HAL
open science

Le véhicule de détection, d'identification et de prélèvement des Services Départementaux d'Incendie et de Secours : nouvelle réponse face à la menace bioterroriste

Charlotte Avanzi

To cite this version:

Charlotte Avanzi. Le véhicule de détection, d'identification et de prélèvement des Services Départementaux d'Incendie et de Secours : nouvelle réponse face à la menace bioterroriste. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01022347

HAL Id: dumas-01022347

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01022347

Submitted on 30 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier GRENOBLE PHARMACIE

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2014 N°

LE VEHICULE DE DETECTION, D'IDENTIFICATION ET DE PRELEVEMENT DES SERVICES DEPARTEMENTAUX D'INCENDIE ET DE SECOURS : NOUVELLE REPONSE FACE A LA MENACE BIOTERRORISTE ?

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ETAT

AVANZI Charlotte

Né(e) le **08 décembre 1988** A **Chambéry**

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le **: 06 juin 2014**

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : **Dr Raphaëlle GERMI**,

Directeur de thèse : **Dr Fabrice BIOT**

Membres

Dr Annick ROUL

Dr Jean BRETON

Dr Lionel LACHENAUD

Dr François THIBAULT

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2014 N°

LE VEHICULE DE DETECTION, D'IDENTIFICATION ET DE PRELEVEMENT DES SERVICES DEPARTEMENTAUX D'INCENDIE ET DE SECOURS : NOUVELLE REPONSE FACE A LA MENACE BIOTERRORISTE ?

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ETAT

AVANZI Charlotte

Né(e) le **08 décembre 1988** A **Chambéry**

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le **: 06 juin 2014**

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : **Dr Raphaëlle GERMI**,

Directeur de thèse : **Dr Fabrice BIOT**

Membres

Dr Annick ROUL

Dr Jean BRETON

Dr Lionel LACHENAUD

Dr François THIBAULT

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2013-2014

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=12)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEURS EMERITES (n=2)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)

Dernière mise à jour : 27/04/2014 Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ
GRENOBLE 1

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=32)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
		(Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ
GRENOBLE 1

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)

BEDOUCH	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)

PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)

FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=3)

CHANOINE	Sébastien	Pharmacie Clinique (UF-CHU)
GARNAUD	Cécile	Parasitologie-Mycologie
VAN NOLLEN	**Laetitia**	**Biochimie Toxicologie (HP2-DNTP-BGM)**

MEDAILLE D'OR D'ANNE D'INTERNAT SUPPLEMENTAIRE (n=2)

BERNARD	Delphine	**période de 6 mois – novembre 2013 à avril 2014**
GAUTIER	Elodie	**période de 6 mois – mai 2014 à novembre 2014**

ATER (n= 3)

BRAULT Julie	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
GRAS Emmanuelle	ATER	Physiologie-Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS

BEL	Coraline	(01-10-2012 au 30-09-2014)	
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
BOSSON	Anthony	(01-10-2013 au 30-09-2015)	Laboratoire GIN
CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
CHRISTEN	**Aude**	(01-10-2013 au 30-09-2015)	DCM
CRESPO	Xenia	(01-10-2013 au 30-09-2015)	LBGE
LECERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Pharmacochimie (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-11-2011 au 31/10.2014)	Laboratoire HP2(JR)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09.2013)	Laboratoire HP2(JR)
OUIDIR	Marion	(01-10-2011 au 30-09-2014)	
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)

Professeur Invité

NURISSO	**Alessandra**	(01/11/13 au 31/12/2013))

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 27/04/2014 Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

REMERCIEMENTS

A mon jury

A Madame Raphaëlle Germi, merci de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

A Monsieur Fabrice Biot, merci d'avoir accepté de diriger ce travail. Merci pour ton accompagnement et ton aide tout au long de cette thèse. Merci beaucoup pour la lecture attentive, ton investissement et les conseils de rédaction.

A Madame Annick Roul, merci de m'avoir fait découvrir le métier de pharmacien sapeur-pompier, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et pour tout le soutien que tu m'as apporté.

A Monsieur Jean Breton merci pour l'aide, le suivi et le soutien que j'ai reçu tout au long de mon année de master et dont je bénéficie encore. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur François Thibault, merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'avoir partagé vos idées et votre expertise dans le domaine.

A Monsieur Lionel Lachenaud, merci également d'avoir accepté de juger ce travail, merci pour les corrections et les commentaires sur ce travail

A mes sources d'inspiration

Au Pr Renée Grillot qui m'a suivi toutes ces années et m'a transmis le goût du voyage et de la recherche.

A tous le personnel du CSP St Jean,
Merci à ceux qui m'ont soutenu mais aussi à ceux qui ne l'ont pas fait, c'est finalement grâce à eux si j'en suis là aujourd'hui.

A ceux qui m'ont apporté leur aide pour la réalisation de ce projet

SDIS 73
Un grand merci au Colonel Xavier Jouannet et au Cdt Fabien Desmartin

Dr Christophe Peyrefitte
Adj Pierre Burdin
Lt Guy Faure
Lcl JPh Gueugneau
Cne Frédéric Lunel
Cdt Roger Viney

A ma famille

A mes parents,
Je dédie tout particulièrement cette thèse à mes parents sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour votre soutien tout au long de ces années, merci pour tous les sacrifices que vous avez fait pour moi, merci d'être des supers parents.
Une mention particulière au chef Avanzi qui m'a donné le goût du métier de sapeur-pompier et qui m'a permis de rester pompier pendant toutes mes études grâce à un soutien logistique sans failles.

A mes frères,
Mathieu & Joël, mes modèles, que j'aime tant.

A ma belle famille
Merci de m'avoir accueilli et soutenu tout au long de ces années. Une mention particulière pour mes seconds parents Brigitte et Robert, merci pour votre écoute, votre soutien et votre aide. Merci à Brigitte pour ces plats gastronomiques et les leçons de coutures et Robert pour les cours d'orthographe et d'œnologie.

A Aymeric,
Enfin, the last but not the least, merci au Dr Monteillier pour ces 7 ans (et des brouettes) de vie commune, merci d'avoir été toujours là pour moi, merci de m'avoir coaché et suivi tous au long de ces derniers mois. Merci pour la relecture (tu le sais que tu vas devoir la relire…), merci d'avoir cherché un appartement pendant que je travaillais, merci de m'avoir soutenu pour les entretiens, merci d'avoir fait à manger pendant toutes ces longues soirées de

travail, merci pour les cours d'english, merci pour les « demi » week-end d'activité, bref merci d'être une patate.

Aux copains de la fac

A mon trio de choc :

A Madame BRY-BEYLS Marguerite, ma marraine, j'envoie tous mes remerciements. Merci d'être devenu ma copine en première année et de l'être toujours aujourd'hui. Merci pour tes fiches de révision et surtout de m'avoir attendu en 2ème année. Pharma n'aurait pas été pareil sans toi…

A nenette l'intello, merci de m'avoir fait rire toutes ces années et d'avoir toujours été là, t'es au top nenette !

A Barlette la blonde, merci d'avoir choisi industrie et d'avoir été un binôme de projet de choc. Merci d'être encore là aujourd'hui.

A Maud,
A ma coloc' Marine
A Marie et Pépère
A toute la bande de copain incroyable :
Lisou, Guigui, Tamien, Marie, Tom, Rocky, Rominou, Barbie, Jéjé, Laurent, Gauthier & Mouton

A toutes les personnes qui ont fait de mes études de pharma un moment moins difficile à passer,
Merci

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements 8
Table des matières 12
Table des figures 15
Table des tableaux 16
Liste des abréviation 18
Le Véhicule de Détection, d'Identification et de Prélèvement des Services Départementaux d'Incendie et de Secours : nouvelle réponse face à la menace bioterroriste ? 22
1. Contexte 27
1.1. Le risque biologique et la menace bioterroriste 27
1.1.1. Définition 27
1.1.2. Evaluation du risque et de la menace biologique 28
1.1.2.1. Etat actuel du risque biologique naturel 28
1.1.2.2. Etat actuel du risque biologique provoqué accidentel 29
1.1.2.3. Etat actuel du risque biologique provoqué criminel et de la menace biologique 30
1.1.3. Les armes biologiques 33
1.1.3.1. Définition 33
1.1.3.2. Agents biologiques 33
1.1.3.3. Caractéristiques des armes biologiques 35
1.2. Organisation de la réponse 41
1.2.1. Sur le plan national 41
1.2.2. Au sein des sapeurs-pompiers 47
1.3. Limites actuelles et évaluation des besoins 48
2. Préconisation : le VDIP et son matériel 53
2.1. Le VDIP : c'est quoi ? 53
2.2. La détection, l'identification et le prélèvement : définition et challenges pour les laboratoires mobiles 54
2.2.1. Le prélèvement 56
2.2.1.1. Les enjeux du prélèvement 56
2.2.1.2. Procédures et matériels 59
2.2.2. Préparation de l'échantillon 63
2.2.3. La détection et l'identification 65

2.2.3.1. Enjeux du choix des méthodes de détection et d'identification 67
2.2.3.1.1.1. Critères intrinsèques 67
2.2.3.1.1.2. Critères extrinsèques 69
2.2.3.1.1.3. Choix des cibles 70
2.2.3.1.1.4. Interprétation des résultats 70
2.2.3.2. Les tests pouvant être mis en œuvre 71
2.2.3.2.1.1. Les tests non spécifiques 72
2.2.3.2.1.1.1. ATPmétrie 72
2.2.3.2.1.1.2. Détection d'ADN par fluorimétrie 74
2.2.3.2.1.1.3. Détection de protéines 75
2.2.3.2.1.1.4. Télédetection par laser 77
2.2.3.2.1.2. Les tests spécifiques des agents biologiques et des toxines 82
2.2.3.2.1.2.1. Les tests de microbiologie classique 82
2.2.3.2.1.2.1.1. La culture et les tests biochimiques 82
2.2.3.2.1.2.1.2. La microscopie 84
2.2.3.2.1.2.1.3. Les tests in vivo sur les animaux 85
2.2.3.2.1.2.2. Les tests de biologie moléculaire 85
2.2.3.2.1.2.3. Les tests basés sur l'amplification du matériel génétique 86
2.2.3.2.1.2.3.1. Principe de la PCR 87
2.2.3.2.1.2.3.2. Choix de la cible 90
2.2.3.2.1.2.3.3. Applications pour les agents du bioterrorisme et exemples de tests…… 92
2.2.3.2.1.2.3.4. Avantages et inconvénients 108
2.2.3.2.1.2.4. Le séquençage 110
2.2.3.2.1.2.5. Les tests immunologiques 113
2.2.3.2.1.2.5.1. Choix de la cible 114
2.2.3.2.1.2.5.2. Les différents tests 114
2.2.3.2.1.2.5.3. Application pour les agents du bioterrorisme et exemples de tests…… 117
2.2.3.2.1.2.5.4. Avantages et inconvénients 123
2.2.3.2.1.2.6. Autres tests 124
2.2.3.2.1.2.6.1. La spectrométrie de masse 124
2.2.3.2.1.2.6.2. Cytométrie en flux 127
2.2.3.2.1.2.6.3. Les biopuces 129

2.2.3.2.1.2.6.4. Détection par les phages 132
2.3. Challenge pour les sapeurs-pompiers et recommandations 133
2.3.1. Le VDIP pour qui, pourquoi ? 133
2.3.2. Armement actuel 134
2.3.2.1. Prélèvements 134
2.3.2.2. Détection et identification 135
2.3.3. Les enjeux matériels 136
2.3.3.1. Choix et recommandations pour le matériel de détection et d'identification 138
2.3.3.2. Choix et recommandations pour le matériel de prélèvement 143
3. Mise en œuvre 147
3.1. Les acteurs : missions et formations 147
3.1.1. Le prélèvement 148
3.1.2. L'analyse et le rendu des résultats 150
3.1.3. Conducteur/logisticien du VDIP 153
3.2. Installation, maintenance et coût 155
3.3. Transport des matières biologiques - Réglementation 156
3.4. Sécurité, décontamination et gestion des déchets 157
3.5. Exemple de protocoles d'utilisation 161
3.5.1. Les champs d'action du VDIP 161
3.5.2. Organigramme des acteurs 163
3.5.3. Organisation générale 164
3.5.3.1. Mise en place du matériel 164
3.5.3.2. Missions 168
Discussion 172
Conclusion 177
Bibliographie 180
Annexes 198

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Historique des pandémies grippales 29
Figure 2 : Historique de l'utilisation d'agents biologique comme arme de guerre (6,7) 31
Figure 3 : Schéma de la chaine de transmission du risque infectieux 33
Figure 4 : Organisation du plan vigipirate au niveau national et du déclenchement des plans spéciaux 43
Figure 5 : Situations de références décrites dans le plan gouvernemental NRBC-.....43
Figure 6 : Organisation de la sécurité civile aux niveaux national, zonal et départemental 48
Figure 7 : Photos du VDIP vue de l'extérieur (A, B et C) et de l'intérieur (D : sorbonnes).... 54
Figure 8 : Organisation des prélèvements sur le terrain avec les acteurs et les matrices potentielles 57
Figure 9 : Flowchart de l'organisation des techniques de détection et d'identification des agents du bioterrorisme 72
Figure 10 : Réaction de bioluminescence 73
Figure 11 : Utilisation du kit Biocheck®. 77
Figure 12 : Principe générale du LIDAR à fluorescence 78
Figure 13 : Schématisation de la réaction de PCR 88
Figure 14 : Vue général du déroulement d'une analyse PCR lors d'une attaque bioterroriste permettant d'obtenir une qualité de résultat optimale 89
Figure 15 : Schématisation de l'interaction d'un anticorps (immunoglobuline G) et de ces antigènes spécifiques 114
Figure 16 : Exemple de réaction sandwich ELISA avec son anticorps de capture et de détection couplé à une enzyme (par exemple péroxydase). 115
Figure 17 : Schéma de fonctionnement général d'un test immunochromatographique..... 116
Figure 18 : Schématisation de l'utilisation des différents tests immunologiques 122
Figure 19 : Spectre de masse de différentes espèces de *Bacillus* 125
Figure 20 : Principe de l'hybridation et de détection sur biopuce 130
Figure 21 : Le Coriolis® RECON de Bertin technologies : structure générale et schéma d'utilisation..... 135
Figure 22 : Définition des acteurs, la formation et les rôles de chacun dans le VDIP..... 155
Figure 23 : Exemple d'organisation des acteurs du VDIP 163
Figure 24 : Exemple d'organisation des acteurs du VDIP 164
Figure 25 : Zone d'habillage 165
Figure 26 : Sortie du VDIP. 166
Figure 27 : Exemple de douche de décontamination commercialisée par Vetter 167
Figure 28 : Schématisation de la sortie de la zone d'intervention avec le prélèvement..... 167
Figure 29 : Schéma de l'organisation générale avec l'ajout de la zone d'échange et de communication 168
Figure 30 : Schématisation des différentes procédures de prélèvement 169
Figure 31 : Exemple d'organisation de la réponse selon les résultats obtenus 170

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des agents biologique en fonction du risque (code du travail) 34
Tableau 2 : Classification des agents du risque biologique 36
Tableau 3 : Recommandation pour le prélèvement des différentes matrices environnementales 60
Tableau 4 : Liste non exhaustives de kits de prélèvements commerciaux disponibles..... 61
Tableau 5 : Présentation de différentes méthodes de préparation de l'échantillon 64
Tableau 6 : Les différents niveaux de certitude pour l'identification 66
Tableau 7 : Tableau récapitulatifs des différents tests de détection 79
Tableau 8 : caractéristiques physique et biochimique des bactéries du genre *Bacillus* 83
Tableau 9 : Tests d'identification basé sur l'amplification de l'ADN pour les pathogènes du bioterrorisme dans l'environnement..... 94
Tableau 10 : Tableau comparatif des différents kits commerciaux selon différents critères . 104
Tableau 11 : Comparaison des différentes techniques de séquençage selon la technologie, l'approche, la performance de lecture et le coût 111
Tableau 12 : Principales caractéristiques des tests immunologiques 118
Tableau 13 : liste des différents agents ciblés parmi les 6 ICT décrits 123
Tableau 14 : description des différents critères pouvant être recherchés pour l'identification et les méthodes associées. 139

LISTE DES ABREVIATION

β-HCG : hormone gonadotrophine chorionique

ACPLA: agent containing particles per liter of air

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ANSES : Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ANSM : agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

B. anthracis: *Bacillus anthracis*

B. cereus: *Bacillus cereus*

B. thuringiensis: *Bacillus thuringiensis*

bDNA: branched DNA

BHQ : black hole quencher

BSPP: Brigade des Sapeurs-Pompiers de Paris

***C. botulinium* :** *Clostridium botulinium*

CDC : centers of diseases control

CEA : commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives

CFU : colonies formant unités

CMIC : cellule mobile d'intervention chimique

CNR : Centre Nationaux de Référence

COGIC : centre opérationnel de gestion interministérielle des crises

COS: commandant des opérations de secours

COZ : centre opérationnel de zone

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Ct : cycle threshold

Da : dalton

DGS: Direction Générale de la Santé

DGSCGC : Direction Générale de la Sécurité Civile et de la Gestion des Crises

dNTP : déoxyribonucléotides triphosphates

DUT: diploma universitaire de technologie

E. coli: *Escherichia coli*

EEE: eastern equine encephalomyelitis virus

EIA: enzyme immunoassay

ELISA: enzyme-linked immunosorbent substrate

ES : electrospray – ionisation par électronébuliseur

FFP: filtering facepiece particule

FRET : förster resonance energy transfer

F. tularensis: *Francisella tularensis*

GC-MS: gas chromatography – mass spectrometry

GE: genome equivalent

h: heures

ICT : immuno-chromatographie

IMASS™ : Integrated Multiplex Assay and Sampling System

INO : Institut National d'Optique

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

INVS: Institut National de Veille Sanitaire

LATE-PCR : Linear After the Exponential Polymerase Chain Reaction

LC-MS: liquid chromatography – mass spectrometry

LCPP: Laboratoire Centrale de la Préfecture de Police de Paris

LCR : ligase chain reaction

LIDAR : light detetction and ranging

m/z : rapport masse sur charge

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Ionisation assistée par matrice

min : minutes

mL : millilitre

MS: mass spectrometry / spéctrométrie de masse

NASBA : nucleic acid sequence based amplification

NRBC-E : nucléaire, radiologique, biologique, chimique et explosif

NSB : Niveau de sécurité biologique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONU : organisation des Nations Unies

PCR : polymerase chain reaction

PCT : Peste, Charbon, Tularémie

PSM : poste de sécurité microbiologique

qPCR : polymerase chain reaction en temps réèl

qRT-PCR : reverse transcription PCR en temps réel

®: registered trademark

RCA: roth rolling circle amplification

RIA: radio-immunoassay

RT-PCR : reverse transcription PCR

SDA : strand diplacement amplification

SDIS : service départemental d'incendie et de secours

SEB : staphylococcal enterotoxin B

SGDN : Secrétariat de la Défense et de la Sécurité Nationale

SIBCRA: Sampling and Identification of Biological, Chemical and Radiological Agents

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

SM : spectrométrie de masse

SRAS : syndrome respiratoire aigüe sévère

TRF : time-resolved fluorescence

™ : unregistered trademark

UNECE : *United Nations Economics Comission for Europe*

URL : unité relative de lumière

USD : Dollars américains

V. major : Variola major

VEE: Venezuelan equine encephalomyelitis virus

VDIP : véhicule détection identification et prélèvement

WEE: western equine encephalomyelitis virus

Y. pestis : *Yersinia pestis*

« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements »

Charles Darwin (1809-1882)

LE VEHICULE DE DETECTION, D'IDENTIFICATION ET DE PRELEVEMENT DES SERVICES DEPARTEMENTAUX D'INCENDIE ET DE SECOURS : NOUVELLE REPONSE FACE A LA MENACE BIOTERRORISTE ?

Les infections ont toujours été une préoccupation des hommes, qui les ont subies pendant des siècles, les considérant presque comme une fatalité. Ces dernières décennies, l'humanité a cru qu'elle pourrait maîtriser le risque infectieux, par la connaissance des agents biologiques pathogènes, l'apparition de traitements efficaces, le changement des conditions d'hygiène et de vie, et le progrès des technologies. Toutefois, les connaissances et la maîtrise progressive des micro-organismes pathogènes ont permis aussi à l'homme de développer des armes biologiques ou d'utiliser à des fins criminelles des agents naturels. Les sociétés actuelles vivent désormais sous la menace d'un attentat bioterroriste, menace concrétisée par une attaque aux USA en 2001 par de la poudre contenant les spores bactériennes responsables de la maladie du charbon. C'est réellement à partir de cette date que furent développés les premiers outils destinés à la protection des populations civiles vulnérables, alors que cette menace faisait auparavant partie du monopole des militaires.

Le Livre Blanc de la Défense de 2008 prévoit dans le cadre des sapeurs-pompiers la mise en service de véhicules appelés véhicules de détection, identification et prélèvement ou VDIP, dans le but de renforcer les capacités de prélèvement, de détection et d'identification des agents chimiques, radiologiques mais également biologiques. Si, à ce jour, les Services Départementaux d'Incendie et de Secours sont armés et expérimentés contre les risques chimiques et radiologiques, la prise en compte du risque biologique et plus particulièrement la détection et l'identification des agents biologiques, est une nouvelle problématique.

En considérant les nombreux aspects humains, techniques et réglementaires, l'objectif de notre travail est donc d'imaginer comment le VDIP pourrait intégrer au mieux la

composante biologique dans ses capacités de prélèvement, de détection et d'identification. Dans un premier temps, nous définirons le contexte de la mise en place du véhicule. Puis, dans un second temps, nous aborderons et listerons les différentes méthodes de détection, d'identification et de prélèvements disponibles avec les principaux avantages et leurs limites susceptibles de nous aiguiller vers des choix d'équipement pour les VDIP. Enfin, nous proposerons des recommandations concernant les personnels composant l'équipage du VDIP et la mise en œuvre opérationnelle de ce véhicule.

CHAPITRE I : Contexte

Qu'est-ce que le risque biologique et le bioterrorisme ?

Comment est organisée la réponse aujourd'hui ?

Quelles sont les besoins ?

1. Contexte

1.1. Le risque biologique et la menace bioterroriste

1.1.1. Définition

La notion de risque biologique fait référence à la probabilité de subir des conséquences néfastes pour la santé de l'homme liées à l'action des êtres organisés, action exercée directement par les organismes vivants ou par l'intermédiaire de substances élaborées par ces organismes. On parle de risque B, par opposition aux risques de type N, R, C et E respectivement pour nucléaire, radiologique, chimique et explosif (1).

Auparavant fatalité, ce risque a toujours accompagné le développement humain et les références historiques comme les grandes épidémies de peste, de variole et de choléra témoignent de cette réalité. Au fil du temps, ce risque s'est modifié, mais n'a pas disparu. Au contraire, les évènements récents comme les épidémies de grippe ou l'apparition syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) en soulignent la pérennité. Le risque biologique est multiforme et peut-être découpé en trois composantes selon la classification de Curé (1). En premier lieu, le risque biologique naturel, lié aux maladies infectieuses et composé des pathologies permanentes, émergentes ou ré-émergentes comme la grippe saisonnière, le paludisme ou encore la tuberculose. À côté de ce risque biologique naturel, probablement irréductible, se trouve le risque biologique provoqué dont l'activité humaine est la principale responsable. Il peut être accidentel (infections nosocomiales) ou criminel (bioterrorisme, biocriminalité).

La menace biologique correspond, quant à elle, à la volonté politique d'un pays ou d'une organisation d'utiliser des armes biologiques. La convention du 10 avril 1972 adoptée par les membres de l'Organisation des Nations Unies (ONU) interdit la mise au point, la fabrication et le stockage des armes biologiques et des toxines.

De ce fait, on définit le bioterrorisme comme l'utilisation intentionnelle, ou la menace d'emploi, à des fins terroristes, de micro-organismes (bactéries, virus, champignons et protozoaires) ou de produits de micro-organismes (toxines), dans le but d'induire une maladie chez l'Homme, l'animal ou le végétal (2).

1.1.2. Evaluation du risque et de la menace biologique

1.1.2.1. Etat actuel du risque biologique naturel

La coévolution des Hommes et des agents infectieux semble être aujourd'hui une évidence. Ces interactions réciproques permettent à la fois leur modelage et leur renouvellement. L'Homme voit son physique, sa longévité et sa santé modifiés mais il est également acteur, par son mode de vie, de l'évolution des agents infectieux (déplacements des biotypes, acquisition de résistances, croisements d'espèces, mutagénèse et biologie synthétique).

Les maladies provoquées par les agents infectieux présentent un risque d'atteinte à la santé, mais constituent également un potentiel important de désordre économique et social. L'exemple le plus parlant est celui des pandémies grippales. Outre un impact sanitaire considérable, les conséquences psychologiques et économiques peuvent être importantes, telles que l'inquiétude générale, les arrêts-maladie, les restrictions commerciales et les interdictions de voyager. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'une telle pandémie se déclare tous les 25 à 30 ans. D'impact sanitaire modéré par rapport aux anciennes pandémies grippales (Figure 1), la dernière pandémie grippale (2009) a néanmoins permis la mise en place d'un plan de prévention et de lutte en 2011 (3) afin que chacun, dans son secteur de responsabilité, puisse être prêt le jour venu, à faire face au risque d'une nouvelle pandémie.

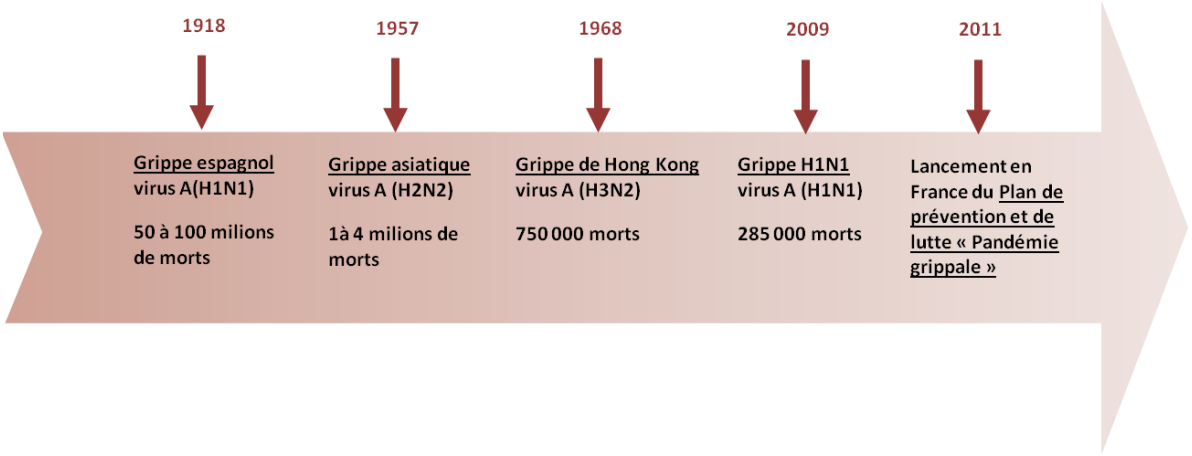


Figure 1 : Historique des pandémies grippales

Un rapport provenant du Centre de formation en sécurité de Zurich (4) a évalué le risque lié aux maladies infectieuses, et celui lié aux pandémies grippales figure parmi les menaces prioritaires.

Les progrès de la science, en particulier de la médecine ainsi que le développement de l'hygiène ont été très importants lors du dernier siècle et ont permis d'éradiquer des maladies jusqu'alors endémiques. Cependant l'Homme est toujours aussi fragile et les progrès n'empêchent pas la ré-émergence ou l'émergence de nouvelles maladies ; le SIDA qui sévit depuis 1981 en est le parfait exemple (5).

De plus, les diverses contaminations comme la fièvre aphteuse et la vache folle ainsi que les épidémies par des virus jusqu'alors inconnus, comme le syndrome respiratoire aigüe sévère (SRAS) et le virus *influenza* H5N1 ont fait prendre conscience à la gouvernance mondiale et aux gouvernements de la réalité de ces dangers.

