culture bactérienne a présenté une limite de détection comprise entre  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  UFC/mL, confirmant sa faible sensibilité. De plus, il s'agit d'une méthode très chronophage, inadaptée à la réalité clinique qui nécessite des résultats rapides pour une prise en charge optimale.

Les deux PCR « maison » ont montré des performances plus prometteuses : la PCR « 20X » a détecté la présence de *Nocardia* 91 % des échantillons testés (toutes dilutions confondues), avec des sensibilités variant de 79,2 % à 100 % selon les espèces. La PCR « 12X » a atteint 97,7 % de détection globale (toutes dilutions confondues), avec des

sensibilités comprises entre 92,5 % et 100 %. Les deux techniques de PCR ont permis de détecter des charges bactériennes jusqu'à  $10^{-7}$  UFC/mL, soit mille fois plus faibles que la culture. Quelques essais réalisés sur des prélèvements cliniques réels ont confirmé la robustesse du protocole « 12X », dont la validation à plus grande échelle est en cours, en vue d'une utilisation prochaine en routine.

Ces résultats démontrent la faisabilité d'un protocole « maison » à la fois fiable, sensible et économiquement accessible, offrant une réelle alternative à la culture pour la détection rapide des *Nocardia* spp. Plusieurs perspectives sont envisageables pour renforcer davantage cette étude. Il serait intéressant de tester ces protocoles sur des prélèvements cliniques réels et d'étendre leur validation à d'autres espèces de *Nocardia*. À l'avenir, cette étude pourrait inspirer la mise au point de travaux similaires sur d'autres agents infectieux difficiles à cultiver.

En guise de conclusion, cette étude affirme que la PCR n'est en aucun cas qu'une technique de laboratoire réservée uniquement à la recherche, mais un véritable outil de diagnostic. Enfin, ce travail met en lumière le rôle central du pharmacien/médecin biologiste : celui d'être l'acteur clé capable de relier la science au soin, en permettant aux avancées technologiques de se traduire par un bénéfice concret pour le patient.

Le Président de la thèse,  
Nom : DOLEANS JORDHEIM ANNE

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **- 8 DEC. 2025**  
Vu, le Directeur de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et  
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Signature :



Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeur C. DUSSART



L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

**OUHBI Ayoub**

Détection rapide des *Nocardia* sur prélèvements : mise au point et évaluation d'un protocole de PCR « maison » utilisant la technique de séquençage haut débit Oxford Nanopore Technologies.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2025, 74 p.

**RESUME en français**

La nocardiose occupe une place particulière parmi les infections rencontrées en milieu hospitalier. C'est une infection peu fréquente, mais grave et redoutée. Rare, car elle ne concerne qu'un petit nombre de patients chaque année. Grave, car elle survient presque toujours dans des contextes de patients fragiles : greffe d'organe, traitement immunosuppresseur, corticothérapie prolongée ou infection par le VIH. Dans ces situations, un retard diagnostique peut avoir des conséquences lourdes, parfois fatales.

Le problème est que la nocardiose est difficile à diagnostiquer. Sur le plan sémiologique et radiologique, elle ressemble à bien d'autres maladies, et sur le plan microbiologique, les cultures sont longues, parfois négatives et présentent une faible sensibilité. Le développement des techniques de biologie moléculaire, notamment la PCR, a donc représenté une avancée déterminante dans le diagnostic rapide de la nocardiose. En quelques heures, il est désormais possible de confirmer ou d'écarter la présence d'une *Nocardia*, là où la culture demande plusieurs jours.

Dans ce travail réalisé au laboratoire de microbiologie de l'hôpital de la Croix-Rousse, deux protocoles de PCR développés en interne et basés sur l'amplification de l'ARN16S, appelés 20X et 12X, ont été évalués et validés pour leur capacité à détecter des espèces de *Nocardia* dans des prélèvements surchargés en *Nocardia*. Ces protocoles ont été comparés à la culture bactérienne afin d'en mesurer la sensibilité et la reproductibilité. Six espèces de *Nocardia* ont ainsi été testées.

Les résultats obtenus ont montré que la PCR 20X a détecté 91% des échantillons, avec des sensibilités allant de 79,2% à 100% selon les espèces de *Nocardia*. La PCR 12X a atteint 97,7% de détection globale, avec des sensibilités comprises entre 92,5% et 100%, et a permis de détecter des charges bactériennes jusqu'à  $10^{-7}$  UFC/mL, soit mille fois plus faibles que celles détectées par culture. Ces résultats confirment que les deux PCR maison sont capables de détecter efficacement plusieurs espèces de *Nocardia*, avec un avantage significatif pour la PCR 12X, plus sensible et plus rapide. Elle constitue ainsi une alternative fiable, robuste et adaptée pour le diagnostic des nocardioses.

Au-delà de la microbiologie, l'objectif de cette étude est d'encourager et de promouvoir l'élaboration d'outils diagnostiques « maison », en adaptant les ressources locales et les moyens disponibles aux besoins réels et spécifiques du laboratoire hospitalier. Ce travail incarne une approche pragmatique et innovante, axée sur l'amélioration du diagnostic, et témoigne d'une détermination affirmée à optimiser la qualité de la prise en charge des patients.

**MOTS CLES**

*Nocardia* – Nocardioses – PCR - Diagnostic moléculaire – Validation - Microbiologie hospitalière - Tests maison.

**JURY**

Mme DOLEANS-JORDHEIM Anne, MCU-PH  
 Mme HODILLE Elisabeth, PH  
 Mme BENITO Yvonne, Dr  
 Mme DUMITRESCU Oana, MCU- PH  
 Mme ROUSSEL-GAILLARD Tiphaine, PH

**DATE DE SOUTENANCE :**

**12 Janvier 2026**

**CONTACT**

elisabeth.hodille@chu-lyon.fr