1.1.2.2. Etat actuel du risque biologique provoqué accidentel

Le risque provoqué accidentel est dû à l'erreur humaine (infection nosocomiale, risque d'exposition professionnelle, risque alimentaire). Ce risque est largement pris en charge par les autorités en santé publique, car celui-ci est évitable par la prise de mesures

d’hygiène et de prévention. De plus, il fait d’ores et déjà l’objet de mesures de surveillance (Institut National de Veille Sanitaire (INVS), Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), OMS) et de réglementations (code du travail) afin de prévenir les maladies infectieuses et de limiter le risque de transmission.

1.1.2.3. Etat actuel du risque biologique provoqué criminel et de la menace biologique

Il est important de distinguer l’acte de bioterrorisme de l’arme biologique de guerre qui a été maintes et maintes fois développée mais qui ne sera pas abordée ici. Les agents sont les mêmes mais la liste peut être élargie à d’autres agents qui n’ont jamais fait l’objet de programme d’armement biologique. Toute infection inhabituelle ou d’origine inexpliquée doit alors être considérée comme suspecte. Dans le cadre du bioterrorisme, bien que l’utilisation d’agents biologiques comme arme ne soit pas une pratique récente (Figure 2), la prise de conscience de la menace date du dernier siècle. Pour preuve, en 1925, les dirigeants politiques mirent en place le protocole de Genève traitant de l’interdiction de l’utilisation d’armes chimiques et biologiques modifiées en 1972 par la convention interdisant la mise au point, la fabrication et le stockage des armes biologiques et des toxines.

La guerre biologique est devenue une inquiétude bien identifiée au milieu des années 1980-1990, en particulier après la mise à jour de l'ampleur du programme soviétique consacré aux armes biologiques. Par la suite, des réserves considérables de toxines botuliques et de bactérie du charbon ont été découvertes en Irak en 1995 suite à première guerre du Golfe. Parmi les vrais actes de bioterrorisme, l'affaire des lettres piégées au charbon survenue aux Etats-Unis à l'automne 2001 entrainant la mort de 5 personnes,

infectant 22 personnes, tout en terrifiant des millions de citoyens, a entrainé des dégâts financiers évalués à plusieurs milliards de dollars.

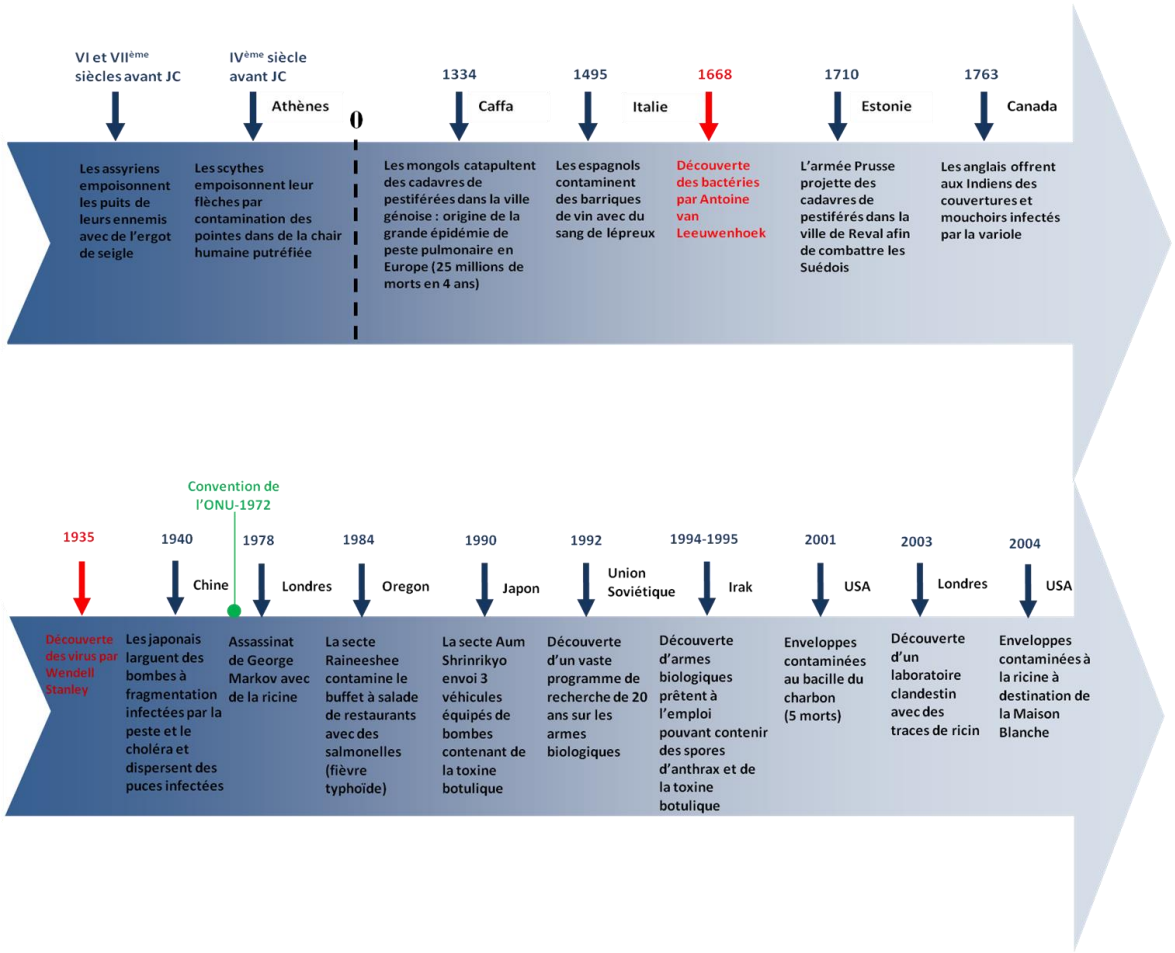


Figure 2 : Historique de l'utilisation d'agents biologique comme arme de guerre (6,7)

Parmi les vrais actes de bioterrorisme, l'affaire des lettres piégées à l'anthrax survenue aux Etats-Unis à l'automne 2001 entrainant la mort de 5 personnes, infectant 22 personnes, tout en terrifiant des millions de citoyens, a entrainé des dégâts financiers évalués à plusieurs milliards de dollars. Bien qu'aucune autre enveloppe ou colis contenant des spores de charbon n'aient été découverts, de fortes perturbations sur les envois postaux ainsi qu'un sentiment de panique ont envahi la France.

La mise en évidence de ces programmes de recherche a conduit de nombreux pays à augmenter les investigations sur les pathogènes de la menace bioterroriste avec notamment des études fondamentales, le développement de systèmes de détection ainsi que de nouveaux moyens de défense et de prévention (traitements, vaccins). C'est alors l'essor de la biodéfense civile. Cependant, la frontière entre la mise au point de vaccins et la fabrication d'agents microbiens pour équiper les armes biologiques est mince et aucun système de surveillance ne permet de vérifier le bon respect de la convention de 1972 ainsi que la régulation du transfert, accidentel ou non, de ces données à des organisations dont le but est de nuire.

En plus du danger lié à ces recherches, le développement de la biologie et des biotechnologies, avec notamment l'apparition d'outils d'analyse performants, permet d'intervenir directement sur le matériel vivant. Ainsi, il est aujourd'hui possible de modifier les génomes en agissant par exemple sur des gènes intervenant dans la virulence ou la résistance aux traitements. Ces avancées technologiques sont cependant à double usage et peuvent aussi bien contribuer à la santé de l'humanité que permettre de perpétrer des actes malveillants, comme la fabrication d'armes biologiques. Les récents débats concernant l'autorisation ou non des publications sur « la manière de rendre transmissible le terrible virus de la grippe H5N1 de l'animal à l'homme » (8,9) témoigne de la limite entre biosûreté, reconnaissance des chercheurs et avancée des connaissances.

Jusqu'à présent, le terrorisme se tournait vers une action de masse visant à toucher le plus grand nombre et ainsi obtenir un impact important. Avec les armes biologiques, de petits attentats peuvent, en plus des dommages physiques (5 morts aux USA en 2001), également causer d'énormes dommages psychologiques, sociaux et économiques comme l'a montré l'attentat aux lettres piégés de 2001. Aujourd'hui, un attentat de grande envergure avec une

arme biologique faisant plusieurs milliers de morts est peu probable, mais l'impact serait tellement catastrophique qu'on ne peut pas négliger ce risque (10).

1.1.3. Les armes biologiques

1.1.3.1. Définition

On définit une arme biologique comme l'association d'agents biologiques avec les munitions, les équipements et les vecteurs utilisés. Les armes biologiques modernes sont considérées comme des armes de destruction massive, tout comme les armes chimiques et nucléaires.

1.1.3.2. Agents biologiques

Les agents biologiques sont présents partout, chez les êtres vivants, dans l'environnement et dans les milieux de travail. La plupart du temps inoffensifs, souvent indispensables à la vie, certains d'entre eux peuvent toutefois provoquer des maladies plus ou moins graves. Ils se transmettent à l'homme suivant ce que l'on appelle une chaîne de transmission (Figure 3).

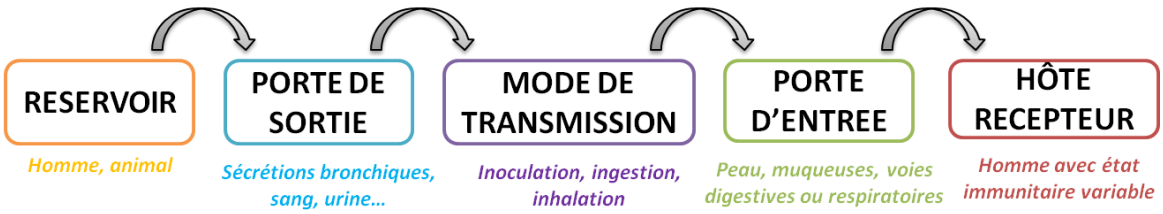


Figure 3 : Schéma de la chaine de transmission du risque infectieux

Sous le terme «agent biologique», on regroupe des micro-organismes[1] naturels, bactéries, virus, parasites, champignons, les toxines qu'ils produisent, ainsi que les micro-organismes génétiquement modifiés. Les agents du risque biologique dits intentionnels sont ceux qui peuvent être utilisés dans un but militaire ou terroriste pour provoquer des dommages chez

[1] On entend par micro-organismes : une entité microbiologique, cellulaire ou non, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique (art R4421-2 code du travail)

l'homme, les animaux domestiques ou les cultures. Ces organismes subissent généralement des modifications, on parle de militarisation de l'agent, augmentant leur virulence ou leur résistance aux traitements par exemple (11).

Les micro-organismes susceptibles de provoquer une infection, une allergie, une intoxication ou des cancers chez l'homme font l'objet d'un classement des risques de 1 à 4 (Tableau 1) (12). Cette classification est utilisée afin de définir l'environnement de confinement (laboratoire de confinement NSB1 à NSB4) nécessaire pour travailler avec les pathogènes. La pathogénicité, les voies de contamination, la dose infectante ainsi que la stabilité sont quelques exemples de critères permettant cette classification.

Tableau 1 : Classification des agents biologique en fonction du risque (code du travail)

	Classe 1	**Classe 2**	**Classe 3**	**Classe 4**
Susceptibilité de provoquer une maladie chez l'homme	N'est pas susceptible de provoquer une maladie chez l'homme	Peut provoquer une maladie chez l'homme	Peut provoquer une maladie grave chez l'homme	Peut provoquer une maladie grave chez l'homme
Susceptibilité de représenter un danger pour les travailleurs	N'est pas susceptible de représenter un danger pour les travailleurs	Peut constituer un danger pour les travailleurs	Constitue un danger sérieux pour les travailleurs	Constitue un danger sérieux pour les travailleurs
Risque de propagation	Pas de risque de propagation	Propagation peu probable	Peut présenter un risque de propagation	Peut présenter un risque élevé de propagation
Traitements	Il existe une prophylaxie ou un traitement efficace	Il existe une prophylaxie ou un traitement efficace	Il existe une prophylaxie ou un traitement efficace	Il n'existe ni prophylaxie et ni traitement efficace
Exemples	*Escherichia coli K12*	*Streptococcus* spp *Legionella* spp Virus de la rougeole	*Brucella abortus* *Mycobacterium tuberculosis* *Yersinia pestis* Virus de la fièvre jaune	Virus de la variole Virus de la fièvre Lassa Virus Ebola

Les agents transmissibles du bioterrorisme sont principalement regroupés dans les classes 3 et 4 et nécessitent donc des précautions de manipulation et de travail maximales

(laboratoires de NSB3 et NSB4) (13). Il existe une autre classification (tableau 2) pour ces agents.

Elle est éditée par les « Centers for Diseases Control » (centres de contrôle et de prévention - CDC) d'Atlanta et actualisée selon l'évolution des connaissances (14).

Cette classification hiérarchisée prend en compte la facilité de dissémination, la transmission interhumaine, la mortalité, les conséquences en termes de santé publique et de perturbation sociale ainsi que les exigences de diagnostics et de surveillance.

La classe A correspond à la catégorie prioritaire en fonction des critères précités. Par définition, la liste des agents inscrits en classe A est exhaustive, celle des autres classes n'est qu'indicative.

Les agents biologiques susceptibles d'être utilisés dans des armes sont généralement classés selon cinq catégories : les bactéries, les virus, les rickettsies, les champignons et les toxines. Cependant, en France, l'annexe de l'arrêté du 15 janvier 2004 (15) désigne certains agents biologiques et toxines comme étant plus particulièrement à risque (Annexe 1). Toutes les maladies provoquées par les agents utilisés dans un contexte bioterroriste sont à déclaration obligatoire.

1.1.3.3. Caractéristiques des armes biologiques

Les avantages de l'utilisation d'agents biologiques au profit d'agents chimiques, nucléaires ou radioactifs sont largement décrits dans la littérature (17) et soulignent la dangerosité et surtout la facilité d'accès de ces armes. La fabrication des armes biologiques est réputée facile car les agents biologiques se multiplient rapidement, ce qui permet d'obtenir en peu de temps une quantité importante d'agent (ou de toxine) à partir d'une culture de petit volume.

Tableau 2 : Classification des agents du risque biologique (traduit et adapté de l'anglais :(16))

Description	Caractéristiques	Exemples	Classe	Maladies
Catégorie A	Agents les plus dangereux Dissémination facile Taux de mortalité élevé Effets de panique et de graves perturbations Mesures prioritaires de santé publique (surveillance, diagnostic, prise en charge et prévention)	*Bacillus anthracis*	3	Charbon
		Clostridium botulinum	3	Botulisme
		Yersinia pestis	3	Peste
		Variola major	4	Variole
		Francisella tularensis	3	Tularémie
		Filovirus (Ebola) et arenavirus (Lassa)	4 et 4	Fièvres hémorragiques virales
Catégorie B	Dangerosité moindre Dissémination moins facile Taux de mortalité moindre Nécessite une surveillance spécifique	*Burkholderia mallei*	3	Morve
		Burkholderia pseudomallei	3	Mélioïdose
		Chlamydia psittaci	2 ou 3	Psittacose
		Coxiella burnetii	3	Fièvre Q
		Rickettsia prowazekii	3	Typhus
		Brucella spp	3	Brucellose
		Cryptosporidium parvum	2	Cryptosporidiose
		Toxines (ricine, entérotoxine B staphylococcique, toxine epsilon de *Clostridium perfringens*)	2	Syndrome toxiques
		alphavirus (virus de l'encéphalite équine du Venezuela, virus de l'encéphalite équine de l'est et de l'ouest)	3	Encéphalites
		Agents biologiques d'origine alimentaire (par exemple, *Salmonella spp*., *Escherichia coli* O157 :H7, *Shigella spp*.)	2/3	
		Agents biologiques transmis par l'eau (par exemple, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*)	2	
Catégorie C	Pourraient être choisis comme agent de bioterrorisme Facilité de production Facilité de dissémination Potentiel haut taux de mortalité	Maladies émergentes (virus de Nipah par exemple)	4	Encéphalites

De plus, l'acquisition de souches pathogènes ou de toxines reste relativement plus facile que celles des précurseurs d'agents chimiques de guerre, en raison de la variété de leurs origines possibles : sources naturelles (cadavres d'animaux ou spores présentes dans le sol, dans des régions endémiques), collections de culture (commerciales, de recherche ou de santé publique), ou bien produits issus de programmes biologiques étatiques offensifs ou défensifs (4).

De plus, le coût de production est moindre par rapports aux autres armes connues ; pour une agression sur un territoire de 1km², les coûts sont estimés à 2000 dollars américains (USD) pour les armes conventionnelles, 800 USD pour les armes nucléaires, 600 USD pour les armes chimiques et seulement 1 USD pour les armes biologiques (18).

Ensuite, alors que les armes chimiques provoquent une atteinte massive et immédiate, les effets d'un acte de bioterrorisme ne seront pas immédiatement quantifiables. Deux phénomènes inexistants pour les autres risques sont à prendre en compte. Tout d'abord le phénomène d'amplification interne qui se définit par la multiplication de l'agent biologique à l'intérieur de l'hôte. Cet effet permet d'une part l'utilisation d'une faible quantité initiale d'agent mais entraine également un retard d'apparition des symptômes en raison du délai d'incubation, qui peut aller de quelques heures pour les toxines à plusieurs semaines pour certaines bactéries. Le second phénomène est l'amplification externe qui est l'expansion de l'agent par transfert à un autre hôte. La dissémination dans l'espace peut donc être importante due à la mobilité des personnes atteintes et à la capacité de certains agents à se transmettre d'un individu à un autre. Par exemple, un cas index de variole non pris en charge peut créer 2 000 cas de variole contacts (19). Le temps de latence entre la contamination et les premiers effets ainsi que l'apparition de la maladie à distance du lieu de dissémination rendent les investigations épidémiologiques difficiles. De plus, le mode

de transmission ainsi que les facteurs associés (comme l'âge par exemple) peuvent également rendre l'enquête difficile.

L'impact psychologique majeur des armes biologiques renvoie à des peurs ancestrales (grande peste noire du Moyen Age par exemple). Il est également lié à leur caractère insidieux et à l'angoisse de l'incertitude pendant la période d'incubation. De manière générale, les armes biologiques sont indétectables par nos sens : elles sont inodores et invisibles. Les infections inexpliquées suscitent des effets de panique, décuplés par l'effet médiatique comme en témoignent les événements comme l'épidémie de SRAS de 2002, la pandémie grippale de 2009 ou encore l'affaire du « concombre espagnol » en 2011. Les conséquences socio-économiques sont importantes avec un engorgement des structures de soins, les mises en quarantaine, les coûts diagnostics et de traitement.

L'utilisation d'armes biologiques entraine également des difficultés diagnostiques et thérapeutiques. Aucun moyen de détection globale n'est opérationnel pour le moment (18). Si l'attentat n'a pas été revendiqué, il est probable que seule une augmentation anormale du nombre de cas d'une maladie alertera les services de santé publique. De plus, les symptômes ne sont souvent pas spécifiques en début de maladie. Or, les traitements contre la peste ou le charbon par exemple, doivent être mis en œuvre dans des délais très courts pour être efficaces.

Enfin, le principal danger des armes biologiques est le large choix du micro-organisme. En effet, il existe plusieurs dizaines d'agents biologiques potentiels et pour chacun d'entre eux, plusieurs centaines de souches peuvent être disponibles. De plus, les progrès des biotechnologies et du génie génétique permettent aujourd'hui de modifier les micro-organismes. Il est donc impossible de prévoir quel type d'organisme est susceptible d'être utilisé et surtout quelles sont les modifications génétiques qu'il a pu subir. Des bactéries comme *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), *Francisella tularensis* (*F. tularensis*) ou encore

Yersinia pestis (*Y. pestis*) sont celles aujourd'hui le plus décrit comme pouvant être utilisées dans des armes biologiques. Cependant, elles font parties des bactéries les mieux surveillées et il est difficile de s'en procurer. En revanche, des bactéries comme *Escherichia coli* (*E. coli*) manipulées dans tous les laboratoires du monde et disponibles auprès de nombreux fournisseurs sont extrêmement faciles à obtenir. Ces bactéries, sont la plupart du temps inoffensives. Avec les progrès technologiques actuels, des souches non virulentes peuvent être facilement rendues pathogènes. De plus, il existe naturellement des bactéries comme *E. coli O157 :H7* qui peuvent provoquer des maladies comme le syndrome hémolytique et urémique et entrainer la mort. Des bactéries comme *E. coli* ne sont pas soumis à la même surveillance que celles définies comme agents du bioterrorisme et pourraient être donc amenées à être utilisées dans des armes biologiques.

Par ailleurs, une arme biologique n'est pas seulement constituée par un agent pathogène. Ce dernier doit être associé à un vecteur[2], qui, afin de garantir une bonne efficacité, doit préserver la virulence de l'agent au moment de la dispersion. Le pouvoir de contamination d'un agent résulte de sa persistance sous forme solide, liquide ou visqueuse, sur tout ce qu'il a touché conduisant à le transférer vers de nouvelles cibles qui ne se trouvaient pas initialement dans la zone affectée.

Selon les moyens disponibles et le type d'agent infectieux, différents modes de dispersions peuvent être envisagés : contamination de l'air, de l'eau ou de l'alimentation. Cependant, les propriétés des pathogènes entrainent certaines limites. En effet, la plupart sont sensibles à la chaleur et donc ne résisteront pas au choc thermique représenté par l'explosion d'une bombe par exemple. De la même façon, la contamination agricole par exemple, expose l'agent aux rayons ultra-violets (UV). Sans protection, la perte de virulence des bactéries dans l'environnement est de 10 % par minute alors que pour les virus elle avoisine les

[2] Un vecteur est un système capable de transporter et disperser un agent biologique et ainsi permettre l'atteindre de sa cible. Il peut être passif ou actif

30 %, ceux-ci étant très sensibles aux UV. Seules les spores de bactéries, comme celles du charbon, ont une durée de vie beaucoup plus longue et résistent plusieurs années dans l'environnement (20). De plus, le plus recherché des scénarios pour une attaque serait une dispersion aérienne du pathogène au sein d'un groupe de personnes (21). En effet, la contamination par voie pulmonaire est la plus efficace en termes de mortalité et morbidité même si ce n'est pas le mode de contamination naturel. La létalité du charbon d'inhalation ou d'une peste pulmonaire avoisine les 100% en l'absence d'un traitement précoce et adapté. Cependant, la taille des particules doit être inférieure à 3µm pour que l'inhalation puisse avoir lieu ; seul quelques agents ont cette capacité (22). La principale limite à l'utilisation des armes biologiques est donc la maîtrise des techniques de dispersion.

La majorité des tentatives bioterroristes révélées à ce jour ont eu recours à des agents bactériens (*B. anthracis*) et à des toxines (toxine botulique, ricine), beaucoup plus faciles à manipuler et à stocker que les agents viraux. En effet, il est plus difficile de se procurer, de stocker et de manipuler des virus que des bactéries. Dans l'hypothèse où ces difficultés pourraient être surmontées, certains agents viraux ont des caractéristiques qui les rendent éligibles en tant qu'armes biologiques. Parmi ces caractéristiques figurent notamment l'éradication ancienne de la maladie, entraînant l'abandon des mesures de prophylaxie spécifique et la perte progressive de l'immunité collective des populations ; la variole en est aujourd'hui le seul exemple.

Les critères les plus discriminants susceptibles de guider le choix d'un groupe terroriste sont une faible dose infectante, une facilité à l'aérosolisation, la stabilité, une forte contagion et la capacité de survivre dans des conditions environnementales variées (10). La facilité d'obtention, de production et de dispersion sont aussi des points importants. Ces critères placent *B. anthracis* (agent du charbon), *Y. pestis* (agent de la peste), *F. tularensis*

(agent de la tularémie), *Variola major* (virus de la variole) et les toxines (toxines botuliques, ricine) au premier rang des agents biologiques utilisables.

Le risque biologique sous toutes ses formes est donc un risque d'actualité en perpétuel évolution. De nouvelles maladies apparaissent et les progrès de la science ont aussi remis au goût du jour d'anciens pathogènes. Les évènements du début du XXIe siècle ont prouvé que l'utilisation d'agents biologiques à des fins terroristes était non seulement encore possible mais que l'impact d'une telle attaque était considérable sur le plan sanitaire et social. Les armes biologiques sont facilement accessibles, de production facile et d'une grande diversité. Cela en fait des armes de guerre au potentiel redoutable.

1.2. Organisation de la réponse

Face à la menace terroriste, les gouvernements se sont adaptés et ont organisé leur réponse via la rédaction de lois et de doctrines opérationnelles.

1.2.1. Sur le plan national

Confrontée plusieurs fois à des vagues de terrorisme, la France a fait évoluer sa législation, à travers les lois de 1986, 1996, 2006 et 2012.

Afin de prévenir la menace et d'agir face aux actions terroristes, un dispositif de sécurité appelé « plan gouvernementale vigipirate » a été créé en 1981. Ce plan a été actualisé à 3 reprises (2002, 2003 et 2006). Il repose sur le principe selon lequel la menace est désormais continue et qu'il est nécessaire de se maintenir dans une posture permanente de sécurité. Dans ce contexte, le plan prévoit des mesures modulables selon l'intensité et la nature de la menace, afin de préserver les moyens mobilisés et de limiter les contraintes imposées à la société.

Le plan Vigipirate est complété par la famille des plans d'intervention « Pirates », adaptés chacun à un type de risque particulier. Ces plans gouvernementaux peuvent être déclenchés par le Premier ministre en cas de menace précise ou d'attaque terroriste utilisant un moyen d'agression spécifique (Piratox, Piratome, Biotox et Piranet)[3] ou se déroulant dans un milieu particulier (Piratair, Métropirate, Pirate-mer, et Pirate-ext)[4] (Figure 4). Ils définissent une structure de gestion de crise et de traitement des informations, ainsi que les actions que doivent entreprendre les autorités civiles et militaires (23,24).

Pour le risque nucléaire, radiologique, biologique, chimique et explosif (NRBC-E), un plan gouvernemental NRBC-E spécifique et classifié n°10135/SGDSN/SPE/PPS/CD, issu de la fusion des plans Piratox, Piratome et Biotox, a été élaboré en septembre 2010.

Il résulte d'un travail interministériel impliquant principalement les ministères chargés de l'intérieur, de la défense et de la santé. Ce plan a pour objectif de fournir une aide à la décision au profit du Premier ministre et des ministres concernés lors de la menace d'exécution ou de l'exécution avérée d'une action malveillante ou à caractère terroriste utilisant des matières, agents ou produits NRBC-E.

[3] Piratox : risque chimique ; Piratome : risque radiologique ; Biotox : risque biologique ; Piranet : lutte en cas d'attaque des systèmes informatiques

[4] Piratair : terrorisme aérien; Métropirate : lutte contre une attaque dans les transports ferrés souterrains; Pirate-mer : terrorisme maritime; Pirate-ext : lutte contre les attaques envers les ressortissants français à l'étranger

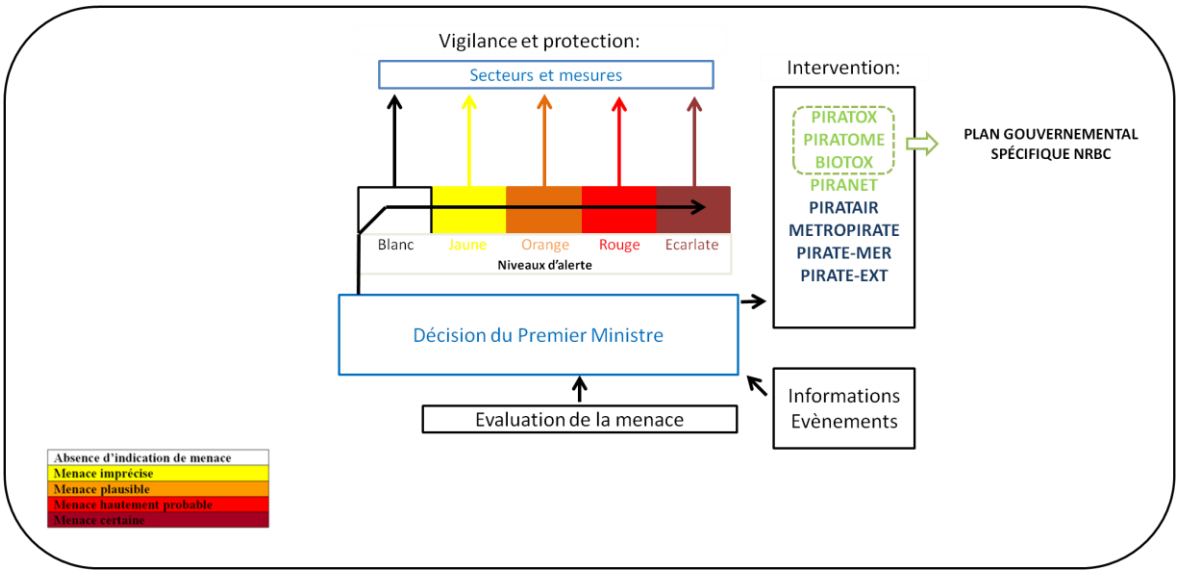


Figure 4 : Organisation du plan vigipirate au niveau national et du déclenchement des plans spéciaux (24)

Il précise l'organisation gouvernementale de gestion de crise, à partir de 6 situations de référence (Figure 5), des mesures ont été définies telles que la mise en alerte d'équipes spécialisées, la diffusion de l'alerte et de consignes aux populations menacées.

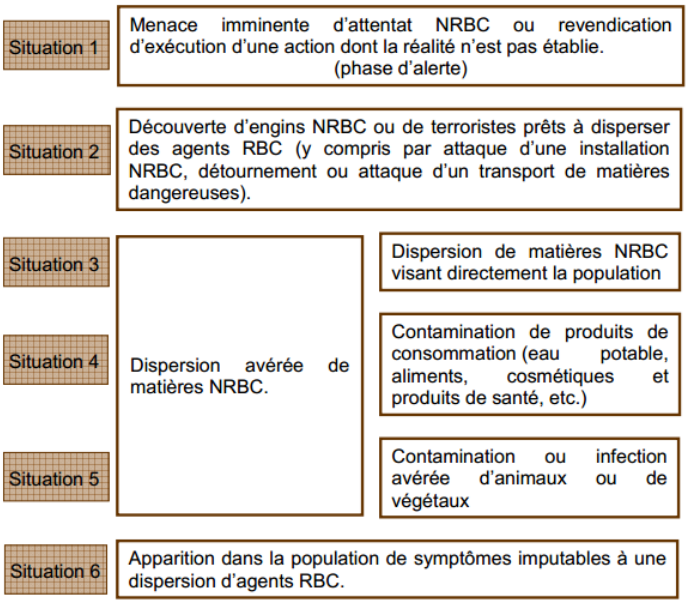


Figure 5 : Situations de références décrites dans le plan gouvernemental NRBC-E (extrait de (25))

Chaque ministère concerné définit les modalités pratiques d'action de ses services sur le terrain et l'ensemble est coordonné par l'autorité préfectorale. Le plan est ensuite décliné et organisé spécifiquement au niveau zonal et départemental en fonction des risques encourus (26).

Cette stratégie de déclinaison du plan gouvernemental NRBC-E est explicitée dans la circulaire n°IOCA1104281C du 23 février 2011 et son guide méthodologique. Ce plan est complété par les circulaires 700 et 800, ainsi que leurs annexes, relatives aux doctrines d'emploi des moyens de secours et de soin face à une action terroriste mettant en œuvre des matières chimiques ou radioactives (27,28). A cela s'ajoute la circulaire interministérielle 007 du 8 octobre 2009 relative au dispositif interministériel d'intervention face à la menace ou à l'exécution d'actes de terrorisme (29) ainsi que la circulaire du 1er ministre relative à la a doctrine de l'État de prévention et de lutte contre le terrorisme NRBC-E (30) complétant ainsi l'arsenal législatif et opérationnel face au terrorisme NRBC-E.

Historiquement, c'est suite à l'affaire des lettres piégées survenue aux Etats-Unis à l'automne 2001 que des stratégies de défense adaptées au risque bioterroriste ont été développées. Le plan Biotox comprend une partie vigilance et mobilisation des moyens face à une menace terroriste ou une suspicion de malveillance de nature biologique, ainsi qu'une partie intervention face à l'événement avec des moyens et des procédures adaptés. Il peut s'agir d'une dispersion accidentelle dans un laboratoire, ou bien d'une dispersion volontaire et criminelle (attentat). En annexe de ce plan, figure le guide Peste, Charbon, Tularémie (PCT) décrivant les stratégies opérationnelles de lutte contre les 3 bactéries pathogènes impliquées ainsi que les protocoles thérapeutiques et prophylactiques de prise

en charge des personnes exposées (guide AFSAPS /ANSM[5], InVS[6]) (31). A cela, il faut ajouter l'existence d'autres mesures présentées par le « plan variole » (dernière version en 2007), le « plan grippe » ainsi que la circulaire 750 (circulaire 750 SGDN/PSE/PPS) décrivant la conduite à tenir en cas de découverte d'une enveloppe contenant une poudre suspecte. L'arrêté ministériel du 15 janvier 2004 (relatif à la mise en œuvre, l'importation, l'exportation, la détention, la cession à titre gratuit ou onéreux, l'acquisition et le transport de certains agents responsables de maladies infectieuses, micro-organismes pathogènes et toxiques), est venu compléter la législation en augmentant la surveillance des mouvements d'agents pathogènes inter laboratoires, renforçant ainsi les règles de biosécurité.

Le Livre blanc (32) sur la défense et la sécurité nationale de 2008 fixe comme objectif le renforcement des capacités de protection et de réponse du pays face aux menaces NRBC-E, notamment dans le domaine de la détection, de l'analyse et de l'intervention. Face au risque biologique il existe des moyens de lutte reposant sur des mesures préventives et curatives (33). Afin de pouvoir les utiliser au mieux, une détection précoce de l'agent en cause est nécessaire. Associés à des plans de gestion de crise préétablis et à une formation sans cesse réactualisée des personnels chargés de les mettre en œuvre, ces moyens doivent permettre de contrôler le risque biologique.

Il existe différents acteurs selon le niveau d'alerte et les missions demandées. Au niveau national, on distingue tout d'abord les acteurs d'alerte, ce sont par exemple les médecins généralistes ou des centres hospitaliers formés par la Direction Générale de la Santé (DGS) à détecter les cas d'infection par les agents du bioterrorisme et surtout à les signaler rapidement. Ensuite on trouve les acteurs de l'analyse, sous l'égide de la SGDSN qui sont

[5] AFFSAPS : Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé rebaptisé ANSM en 2012 : Agence nationale de Sécurité des médicaments et des produits de santé
[6] InVS : Institut national de veille sanitaire

représentés en France par le réseau des laboratoires Biotox-Piratox regroupant les laboratoires pour les analyses de biologie clinique mais également environnementale.

Le réseau regroupe divers types de laboratoires (établissements publics, privés, civils ou militaires) répertoriés sur l'ensemble du territoire national (incluant les départements et collectivités d'Outre-mer). Ces laboratoires possèdent des capacités d'analyse sur des matrices variés allant du prélèvement clinique (humain ou vétérinaire) aux prélèvements environnementaux.

Le réseau est organisé en 2 sous-réseaux parallèles ; un pour la biologie et toxicologie humaine et l'autre pour la chimie, toxicologie ainsi que la biologie environnementale et vétérinaire. Chaque sous-réseau est hiérarchisé en trois niveaux d'expertise avec une répartition régionale pour les niveaux 1 et 2 et nationale pour les niveaux 3.

Les laboratoires de niveau 1 aussi appelés laboratoires sentinelles sont capables de réaliser des prélèvements et de les acheminer dans les conditions de sécurité requises. Les laboratoires des centres hospitaliers, les laboratoires du ministère de la défense (Délégation générale pour l'Armement, Gendarmerie nationale, Service de santé des Armées), les laboratoires d'analyse de l'eau potable ainsi que les réseaux des laboratoires vétérinaires et de l'Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) sont les laboratoires de niveau 2. Ils sont répartis au niveau des zones de défense selon leur domaine de compétence.

Enfin les laboratoires de niveau 3 comprennent les centres nationaux de référence (CNR) ainsi que les laboratoires à compétence nationale dans le domaine des agents hautement pathogènes pour lesquels il n'existe pas de CNR ainsi que du véhicule d'intervention Biotox-Piratox de la Gendarmerie nationale (33).

En cas de doute de contamination par un agent du bioterrorisme, les prélèvements sont acheminés aux laboratoires de référence où les tests d'identification peuvent être réalisés.

Toujours au niveau national, figurent également les acteurs de gestions des stocks d'antibiotiques et de vaccins (DGS). Quant au niveau départemental et local ce sont principalement les établissements de santé et les préfectures qui organisent la prise en charge des victimes et les actions de décontamination.

1.2.2. Au sein des sapeurs-pompiers

Le premier niveau d'intervention pour les sapeurs-pompiers est départemental. Le Service Départemental d'Incendie et de Secours (SDIS) est dirigé par un officier supérieur des sapeurs-pompiers et placé sous la double autorité du Préfet (gestion opérationnelle) et du Président de son Conseil d'Administration (pour la gestion administrative et financière). Le SDIS est chargé de l'analyse des risques et de la mise en place des moyens de secours. Il organise l'activité de l'ensemble des centres de sapeurs-pompiers du département. Son centre opérationnel (CODIS) veille 24 heures sur 24 heures (24h/24h) et coordonne les différentes interventions.

Si l'événement dépasse les capacités de réponse d'un département, la zone de défense par l'intermédiaire du Centre Opérationnel de Zone (COZ), fournit les moyens de renforts et coordonne les actions (Figure 6).

En cas de besoin, le niveau national par l'intermédiaire du Centre Opérationnel de Gestion Interministériel de Crise (COGIC) appuie le dispositif déjà en place. Les sapeurs-pompiers sont placés sous la tutelle du ministère de l'Intérieur - Direction générale de la sécurité civile et de la gestion des crises (DGSCGC). Cette direction est chargée de prévenir les risques naturels et technologiques et de coordonner les secours en cas de sinistre très importants.

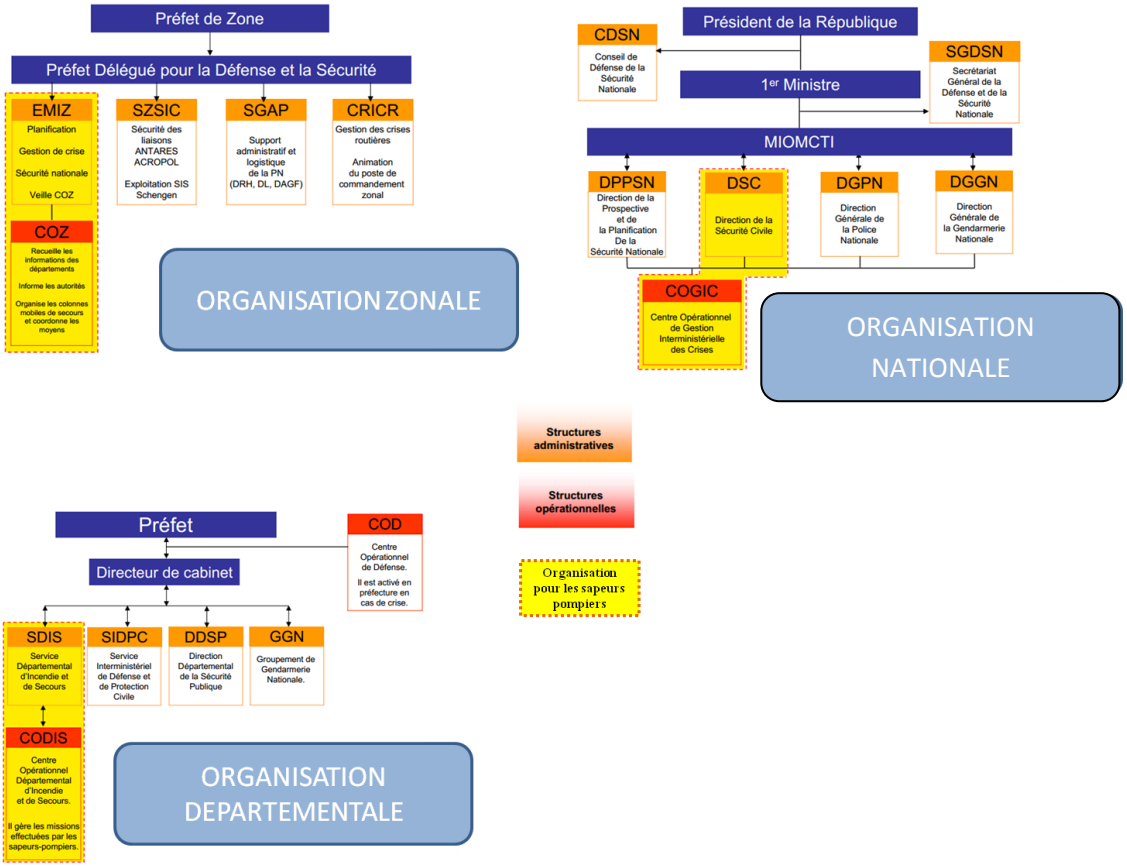


Figure 6 : Organisation de la sécurité civile aux niveaux national, zonal et départemental avec, en jaune, les organes de directions sapeurs-pompiers

De ce fait, les circulaires et plans émis au niveau national sont ensuite déclinés en directives opérationnelles au niveau départemental. Chaque département possède ses propres directives en fonction des besoins et des risques encourus au niveau local.

1.3. Limites actuelles et évaluation des besoins

Lors d'incidents impliquant des matières NRBC-E, les sapeurs-pompiers sont les premiers intervenants. Ils effectuent la première reconnaissance et prennent ainsi les premières décisions. Il existe actuellement des doctrines opérationnelles bien définies au sein des sapeurs-pompiers. Pour le risque chimique, par exemple, les premiers textes datent de 1986. Chaque SDIS possède aujourd'hui le matériel d'intervention spécialisé (CMIC :

cellule mobile d'intervention chimique) ainsi que du personnel formé à l'intervention en milieu à risque (formation de spécialité RCH[7] niveaux 1 à 4). Les doctrines et outils actuellement disponibles permettent une identification rapide de l'agent chimique en cause grâce à du matériel de détection performant. Cela permet d'assurer la protection du personnel intervenant mais aussi d'apporter des solutions et de limiter la propagation de l'agent. Les mêmes conditions sont remplies pour le risque radiologique (formation spécialisée RAD[8] niveaux 1 à 4, CMIR : cellule mobile d'intervention radiologique).

En ce qui concerne le risque biologique, les doctrines opérationnelles sont limitées à la protection des intervenants et des tiers ainsi qu'au prélèvement. Pour le moment, les formations spécifiques aux risques biologiques sont incluses dans les formations nationales RCH. Il n'y a donc pas de formation spécialisée et le matériel disponible (limité à des tenues de protection et des outils permettant le prélèvement) est regroupé dans la CMIC. Il existe néanmoins un dispositif « plis et colis suspects », initialement restreint au risque « charbon bactérien » lors de sa mise en place en 2001, s'appliquant aujourd'hui aux plis, colis ou encore aux substances répandues sur les surfaces, lorsque la présence d'un danger radioactif, biologique ou chimique est suspecté (34). Il s'agit d'un dispositif d'aide à la prise de décision opérationnelle adaptée au type d'alerte signalé, tout en évitant une mobilisation disproportionnée des moyens. Une équipe, composée d'un minimum de personnels, se rend sur les lieux afin d'effectuer une première reconnaissance et une levée de doute sur l'objet supposé contaminé et contaminant grâce à l'utilisation de matériel de détection. Un processus opérationnel avec l'utilisation de tenues adaptées au risque biologique, chimique et radiologique est alors mis en œuvre. Les victimes impliquées sont décontaminées et le produit suspect est récupéré. Pour l'instant, concernant le risque biologique, la levée de doute ne peut être effectuée sur place, à la différence du risque

[7] RCH : Risque CHimique
[8] RAD : risque RADiologique

chimique et radiologique, car il n'existe pas de moyens de détection des agents biologiques chez les sapeurs-pompiers. Le prélèvement de l'objet contaminé est réalisé sur place et envoyé au sein d'un laboratoire de référence du réseau Biotox-Piratox. L'obtention des résultats dépend de la durée d'acheminement vers ce laboratoire référent, de sa disponibilité ainsi que des délais d'exécution des analyses.

Aux vues de ces éléments, la mise en évidence du risque biologique reste moins complète que celle actuellement disponible pour les risques chimiques et radiologiques. Or, une des priorités énoncée dans le Livre Blanc est d'améliorer les capacités de lutte contre la menace NRBC-E en augmentant notamment les aptitudes d'intervention, de traitement, d'analyse et de détection des acteurs de la sécurité civile. Ainsi, un très récent déploiement de véhicules « laboratoires » nommés Véhicule de Détection, d'Identification et de Prélèvement (VDIP) destinés à couvrir les 16 plus grandes agglomérations (35) a débuté dans le but d'offrir aux autorités des outils d'analyses capables de les aider dans les prises de décisions.

Cependant, à la différence des autres risques, le risque biologique met en jeu des organismes vivants, souvent eux-mêmes d'origine environnementale, entraînant des difficultés de détection et d'identification. Il existe plusieurs dizaines d'organismes ou toxines pouvant être impliqués et presque autant de méthodes de détection. Le choix de ces méthodes doit prendre en compte les contraintes imputables aux pathogènes ainsi que les contraintes du terrain.

CHAPITRE II : Le VDIP

Qu'est-ce que le VDIP?

La détection, l'identification et le prélèvement :

Définition & challenges pour les laboratoires mobiles

Challenge pour les sapeurs-pompiers et recommandations

2. Préconisation : le VDIP et son matériel

2.1. Le VDIP : c'est quoi ?

Le véhicule de détection, d'identification et de prélèvements (VDIP) a fait son apparition dans le parc engin sapeurs-pompiers en 2011. C'est un laboratoire mobile spécialisé dans les interventions à caractère NRBC-E d'origine accidentelles ou malveillantes et destiné à intervenir sur tout évènement mettant en œuvre des agents radiologiques, chimiques et biologiques dans leurs composantes de détection, d'identification et de prélèvement (Figure 7).

Son champ d'action est zonal, et seul les SDIS du Rhône, de Moselle ainsi que la Brigade des Sapeurs-Pompiers de Paris en sont à ce jour dotés. Il existe deux autres véhicules que l'on pourrait qualifier de laboratoires mobiles présents au Bataillon de Marins-Pompiers de Marseille et à l'Unité d'Instruction et d'Intervention de la Sécurité Civile 1 de Nogent-le-Rotrou, mais ils ne sont pas pour l'instant rattachés au parc des VDIP.

Le VDIP est destiné à constituer l'échelon intermédiaire entre des unités opérationnelles spécialisées dans la reconnaissance, le prélèvement, la détection, le balisage et le traitement comme les CMIC et les CMIR, qui équipent déjà les SDIS mais dont les outils d'analyse en matière de détection et d'identification biologiques sont quasi inexistants et, à l'échelon supérieur, avec les laboratoires spécialisés dédiés du réseau Biotox-Piratox.

Un exemple de l'équipement actuellement en place au sein du VDIP du Rhône est disponible en annexe (Annexe 2).

Figure 7 : Photos du VDIP vue de l'extérieur (A, B et C) et de l'intérieur (D : sorbonnes) – (Photos de Stéphane BILDE (A,C), Charlotte Avanzi (B,E))

2.2. La détection, l'identification et le prélèvement : définition et challenges pour les laboratoires mobiles

En France, la détection des agents biologiques dans le cadre d'un acte de bioterrorisme est essentiellement basée sur de la surveillance épidémiologique et environnementale. La surveillance épidémiologique est réalisée au sein d'un réseau dont les acteurs principaux sont les professionnels de santé. Les protocoles et rôles de chacun sont décrits dans les plans gouvernementaux.

Actuellement, il n'existe pas de réelle surveillance environnementale mais des protocoles, également définis dans les plans gouvernementaux, sont disponibles et donnent les grandes lignes de la procédure à suivre en cas d'attaque bioterroriste. Cette procédure concerne

plusieurs acteurs comme la gendarmerie nationale, l'armée, la sécurité civile mais également les laboratoires de référence.

La mise en évidence d'une dissémination accidentelle ou volontaire d'un pathogène sur les lieux d'une intervention passe par la réalisation de plusieurs étapes. Tout d'abord, le prélèvement est l'action de recueillir un échantillon à partir d'une matrice (humaine, animale ou environnementale) potentiellement souillée. Il est suivi d'une étape de préparation de l'échantillon. Cette dernière permet de façonner l'échantillon (concentrer, extraire et/ou purifier) afin de le rendre analysable. Vient ensuite la détection qui permet de vérifier la présence d'un pathogène dans l'environnement ; la réponse est binaire, c'est-à-dire la présence ou non d'un agent pathogène figurant dans la liste des agents de la menace bioterroriste. Enfin, la dernière étape est l'identification du pathogène, à partir du prélèvement effectué, permettant de déterminer quel type d'agent est mis en œuvre. Elle doit aboutir à attribuer un nom d'espèce et le caractère vivant de l'agent biologique mis en œuvre.

L'ensemble de ses étapes est indispensable au bon déroulement de l'analyse qui conditionne la conduite opérationnelle à tenir, la mise en œuvre des mesures de protection individuelles et collectives pour la population et les équipes de secours, ainsi qu'aux contre-mesures médicales (décontamination, isolement, traitement médicamenteux). Les caractérisations complémentaires comme le typage de la souche identifiée, déterminant éventuellement son origine constitue un élément de la preuve juridique pour des réponses judiciaire, stratégique et politique. L'étude du caractère pathogène et la détermination d'éventuelles résistances aux traitements recommandés sont destinées à réajuster la réponse thérapeutique.

2.2.1. Le prélèvement

2.2.1.1. Les enjeux du prélèvement

La dissémination d'un agent biologique, qu'elle soit accidentelle ou criminelle, entraîne une contamination de la cible, en général l'homme, mais aussi les animaux et/ou l'environnement. Le prélèvement est donc le seul support pour la détection et l'identification. Si, celui-ci n'est pas effectué, stocké et acheminé dans de bonnes conditions, le matériel biologique peut être dégradé, contaminé par des inhibiteurs de la détection, voire complètement perdus. De plus, la viabilité de l'agent peut être altérée, ce qui entraîne l'absence de croissance en milieu de culture. Par conséquent, un prélèvement, un conditionnement et un transport de l'échantillon mal réalisés peuvent au mieux perturber et retarder la détection et l'identification, au pire la rendre impossible. (36)

Les prélèvements peuvent être réalisés sur plusieurs matrices : humaines ou animales (sang, crachat, tissus…) ou environnementales (air, sols, eau, nourriture) selon des procédures clairement définies et par du personnel formé. Dans le cadre d'une détection de terrain, le transport doit ensuite être effectué dans les conditions permettant de garantir la viabilité de l'agent (30,37). Afin de répondre à ces contraintes organisationnelles, l'Organisation du Traité de l'Atlantique Nord (OTAN) publie régulièrement les recommandations à destination des forces armées de l'OTAN concernant le prélèvement et l'identification des agents biologiques et chimiques en cas de dissémination accidentelle ou volontaire au sein de la population ou dans l'environnement (38). Ces recommandations peuvent servir de base de travail pour la mise en place du VDIP.

Les prélèvements sont classés en 3 catégories selon la source :

- Catégorie 1 : les poudres, les liquides, les restes de munition, les équipements de protection NRBC et les surfaces non poreuses

- Catégories 2 : l'air, les végétaux, les sols, la neige, l'eau (potable et non potable) et la nourriture
- Catégorie 3 : les échantillons biomédicaux (sang, urine..) et les arthropodes vecteurs (moustiques, tiques…)

Les prélèvements biomédicaux (humains ou animaux) sont effectués par des personnels autorisés médicaux ou paramédicaux possédant la formation et le matériel adéquats. En revanche, les prélèvements environnementaux peuvent être pratiqués par des personnels n'appartenant pas aux services de santé tels que des sapeurs-pompiers ou des agents de la force publique ayant suivi une formation sur le risque biologique et les techniques de prélèvement (Figure 8).

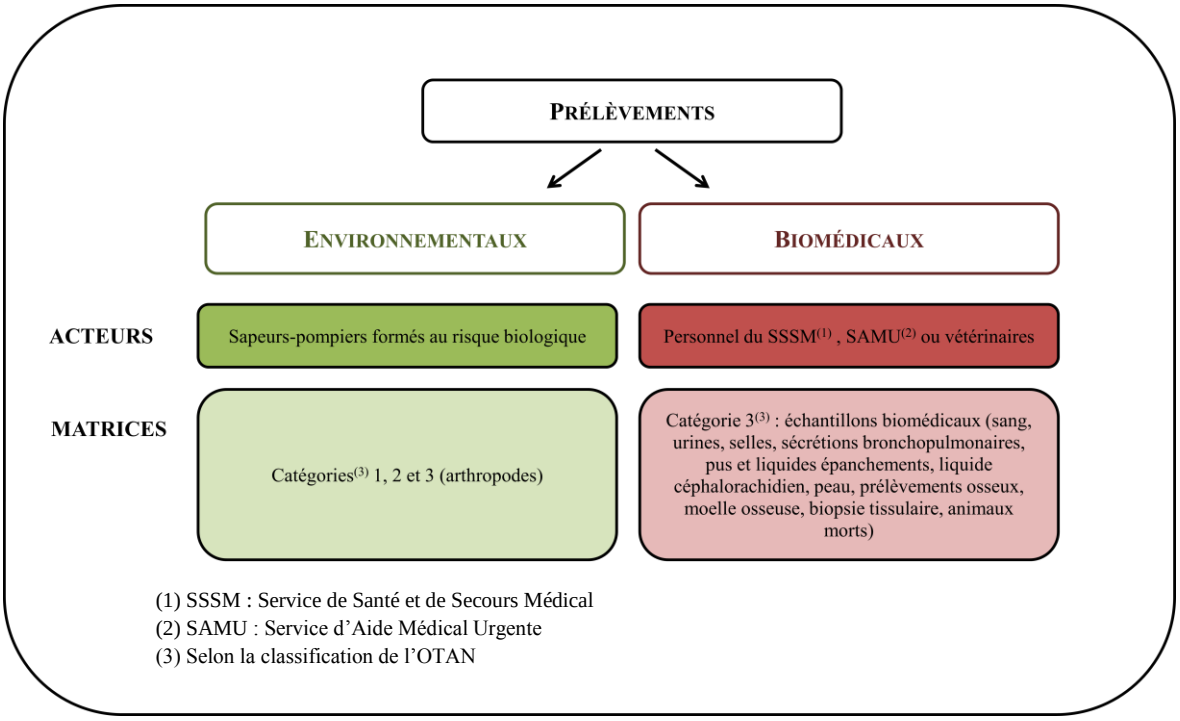


Figure 8 : Organisation des prélèvements sur le terrain avec les acteurs et les matrices potentielles

Concernant les prélèvements environnementaux, il faut tout d'abord noter qu'ils peuvent inclure une large variété de matrices allant des plus compliquées (sol, liquide, végétation…) aux plus simples (air, fumée, surfaces…). Dans chacune d'entre elles, une quantité importante de micro-organismes de l'environnement les colonisent de façon naturelle. Cela implique que le pathogène recherché peut-être présent mais en concentration inférieure par rapport à cette présence naturelle. En conséquence, le prélèvement peut être accompagné d'étapes de concentration avant d'être utilisé pour l'identification. C'est souvent le cas pour les échantillons d'air et de liquide (39).

Par exemple, dans un même prélèvement, il peut être identifié des agents biologiques appartenant au même genre que celui du pathogène recherché. De nombreuses espèces de *Bacillus* peuplent le sol et l'eau et peuvent ainsi interférer dans la détection du pathogène *B. anthracis*. Il faut donc des techniques d'identification très spécifiques afin de les différencier de façon certaine (40).

Ensuite, il faut également garder à l'esprit que la viabilité dans l'environnement dépend des caractéristiques du pathogène mais aussi de la matrice sur laquelle il est retrouvé. Il faut donc, en plus du prélèvement, noter les facteurs environnementaux pouvant avoir un impact sur la qualité du prélèvement (météorologie, température, type de matrice...). Par exemple, *Y. pestis* est sensible à la chaleur et ne survit que quelques jours à des températures supérieures à 10°C.

Enfin, le dernier challenge est le choix de la méthode d'identification et de détection en fonction du prélèvement. En effet, des études (40) ont montré que certaines bactéries (*Vibrio, Salmonella*…) s'adsorbent sur les particules du sol préservant leur viabilité mais empêchant leur culture.

2.2.1.2. Procédures et matériels

Le prélèvement est une étape critique indispensable à la qualité de l'analyse. En effet, comme celui-ci est souvent naturellement contaminé par d'autres micro-organismes, il faut donc que l'intervention humaine soit minime afin de limiter la sur-contamination. C'est pourquoi des recommandations ont été émises concernant le type de matériel à utiliser (30,37,38) et les procédures (taille de l'échantillon et nombre). Les règles de base concernant l'échantillonnage sont en premier lieu de bien identifier l'échantillon (lieu, date, heure..). En second lieu, il convient d'effectuer le prélèvement en trois exemplaires, l'un destiné pour l'analyse proprement dite ou expertise, l'autre conservé pour une éventuelle contre-expertise, et un troisième au titre de la conservation de la preuve (30). Les quantités prélevées devront être suffisantes pour l'ensemble des analyses nécessaires.

Pour les prélèvements environnementaux, l'échantillonnage doit être réalisé préalablement à toute autre manipulation de l'objet suspect et nécessite l'utilisation d'outils de prélèvement stériles à usage unique selon des procédures adéquates réalisées par du personnel formé. De plus, les analyses par des méthodes de terrains doivent être entreprises seulement après la collecte en quantité suffisante d'échantillons réservés aux laboratoires de référence en évitant toute contamination extérieure. Si l'objet ne peut être conditionné (volumineux), il est conservé sur le site.

Le matériel de prélèvement et les quantités à prélever en fonction du type de matrice sont référencés dans le Tableau 3. Des exemples de kits de prélèvement commerciaux et les matrices sur lesquelles ils peuvent être utilisés sont recensés et associés à des sites internets dans le Tableau 4.

Tableau 3 : Recommandation pour le prélèvement des différentes matrices environnementales (adapté de (38))

Types d'échantillon		Matériels[1]	Quantités à prélever	Détails
Gazeux (aérosols et particules)		Unités de prélèvement stériles d'aérosols, filtres, milieux de croissance, éponges, lingettes,	Minimum 100L	Seulement si une détection positive est retrouvée ou sur ordre
		Colleteur d'air (cyclone, sur filtre, électrostatique)		Si possible, éviter la récupération des poudres ayant été directement en contact avec le sol
Liquides et eaux		Pipettes, seringues, flacons à seller avec téflon, éponge	100mL (eau) 10mL (liquides)	Prélever indépendamment eaux de surface, sédiments, eau de profondeurs. Penser à prélever les eaux post-décontamination
Solides	Sols, poudres	Sacs plastiques à seller, truelle, pelle, cuillère, spatules, flacons à seller avec téflon, filtres	Surface de 10x10x2cm (sols)	Prélever les débris séparément
	Neige	Cuillères, pelle, truelle, flacons à seller avec téflon	Surface de 10x10x2cm	Ne prélever que la (les) couche(s) touchée(s)
	Pierres	Sacs plastiques à seller	Taille: de 0,5 à 2cm pour un volume maximum de 200mL	
	Végétaux	Sacs plastiques à seller, ciseaux, sécateurs, pinces de prélèvement	2L	Ne pas toucher les plantes avec les gants
	Solides non transportables	Cotons secs, cotons imprégnés de tampon, écouvillons dans milieu adapté	Pas de quantité minimum	Peut-être de type bâtiments, tables, murs…
	Vêtements	Sacs plastiques de 5L à seller, pinces	Pas de quantité minimum	Découper les parties contaminées
Echantillons de contrôle		Tous les échantillons de contrôles doivent être réalisés dans les mêmes conditions que l'échantillon contenant l'agent à analyser. Il permet d'évaluer le bruit de fond présent dans la matrice.		

[1] Tout le matériel doit être conditionné en emballage stérile à usage unique

Tableau 4 : Liste non exhaustives de kits de prélèvements commerciaux disponibles

Instruments/kits	Fabricants	Sites internet (au 27/04/14)	Types de matrices	Commentaires
Alexeter Collection Swab®	Alexeter	http://www.alexeter.com/biow/index.asp	- Poudre, surfaces. - Remise en milieu liquide - Pré-traitement par filtration	- Compatible avec les tests immunologiques *BioDetect test strip* et avec la détection par PCR - 75 dollars américains (USD) / boîte de 25 - Décontamination par immersion possible
Sample collection and recovery device (SCRD)	ASD biosystem	http://www.asdbiosystems.com/p1.htm	- Poudre, surface - Remise en milieu liquide	- Compatible avec les tests immunologiques et avec la détection par PCR - 12 USD chacun - Décontamination par immersion possible
Kits SWIPE™	New Horizons Diagnostics	http://www.nhdiag.com/profile_one.shtml	- Solides, liquides, poudres, particules - Pré-traitement par filtration pour le kit *SWIPE™ Sample Processing Kit*	- Compatible avec les tests immunologiques et avec la détection par PCR - 13,20-23,10 USD selon le kit
B2C™ Bulk sample collection kit	QuickSilver Analytics, Inc.	http://www.chembiokits.com/	Poudres	26,71 USD chacun
ULTRA-TURRAX® Tube Drive control	IKA®	http://www.ika.com	Liquides, poudres, surfaces, solides (végétaux, écorces..)	- 968 USD la malette contenant différents tubes (disperseurs, broyeurs, agitareurs) - Recharge: en moyenne 10 US USD/tube
BiSKit™ Large Area Sampling Kit (LAS Kit)	QuickSilver Analytics, Inc.	http://www.chembiokits.com/	Surfaces	- 51,65 USD chacun - Compatible avec les PCR et immuno-essais
QSA model 102™	QuickSilver Analytics, Inc.	http://www.chembiokits.com/	-Surfaces, liquides et solides - Agents RBC-E	3050,65 USD le kit complet
Mini Push Pack™	QuickSilver Analytics, Inc.	http://www.chembiokits.com/	Liquides, surfaces et solides	44,61-102,70 USD selon le kit

Kit SAS™ Small area sampling	QuickSilver Analytics, Inc.	http://www.chembiokits.com/	Poudres et liquides	22,68 USD chacun
S3™ Bio sampler	QuickSilver Analytics, Inc.	http://www.chembiokits.com/	Surfaces	- Compatible avec les tests immunologiques et avec la détection par PCR - 32,46 USD chacun
Coriolis® FR ou RECON	Bertin technology	http://www.bertin.fr/en/coriolis-fr-first-response-bio-aerosol-sampler.aspx	Bio-collecteur d'air (cyclone)	32250 USD
SASS® technology	Research international™	http://www.resrchintl.com/	Bio-collecteur d'air (cyclone)	
IMASS™ et SASS®	BBI detection	http://www.bbidetection.com	Poudre, liquide, surface et aérosols	Pour les poudres : couplé à une détection immunologique
Air Corona™	Leti™ et le Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA)	http://www.leti.fr/	Bio-collecteur d'air (électrostatique)	
BioBadge® 100	FLIR®	http://www.southernscientific.co.uk/catalog/products/icx-biobadge	Bio-collecteur d'air (filtre)	
ACD-200	INNOVAPREP	http://innovaprep.com/products/acd-200-bobcat-aerosol-collector/	Bio-collecteur d'air (filtre)	
XMX/2AL-MIL	Dycor	http://www.dycor.com/Products/DefenseSecurity/AerosolCollectors/XMX2LMIL.aspx	Bio-collecteur d'air	
TED Evaluation Kit	BioTX	http://biotx.net/products/ted	Poudres, fibres, liquides et surfaces	559,59 USD
M-Vac portable SEC	MSI M-Vac® system	http://www.m-vac.com/products/overview/portable-sec	Sols, poudres et végétaux	

2.2.2. Préparation de l'échantillon

Avant d'être analysés, les échantillons peuvent avoir besoin d'être préparés. Idéalement, cette préparation doit être universelle, utilisable pour tous les types d'échantillon ainsi que pour tous les types de méthode.

Cependant, cette étape dépend du type d'échantillon (solide, liquide ou gazeux) ainsi que de la technique d'identification utilisée. Cette préparation peut avoir plusieurs rôles :

- Convertir l'échantillon dans un format compatible avec la méthode de détection comme par exemple passer sous forme liquide un échantillon présent sur un écouvillon ;
- Séparer la matrice de l'agent à identifier afin d'augmenter la probabilité de détection ;
- Concentrer l'échantillon afin d'augmenter la sensibilité ;
- Purifier l'échantillon afin de s'affranchir de la présence de potentiels inhibiteurs dans la matrice.

Il existe également des différences de traitement concernant le type d'agent recherché. Les toxines ne contiennent pas d'ADN et sont donc plus proches dans leur structure et réactivité des toxiques chimiques. La préparation par l'extraction des acides nucléiques par exemple, n'est donc pas envisageable pour les toxines. De plus, pour les agents biologiques, on va chercher à préserver la viabilité afin de pouvoir mettre en culture l'agent tandis que pour les toxines elle n'a pas lieu d'être conservée. Les précautions concernant la manipulation et le traitement du prélèvement sont donc différentes.

La préparation peut donc être réalisée par différents moyens selon le type d'agent recherché et il est important de bien cibler le ou les agents à identifier en priorité en fonction du scénario et des symptômes des victimes (39,40).

Les méthodes de préparation le plus souvent retrouvées dans la littérature (38,39,41) sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Présentation de différentes méthodes de préparation de l'échantillon

Méthodes	Description	Exemple de matrice	Remarques	Références
Centrifugation	Technique de séparation où la rotation de l'échantillon à forte vitesse qui génère une force centrifuge permettant de séparer les particules	Surtout utilisée pour les matrices liquides. Permet de concentrer des échantillons	Si vitesse autour de 2000 g, les cellules microbiennes se trouvent dans le surnageant. Autour de 10000 g, les cellules et spores sont précipitées dans un culot au fond du tube. Pour séparer les virus, il faut utiliser une ultracentrifugation (environ 100000 g)	(38–41)
Homogénéisation, agitation et filtration	Permet d'éliminer les grosses particules	Utilisée pour mettre en milieu liquide les échantillons solides ou provenant d'écouvillons	La taille du filtre doit être bien choisie afin que les bactéries ne restent pas bloquées dans le filtre.	(39,41–43)
Détergents	Permet de casser les liaisons adhésives entre les agents et les matrices	Utilisés surtout pour les matrices solides et les prélèvements par écouvillons	Limite de 0.1% en concentration pour les bactéries Ne pas utiliser si la présence d'un virus est suspecté (très sensibles aux détergents)	(38,40)
Extraction des acides nucléiques (seulement pour les agents biologiques)	Permet de récupérer tous les acides nucléiques présents dans l'échantillon	Tous types	- Ne permet pas de conserver la viabilité de l'agent - Pour les spores, soniquer avant extraction - Les substances dans la matrice peuvent inhiber l'extraction - L'extrait doit être quantifié avant identification	(39)

Les moyens précédents ne sont que des exemples inspirés des recommandations de la littérature surtout dédiés à l'analyse en laboratoires d'infrastructure pour la plupart. Il faut noter qu'un kit spécifique pour la préparation de l'échantillon est en général fourni avec les kits d'identification utilisés sur le terrain. Il est d'ailleurs préférable d'utiliser le kit recommandé par les fournisseurs car les études de validation ont été réalisées sur l'ensemble complet.

2.2.3. La détection et l'identification

De nombreuses macromolécules constituant les micro-organismes peuvent comporter une signature propre permettant l'identification spécifique de l'organisme ou de plusieurs organismes appartenant au même rang taxonomique. Il existe de nombreuses techniques permettant la détection de micro-organismes pouvant se répliquer (bactéries, rickettsies ou virus) et celle des agents ne le pouvant pas (toxines). Leur présence peut être mise en évidence directement (culture, microscopie) ou indirectement (tests immunologiques, biologie moléculaire). Il faut bien distinguer ici le test de détection ou d'identification du test diagnostic. Pour ce dernier, le test est fait directement sur l'homme ou sur l'animal ; le but étant d'établir un diagnostic de maladie. Dans le cas de la détection et l'identification, le but est de mettre en évidence la présence anormale d'un organisme pouvant être pathogène pour l'homme ou l'animal, et dans le cas du VDIP, d'un pathogène relevant du bioterrorisme.

Selon le type d'agent et le type de méthode utilisée, un manuel de poche, le *Sampling and Identification of Biological, Chemical and Radiological Agents* (SIBCRA) *Handbook*, destiné aux équipes de l'OTAN spécialisées dans les risques NRBC a défini 3 niveaux de critères indiquant le degré de certitude de l'identification : provisoire, certaine, formelle (Tableau 6).

Tableau 6 : Les différents niveaux de certitude pour l'identification

	Agents biologiques	Toxines
Identification provisoire **(1 seul critère)**	- Présence d'un unique antigène de l'agent en question démontrée par une réaction positive avec un anticorps spécifique, ou - Présence d'une unique séquence d'acide nucléique de l'agent en question démontrée par une réaction positive avec une sonde nucléique spécifique, ou - Une réponse positive est obtenue après culture ou tests biochimiques *in vitro*	-Les données chromatographiques obtenues dans 2 différentes conditions expérimentales correspondent à celles connues de la littérature, ou - La masse moléculaire de la toxine, obtenue par spectrométrie de masse (SM) correspond à celles connues de la littérature, ou - Un test immunologique spécifique donne une réponse positive
Identification confirmée	- Tests immunologiques et génétiques positifs, ou - Tests immunologiques et culture ou tests biochimiques *in vitro* positifs, ou - Tests génétiques et culture ou tests biochimiques *in vitro* positifs + contrôles de référence authentiques (contrôles positifs et négatifs) réalisés dans des conditions expérimentales identiques	- Les données chromatographiques obtenues dans 2 différentes conditions expérimentales ainsi que la masse moléculaire de la toxine, obtenue par SM correspondent à celles connues de la littérature, ou - Les données chromatographiques obtenues dans 2 différentes conditions expérimentales correspondent à celles connues de la littérature, et un test immunologique spécifique donne une réponse positive, ou - La masse moléculaire de la toxine, obtenue par SM correspond à celles connues de la littérature, et un test immunologique spécifique donne une réponse positive, ou - La masse moléculaire et la carte des masses des produits de digestion (au moins 3 produits) correspondent à celles connues de la littérature
Identification formelle	- Réponse positive avec une méthode génétique d'identification, et - Réponse positive obtenue avec une méthode immunologique, et - Résultat positif obtenu par des méthodes de culture ou tests biochimiques in vitro, et - Les capacités de l'agent à provoquer une maladie sont vérifiées sur un modèle animal. + contrôles de référence authentiques (contrôles positifs et négatifs) réalisés dans des conditions expérimentales identiques	- Les données chromatographiques obtenues dans 2 différentes conditions expérimentales ainsi que la masse moléculaire de la toxine, obtenue par SM correspondent à celles connues de la littérature, et - La masse moléculaire et la carte des masses des produits de digestion (au moins 3 produits) correspondent à celles connues de la littérature, et - Les séquences en acides aminés correspondent à celles connues de la littérature
Remarques	Ces critères ne s'appliquent qu'aux agents classiques à l'exception pour l'identification fiable des agents ne pouvant être cultivés, des agents génétiquement modifiés et des nouveaux agents (toxines, acides nucléiques infectant..).	

2.2.3.1. Enjeux du choix des méthodes de détection et d'identification

La prise en compte actuelle du risque biologique terroriste ou accidentel apporte de nouveaux défis pour le développement de matériels de détection et d'identification (39). Dans le contexte d'un laboratoire mobile et de l'intervention sur le terrain, plusieurs critères (extrinsèques), ajoutés à ceux définissant les tests de détection (intrinsèques), sont à évaluer afin de déterminer quel type de test pourrait être utilisé au sein du VDIP.

2.2.3.1.1.1. Critères intrinsèques

Il existe trois grands critères analytiques permettant de qualifier un test de détection ou d'identification : la rapidité, la sensibilité et la spécificité (44). Dans le contexte du bioterrorisme, un délai d'obtention des résultats trop long peut avoir des conséquences importantes. En effet, ce délai est un paramètre important qui conditionne les mesures de protection à mettre en place et la rapidité de prise en charge des personnes exposées (type de décontamination, mise en place d'un traitement). De plus, des études ont montré que pour avoir une activité optimale de traitement, les résultats de l'identification de l'agent en cause devaient être rendus en moins d'une heure, conditionnant la survie de la victime qui aurait inhalé les agents responsables du charbon ou de la peste par exemple (45–47). Cependant, celle-ci peut être à contre sens avec la sensibilité analytique représentant la capacité à détecter de faibles quantités de la cible de façon fiable dans un échantillon biologique (8). Elle est souvent confondue avec la limite de détection qui est la quantité la plus faible de cible pouvant être détectée dans l'échantillon. Les tests rapides sont donc souvent moins sensibles et leur capacité à détecter de faibles quantités d'échantillons est moindre. De plus, certains agents biologiques ont une dose infectieuse extrêmement faible. De ce fait, une sensibilité analytique élevée peut donc être un avantage important afin de détecter avec fiabilité la présence de traces de l'agent causal. La spécificité analytique est

un paramètre caractérisant la capacité du test à détecter seulement la cible sans être affectée par d'autres composants ou micro-organismes (4,6). Ce paramètre est également important puisque la possibilité d'obtenir un résultat faussement positif pourrait entraîner des conséquences graves comme des coûts élevés directs et indirects dans la chaîne organisationnelle et un impact psychologique sur la population. Toutefois, puisqu'on ne peut pas tester en laboratoires toutes les molécules pouvant être présentes dans l'environnement, certains tests de détection donnent des résultats faussement positifs difficilement prévisibles sur le terrain (39). C'est pourquoi, les méthodes doivent être validées sur plusieurs souches de l'agent causal et à des concentrations différentes afin d'évaluer la sensibilité ainsi que la limite de détection. Elles doivent aussi avoir été testées avec d'autres agents du même genre afin de vérifier la spécificité. Idéalement, le test doit être rapide et reproductible, présenter des valeurs de sensibilité et de spécificité proches de 100%. Cependant, il est très difficile d'obtenir des tests regroupant à la fois une bonne sensibilité et spécificité analytiques. Il est donc important de définir les besoins nécessitant ce test :

- Soit un test **très sensible :** utile pour s'assurer **qu'un pathogène n'est pas présent** (peu de faux négatifs) mais il y a un risque d'obtenir des **faux positifs.** En effet, les améliorations technologiques permettent aujourd'hui d'obtenir des valeurs de sensibilité accrue des appareils, ce qui augmente par conséquent la probabilité que d'autres microorganismes de l'environnement soient faussement détectés en tant qu'agent pathogène.
- Soit un test **très spécifique :** utile pour s'assurer **qu'un pathogène est bien présent** (peu de faux positifs) mais il y a un risque d'obtenir des **faux négatifs.**

D’une manière générale, la limite de détection doit être la plus basse possible afin de détecter, quel que soit l’échantillon, des concentrations pouvant être parfois très faibles de micro-organismes.

Par exemple, lors des attentats aux lettres piégées de 2001, la quantité de *B. anthracis* estimée était de $3x10^{11}$ spores/mL, la limite de détection doit donc être bien inferieure pour les tests à mettre en place (48,49).

2.2.3.1.1.2. Critères extrinsèques

Concernant les critères extrinsèques (50), ils sont étroitement liés à la nécessité de l’utilisation sur le terrain de méthodes de détection et d’identification.

- Le premier critère est la capacité de ces méthodes à être utilisées sur le terrain, c'est-à-dire que ces techniques doivent être faciles d’utilisation et rapidement déployables (taille, poids).
- De plus, la méthodologie employée devrait permettre la détection simultanée de plusieurs agents et nécessiter le minimum d’intervention humaine dans le traitement de l’échantillon, voire si possible automatisée.
- Par ailleurs, les conditions de conservation des réactifs sont souvent difficilement compatibles avec une utilisation en laboratoire mobile, et parfois certains kits possèdent des réactifs qui doivent être stockés à des températures différentes : température ambiante (+20-30°C), au frais (+2-8°C), au congélateur (-18-20°C) voire à très basse température (-70-80°C). Ces conditions variées de conservation, habituels dans les laboratoires classiques, sont souvent incompatibles avec un usage facile, rapide et opérationnel, les processus de préparation des réactifs devant parfois nécessiter plusieurs dizaines de minutes. De même, la durée de validité des réactifs doit être maximale, et dans l’idéal excéder plusieurs années. L’utilisation

de ceux-ci n'étant qu'occasionnelle, leur renouvellement représente donc un coût de fonctionnement important. La stabilité et le mode de conservation des réactifs est donc un critère de choix important.

- Enfin, le coût de la méthode est aussi à prendre en compte dans le choix final.

2.2.3.1.1.3. Choix des cibles

Les progrès de la science permettent aujourd'hui le développement de micro-organismes dont le génome a été modifié afin d'augmenter la virulence, de conférer une protection envers les traitements ou bien d'échapper aux cibles actuelles utilisées pour la détection. Dans ce contexte, un autre grand critère important à prendre en compte est l'ubiquité. L'objectif de l'ubiquité, dans le contexte des maladies infectieuses, est de détecter toutes les souches de la cible microbienne, considérant sa variabilité phylogénétique propre ainsi qu'en prenant en compte les possibilités de remaniements génétiques qui ont pu être appliqués à la souche. C'est pourquoi, en général, l'identification d'un micro-organisme doit combiner la recherche de différentes signatures spécifiques d'une espèce.

2.2.3.1.1.4. Interprétation des résultats

Les résultats des tests de détection peuvent être représentés sous plusieurs formes pouvant nécessiter un degré variable de traitement des données. L'exemple du test de grossesse illustre les différents types de résultats pouvant être obtenus pour une même cible. Lors d'une grossesse, l'hormone gonadotrophine chorionique (β-HCG) est sécrétée par le placenta, sa concentration va augmenter durant toute la période de gestation. Actuellement, la détection de la β-HCG peut se faire dans l'urine (test immunochromatographique sur bandelette) ainsi que dans le sang (prélèvement sanguin). Dans le premier cas, le résultat est affiché directement sur la bandelette, l'apparition d'une bande témoigne d'un résultat

positif. Dans le cas de la prise de sang, le résultat est donné par une concentration en hormone. Si celle-ci dépasse les 10 UI/mL, la patiente est enceinte. Dans ce deuxième cas, des connaissances en biologie, un prélèvement invasif et un temps d'analyse plus long sont nécessaires afin d'interpréter le résultat.

De façon générale, on définit plusieurs types de réponse :

- Binaire : positive ou négative

  Exemple : présence ou absence du pathogènes dans l'échantillon

- Ordinale : probabilité forte, intermédiaire ou faible
- Quantitative : valeur continue ou discrète

  Exemple : nombre de cycle threshold (Ct) lors d'une polymerase chain reaction en temps réelle (qPCR)

Enfin, il est important de réfléchir aux résultats obtenus (identification provisoire, confirmée ou formelle) ainsi qu'à leur utilité en termes d'action protective.

2.2.3.2. Les tests pouvant être mis en œuvre

Il convient donc d'arrêter une décision quant au choix de la méthode en prenant en compte chacun des critères précédents. Plusieurs technologies différentes ont donc été mises au point répondant plus ou moins aux critères cités précédemment. Cette section fait un état des lieux des techniques les plus souvent décrites pour la détection et l'identification d'agents biologiques ou toxines protéiques selon le plan de la Figure 9.

Chaque test sera présenté sous forme de tableau comprenant le nom de la méthode, un exemple de kit disponible, le fabricant ainsi les données de performant et le coût si disponible.

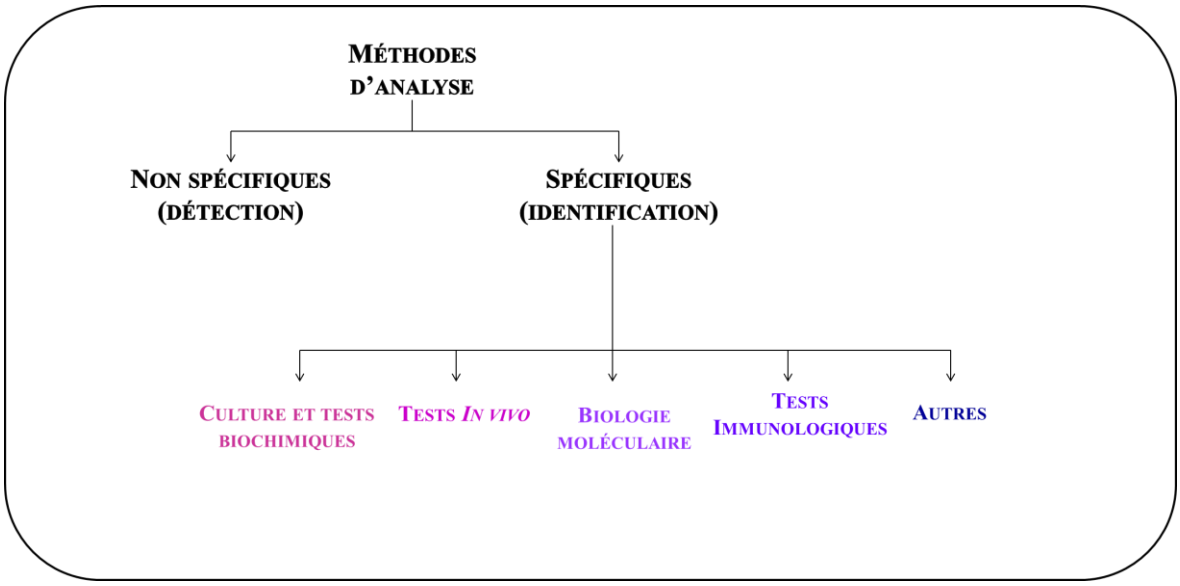


Figure 9 : Flowchart de l'organisation des techniques de détection et d'identification des agents du bioterrorisme

Les conditions environnementales, le type d'échantillon, sa préparation ainsi que le type de cible ont un impact sur la performance des technologies d'identification utilisées. C'est pourquoi il est souvent difficile de comparer les différentes technologies entre elles. Les méthodes sont décrites de façon générale et des références de produits disponibles sur le marché sont données à titre d'exemple et de façons non exhaustives. Les fiches des fournisseurs ainsi que les publications scientifiques sur les études de performances sont citées en référence lorsqu'elles sont disponibles. Il faut aussi noter qu'il est plus difficile d'obtenir ses études pour les pathogènes du bioterrorisme du fait de la confidentialité inhérente à ce sujet.

2.2.3.2.1.1. Les tests non spécifiques

2.2.3.2.1.1.1. ATPmétrie

L'ATP est une molécule présente dans tous les organismes vivants. Les micro-organismes tels que les bactéries et les virus contiennent donc également de l'ATP. Elle est essentielle à la vie cellulaire, son rôle étant de fournir l'énergie pour les réactions chimiques

cellulaires. La réaction qui se produit lors du contact entre la luciférine, la luciférace et l'ATP est appelée réaction de bioluminescence (Figure 10). Ce processus produit de la lumière dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité d'ATP. L'ATPmétrie est une méthode permettant de mesurer cette intensité produite. La lecture est faite par un luminomètre et la valeur obtenue en unité relative de lumière (URL) permettra grâce à un étalon d'évaluer la quantité d'ATP. Le kit PROFILE® 1 (New Horizons diagnostics Inc, Columbia, MD, USA) utilise cette technologie afin de détecter les bactéries et toxines du bioterrorisme (Bioluminomètre modèle 3550) ainsi que les spores (Bioluminomètre modèle 3550i) dans des échantillons humains, environnementaux, alimentaires et eaux (53).

Outre ses capacités à rendre un résultat rapidement (Tableau 7), le coût de l'utilisation de l'ATPmétrie reste peu élevé (5 USD/ réaction) et son utilisation est simple. Le matériel est petit et compact permettant une utilisation sur le terrain. Dans le cas du Profile® 1, ses performances ont été testées sur différents types de matrices ainsi que sur différents pathogènes de la menace biologique (54) Cependant, l'utilisation de ce type de test non spécifique peut conduire à l'obtention de résultats erronés (faux positifs ou faux négatifs) dus aux interférences avec la flore bactérienne vivante de l'environnement. De plus, le résultat affiché ne permet pas d'identifier spécifiquement le pathogène, la seule information qui peut en être tirée est la présence anormale de pathogènes dans l'échantillon.

$$\text{Luciférine} + \text{ATP} + O_2 \xrightarrow{\text{Luciférase} + Mg^{2+}} \text{Lumière} + \text{AMP} + \text{PPi}$$

Figure 10 : Réaction de bioluminescence

L'utilisation d'un lecteur qui, bien que petit et compact, représente un coût d'achat initial non négligeable auquel vient s'ajouter le coût de la métrologie de l'appareil et des réactifs.

Un autre point important est que l'ATPmétrie n'est pas applicable aux virus car ces derniers sont dépourvus d'ATP intracellulaires libres. Cependant certains chercheurs ont réussi à contourné cette difficulté en basant leur détection sur la quantité d'ATP de la cellule hôte (55) utilisée au profit du développement du virus. Cependant, la détection de toxines reste impossible avec cette méthode. Enfin, l'ATP n'est présente que dans les cellules vivantes. De ce fait, avec ce type d'appareil si la prise en charge de la menace est réalisée trop tardivement, il se peut que les pathogènes ne déjà soient plus détectables. De plus, ce type d'appareil nécessite une préparation de l'échantillon importante avec l'utilisation de matériels non fournis avec le kit. L'ajout de ces différentes étapes peut ainsi diminuer la rapidité d'analyse.

2.2.3.2.1.1.2. Détection d'ADN par fluorimétrie

Plusieurs méthodes permettent de détecter l'ADN, elles peuvent être spécifiques comme la PCR ou non spécifiques comme la fluorimétrie. Pour cette dernière, le principe est d'introduire une molécule non-fluorescente dans l'échantillon. Cette molécule se fixe à un composant cellulaire retrouvé chez tous les agents. Quand cette fixation a lieu, la molécule devient fluorescente. Le Prime Alert® (GenPrime™, Spokane, WA) utilise cette technologie afin de détecter la présence de l'ADN/ARN des pathogènes dans les matrices de type poudre uniquement. Le kit Microbe screen utilisant la technologie Prime Alert® est commercialisé en vue de la détection de 13 pathogènes[9] décrit par le CDC comme les agents de haute-priorité. L'appareil doit être calibré avant utilisation et peut être facilement décontaminé en cas de résultat positif. Un résultat négatif indique qu'il n'y a pas de pathogènes présents ou qu'il n'y en a pas assez pour être détecté. Le résultat n'est pas quantitatif, il indique seulement si une grande quantité d'ADN/ARN est retrouvée.

[9] Charbon, peste, tularémie, mélioïdose, morve, brucellose, salmonellose, choléra, fièvre thyphoïde, fièvre Q, psittacose, virus et nouveaux agents

Comme pour l'ATPmétrie, l'utilisation de la fluorimétrie permet d'obtenir des temps d'analyse très courts avec des résultats en 5 minutes. De plus, la miniaturisation des appareils permet aujourd'hui de pouvoir utiliser des appareils légers, de petites tailles et compacts, facilement utilisables sur le terrain. Comme le Profil™ 1, le Prime Alert® permet de détecter plusieurs pathogènes mais parmi un panel plus réduit de 13 pathogènes. Un résultat positif implique donc une forte probabilité d'avoir un agent du bioterrorisme dans l'échantillon.

Cependant, l'utilisation d'une méthode restreinte à la détection d'ADN ou d'ARN exclu inévitablement les toxines du panel de cibles. Le Micro screen kit ne permet pas de détecter les toxines et nécessite l'utilisation d'un autre kit (Toxin screen) spécifique basée sur une détection immunologique. De plus, bien que ces tests ne détectent qu'un nombre limité d'agents, l'identification spécifique n'est toujours pas possible. Elle nécessite donc des investigations complémentaires. A cela s'ajoute la restriction de ces tests à un seul type de matrice. L'utilisation d'un lecteur est également nécessaire représentant un coût d'achat initial (Tableau 7) ainsi que les coûts de maintenance et des réactifs.

2.2.3.2.1.1.3. Détection de protéines

Une des autres méthodes non spécifique habituellement décrite est la détection de protéines. Les protéines sont des molécules retrouvées dans toutes les cellules et sont des éléments essentiels à leur survie. Elles peuvent jouer un rôle structural, de mobilité, de régulation ou de virulence. Les protéines sont composées de plusieurs chaînes d'acides aminés. En utilisant cette définition, on peut facilement deviner que la détection de protéines dans un échantillon ne devant pas en contenir (comme dans une poudre contenue dans une enveloppe par exemple) peut être un outil d'alerte révélant une suspicion d'attentat bioterroriste. Comme pour l'ADN, il existe des méthodes non spécifiques

(détection général des protéines) et des tests spécifiques (détection de protéines spécifiques à un micro-organisme).

20/20 GenSystems (Rockville, MD) a mis au point le Biocheck® Powder Screening Test Kit qui permet de déterminer la présence de protéines dans une poudre suspecte. L'échantillon est collecté par écouvillonnage et doit être incubé 5 minutes dans un liquide (Figure 11). Si l'échantillon contient des protéines, la solution devient bleue. Si l'échantillon n'en contient pas, il n'y a pas de changement de couleur. En cas de résultat négatif, un contrôle positif est disponible pour la vérification du kit. Un autre tube est utilisé afin de mesurer le pH de l'échantillon. Les échantillons acides ne sont pas compatibles avec ce test et perturbent l'analyse.

A l'image des tests décrits précédemment, le Biocheck® permet d'obtenir un résultat en quelques minutes avec un minimum de manipulation et une grande facilité. Le kit peut être utilisé sur le terrain et il est à usage unique. Il n'y a pas d'appareillage nécessaire pour la lecture, celle-ci se fait visuellement. Le prix pour un kit reste aussi très abordable. Ce test a été validé sur plusieurs cibles (*B. anthracis*, ricine, toxine botulique) (54) mais n'a été testé que pour des matrices de type poudre. De plus, d'autres protéines peuvent interférer avec le test comme les protéines du lait en poudre et donner des faux positifs.

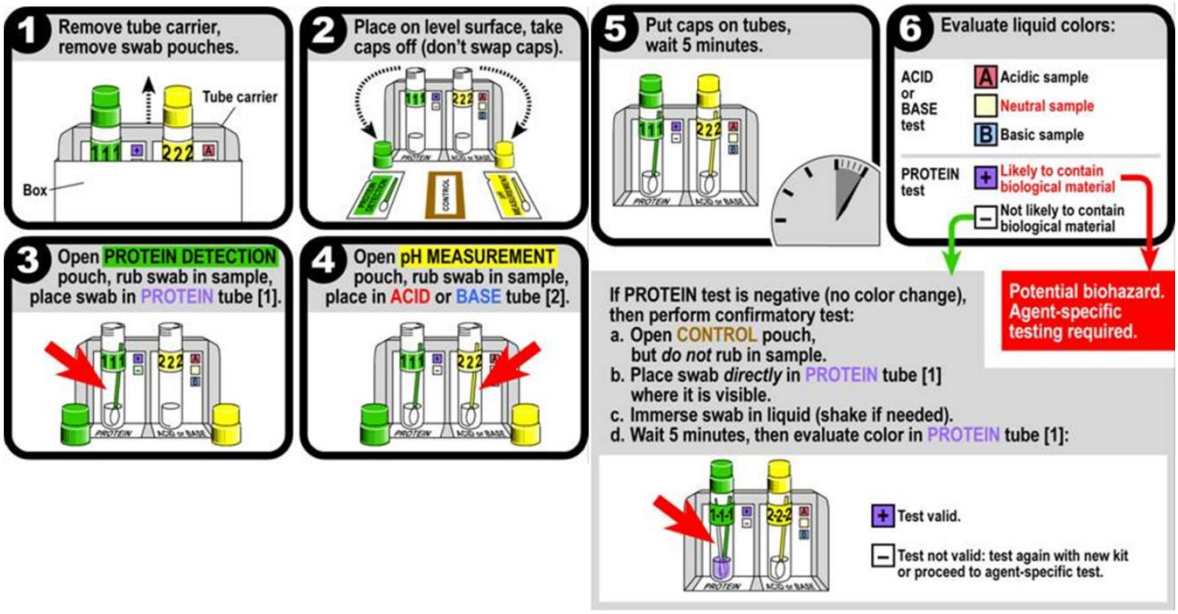


Figure 11 : Utilisation du kit Biocheck® - Réaction basée sur le principe de la réaction du biuret qui est une réaction colorimétrique dans lequel les protéines formes un complexe avec les sels de cuivre qui donne une coloration bleu-violet au milieu. Si le test de pH est neutre et le test colorimétrique est positif (bleu), l'échantillon doit être considéré comme contaminé (56).

2.2.3.2.1.1.4. Télédetection par laser

La télédétection par laser ou LIDAR (*Light detection and ranging*) est la dernière méthode non spécifique décrite ici. Elle utilise une technologie basée sur l'analyse des propriétés d'un faisceau renvoyé par son émetteur.

Il existe plusieurs types de LIDAR (Raman, fluorescence et à absorption différentielle) mais seule celui à fluorescence est utilisé pour la détection d'agents biologiques. Un faisceau UV est envoyé sur la cible à une longueur d'onde de 266 nm ou 355 nm pour lesquelles le matériel biologique est fluorescent (Figure 12). La fluorescence émise est captée par l'appareil et les données sont analysées par un logiciel afin d'être transformées en données exploitables. Ce type d'appareil peut être utilisé en intérieur ou en extérieur. Ils sont généralement utilisés pour détecter la présence de bioaérosols dans l'environnement. Le principal avantage est qu'ils peuvent être utilisés à plusieurs kilomètres du lieu supposé

de la contamination permettant ainsi le travail des opérateurs dans un périmètre de sécurité. Ils permettent également de déterminer une zone de danger en identifiant la position du nuage d'aérosol ainsi que ses mouvements dans l'air. De plus, ce système ne nécessite pas l'utilisation de réactifs ou de préparation d'échantillon au préalable. Cependant, la forme de rendu des résultats n'est pas encore claire et la mise en œuvre d'un appareil de ce type peut être lourde et pourrait nécessiter une formation particulière.

Le Biosense® et SR-Biospectra® sont deux prototypes de LIDAR à fluorescence développés par l'Institut National d'Optique (Canada) ; ils sont respectivement utilisés pour couvrir des surfaces extérieures et intérieures. Ils sont actuellement toujours à l'essai et n'ont pas été testés sur des agents du bioterrorisme (57).

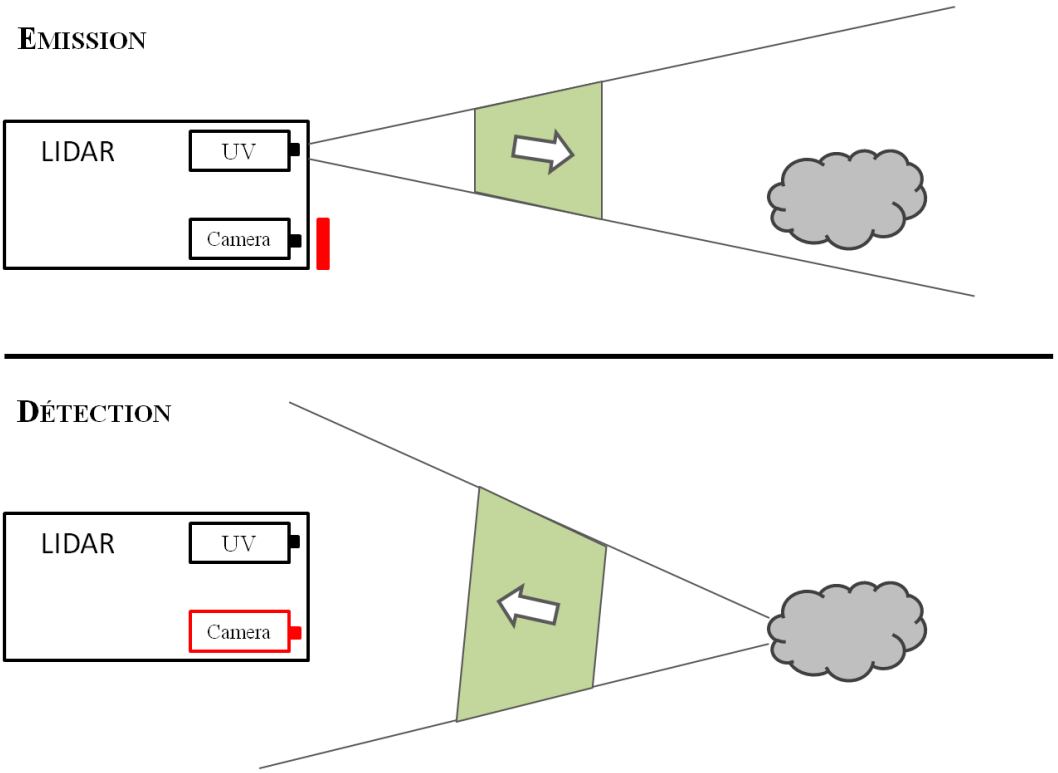


Figure 12 : Principe générale du LIDAR à fluorescence

Tableau 7 : Tableau récapitulatifs des différents tests de détection

		ATPmétrie	Détection d'ADN par fluorimétrie	Détection de protéines	Télédetection par LIDAR
Matériels / kits commerciaux	Kits commerciaux	PROFILE™ 1	Prime Alert®	Biocheck® Powder Screening Test Kit	SR-Biospectra® / BioSense ®
	Fabricant	New Horizons diagnostics Inc (Etats-Unis d'Amérique) http://www.nhdiag.com/profile_one.shtml Life Sciences Advanced Technologies Inc. http://www.lifesci.com/profile-i/	GenPrime™ (Etats-Unis d'Amérique) http://www.genprime.com/products_primealert.asp	20/20 GenSystems, Inc (Etats-Unis d'Amérique) http://www.biocheckinfo.com	Institut National d'Optique (Canada) www.ino.ca
Caractéristiques	Rapidité d'analyse	20 minutes (1)	5 minutes (3)	5 minutes	-
	Facilité de préparation et d'utilisation	Plusieurs étapes de préparation de l'échantillon	Plusieurs étapes de manipulation	Facile et rapide à utiliser http://biocheckinfo.com/schematic/	Nécessite une formation à son utilisation
	Utilisation sur le terrain	Ne doit être manipuler que dans un environnement stérile afin d'éviter les contaminations	Ne doit être manipuler que dans un environnement stérile afin d'éviter les contaminations Réactifs toxiques à manipuler	Oui	SR-Biospectra : environnement confiné BioSense : environnement extérieur

			sous hôte		
	Appareillage	Oui Petit, portatif, alimenté par batterie	Oui	Non – 1 kit par utilisation	Oui
	Réactifs	Oui Conservation à -20°C Nécessite des équipements supplémentaires (matériel de prélèvement, milieux de transport)	Oui Tous le matériel nécessaire au prélèvement ou à la préparation est fourni	Oui Tous le matériel nécessaire au prélèvement ou à la préparation est fourni	Non
	Cibles et matrices	Cibles : bactéries, spores et toxines Matrices : humains, environnementaux, alimentaires et eaux	Cibles : 13 agents[10] (virus et bactéries) Matrice : poudre	Cibles : anthrax, ricine, toxine botulique Matrices : poudres	Matrices : aérosols
	Interprétation des résultats	Facile, sans logiciel, conversion de valeurs URL en quantité d'ATP	Facile, sans logiciel, conversion d'une valeur d'absorbance en quantité d'ADN	Visualisation du changement de couleur (le liquide devient bleue si réaction positive)	Lecture de graphiques sur un moniteur – Nécessite une formation à son utilisation

[10] *B. anthracis, Y. pestis, B. mallei, B. pseudomallei, Brucella* spp, *Salmonella* spp, *V. cholerae, S. typhi, C. burnetii, C. psittaci*, virus et nouveaux agents

	Sensibilité / Spécificité	1×10^4 CFU de *B. anthracis* de différentes souches et 1×10^6 CFU de *Y. pestis* (2) Interférences avec la flore bactérienne normale de l'environnement.	2×10^{10} à 1×10^9 CFU de *B. anthracis* selon les souches et 1×10^8 CFU de *Y. pestis* (2) 4% de faux positifs (3)	Sensibilité : 1×10^7 à 1×10^8 CFU de *B. anthracis* selon les souches, 1×10^7 CFU de *Y. pestis*, 100µg de ricine (2)	Encore à l'essai
	Limite de détection	-	~ 100 millions à 10 milliards de spores / mL	80 millions de spores / mL	Encore à l'essai
	Coût	bioluminomètre (~5000USD) – prix d'un test (~5USD)	fluoromètre (~12000USD) – prix des cartouches (~200USD)	~700USD pour 25 tests	-
	Références bibliographiques	(53,54)	(58,59)	(56,60)	(14,15)

2.2.3.2.1.2. Les tests spécifiques des agents biologiques et des toxines

A la différence des tests décrits précédemment, les tests dits spécifiques permettent d'identifier le ou les micro-organismes en cause, c'est pourquoi ils seront appelés tests d'identification. Il existe de nombreux tests permettant d'identifier les agents de la menace biologique incluant les méthodes de référence et relativement anciennes comme la culture et les tests biochimiques mais aussi des méthodes immunologiques et moléculaires plus récentes.

2.2.3.2.1.2.1. Les tests de microbiologie classique

2.2.3.2.1.2.1.1. La culture et les tests biochimiques

La culture est une méthode permettant la croissance contrôlée *in vitro* des micro-organismes. Elle est utilisée depuis le XIXème siècle et constitue la méthode de référence pour l'identification des micro-organismes (61)**.** Lors d'une attaque bioterroriste, la mise en culture des micro-organismes est très importante car elle permet de montrer leur caractère viable, de réaliser des investigations complémentaires (sensibilité aux traitements et virulence) et de constituer une preuve sans équivoque d'allégation de leur emploi. Pour les bactéries, la mise en culture peut être réalisée en milieu solide ou liquide. La qualité du milieu, la quantité d'oxygène, de dioxyde de carbone ainsi que le temps et la température d'incubation sont les paramètres de bases qui diffèrent d'un pathogène à l'autre. Après culture, des tests biochimiques (tests à l'oxydase, réaction à la bilirubine, *etc*…) sont réalisés afin de déterminer l'espèce présente. Par exemple, les bactéries du genre *Yersinia* poussent sur gélose ordinaire entre 28-37°C pendant au minimum 24 h et jusqu'à 7 jours. Pour les caractères biochimiques, elles sont oxydase négative, catalase positive, indole négative, uréase positive et ne fermentent pas le lactose (62)**.** Cependant, à la différence

des autres *Yersinia*, l'agent responsable de la peste, *Y. pestis*, ne possède pas d'uréase et poussent de façon optimale à 28°C. C'est de cette façon qu'elle peut être identifiée. Un autre exemple est celui des bactéries du genre *Bacillus* dont les caractéristiques sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 8 : caractéristiques physique et biochimique des bactéries du genre *Bacillus* (adapté de (63))

Tests	*B. anthracis*	*B. cereus*	*B. thuringiensis*	*B. megaterium*	*B. substilis*
β-hémolyse	-	+	+	-	V (64%)
Mobilité	-	+	+	V (42%)	V (84%)
Capsule	+	-	-	-	-
Hydrolyse de l'urée	-	V (26%)	+	V (47%)	V (47%)
Réduction des nitrates	+	V (89%)	+	-	V (89%)
Indole	-	-	-	-	-
Sensibilité à la pénicilline	+	-	-	-	-

V= variable

Depuis le XIXe siècle, les protocoles des tests biochimiques ont été simplifiés (64) grâce à l'arrivée des galeries API, au développement de nouveaux milieux et substrats ainsi qu'à l'apparition d'automates comme le Sherlock® Microbial ID System (65) qui a déjà fait ses preuves concernant la différenciation de *Francisella* spp, *Yersinia* spp et des spores de *Bacillus* (39).

Concernant les virus, ces derniers ne peuvent se répliquer que dans des cellules hôtes vivantes et nécessitent donc la mise en œuvre de culture cellulaire délicate à réaliser contrairement à la majorité des bactéries capable de croître en milieu axénique, hormis quelques espèces bactériennes ou de rickettsies à tropisme intracellulaire quasiment obligatoire. Par ailleurs, il existe un très grand nombre de virus possédant chacun des caractéristiques, en termes de tropisme cellulaire, qui leur sont propres. Il n'y a donc pas de protocole standardisé pour la culture virale. L'identification par la culture ne peut être entreprise que par des laboratoires spécialisés. La méthode de référence étant l'observation d'un effet cytopathique des virus sur les cellules infectées.

Il est très important de souligner que les agents devront être manipulés dans des laboratoires au confinement adapté dès lors qu'ils sont mis en culture (66).

Bien que très sensible et spécifique, la culture présente plusieurs problèmes. Tout d'abord, cette méthode requiert l'utilisation d'organismes vivants ainsi 18 à 48h (46) pour avoir un nombre suffisant d'organismes permettant la détection de leurs activités physiologiques et de leur sensibilités aux traitements. De plus, elles nécessitent la manipulation dans un environnement stérile et par un technicien expérimenté. Concernant les tests biochimiques, bien qu'ils permettent une bonne différenciation des espèces au sein d'un genre, ils nécessitent obligatoirement la mise en culture et un isolement préalable du pathogène à partir de l'échantillon, étape qui peut nécessiter plusieurs jours. De plus, ces tests ne sont pas applicables aux virus.

2.2.3.2.1.2.1.2. La microscopie

La microscopie vient en complément des tests biochimiques. Elle permet d'étudier la morphologie des micro-organismes et participe donc à l'identification. Les bactéries sont observables au microscope optique. Chaque espèce de bactérie est caractérisée par sa morphologie (bacille ou coque) et par sa mobilité. De plus, les bactéries peuvent être colorées et être ainsi visibles au microscope (coloration de Gram ou de Ziehl-Nielseen). Par exemple, *Y. pestis* est un coco-bacille à coloration de Gram négative (caractérisée par la couleur rose en microscopie). Cette bactérie est immobile contrairement aux autres *Yersinia*. En revanche, la taille d'un virus étant en moyenne environ 100 fois inférieure à celle d'une bactérie, un microscope optique ne suffit donc pas pour les observer. Le microscope électronique permet d'obtenir un grossissement suffisant pour observer les virus. Ces derniers peuvent être caractérisés par la structure de leur particule virale, la stratégie de réplication virale ou bien grâce à la classification de Baltimore, selon le type et

l'organisation du génome viral (67). Pour plus de spécificité, des anticorps spécifiques du virus peuvent être ajoutés à l'échantillon et la réaction peut être observée au microscope, en immunofluorescence. Cependant, la microscopie électronique nécessite un équipement extrêmement coûteux et une très grande expertise qui rendent cette méthode utilisable par seulement quelques laboratoires experts dans ce domaine. Quant à la microscopie optique, elle est couramment mise en œuvre par l'ensemble des laboratoires de biologie médicale mais requiert également une expertise pour la préparation de l'échantillon, la lecture et l'interprétation.

2.2.3.2.1.2.1.3. Les tests in vivo sur les animaux

Le terme *in vivo* est utilisé pour qualifier les tests ou examens pratiqués sur des organismes vivants comme les animaux ou les humains. Ils constituent en général l'ultime phase de l'expertise et ont pour objectif de prouver le caractère pathogène de l'agent. Ces tests consistent à infecter des animaux (en général des lignées de souris) avec des concentrations connues de l'agent biologique par une voie d'administration particulière (intra-péritonéale ou nasale par exemple) et de comparer la mortalité avec celle obtenue pour une souche de référence. Ces tests sont très longs et nécessitent une infrastructure que seuls les laboratoires de référence possède, c'est-à-dire des animaleries de sécurité biologique de niveau 3 voire 4 (38). De plus, ces tests sont chers et nécessitent l'approbation par un comité d'éthique. C'est pourquoi ce type de test n'est pas envisageable pour une utilisation terrain.

2.2.3.2.1.2.2. Les tests de biologie moléculaire

L'ADN est une molécule présente dans toutes les cellules des êtres vivants. Elle est le support de l'information génétique. Cette information est codée par l'enchainement de

bases nucléotidiques (adénine, thymine, cytosine et guanine) codées par les quatre lettres A, T, C et G définissant une séquence. Cette séquence peut être découpée en unités appelées gènes. C'est à partir de cette simple définition que les tests moléculaires prennent leur origine. La biologie moléculaire regroupe un ensemble de techniques basées sur l'étude, la détection et la modification des acides nucléiques. On distingue les méthodes basées sur le principe de détection de portions particulières d'ADN appelées gènes cibles, spécifiques d'un organisme donné, et les méthodes d'étude de séquences de gène jusqu'au génome entier de l'organisme. Dans le premier cas on parle des méthodes basées sur le principe de la PCR et dans le second cas on parle de séquençage.

2.2.3.2.1.2.3. Les tests basés sur l'amplification du matériel génétique

Cette technique permet d'obtenir un signal traduit par une bande sur un gel d'électrophorèse ou une fluorescence mesurée par un détecteur, indiquant la présence de matériel génétique correspondant à la cible dans l'échantillon, alors qu'une détection directe sans amplification préalable n'est pas possible. Plusieurs méthodes peuvent être mises en œuvre. Elles sont regroupées en deux classes (68): celles amplifiant une cible (PCR, strand diplacement amplification (SDA) (69) , ligase chain reaction (LCR) (70) et nucleic acid sequence based amplification (NASBA)) (71) ; celles amplifiant le signal (branched DNA (bDNA) (72), hybrid capture (68,73) et par clivage d'ADN) (68) ou bien celle amplifiant à la fois une cible et le signal comme la rolling circle amplification (RCA) (68,74). La PCR est la technique moléculaire la plus développée actuellement. Elle permet de détecter aussi bien un large panel de pathogènes qu'un organisme spécifiquement. Ces applications sont multiples allant de la découverte de nouveaux pathogènes à la détection de résistances.

2.2.3.2.1.2.3.1. Principe de la PCR

Développée par Kary Mullis en 1985 (75), la PCR ou Polymerase Chain Reaction est une méthode *in vitro* de synthèse enzymatique d'une région spécifique de l'ADN. La PCR requiert l'utilisation d'ADN, d'une enzyme, la polymérase, de courtes séquences nucléotidiques (amorces), de deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) ainsi qu'un tampon spécifique contenant du magnésium. Les concentrations en magnésium, amorces et ADN ont besoin d'être optimisées pour chaque test de PCR (76). Le principe de la PCR est basé sur la réalisation successive de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction implique deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre et qui sont complémentaires à des régions spécifiques de l'ADN matrice, on parle de région cible (Figure 13). Ces amorces définissent la région à amplifier. Les produits de chaque étape de synthèse sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes. De cette façon, au lieu d'être linéaire, l'amplification est exponentielle (2^n copies d'ADN avec n le nombre de cycles de PCR). Un cycle est constitué de 3 étapes (Figure 13) : la première est une réaction de dénaturation permettant la séparation des brins matrices. La seconde est l'étape d'hybridation, les amorces se fixent à leur région complémentaire. Enfin la dernière étape est l'élongation où le nouveau brin est synthétisé à partir du brin matrice. Le nouveau brin synthétisé servira de matrice pour le cycle suivant (77). Chaque étape d'un cycle d'amplification correspond donc à des modifications de température pendant des durées déterminées dans le thermocycleur, le tout en fonction de critères dépendant à la fois de la portion d'ADN à amplifier et des amorces utilisées.

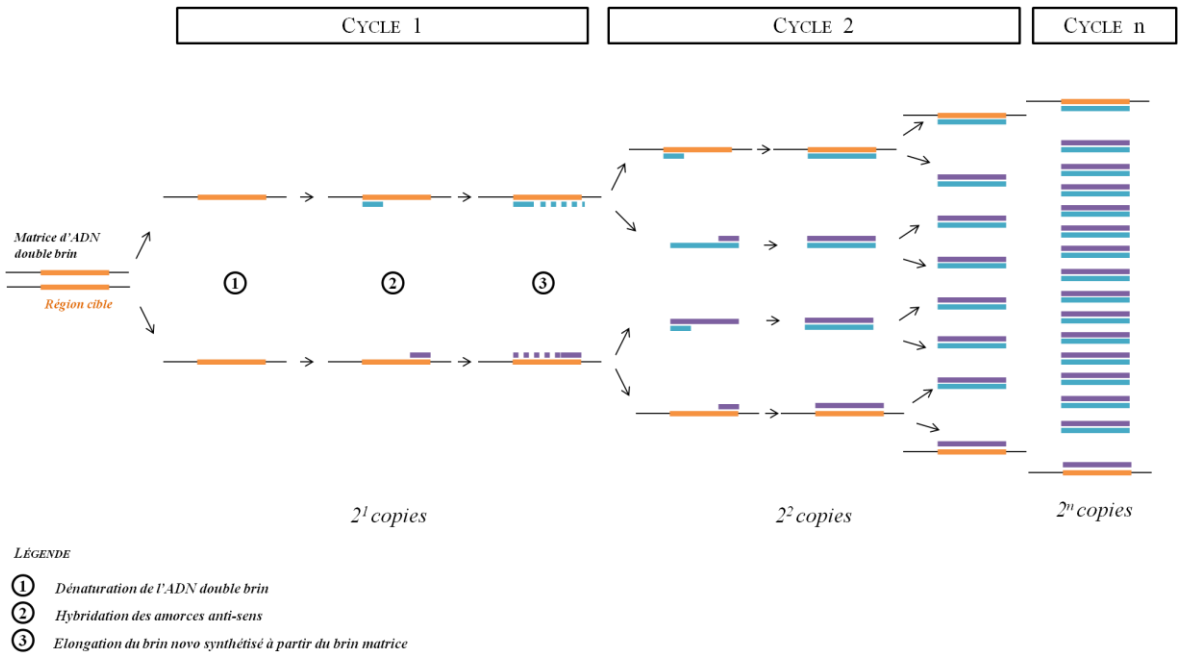


Figure 13 : Schématisation de la réaction de PCR – Elle est basée sur la répétition de cycles de différentes températures. Chaque cycle (n) comprend 3 étapes ((1) dénaturation, (2) hybridation et (3) amplification). L'augmentation du nombre de copies d'ADN est donc exponentielle avec le nombre de copies à la fin de la PCR équivalent à 2^n.

Pour obtenir une PCR de qualité, elle doit être précédée par une étape d'extraction de l'ADN/ARN à partir de l'échantillon récolté. Cette étape consiste à récupérer l'ADN/ARN présent dans l'échantillon en effectuant une lyse des cellules. Plusieurs kits et plateformes (MaGNA Pure System de Roche ou easyMAG® de bioMérieux) (78) peuvent être utilisés selon le type d'échantillon. Les techniques sont surtout basées sur la séparation à l'aide de billes magnétiques et sur colonne (79–81).

Une fois extrait, l'ADN est purifié afin de retirer les potentiels inhibiteurs encore présents (82). Par exemple, l'acide humique est un inhibiteur connu de PCR, il est souvent retrouvé dans la couche supérieure des sols. Il agit comme quencher[k] sur la fluorescence par fixation à l'ADN polymérase ainsi qu'aux acides nucléiques (27). L'échantillon purifié est ensuite placé dans un thermocycleur afin de subir un nombre prédéterminé de cycles

[k] Quencher : entité moléculaire, ou une espèce chimique, capable de désactiver un état excité créé dans une entité moléculaire par transfert d'énergie, d'électron ou par un mécanisme chimique.

d'amplification (en général entre 30 et 40 cycles). C'est la PCR dite « classique » ou « en point final ». Une fois terminée, l'échantillon amplifié ou amplicon est déposé dans un gel d'agarose. Après électrophorèse, une bande marquée contenant l'amplicon doit migrer au niveau de la masse attendue par comparaison à un marqueur de masse moléculaire. L'apparition de la bande à la taille attendue témoigne de la présence de la cible dans l'échantillon de départ. Les étapes de pré-PCR (Figure 14) sont importantes car ce sont elles qui conditionnent la qualité de la PCR et par conséquent celle du résultat.

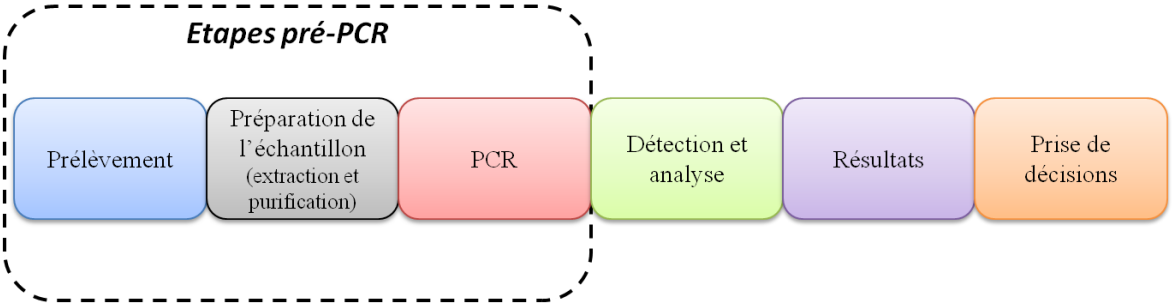


Figure 14 : Vue général du déroulement d'une analyse PCR lors d'une attaque bioterroriste permettant d'obtenir une qualité de résultat optimale – Adapté de (82)

La technique décrite précédemment peut prendre plusieurs heures à effectuer. La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) permet de s'affranchir de l'étape de migration sur gel d'agarose, ce qui représente un gain de temps considérable, soit environ une heure. Lors de cette qPCR des molécules fluorescentes sont ajoutées au milieu. Ainsi, la fluorescence proportionnelle au nombre de copie d'ADN formés, peut être lue à chaque cycle. Plusieurs systèmes peuvent être utilisés pour la détection du signal fluorescent en temps réel. Ils sont divisés en 2 groupes: les agents intercalants (SYBER green®, EvaGreen (83)**)** et les sondes (Taqman, Förster resonance energy transfer (FRET), Black Hole Quencher (BHQ), balises moléculaires, amorces scorpions, Locked Nucleic acid (LNA) et amorces Lux™) (84–89).

De plus, grâce à cette méthode, l'ADN amplifié peut être quantifié fournissant ainsi des informations sur la quantité présente dans l'échantillon de départ. Une autre méthode dérivée est la reverse transcription PCR (RT-PCR) qui permet de travailler sur l'ARN. Tout comme pour l'ADN, elle nécessite une extraction préalable de l'ARN, qui est différente et délicate à réaliser car l'ARN est beaucoup moins stable que l'ADN et se dégrade très rapidement. L'étape précédent la PCR consiste en une transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) suivi de l'amplification de ce dernier. Cette méthode permet notamment l'application de la PCR sur les virus à génome à ARN. De la même façon que précédemment les RT-PCR peuvent être « classiques » ou « en point final » mais également en temps réel (qRT-PCR).

Il existe plusieurs autres variantes de la PCR (nested PCR(90), NASBA® (91), rep-PCR (92)…) mais les plus couramment utilisées sont celles décrites ci-dessus.

2.2.3.2.1.2.3.2. Choix de la cible

La détection moléculaire d'un pathogène repose sur la mise en évidence de la présence d'un gène cible spécifique à tous les représentants de l'espèce recherchée (44**).** Les tests d'amplification comme la PCR ne vont permettre de détecter qu'une petite partie du génome du micro-organisme via l'amplification d'un ou plusieurs gènes. Le choix de ce(s) gène(s) va dépendre de plusieurs critères. Pour les bactéries, le gène le plus couramment utilisé est celui codant pour l'ARN ribosomal 16S (93). Ce gène est dit « conservé », c'est-à-dire que la séquence et la fonction ont été maintenues au cours de l'évolution de l'organisme. L'utilisation de ce type de gènes comme cible pour des tests d'identification permet de s'assurer du maintien de sa spécificité dans le temps. Cependant, bien que conservés, ces gènes peuvent être modifiés génétiquement afin de contourner les tests d'identification. C'est pourquoi, il est aussi important de cibler des gènes dits essentiels.

De part leur caractéristique indispensable à la survie de l'organisme, ces gènes ne peuvent être modifiés sans entrainer une perte ou une diminution d'une fonction vitale (44)**.** De plus, les techniques de biologie moléculaire permettent aussi de cibler les gènes dits de virulence et de résistance aux antibiotiques afin de distinguer les souches virulentes ou avirulentes et les résistantes des non résistantes au traitement. Ces deux paramètres sont très importants pour la prise en charge de la population dans le cas d'une dissémination de l'agent dans l'environnement.

Malgré toutes les cibles disponibles pour un organisme, la possibilité de modification génétique cumulée à la grande homologie existant entre les espèces d'un même genre, il est très difficile d'obtenir un test spécifique avec une seule cible. C'est pourquoi il est souvent recommandé de cumuler les cibles pour un même test en utilisant plusieurs paires d'amorces. Par exemple, *B. anthracis* est très proche génétiquement de *B. cereus* et *B. thuringiensis* (94)**.** La principale différence entre ces espèces est la présence, chez *B. anthracis,* de deux plasmides intervenant dans la pathogénicité: pXO1 et pXO2. pXO1 codent pour les 3 toxines responsables de l'œdème et la mort tandis que pXO2 codent pour les protéines de la capsule bactérienne (94,95)**.** Cependant, certaines études ont montré que des souches de *B. anthracis* pouvaient perdre le plasmide pXO2 diminuant ainsi la qualité de la détection (96)**.** De plus, il a aussi été démontré la présence des plasmides dans certaines souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis* diminuant ainsi la spécificité de cette cible (97)**.**

C'est pourquoi il est important de choisir un test ciblant plusieurs gènes de l'organisme afin de s'affranchir de toutes les possibilités de faux-négatifs pouvant être induit par un remaniement génétique, l'apparition d'une résistance, la non virulence d'une souche ou la présence d'une espèce environnementale apparentée. On parle donc de tests multiplexes.

2.2.3.2.1.2.3.3. Applications pour les agents du bioterrorisme et exemples de tests

Comme évoqué précédemment, de nombreux tests basés sur la technique de PCR ont été développés et commercialisés pour la détection des agents de la menace biologique suite aux attentats de 2001. On retrouve parmi eux des tests utilisés pour l'identification environnementale et ceux utilisés pour le diagnostic clinique chez l'homme ou chez l'animal. Seuls les tests pour l'identification dans des échantillons environnementaux seront détaillés ici. Au sein de cette catégorie, on retrouve les tests commercialisés et standardisés souvent utilisés sur le terrain et les tests dits « maisons » développés au sein des laboratoires et qui sont non commercialisés. Ce mélange représente un éventail de méthodes allant de la technique de paillasse à l'automatisation complète du processus de PCR incluant les étapes de pré-PCR. Le tableau suivant recensent, de façon non exhaustive, les techniques actuellement disponibles pour les différents agents des catégories A, B et C (classement CDC). Pour chaque agent, un ou plusieurs exemples de tests de PCR dits « maison » sont cités dans la littérature scientifique ainsi que des exemples de kits commerciaux validés pour la PCR mais aussi pour l'extraction de l'agent, à partir de diverses matrices environnementales spécifiques (Tableau 9).

Les résultats obtenus montrent qu'il existe de nombreuses méthodes de détection moléculaire basées sur la PCR pour des échantillons environnementaux. Ce nombre repose sur la disponibilité de techniques différentes évoquées précédemment mais surtout sur un large choix de cibles pouvant être utilisées pour chaque agent. Il existe néanmoins des pathogènes (*Chlamydia psittaci* ou certains virus de l'encéphalopathie équine (VEE) par exemple) pour lesquels la littérature ne rapporte l'existence de tests seulement pour une identification à partir de matrices biologiques humaines ou animales mais pas

environnementales. Ceci peut-être dû à ce que ces pathogènes ne représentent à ce jour sans doute pas une menace biologique de première importance.

Nous rappelons par ailleurs que ces techniques de biologie moléculaires se réalisent en deux voire trois étapes clé : l'extraction-purification du matériel génétique suivi de l'amplification, avec parfois une étape de transcription inverse préalable pour les génomes viraux à ARN. Au cours de chacune de ces étapes, l'opérateur peut contaminer l'échantillon avec les témoins positif par exemple ainsi que dégrader ou perdre le matériel génétique. Ceci rend l'ensemble des techniques de biologie moléculaire opérateur-dépendant.

L'ensemble de ces étapes peuvent être réalisées à l'aide de kits provenant de différents fournisseurs. Ces méthodes sont aussi souvent développées au sein même des laboratoires référents.

Enfin, malgré quelques exceptions (98–101) la plupart des tests ne sont développés que pour un seul agent (test en simplexe).

Tableau 9 : Tests d'identification basé sur l'amplification de l'ADN pour les pathogènes du bioterrorisme dans l'environnement – kit commerciaux de PCR nécessitant la réalisation extemporanée de l'extraction

Classe (CDC)	Pathogènes	Méthodes maisons		Kits commerciaux	
		Formes de dispersion	Références	Kits d'extraction	Kits de PCR
A	Arenavirus (Lassa)	Aérosols	(102,103)	/	/
A	*B. anthracis*	Aérosols (spore)	(101,104–108)	Sol (109) Air dans PBS, surface, poudre, IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	LightMix® kit *Bacillus anthracis* (111) TaqMan®*Bacillus anthracis* kit (112) *Bacillus anthracis* PCR Detection Kit (113) qPCR *Bacillus anthracis* (114) MBA[l] - Multiplex BioThreat Assay (115) JBAIDS system[m] (110) *Bacillus anthracis* DNA Real Time amplification kit (116)
A	*C. botulinum*	Nourriture Aérosols	(117–119)	Foodproof StarPrep Two Kit (120) Air dans PBS, sol, eau et feces: IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	Foodproof *Clostridium botulinum* Detection Kit (120) JBAIDS system (110)

[l] Le MBA- Multiplex Biothreat Assay permet la détection simultanée de 5 bactéries et 1 virus à l'aide de 16 signatures spécifiques

[m] JBAIDS système permet la détection de 14 organismes simultanément (virus et bactérie) à l'aide de 16 signatures. Les kits du test R.A.P.I.D® de BioFire™ diagnostic peuvent être adapté au JBAIDS afin de détecter la ricine, *E. coli* 0157.H7, *Cryptosporidium, Salmonella* spp *et Clostridium botulinium.*

A	Filovirus (Ebola Zaire, Soudan, Reston, Côte d'Ivoire Marburg)	Aérosols	(121–125)	IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	JBAIDS system (110) (Ebola et Marburg)
A	*F. tularensis*	Aérosols	(101,126–129)	(130) IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	LightMix® kit *Francisella tularensis* (111) TaqMan® *Francisella tularensis* kit (112) *q*PCR *Francisella tularensis*(114) MBA- Multiplex BioThreat Assay (115) JBAIDS system (110)
A	Variola major	Aérosols	(131,132)	Air dans PBS, poudre, surface: IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	MBA - Multiplex BioThreat Assay (115) JBAIDS system (110)
A	*Y. pestis*	Aérosols	(101,133,134)	(135) Air dans PBS, poudre, surface: IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	LightMix® kit *Yersinia pestis* (111) TaqMan® *Yersinia pestis* kit (112) MBA - Multiplex BioThreat Assay (115) JBAIDS system (110)

B	*Brucella* species	Aérosol Nourriture	(136,137)	IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	LightMix® kit *brucella genus* (111) TaqMan® *Brucella spp* kit (112) LSI VetMax™ *Brucella* real time PCR kit (112) Foodproof *Brucella* Detection Kit (120) JBAIDS system (110) *Brucella melitensis* Brucella species DNA Real Time amplification kit (116)
B	*B. mallei*	Sol	(138–142)		MBA - Multiplex BioThreat Assay (115) JBAIDS system (110)
B	*B. pseudomallei*				MBA - Multiplex BioThreat Assay (115) JBAIDS system (110)
B	*C. psittaci*	Aérosols	(143)		Que chez animaux BACTOTYPE® PCR Amplification Kit Chlamydia sp. (60)
B	*C. perfringens*	Nourriture	(99,144–147)		

		Aérosols			
B	*C. burnetii*	Aérosols	(148–150)	(151)	LSI VetMax™ *Coxiella burneii* real time PCR kit (112) (pour échantillons animaux) *q*PCR *Coxiella burneii* (114) JBAIDS system (110) Adiavet™ Cox Realtime
B	*E. coli* O157:H7	Nourriture ou eau	(56,61–67)	Foodproof Sample preparation kit I *E.Coli* (120) Foodproof StarPrep One kit *E.Coli* (120) Foodproof magnetic preparation kit I *E.Coli* (120) Aliment[n]: IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	TaqMan® *E. Coli 0157.H7* kit (112) MicroSEQ® *E. coli 0157.H7* (112) LSI VetMax™ *STX2 assay* (112) Foodproof *E. coli 0157.H7* Detection Kit (120) *q*PCR *E. Coli 0157.H7* (114) JBAIDS system (110)

[n] Testé pour : lait, salade, bœuf haché et thon

B	*S. typhi*	Nourriture ou eau	(98–100,152–157)	Foodproof short preparation I kit *Salmonella* (120) Foodproof Sample preparation kit I *Salmonella* (120) Foodproof StarPrep One kit *Salmonella* (120) Foodproof magnetic preparation kit I *Salmonella 8* Aliment et eau: IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	LightMix® kit *Salmonella spp* (111) TaqMan® *Salmonella spp k*it (112) MicroSEQ® *Salmonella spp* (112) Foodproof *Salmonella* Detection Kit (120) JBAIDS system (110)
B	*Salmonella* species				
B	*Shigella* species	Nourriture ou eau	(98–100,152)	Foodproof Sample preparation kit I *Shigella* (120) Foodproof StarPrep One kit *Shigella* (120) Foodproof magnetic preparation kit I *Shigella* (120)	Foodproof *Shigella* Detection Kit (120) *Mericon* Shigella spp Kit (158)
B	Ricine extraite de *Ricinus communis*		Détection du gène qui produit la ricine : (159,160)	Air dans PBS, poudre, surface: IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	JBAIDS system (110)
B	Entérotoxine B du	Nourriture	(161,162)		

	Staphylocoque (SEB)				
B	*R. prowazekii*	Aérosols	(163)	Surface, poudre et air dans PBS: IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (164)	JBAIDS system(110)
	WEE, EEE et VEE	Aérosols	(165)	Surface, poudre et air dans PBS: IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (164)	JBAIDS system (110) (EEE, WEE, VEE) qPCR Western equine encephalomyelitis virus (114)
B	*V.cholerae*	Nourriture ou eau	(99,166–170)		TaqMan® Vibrio cholerae assay bead (112) Vibrio cholerae DNA Real Time amplification kit (116)
B	*C. parvum*	Eau	(171–176)	Eau: IT 1-2-3™ Sample Purification Kits (110)	LSI VetMax™ *Cryptosporidium parvum* real time PCR (112) *q*PCR *Cryptosporidium* (114) JBAIDS system (110)
C	Maladies infectieuses émergentes comme le virus de Nipah et les hantavirus		(177)		AmpliSens Hantavirus -EPh PCR kit (116)

Afin de faciliter l'utilisation de ces tests, plusieurs systèmes permettent aujourd'hui la réalisation de l'ensemble des étapes par un seul et même appareil. Quelques exemples sont décrits ici (Tableau 10). Plusieurs paramètres sont décrits pour chacun des outils incluant la rapidité d'analyse, la facilité de préparation et d'utilisation du matériel, la conservation des réactifs, les cibles et les matrices visées ainsi que la facilité d'interprétation des résultats. Ces facteurs sont essentiels pour une analyse de terrain. Dans un second temps, le type de méthode, les données de sensibilité, spécificité, limites de détection, le coût et la possibilité d'utilisation de kit d'entrainement sont aussi des critères utiles pour distinguer ces différents systèmes et ces paramètres sont cités lorsque les données sont disponibles.

Tous les tests présentés (Tableau 10) proviennent de différents fabricants, et bien que basés sur la technique de PCR, chacun d'entre eux utilisent un format différent. Des formats Taqman® sont utilisés pour le Razor® Ex de BioFire, le T-COR4™ de Tétracore ainsi que le FireFly Dx de positive ID corp. Le Filmarray® de Biofire utilise une PCR nichée tandis que le Bioseeq® plus de Smith detection met en œuvre une LATE-PCR et que Cepheid® opte pour un choix de balises moléculaires. Enfin, le M-Band de positive ID corp choisi de combiner la qPCR Taqman® à une technique immunologique comme l'ELISA sandwich pour l'identification des toxines. Les temps d'analyse sont variables allant de 15 minutes pour le plus rapide, le FireFly à 3-6 heures pour le M-Band qui effectue des mesures en continue dans l'air. Pour des PCR dites « classiques » les durées d'analyse annoncées sont de l'ordre de 30 à 60 min (Tableau 10). De plus, toutes ces méthodes utilisent un système de cassette recueillant le prélèvement qui est ensuite introduit dans l'appareil d'analyse. Elles ont également toutes l'avantage de combiner l'extraction, la purification, la PCR et l'analyse réduisant ainsi le risque de contamination et la durée totale d'analyse. Les étapes sont automatisées et facilitent le travail du manipulateur. Quelques méthodes (Filmarray®, Razor® Ex et T-COR4™) nécessitent

toutefois une préparation rapide de l'échantillon qui consiste à le diluer dans un tampon puis à transférer cette solution dans les puits d'analyse. Cette manipulation supplémentaire impliquerait une manipulation dans le véhicule et non directement sur le terrain. En revanche, pour les systèmes comme le Bioseeq® et le FireFly Dx, comme il n'y a pas de préparation manuelle de l'échantillon, l'analyse peut être réalisée sur place à l'aide de l'appareil d'analyse portable. Pour le format GeneXpert®, le prélèvement est récupéré par un écouvillon qui est ensuite introduit dans une cartouche compartimentée. L'appareil d'analyse n'étant pas portable, le prélèvement ou la cartouche doit être acheminée jusqu'au véhicule.

De plus, il est important de noter que les réactifs sont contenus dans les cartouches du système GeneXpert® qui peuvent être conservées à température ambiante diminuant ainsi la part de l'intervention humaine pour la préparation.

L'analyse des données est en général facile puisque la réponse est binaire : résultat positif ou négatif. Le résultat est affiché dans la plupart des cas directement sur l'appareil, excepté pour le GeneXpert® où un ordinateur qui pilote le système est nécessaire ainsi que pour le M-Band où les résultats sont disponibles sur un réseau protégé.

Concernant les matrices, la plupart des tests permettent d'analyser des poudres, des liquides ou des surfaces. Aucune donnée n'est disponible pour le FireFly Dx concernant les cibles et les matrices.

Un autre paramètre important est le nombre d'agents et/ou de cibles moléculaires cherchés en une seule analyse. Un test est dit « simplexe » lorsqu'une seule paire d'amorces est utilisée, tandis qu'un test « multiplexe » met en œuvre plusieurs couples d'amorces dans le même mélange et permet donc la détection simultanée soit de plusieurs gènes d'un même agent biologique, soit plusieurs agents biologiques.

Parmi les tests multiplexes on distingue le M-Band et le Film array® dans lesquels un seul échantillon est utilisé pour plusieurs analyses. Ainsi, plusieurs cibles sont recherchés notamment pour le Film array® criblant 17 pathogènes. Pour les tests simplexes, on retrouve le GeneXpert® et le T-COR4™ utilisant une cartouche par cible, 4 boitiers pouvant être lu en parallèle. Cependant, alors que le GeneXpert® est un appareil qui peut mesurer plusieurs longueurs d'ondes de fluorescence et donc peut être utilisé pour des tests multiplexes, un seul test est commercialisé pour le moment qui permet seulement la détection de *B. anthracis*. Le RAZOR® Ex fonctionne sur le principe d'une cassette ou cartouche à plusieurs puits, chacune pour une cible et certains de ces des puits sont réservés aux contrôles positifs et négatifs. Enfin le BioSeeq® fait intervenir des petites « dosettes » permettant le prélèvement, qui sont ensuite connectées à l'appareil. Une « dosette » par cible est utilisée et l'appareil peut analyser jusqu'à six « dosettes » en parallèle.

Concernant les critères de sensibilité, de spécificité et de limite de détection, il est très difficile de comparer les tests entre eux. D'une part, les données de performances ne sont pas toutes publiées et d'autre part ces tests n'ont pas été réalisés dans les mêmes conditions : souches pathogènes, matrices environnementales, contaminants, inhibiteurs, De plus, le test Film array® par exemple, n'est pas validé par la FDA pour le moment. Par ailleurs, des produits comme le RAZOR® Ex, équipant les forces armées américaines ne sont pas commercialisés en dehors des Etats-Unis.

Enfin, une autre considération majeure est le prix de ces tests. Globalement, les prix des appareils (thermocycleurs) avoisinent la dizaine de milliers d'euros exceptés le GeneXpert®, beaucoup plus cher. Le prix des cartouches varie quant à lui de 5USD à 200USD pour le RAZOR® Ex. Cependant, la comparaison des prix d'une cartouche du

GeneXpert® (70USD) ne visant qu'une cible à celle du T-COR4™ utilisant le même principe et le même nombre de cibles (30USD) ou encore à celle du RAZOR® Ex (200USD pour 10 cibles soit 20USD/cible) montre les disparités selon le type de produit. Par ailleurs, les fournisseurs proposent des prix en fonction de la quantité commandée, ce qui explique que les prix sont souvent, dans ce domaine, beaucoup plus élevés que ceux proposés pour les tests de dépistage hospitaliers pour les agents biologiques communautaires, même si les fournisseurs sont les mêmes et mêmes si les produits mettent en œuvre les mêmes technologies.

Avec les données disponibles actuellement, la comparaison des méthodes se ferait donc sur plusieurs critères notamment la facilité d'utilisation, le nombre de cibles, le coût et la disponibilité sur le marché.

Tableau 10 : Tableau comparatif des différents kits commerciaux selon différents critères

Matériels / kits commerciaux	Kits commerciaux	Film Array®	RAZOR® Ex	GeneXpert®	Bio-seeq™ Plus	T-COR 4™	M-Band	FireFly Dx
	Fabricant	BioFire Diagnostics (Idaho technology) / bioMérieux http://www.biofiredefense.com/	BioFire Diagnostics (Idaho technology) / bioMérieux http://www.biofiredefense.com/	Cepheid http://www.cepheid.com	Smith detetction http://www.smithsdetection.com	Tetracore® http://www.tetracore.com/t-cor/index.html	Positive ID corp http://www.positiveidcorp.com	Positive ID corp http://www.positiveidcorp.com
Caractéristiques	**Méthode**	PCR nichée	qPCR (TaqMan®, HybProbe®)	qPCR (balises moléculaires)	Linear After the Exponential Polymerase Chain Reaction (LATE-PCR™)	TaqMan®	TaqMan® -qPCR & immunologique (sandwich)	TaqMan®
	Rapidité d'analyse	~1h	~30min	30-40 min	~50min	~45min	3-6h	~15min
	Facilité de préparation et d'utilisation	- Extraction, purification et PCR dans le même appareil sans intervention du manipulateur entre les étapes - Très peu de manipulations - 2 min de préparation de l'échantillon	- Extraction, purification et PCR dans le même appareil sans intervention du manipulateur entre les étapes - Très peu de manipulations - 5 min de préparation de l'échantillon	- Extraction, purification et PCR dans le même appareil sans intervention du manipulateur entre les étapes - Très peu de manipulations - Pas de préparation de l'échantillon	- Extraction, purification et PCR dans le même appareil sans intervention du manipulateur entre les étapes - Très peu de manipulations - Pas de préparation de l'échantillon	- Extraction, purification et PCR dans le même appareil sans intervention du manipulateur entre les étapes - Quelques manipulations supplémentaires - Préparation de l'échantillon avec kit non fourni puis pipetage de 30 µL à	Automatisé – Combine l'extraction, la purification et la PCR (microfluidique)	Combine l'extraction, la purification et la PCR

						faire pour l'essai		
	Utilisation sur le terrain	Cassette à remplir dans le laboratoire mobile	Appareil transportable mais cassette à remplir dans le laboratoire mobile	Analyse dans le laboratoire mobile mais la cartouche contenant les réactifs est transportable	Le prélèvement se fait directement par pipetage et injection dans l'appareil qui est transportable	Boitier type GeneXpert® de Cepheid	Oui en extérieur ou intérieur	Développé pour de la détection par du personnel peu formé
	Appareillage	Oui, branché sur secteur avec ordinateur	Oui, sur batteries rechargeables (8 analyses/ charge) – Pas d'ordinateur	Oui, branché sur secteur avec ordinateur	Oui, sur batteries rechargeable (60 tests/charge) – Pas d'ordinateurs	Oui, sur batteries rechargeable (autonomie de 8h) – Pas besoin d'ordinateur	Oui, encombrant, plus d'un mètre de haut	Oui, taille d'un téléphone portable
	Réactifs	Lyophilisé donc stable à température ambiante Tout le petit matériel (seringues…) est fourni	Lyophilisé donc stable à température ambiante Tout le petit matériel (seringues…) est fourni	Lyophilisé donc stable à température ambiante	Peut être conservé de +2°C à +35°C	Lyophilisé donc stable à température ambiante	Autonome pour 248 analyses (8/jour pendant 30 jours) – Stockés dans l'appareil	Chargés dans l'appareil
	Cibles et matrices	Multiplexe : 17 pathogènes[o]	Cibles: RAZOR™ System 10 Target Screen Kit[p] avec contrôles positifs et negatifs – 1 cassette à remplir avec échantillon pour chaque puits	1 pathogène (*BA* souche Aimes, 4 cibles) Matrices : liquides, poudres, surfaces	6 essais indépendants en simultanée Cibles : *BA*, *FT*, Orthopox, *YP* Matrices : poudres et liquides concentrés récupérés par un	1 boitier/ cible: *BA*, *Brucella* spp, *FT*, *YP*, orthopox, Rc, Tox Bot, SEB, *Burkholderia*, VEE Matrices : liquides, poudres, surfaces	Collecteur d'air – detection multiplexe *BA*, *YP*,Rc, Tox Bot, SEB, *Burkholderia*, VEE	Echantillons environnementaux

[o] *BA*, *YP*, *FT*, *Brucella* spp., *C. botulinum*, *Bukholderia* spp., *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., *Rickettsia prowazekii*, variola major, orthopox, EEE, VEE, WEE, Ebola Zaire, virus de Marburg, Rc, SEB

[p] *BA*, *Brucella melitensis*, *C. botulinum* (A), *Coxiella*, *E. coli* 0157, *FT*, *YP*, V. major, Rc, *Salmonella*

			Matrices: liquides, poudres, surfaces		collecteur			
	Interprétation des résultats	Interprétation effectuée par l'appareil – Réponse binaire : détecté ou non détecté Données exportables	Interprétation effectuée par l'appareil – Réponse binaire : détecté ou non détecté Données exportables	Interprétation effectuée par l'appareil – Réponse binaire : positif ou négatif – Possibilité d'obtenir les courbes de qPCR Données exportables	Données exportables	Pas d'ordinateur nécessaire, lecture directe mais ordinateur peut être ajouté en option	Résultats disponibles en temps réel sur un réseau protégé	Les résultats peuvent être analysés sur téléphone portable ou ordinateur (bluetooth)
	Sensibilité / Spécificité	- Sensibilité : 250 GE[q] - Spécificité : pas de faux positifs dans les échantillons testés	- Spécificité : moins de 1% de faux positifs	Spécificité : faux négatifs pour certaines souches de *BA*. Mais pas de faux positif pour d'autres espèces *Bacillus*	Spécificité (178)	ND	ND	ND
	Limite de détection	5 GE/µL	100 CFU/mL	68 CFU/mL (=148 spores/ml)	*B. anthracis* : 100 spores *F. tularensis* : 1 CFU / 30 copies *Y. pestis* : 100 CFU / 125 copies	ND	ND	ND
	Coût	Instrument : 49500USD Cartouche : 180 USD	Instrument : 38500USD Cartouche : 200USD	Instrument : 136000USD Cartouche : 70USD	Instrument : 37200USD Cartouche : 30USD	Instrument : 16000USD Cartouche : 12USD	ND	Instrument : 49500USD Cartouche : 180 USD

[q] GE : Génome équivalent = nombre de copie de génome

		l'une (1 essai)	l'une (1 essai)	l'une (1 essai)	l'une	l'une		l'une (1 essai)
	Kit d'entrainement	Oui	Oui	ND	Oui	ND	ND	Oui
	Commentaires	Kit agents du bioterrorisme non validé par FDA Il existe 2 panels pour les virus respiratoires et gastro-intestinaux validés par la FDA	- Equipe déjà les forces militaires américaines -RAZOR Training Pouch, RAZOR Yeast Kit, RAZOR BA3 Target Kit, RAZOR Food Screen 3 Target Kit and RAZOR Water Screen 3 Target Kit. - Uniquement disponible pour le gouvernement américain	Ne détecte qu'une seule souche de *B. anthracis* (Ames), faux négatifs avec d'autres souches (*B. anthracis* Sterne par exemple)	/	- Kit de collection environnemental disponible	Collecteur d'air combinant la détection par PCR et immunologique pour les toxines – Appareil de détection continue	Kit agents du bioterrorisme non validé par FDA Il existe 2 panels pour les virus respiratoires et gastro-intestinaux validés par la FDA
	Références bibliographiques	(110,179,180)	(180,181)	(180,182,183)	(178,180,184,185)	(180,186)	(187–189)	(190,191)

BA: B. anthracis, YP: Y. pestis, FT : F. tularensis, Rc : ricine, SEB : toxine staphylococcique, Tox Bot : toxine botulique, orthopox: orthopoxvirus, ND : données non disponibles

2.2.3.2.1.2.3.4. Avantages et inconvénients

Dans le domaine de la détection des agents du bioterrorisme, les méthodes d'analyses doivent impérativement être rapides, sensibles et spécifiques. Celles basées sur la PCR répondaient à ces critères et se sont développées puis sont devenues indispensables grâce à leur capacité à cibler spécifiquement un organisme, leur rapidité croissante d'exécution des analyses et leur faible limite de détection (77,82,192,193).

La PCR est une technique très sensible qui permet d'obtenir rapidement de grandes quantités d'ADN à partir d'un prélèvement ne contenant que quelques copies d'ADN matriciel et même à partir d'ADN dégradé. Elle peut s'avérer très utile pour le diagnostic de terrain des agents du bioterrorisme. En effet, la manipulation ces organismes requérant un travail en milieu confiné de type 3 ou 4, il est souvent difficile d'exporter des méthodes comme la culture ou l'inoculation à l'animal sur le terrain. Cependant, cette technique possède des limites qui sont paradoxalement les conséquences de ses propres avantages. Du fait de sa sensibilité, une contamination du poste de travail, des matériels, pipettes et embouts de pipettes, des réactifs, et du manipulateur par notamment les témoins positifs peut être à l'origine de faux positifs. Un autre inconvénient relatif à la manipulation est l'inhibition de la polymérase par des substances contenues dans l'échantillon. Il en découle l'obligation de pré-traitement (extraction de l'ADN et purification) de l'échantillon avant son utilisation pour la PCR. De ce fait, l'étape de PCR doit toujours être précédée de l'étape d'extraction qui est le plus souvent réalisée dans les laboratoires de façon manuelle. L'extraction est une étape courte mais qui devient laborieuse lorsque plusieurs échantillons doivent être traités. De plus, les résultats peuvent variés d'un manipulateur à l'autre et des contaminations peuvent être introduites. Toutes ces manipulations supplémentaires entrainent également une augmentation du coût de la PCR. Celui-ci ayant été évalué à 125USD par réaction en moyenne (77,192), avec des prix plus élevés pour les techniques

utilisant de la fluorescence, il reste plus cher qu'une technique conventionnelle. Cependant les possibilités de multiplexage permettent de réduire les coûts et apporte un gain de temps considérable, jusqu'à plusieurs heures.

Un autre aspect limitatif de la PCR est que cette méthode ne détecte que les acides nucléiques et par conséquent ne permettrait pas la distinction entre un agent du bioterrorisme et une bactérie chez qui on aurait cloné la portion du gène cible par exemple. La réponse résiderait sans doute dans le principe de ne pas rendre public les couples d'amorces utilisés pour les PCR, ce qui n'est pas le cas des kits commercialisés. Nous pouvons tout à fait imaginer un individu malveillant, désirant créer le désordre mais n'ayant pas accès à des ressources biologiques pathogènes, faire synthétiser les portions de gènes correspondant aux cibles des PCR et les cloner dans une bactérie non pathogène telle qu'*E. coli*. Pour réaliser de tels clonages, des kits performants et faciles d'utilisation sont commercialisés, ce qui fait que cette technique est à portée de main de tout étudiant en biologie.

Les méthodes développées par les laboratoires spécialisés et non commercialisées ont pour avantage de permettre de conserver une certaine confidentialité des gènes cibles et des couples d'amorces utilisés. En revanche, ces méthodes de PCR dites « maisons » sont moins automatisées. Les tests de stabilité à température ambiante n'ayant souvent pas été réalisés, les réactifs sont stockés séparément à des températures différentes (-20°C pour les couples d'amorces par exemple, -80°C pour les témoins d'extraction, +4°C pour les enzymes lyophilisées, température ambiante pour les différents tampons de lyse et d'élution) et une préparation de l'échantillon et des réactifs est nécessaire et ne peut se réaliser seulement dans des conditions relevant des bonnes pratiques de laboratoire par des techniciens entraînés : en effet, la préparation du mélange de réactifs doit être faite à distance avant l'ajout d'ADN afin de ne pas contaminer les réactifs (194). Les laboratoires

doivent donc être séparés physiquement : c'est la sectorisation. De plus, il est encore plus important de séparer l'endroit où est réalisée l'amplification, car le déversement accidentel du tube contenant l'amplicon créerait un aérosol contaminant durablement le local et les appareils. Les pièces de préparation des pré- et post-PCR doivent ainsi impérativement être séparées (195). Ce type de manipulation nécessite l'utilisation de hôtes dédiés et la mise en place d'un sens de circulation, l'utilisation de lieux de stockage différents pour les produits contenant de l'ADN et ceux n'en contenant pas ainsi que pour le matériel dédié. Les kits commerciaux disponibles (Tableau 10) permettent de résoudre en grande partie ces problèmes grâce à l'automatisation des étapes et à la lyophilisation des réactifs. Même si certains tests nécessitent une préparation, celle-ci est plus aisément réalisable dans un véhicule mobile par du personnel peu formé. Le principal problème des kits commerciaux est l'accessibilité aux données de performances, au marché et le nombre limité de cibles pour certains d'entre eux.

2.2.3.2.1.2.4. Le séquençage

Le séquençage est une méthode permettant de déterminer la séquence en acide nucléiques. Selon la méthode utilisée on peut décoder des séquences plus ou moins longues allant de quelques centaines de paires de bases, c'est-à-dire une portion de gêne, au génome entier. Dans le premier cas, les cibles recherchées sont souvent des gènes impliqués dans les phénomènes de résistances mais également les gènes d'identification comme l'ARN ribosomique 16S pour les bactéries. Ce type de séquençage est aussi beaucoup utilisé pour les méthodes de clonage afin de vérifier la validité de la transformation.

Les techniques de séquençage sont apparues dans les années 1970 avec la méthode dite de Sanger utilisant la technologie des terminateurs (196). Cependant, cette technique ne permet un rendement que de 1 mégabases de données (Tableau 11) ainsi que la réalisation

de tests simplexes uniquement. Depuis, cette technique dite de première génération a été continuellement améliorée jusqu'à l'apparition de la seconde génération représentée par la technologie du séquençage par synthèse (454-pyroséquençage, Solexa ou encore l'ABI-ligation (Tableau 11)), générant une quantité de données beaucoup plus importante (Tableau 11) et permettant un séquençage rapide, complet, de plusieurs génomes simultanément (197).

Tableau 11 : Comparaison des différentes techniques de séquençage selon la technologie, l'approche, la performance de lecture et le coût (197,198)

	Compagnies et sites web	Technologies	Approches	Nombre de paire de bases par run	Coût de l'appareil
1ère génération	Applied Biosystem http://www.appliedbiosystems.com	Séquenceur Sanger ABI3730xl	Synthèse en présence de terminateurs marqués	96kb	365 000USD[r] - 130 000USD[s]
2ème génération	Roche Applied Science www.roche-applied-science.com	454/Roche FLX system	Pyroséquençage	80-120 Mb	500 000USD
	Illumina, Inc http://www.illumina.com/	Illumina/Solexa	Séquençage par synthèse avec terminateurs réversibles	1 Gb	430 000USD
	Applied Biosystem http://www.appliedbiosystems.com	ABI/Solid	Séquençage parallèle par ligation	1-3 Gb	591 000USD

Kb= kilo-bases Mb= Méga-bases Gb= Giga-bases

[r] Prix en 2006
[s] Prix en 2007

La préparation de l'échantillon au séquençage, comme pour la PCR, nécessite une extraction préalable et une purification de l'ADN. Puis la préparation diffère selon le type de méthode choisie. Par exemple, la technologie Sanger, ne permettant de cibler qu'une petite partie de l'ADN, se déroule en 2 étapes : une première étape d'amplification et purification de la région d'intérêt suivie d'une seconde étape de séquençage de cette région. Quant aux méthodes de nouvelle génération, comme celle du Solexa d'Illumina, une première étape de fragmentation de l'ADN est réalisée, suivie d'une étape de ligation à des molécules permettant la détection sur le séquenceur. Les produits ligués sont ensuite amplifiés et séquencés. Selon la taille de la séquence à analyser, le temps de rendu des résultats peut varier de quelques heures pour la méthode de Sanger, à plusieurs jours pour le Hiseeq®2500 d'Illumina. Les données extraites sont dites « brutes », car disponibles sous forme de séquences, une analyse bio-informatique nécessitant une grande expertise dans le domaine est requise. Enfin, un des derniers paramètres importants à prendre en compte pour le séquençage sont les coûts de l'appareillage et des réactifs qui avoisinent le millier de dollars. De façon appliquée, le séquençage est surtout utilisé pour la comparaison de séquences entre plusieurs pathogènes afin de mettre en évidence des mutations ayant un impact sur la physiopathologie du micro-organisme. Elle peut aussi être utile dans la recherche de nouveaux pathogènes inconnus. Dans le cadre du bioterrorisme, le séquençage d'ADN ou d'ARN présent dans un échantillon peut permettre de mettre en évidence des signatures spécifiques d'un pathogène (exemple : CRISPR[t], ARN ribosomique 16S différent d'une espèce à l'autre) (199,200) témoignant ainsi de sa présence. Il pourrait aussi être utilisé afin d'associer à l'identification de pathogènes, la mise en évidence de résistances aux traitements par l'identification de mutations connues

[t] CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Représente une famille de courtes et régulièrement espacées séquences répétées

mais aussi à évaluer la virulence (gènes spécifiques connus). Ainsi, le séquençage de l'ensemble du matériel génétique présent dans un prélèvement permettrait aux autorités de ne pas se limiter à la liste des seuls agents biologiques relevant du bioterrorisme mais de mettre en évidence la présence de tout autre agent biologique potentiellement pathogène voire d'une nouvelle espèce non encore décrite. Ces méthodes sont non ciblées et concernent un spectre très large voire illimité d'agents. Par leur puissance croissante due à la progression de la bioinformatique, elles sont très probablement la solution d'avenir de la détection biologique.

En ce qui concerne les agents pathogènes figurant sur la liste du CDC, les séquences de leurs génomes complets sont publiées et disponibles sur des serveurs informatiques. Elles peuvent servir de référence en cas de comparaison (201–207).

Cependant, l'hyper-spécialisation requise pour le traitement des données informatiques, la durée et la technique nécessaire pour la préparation de l'échantillon, le délai de rendu et d'analyse des résultats ainsi que le prix de l'appareil et des réactifs ne permettent pas à ce jour d'envisager l'utilisation d'une telle technologie dans un laboratoire mobile destiné à de la détection rapide de terrain. Toutefois, la progression exponentielle de ces technologies et des bases de données laisse imaginer une automatisation et une miniaturisation dans un délai court de ces outils et du traitement des données, permettant probablement dans la décennie prochaine de voir des automates de séquençage être utilisés en routine dans les laboratoires de biologie dans un premier temps, et pourquoi par à terme en laboratoire mobile.

2.2.3.2.1.2.5. Les tests immunologiques

Les immunoessais ou tests immunologiques permettent d'identifier ou de quantifier la présence d'antigènes et/ou d'anticorps dans un échantillon donné (208). Les antigènes sont

des protéines, polysaccharides ou dérivés lipidiques exprimés ou sécrétés par un organisme étranger à l'hôte, dont les cellules du système immunitaire les reconnaissent et déclenchent la production d'anticorps spécifiques (Figure 15).

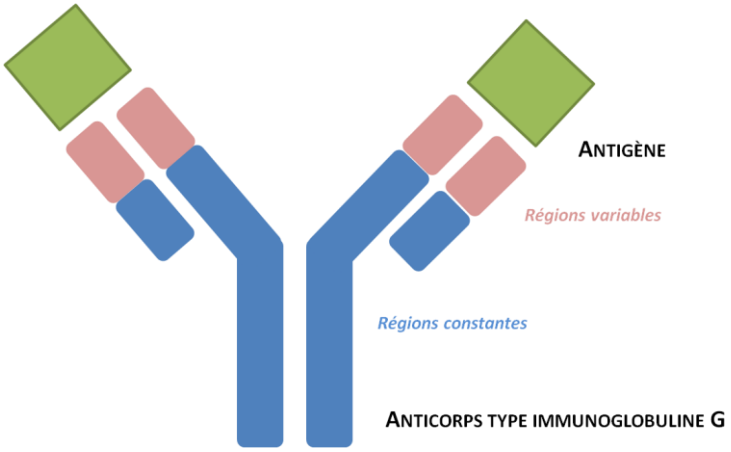


Figure 15 : Schématisation de l'interaction d'un anticorps (immunoglobuline G) et de ces antigènes spécifiques

2.2.3.2.1.2.5.1. Choix de la cible

Dans le cas d'échantillons environnementaux, il sera surtout recherché la présence de ces antigènes exprimés à la surface des agents biologiques ou sécrétés par ces derniers. Chaque agent en possède plusieurs qui lui sont spécifiques et qui sont reconnus par des protéines : les anticorps ou immunoglobulines. Issus de la réponse immunitaire de l'hôte, ces anticorps peuvent aujourd'hui être produits de manière industrielle et même être modifiés artificiellement.

2.2.3.2.1.2.5.2. Les différents tests

Il existe actuellement plusieurs méthodes de révélation permettant de détecter le complexe antigène-anticorps formé. La technique la plus ancienne, appelée radio-immunoassay (RIA), mettant en jeu des composés radioactifs a été supplantée par les méthodes immuno-enzymatiques (enzyme immunoassay ou EIA) dont la plus utilisée est le test immuno-

enzymatique sur support solide par adsoption (enzyme-linked immunosorbent assay ou ELISA) (209,210). Cette méthode met en jeu deux anticorps différents, un de capture fixé sur un support et un autre de révélation couplé à un substrat chromogénique (Figure 16).

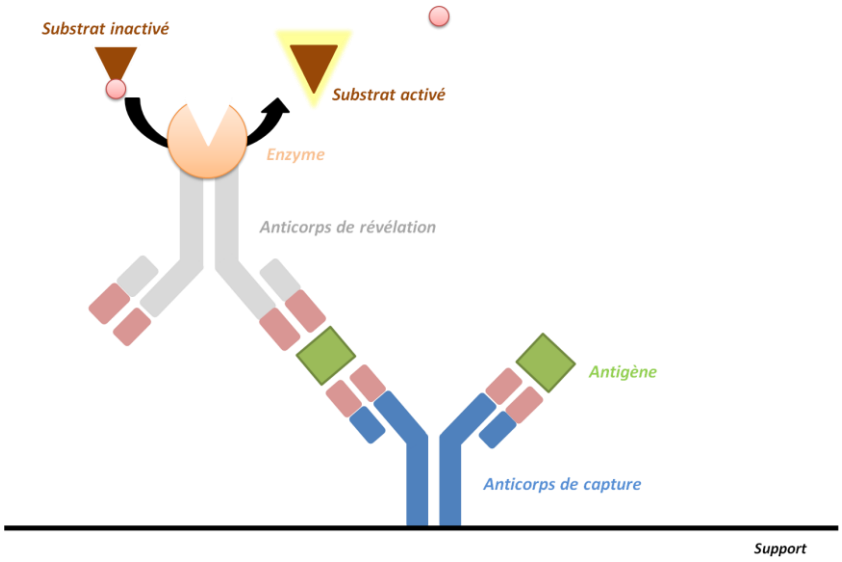


Figure 16 : exemple de réaction sandwich ELISA avec son anticorps de capture et de détection couplé à une enzyme (par exemple péroxydase). Après ajout du substrat (par exemple diamino-3,3'benzidine), celui-ci au contact de l'enzyme va se colorer.

Aujourd'hui, il existe plusieurs formats de tests d'immunodétection utilisant des nouvelles technologies de détection comme la chimiluminescence ou la fluorescence (immunofluorescence directe ou indirecte, time-resolved fluorescence ou TRF (211)) mais dont le principe repose sur la technologie ELISA. L'arsenal a ensuite été complété par l'apparition de nouveaux supports. Il existe comme supports, des billes magnétiques sur lesquelles sont greffés des anticorps de capture développés notamment par la technologie xMAP® de Luminex® (212) et qui reposent sur une séparation immunomagnétique (213) mais aussi des colonnes sur lesquelles sont greffés des anticorps de capture spécifique (214). Un autre support, davantage connu en matière de détection immunologique rapide, est le test immuno-chromatographique (ICT). Ce principe est retrouvé dans de nombreux tests diagnostiques dont le plus connu est le test de grossesse pour la détection de

l'hormone β-HCG. La Figure 17 ci-dessous décrit le mode d'action général de ce test avec, l'apprêtement des différentes couches sur la bandelette.

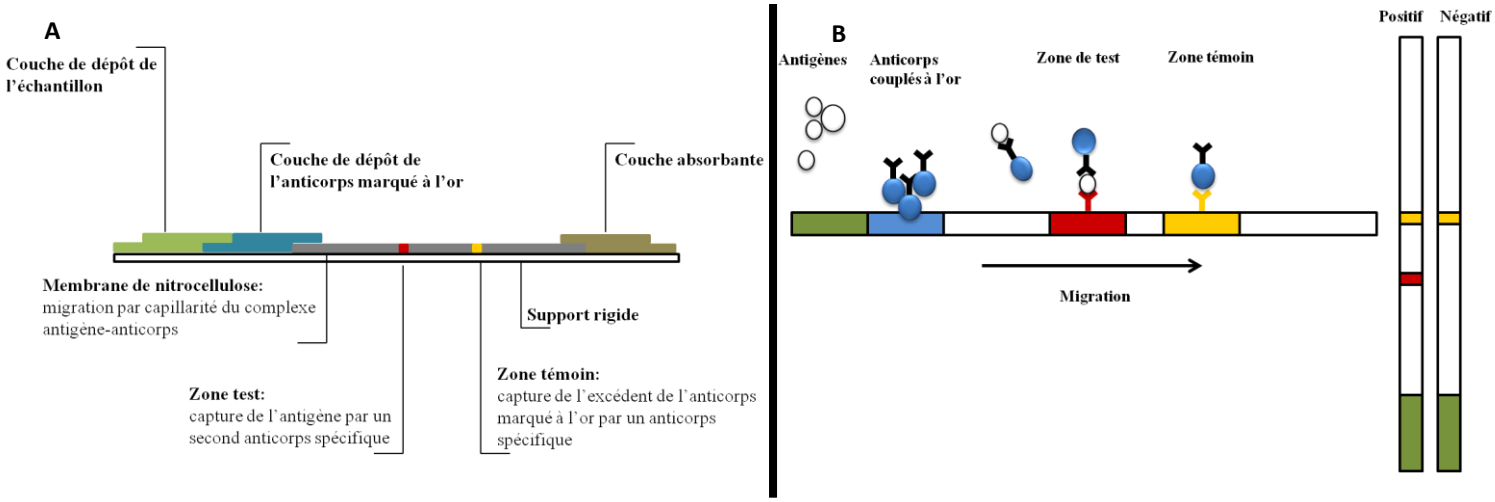


Figure 17 : Schéma de fonctionnement général d'un test immunochromatographique – (A) Différentes parties de la bandelette – (B) Principe de la détection et lecture de la bande (résultat positif et négatif)

Les tests utilisant ce format sont rapides, de l'ordre de quelques minutes, et ne nécessitent comme étape préliminaire que la dilution-dissolution de l'échantillon dans un tampon de migration. La lecture se fait à l'œil nu et l'interprétation du résultat ne nécessite pas de formation particulière. La réponse est binaire : résultat positif (apparition de la bande rouge) ou négatif (pas de bande). Un contrôle (bande jaune) est ajouté afin de valider le test. Si cette bande n'apparaît pas, le test n'est pas interprétable, il doit être répété.

D'une manière générale, l'efficacité d'un test d'immuno-détection dépend de deux facteurs : d'une part l'efficacité de la formation du complexe antigène-anticorps c'est-à-dire l'affinité de l'anticorps pour son antigène et, d'autre part, la méthode de détection.

2.2.3.2.1.2.5.3. Application pour les agents du bioterrorisme et exemples de tests

Comme pour les tests de biologie moléculaire, il existe de nombreux tests immunologiques non commercialisés permettant l'identification des agents du bioterrorisme. Cependant, ces tests sont souvent basés sur les techniques ELISA standard (type sandwich) non automatisées, nécessitant alors une préparation longue (temps d'incubation, lavages…) ainsi qu'un savoir-faire. De plus, beaucoup de ces tests sont développés dans un but diagnostique à partir de matrices biologiques telles que le sang ou les urines. Actuellement sur le marché, la majorité des tests permettant une détection environnementale sont basés sur le principe de l'ICT décrit précédemment (39). Les principales caractéristiques des tests les plus connus sont décrites dans le tableau ci-dessous (Tableau 12).

Les tests présentés proviennent tous de différents fabricants qui annoncent un temps d'analyse compris entre 15 et 20 minutes. Leur format ICT permet une utilisation sur le terrain et une prise en main facilitée. Tous les réactifs sont fournis à l'achat des tests et un kit d'entrainement est disponible pour chacun de ceux-ci. Le format général est de type « cassette » (Figure 18 A) et les matrices sont de types poudres, liquides et surfaces. Les échantillons sont prélevés via un écouvillon stérile ; celui-ci est ensuite rincé dans un tampon afin d'obtenir le produit sous forme liquide facilement applicable sur la « cassette ». (Figure 18 B). Le dépôt nécessite en général de petites quantités, quelques gouttes, soit l'équivalent de 100-300 µL selon les tests.

D'autres formats peuvent aussi être utilisés, comme celui du IMASS™ Biothreat de BBI détection. Les bandelettes sont contenues non pas dans une « cassette » mais dans un tube rigide translucide, permettant la lecture des bandes, terminé par une extrémité en éponge permettant le prélèvement, suivi de la migration sur les bandelettes (Figure 18 C et D).

Tableau 12 : Principales caractéristiques des tests immunologiques (*BA: B. anthracis, YP: Y. pestis, FT : F. tularensis, BM : Burkholderia mallei*, Rc : ricine, SEB : toxine staphylococcique, Tox Bot : toxine botulique, orthopox: orthopoxvirus, ND : données non disponibles)

	Kits commerciaux	**NIDS®[u] 3000**	**IMASS[v]™ Biothreat**	**RAMP®**	**KDTB Gold®**	**RAID™ Multi test strip**	**BioThreat Alert®**
Matériels / kits commerciaux	**Fabricants**	Smith detection http://www.smithsdetection.com/ ANP technology http://www.anptinc.com/	BBI detection http://www.bbidetection.com/	Response Biomedical http://responsebio.com	Nexter/NBS-sys http://www.nexter-group.fr/	Alexeter Technology LLC http://www.alexeter.com/biow/index.asp	Tetracore® http://tetracore.com/index.html
Caractéristiques	**Méthode**	ICT	ICT	ICT	ICT	ICT	ICT
	Rapidité d'analyse	15 min	15 min	20 min	15 min	15 min	15 min (+20 sec de lecture sur le lecteur)
	Facilité de préparation et d'utilisation	Oui, échantillon à récupérer via des écouvillons et re-suspendu avant d'être déposé dans la cassette	Oui, taille d'un crayon, facile à transporter et à décontaminer	Oui, échantillon à récupérer via des écouvillons et re-suspendu avant d'être déposé dans la cassette	Oui, échantillon à récupérer via des écouvillons et re-suspendu avant d'être déposé dans la cassette	Oui, échantillon à récupérer via des écouvillons et re-suspendu avant d'être déposé dans la cassette	Oui, échantillon à récupérer via des écouvillons et re-suspendu avant d'être déposé dans la cassette
	Utilisation sur le terrain	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	Appareillage	Oui : Portable, batterie (2-3h d'autonomie) Stockage des résultats sur carte microSD	Non	Oui – Ramp® reader mais pas de calibration ou maintenance	Non, mais un lecteur électronique peut être associé	Non	Non, mais un lecteur électronique peut être associé (BioThreat alert® reader- 5h de batteries)
	Réactifs	Tout est fourni avec le kit y compris le matériel de	8 bandes dans l'appareil, une éponge permet le prélèvement à son	Tout est fourni avec le kit y compris le matériel	Tout est fourni avec le	Tout est fourni avec le kit y	Tout est fourni avec le kit y compris le matériel de

[u] NIDS : Nano intelligent detection system
[v] IMASS™ :Integrated Multiplex Assay and Sampling System

		prélèvement	extrémité	de prélèvement	kit y compris le matériel de prélèvement	compris le matériel de prélèvement	prélèvement (seulement pour 5 prélèvements)
	Cibles et matrices	Matrices : poudres, liquides et surfaces Cibles : multiplexe : 5 agents / bandelette *BA*, *YP*, *FT*, SEB, Rc, orthopox, Tox bot A et B 100µl d'échantillon nécessaire	Matrices : poudres, liquides et surfaces Cibles : 8 agents *BA*, *YP*, *FT*, *BM*, *Brucella* spp, SEB, Rc, orthopox, Tox bot A et B	Matrices : poudres, liquides, surfaces Cibles: simplexe *BA*, *YP*, orthopox, Tox Bot, Rc	Matrices : poudres, liquides et surfaces Cibles : simplexe : 1 cassette/ cible *BA*, *YP*, *FT*, SEB, Tox Bot A, B et E et Rc	Matrices : poudres, liquides et surfaces Cibles : multiplexe: 1 cassette/ 5 ou 8 cibles RAID™ 5 : *BA*, *YP*, tox bot, Rc, SEB RAID™ 8 : idem + *Brucella*, orthopox, et *FT* 300µl d'échantillon/cible	Matrices : poudres, liquides et surfaces Cibles : simplexe : 1 test/ cassette *BA*, *YP*, *FT*, *Brucella*, Tox Bot, orthopox, Rc, SEB
	Interprétation des résultats	Directement sur l'écran de l'appareil	Lecture visuelle : positif ou négatif	Le résultat est donné sous forme de code, se référer au manuel	Lecture visuelle : positif ou négatif	Lecture visuelle : positif ou négatif	Lecture visuelle : positif ou négatif
	Sensibilité / Spécificité	ND	ND	Sensibilité : *BA*: 2.10^5 CFU/ml Spécificité : *BA*, jusqu'à 400 spores sans faux négatifs	Spécificité : espèces apparentées testées, pas de faux négatifs rapportés aux concentrations testées	Pas de publication[w]	Tox Bot A : ne détecte pas la toxine purifiée mais la toxine sous forme de complexe (10ng/ml)
	Limite de détection	Rapporté par le fabricant: *BA*: $7.5.10^6$ spores/ml	ND		Bactéries : 10^4 à 10^7 cfu/ml[x]	Rapporté par le fabricant: *BA* : 10^6 spores/mL	Rapporté par le fabricant: *BA* : $10^{5-}10^6$CFU/mL

[w] Recherches pour RAID Multi test strip Alexeter dans http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

		Rc: 12.5ng/ml		*BA*: 8 × 10^8 spores/mL Tox Bot A: 5000 ng/l Rc: 5000 ng/l	Toxines : 1-10ng/ml	Rc : 6 ng/mL Tox. Bot : 30 ng/ml Brucellose : 1.5.10^6 CFU/ml Orthopox : 1.6 .10^6 PFU/ml *YP* : 3,6.10^4 CFU/ml *FT* : 1.6.10^6 CFU/ml SEB : 10 ng/ml	*YP* : 7.10^3 CFU/ml Rc: 2 to 5ng/mL
	Coût	Appareil : 7500USD Réactifs : 45-75USD par bandelette selon le nombre de cibles	158USD pour le support et les 8 bandelettes	Appareil : ~11300USD Réactifs : 20 à 30USD/ test (varie selon la cible)	~2600USD pour la malette « toxines » (5x5 tests + lecteur)	RAID™ 5: 695USD/boîte de 10 RAID™ 8: 995USD/ boîte de 10	Lecteur : ~5500USD Réactifs : 1 boite/ cible ~25USD/boite
	Kit d'entrainement	Oui	Oui	Oui	ND	Oui	Oui
	Commentaires	Pas de tests de sensibilité ou spécificité publiés Technologie permettant d'éviter l'effet Hook	Pas de tests consultables en raison de la confidentialité – Anticorps monoclonaux		Equipe le VDIP actuellement pour la partie toxine Développer en partenariat avec le CEA Campagne de tests sur les toxines financée par la SGDSN en 2010	Un second test avec les biodetect test strip ® (ICT) et leur lecteur (Guardian) vendu par Alexeter est recommandé afin de confirmer le résultat obtenu avec RAID™ : permet une double vérification	
	Références bibliographiques	(180,215)	(216)	(180,217–220)	(180,221)	(180,222)	(180,214,219,223–225)

[x] Résultats des tests de spécificité et limites de détection envoyés par l'entreprise et devant être tenus confidentiels

Ce test permet donc de ne manipuler l'échantillon qu'une seule fois et ne nécessite pas la re-suspension manuel dans un tampon.

Pour les ICT, le format le plus commun est la bandelette ne permettant de détecter qu'un seul agent. C'est le cas pour les tests RAMP®, KDTB Gold® et le BioThreat Alert®.

Plusieurs fabricants ont réussi à contourner ce problème en utilisant différentes techniques. Le IMASS™ permet de combiner huit bandelettes et permet donc la détection de huit agents à partir d'un seul échantillon. Le RAID™ Multi test strip de Alexeter Technology combine sur une seule cassette jusqu'à huit cibles en parallèle (Figure 18 G). Cependant, ce test nécessite le dépôt d'un échantillon pour chaque agent. Le NIDS® 3000 de Smith détection permet quant à lui sur une seule bandelette de détecter cinq agents à partir d'un seul échantillon.

Pour la lecture des résultats, trois possibilités s'offrent à l'opérateur : soit une lecture directe de la bandelette (IMASS™ et RAID™), soit une lecture via un appareil (NIDS 3000 et RAMP®) ou soit les deux (KDTB Gold® et BioThreat Alert®). Cette dernière option permet de s'assurer du résultat même si l'intensité de la bande est très faible.

Trop peu de données sur la sensibilité et la spécificité sont disponibles et ne permettent pas de comparer les différents tests entre eux. En revanche, il est facile de remarquer que les limites de détection sont sensiblement identiques concernant *B. anthracis* et les toxines de manière général (sauf pour le test RAMP® pour lequel la limite de détection est de 1000 fois inférieure à celle des autres tests dans le cadre des toxines). Le coût des lecteurs peut aller jusqu'à 12,000 USD, celui des tests variant, selon le type (muliplexe ou non) et la quantité, de 7 USD à 75 USD. Enfin, le dernier critère de différenciation est le type de cible. Au maximum, huit agents peuvent être recherchés sur l'ensemble des tests commercialisés et seuls trois d'entre eux permettent les détecter tous (IMASS™, RAID™ et BioThreat Alert®) (Tableau 13).

A : Modèle de cassette – Le Biothreat Alert® de Tetracore®

B: Préparation de l'échantillon pour dépôt sur la cassette (Alexeter collection Swab™) : a- Sortir l'écouvillon de son emballage – b- déposer l'écouvillon sur la surface, le liquide ou la poudre à prélever – c- Remettre le swab dans son emballage d'origine – d- Ajouter le tampon – e-f- ouvrir le tube contenant le tampo net l'échantillon et le déposer sur la cassette à l'endroit indiqué.

C et D: Technique de prélèvement par IMASS™

E et F: Test ABICAP® de Senova – E: représentation de la colonne et de la capture des antigènes de l'échantillon par les anticorps greffés – F: lecture visuelle du résultat avec les contrôles positifs et négatifs de réaction

G: Représentation des kits RAID™ 8 et RAID™ Tox d'Alexeter

Figure 18 : Schématisation de l'utilisation des différents tests immunologiques (216, 222, 225)

Tableau 13 : liste des différents agents ciblés parmi les 6 ICT décrits

	NIDS 3000	IMASS™ Biothreat	RAMP®	KDTB Gold®	RAID™ Multi test strip	BioThreat Alert®
B. anthracis	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Y. pestis	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
F. tularensis	Oui	Oui	**Non**	Oui	Oui	Oui
***Brucella* spp**	**Non**	Oui	**Non**	**Non**	Oui	Oui
SEB	Oui	Oui	**Non**	Oui	Oui	Oui
Ricine	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Toxines botuliques	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
orthopoxvirus	Oui	Oui	Oui	**Non**	Oui	Oui

Concernant les autres types de support, la technique d'immunofiltration utilisé par Senova dans les tests ABICAP® est aussi un test envisageable. Sur les colonnes sont greffés des anticorps spécifiques d'un agent. L'échantillon sous forme liquide est déposé sur la colonne. Si des antigènes de l'agent recherché sont présents, après ajout d'une molécule chromogénique, une bande colorée apparaît sur la colonne (Figure 18 E et F).

La lecture des résultats peut être réalisée à l'œil nu ou via l'utilisation d'un appareil (environ 1100 USD). Le prix d'une colonne étant d'environ 15 USD pour les classiques et 25 USD pour les colonnes contenant en plus des contrôles positifs et négatifs.

Des tests effectués sur *Y. pestis* ont montré une spécificité similaire aux tests ELISA standard ainsi qu'une limite de détection équivalente. Le test est cependant plus sensible que le BioThreat Alert® (214).

Il a également été évalué, dans cette même étude, comme simple de réalisation.

2.2.3.2.1.2.5.4. Avantages et inconvénients

De façon générale, les tests immunologiques sont rapides et plus spécifiques que les tests de biologie moléculaire. (226) De plus, ils permettent la détection des toxines. Cependant, ces

tests restent moins sensibles que les tests de biologie moléculaire (39,193,210) et ne permettent d'obtenir que des résultats qualitatifs.

Au sein des immuno-essais il existe des disparités en termes d'efficacité. Tout d'abord, selon le type d'anticorps utilisé, l'utilisation d'un anticorps monoclonal rendra le test beaucoup plus spécifique et le bruit de fond beaucoup plus bas (210). Les tests ELISA sont plus difficiles à mettre en œuvre dans un laboratoire mobile, ils prennent du temps (227) et entrainent des problèmes de conservation (228). Les ICT sont plus faciles à mettre en œuvre et ne nécessitent que très peu de manipulations. De plus, ils sont beaucoup plus stables et peuvent être conservés plus longtemps. Cependant, ils ne permettent pas la détection de plusieurs cibles à la fois. Ainsi, l'échantillon doit être réparti sur plusieurs tests ce qui peut constituer une limite lorsque les quantités sont faibles. De plus, d'une cible à une autre, la sensibilité de l'anticorps pour son antigène va être différente. Il est rapporté pour les ICT que selon le type de toxine détectée, la sensibilité peut varier de 50 pg/mL à 50 ng/mL (210). Cette sensibilité est bien inférieure à celle obtenue lors des ELISA classiques effectués au laboratoire (209). Enfin, bien que très facile, la lecture des résultats des ICT peut-être un biais dans l'analyse puisque celle-ci est conditionnée par la capacité limité de l'œil humain.

Plusieurs tests commerciaux ICT offrent aujourd'hui des solutions aux problèmes de lecture grâce à l'apparition d'appareillage pour la lecture des bandes, mais aussi au problème de multiplexage grâce à l'apparition de tests comme l'IMASS™ par exemple.

2.2.3.2.1.2.6. Autres tests

2.2.3.2.1.2.6.1. La spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse physique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules. Elle est basée sur la mesure du rapport masse-sur-charge (m/z) de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentations.

Elle permet d'obtenir des informations sur la masse moléculaire de la molécule, la masse de ces fragments, la quantité totale présente dans l'échantillon et sur sa structure chimique (229). Dans un premier temps, les molécules sont tout d'abord séparées les unes des autres via le passage d'un état condensé à un état gazeux. Puis les molécules sont ensuite ionisées. Ces deux étapes peuvent être réalisées en même temps et plusieurs types de sources d'ionisation peuvent être utilisées selon le composé à analyser (sources dures ou douces, électronique, chimique, laser…). La dernière étape est la mesure du rapport m/z par passage dans l'analyseur. Il existe également différents types d'analyseur dont les plus connu sont l'analyseur quadripole ou encore celui à temps de vol (TOF). Les résultats sont donnés sous la forme d'un spectre de masse (Figure 19), dont la lecture permet de déterminer la structure de la molécule ou encore de déterminer l'agent présent en comparant ce spectre à une banque de spectres de référence.

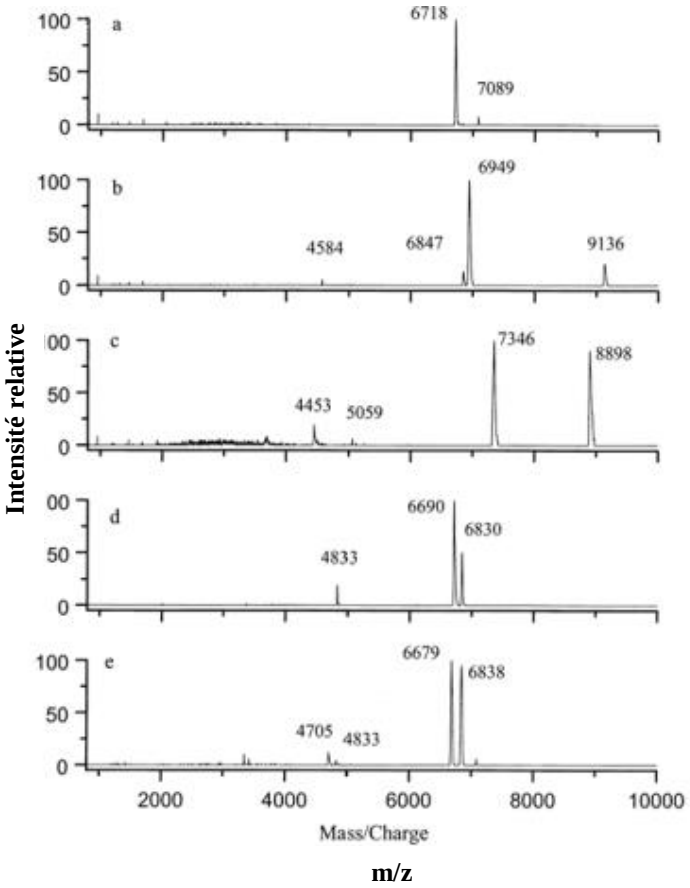


Figure 19 : Spectre de masse de différentes espèces de *Bacillus* – (a*) B. thuringiensis,* (b*) B. subtilis,* (c) *B. globigii,* (d) *B. cereus,* (e) *B. anthracis* souche Sterne - (195)

La spectrométrie de masse a de nombreuses applications dont l'analyse organique et bio-organique structurale. Des informations comme la structure moléculaire sont fournies par l'observation de pics caractéristiques des fonctions chimiques. Cependant, la forme des données dépend largement de la méthode d'ionisation utilisée.

La spectrométrie de masse couplée à une technique de séparation comme la chromatographie a déjà fourni les preuves de son utilité (230) pour l'identification des agents chimiques de guerre comme l'ypérite ou les neurotoxiques organophosphorés tels que le sarin ou le VX. Par rapport à des protéines, ces agents ont des faibles masses moléculaires (<600 daltons (Da)), si bien que leur extraction peut être facilement réalisée par chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) ou liquide (LC-MS) avec une analyse couplé par spectrométrie de masse. Les techniques d'ionisation utilisées sont l'ionisation électronique[25] et l'ionisation chimique[26].

Pour les toxines protéiques comme la SEB (28400 Da) ou encore la ricine (62600 Da), leurs masses moléculaires et leurs compositions plus complexes (plusieurs centaines d'acides aminés) ne leur permettent d'utiliser ce type de méthode.

Dans l'étude des protéines, deux principaux types d'ionisations sont le plus souvent utilisées :

- l'ionisation assistée par matrice (MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* (231), où l'ionisation est provoquée par un faisceau laser ;
- l'ionisation par électronébuliseur (ES : *electrospray*) : l'ionisation est réalisée par l'application d'un champ électrique sur la molécule maintenue sous forme d'aérosol.

Ces techniques d'ionisations couplées à différents analyseurs permettent d'identifier des structures complexes comme des protéines jusqu'à des micro-organismes complets.

[25] L'ionisation électronique : la molécule est ionisée après impact avec un électron très énergétique qui lui arrache un de ces électrons.

[26] Un gaz est d'abord ionisé via l'ionisation électronique et ce sont ces ions qui vont ensuite permettre l'ionisation de la molécule d'intérêt. Le méthane, l'isobutane et l'ammoniac font partis des gaz les plus utilisés.

La spectrométrie de masse présente deux qualités essentielles qui sont la sélectivité et la sensibilité puisqu'elle permet d'être utilisée sur des quantités très faibles d'échantillon, de l'ordre du picogramme. Un autre atout est qu'elle est applicable à tous types d'échantillons (organiques, bio-organiques, minéraux) sous forme liquide, solide ou gazeuse. Enfin, un des gros avantages est la rapidité d'analyse de l'ordre de quelques minutes (232).

Cependant, la complexité des échantillons à analyser, notamment pour les agents du bioterrorisme, nécessite l'utilisation d'échantillons purifiés ne contenant que la molécule ou l'organisme d'intérêt. En effet, pour un échantillon d'air par exemple, celui-ci peut contenir plusieurs centaines d'agents (195) comme des bactéries, des spores, des virus mais aussi d'autres particules comme des polluants ou du pollen. Pour les bactéries par exemple, une mise en culture préalable est normalement réalisée à partir de laquelle seulement une colonie est prélevée pour l'identification en spectrométrie de masse. De plus, bien que très sensible, un spectromètre de masse utilisant les types d'ionisation et analyseurs les plus performants coûte relativement cher, jusqu'à 850000$ pour un MALDI-TOF (233). Pour finir, il est aussi important de prendre en compte le volume d'un tel appareil qui, aujourd'hui, n'est pas adapté à une utilisation dans un véhicule mobile. De plus, cette technique nécessite une grande expertise pour l'analyse des résultats. Ces derniers dépendent de la richesse et de la qualité des bases de données, c'est-à-dire du nombre de souches différentes d'une même espèce enregistrée dans la base de données : plus il y a de souches d'une même espèce dans la base de données, plus la probabilité de reconnaître cette même espèce est importante.

2.2.3.2.1.2.6.2. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de compter et caractériser des cellules, particules ou molécules en les faisant passer dans un faisceau laser. La lumière réémise

permet de classer les populations présentes. Dans ce type de test, des anticorps marqués avec des fluorochromes peuvent être utilisés afin de cibler une population particulière dans l'échantillon. En présence de ces anticorps, l'échantillon est alors passé dans le cytomètre et la population marquée est comptée (195). Afin d'augmenter les capacités de multiplexage, de nouveaux tests utilisant des billes fluorescentes sont apparues. Ces billes peuvent être greffées d'anticorps spécifiques qui fixent les cibles. Un second anticorps fluorescent est ajouté, formant ainsi un « sandwich » avec la cible et la bille. L'appareil mesure ensuite la fluorescence de la bille et de l'anticorps secondaire. Luminex Corp (Austin, Texas), a reçu un financement en 2012 pour développer une méthode de détection pour les agents du bioterrorisme basée sur la technologie xMAP® (212). La technologie xMAP® met en œuvre des billes magnétiques fluorescentes sur lesquelles peuvent être greffées des anticorps, des acides nucléiques, des protéines ou des enzymes. En outre, le gouvernement Canadien a acquis un système Bio-Plex® suspension Array System commercialisé par Bio-Rad afin de développer un test utilisant la technologie xMAP® de Luminex™ pour la détection simultanée des toxines de guerre comme la ricine, les toxines botuliques ou encore l'entérotoxine B staphylococcique dans des échantillons d'origine inconnue. Ce test permet de tester en deux heures un échantillon par rapport à la journée entière nécessaire pour les méthodes traditionnelles ELISA.

Cependant, ce type de dosage reste difficile à mettre en place dans un laboratoire mobile. Il demande une grande expertise pour la manipulation, des conditions de stockage des réactifs particulières et représente un coût important en termes d'appareillage et de réactif.

Les cytomètres de flux sont des appareils performants mais qui nécessitent de l'espace et des conditions de manipulation rigoureuses et stables du fait de la présence de systèmes

Bien que plus petits, les appareils Luminex™ ou BioRad® mettent aussi en jeu des systèmes de fluidiques et nécessitent des calibrations avant chaque usage. De plus, ces appareils ont

besoin d'une connexion à un ordinateur et l'analyse des données exige non seulement une formation avancée mais aussi une grande expérience. Pour l'ensemble de ces raisons, la cytométrie de flux ne convient pas à ce jour à une utilisation dans un laboratoire mobile.

2.2.3.2.1.2.6.3. Les biopuces

Les biopuces ou puces à ADN ont été inventées à la fin des années 1980 par le britannique Edwin Southern. Une puce est composée d'un support solide (verre, silicium ou plastique) sur lequel sont synthétisées et greffées des milliers de séquences d'acides nucléiques appelés sondes. Chacune des sondes est complémentaire et spécifique d'une séquence d'ADN de ou des agents recherchés.

L'ADN contenu dans l'échantillon est d'abord extrait et purifié. Les cibles recherchées sont ensuite marquées par des molécules fluorescentes et amplifiées par PCR. Les produits amplifiés sont ensuite déposés sur la puce, et s'hybrident aux sondes. Puis, l'ADN non fixé est éliminé par un lavage (Figure 20). L'intensité de fluorescence est finalement détectée par un lecteur.

Un des avantages des puces à ADN est qu'elles permettent de détecter plusieurs cibles en même temps. En effet, plusieurs milliers de sondes peuvent être greffées, et pour chacune d'entre elles, la position sur la puce est connue. La fluorescence permet de connaître la sonde qui a détecté une cible et donc d'identifier le pathogène présent dans l'échantillon (235). De cet avantage découle aussi la capacité à cibler plusieurs parties d'un organisme et donc d'augmenter la spécificité et la sensibilité du test. Un autre avantage de ce type d'analyse est la faible quantité d'échantillon nécessaire à l'analyse. L'amplification de l'ADN contenu dans l'échantillon rend cette technique très sensible, mais aussi très longue et difficile à mettre en œuvre, faisant appel à des personnels expérimentés, notamment pour l'amplification des différentes cibles en une seule PCR. (236).

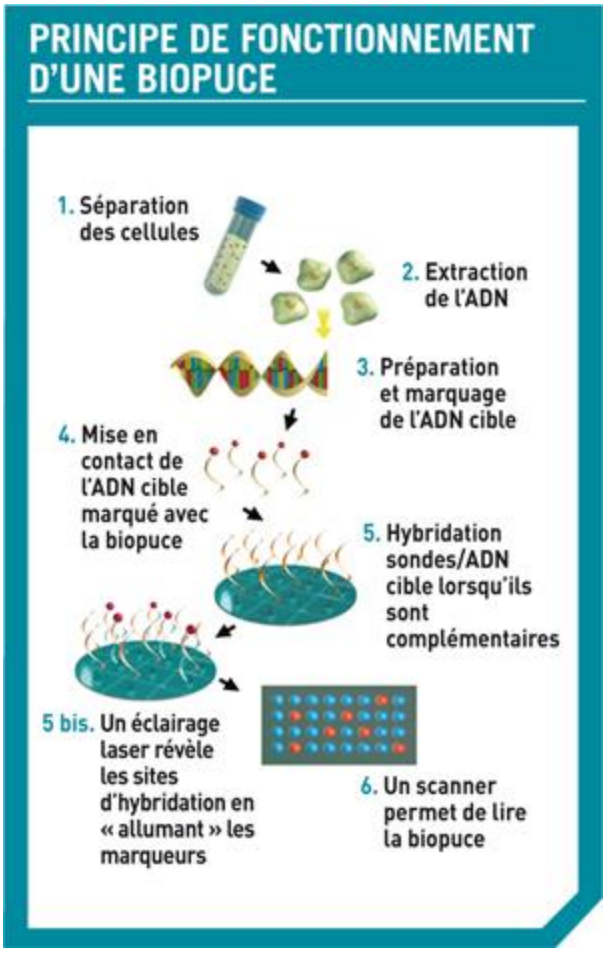


Figure 20 : Principe de l'hybridation et de détection sur biopuce (234)

La littérature rapporte des tentatives d'utilisation de puces à ADN sans amplification pour les échantillons environnementaux mais ces techniques ne sont pour le moment pas encore assez développées (236).

Afin de s'affranchir de l'étape de PCR, des puces à protéines ont vu le jour utilisant le plus souvent le principe de l'ELISA avec la fixation d'anticorps de capture sur le support solide et des anticorps marqués pour la révélation (235). L'utilisation d'anticorps a l'avantage de pouvoir également permettre la détection des toxines.

D'autres techniques utilisant le principe de la micro-fluidique appelées *« lab-on-chip »* pour laboratoire sur puce permettent de réaliser les étapes de PCR et d'hybridation de façon interne et permettent ainsi de diminuer le temps d'analyse et de réduire la manipulation de l'échantillon. Les laboratoires Veredus ont développé le VereThreat™, une *lab-on-chip* permettant l'identification dans les fluides biologiques de *B. anthracis,* de *Y. pestis,* de *F. tularensis* et du virus de la variole (237).

Cependant, même en éliminant ou en automatisant cette étape d'amplification, l'hybridation sur puce reste une méthode difficile à envisager pour une utilisation de terrain. En effet, l'hybridation demande un temps minimum d'incubation et plusieurs lavages successifs ainsi que l'utilisation de tampons de lavages particuliers. La manipulation est délicate et semble incompatible avec une utilisation de terrain. De plus, l'analyse nécessite l'utilisation d'un lecteur associé à un ordinateur puissant et l'interprétation des résultats est compliquée pour une personne non experte. De surcroît, l'étape préalable d'extraction et de purification de l'échantillon est susceptible d'introduire des contaminants et l'utilisation de milliers de sondes peut aussi être à l'origine de faux positifs dus à la présence d'agents biologiques de l'environnement dans l'échantillon, proches des agents pathogènes recherchés. Un résultat positif doit souvent être vérifié à l'aide du séquençage par exemple. Par ailleurs, les conditions strictes de conservation des puces sous peine de dégradation rapide sont également un aspect important à prendre en considération. Par exemple, ces puces sont très sensibles à l'humidité et sont généralement conservées dans des vacuums. Enfin, le coût de ces technologies miniaturisées est supérieur à celui des technologies classiques comme la PCR ou les immuno-essais. Le coût final comprend le prix de la puce greffée, le prix de l'analyseur, des réactifs d'hybridation ainsi que celui des réactifs de PCR. Il faut donc compter plusieurs milliers d'euros par analyse. Il existe, cependant, dans la littérature, plusieurs descriptions de puces permettant l'identification de certains agents du bioterrorisme à partir de matrices

environnementales (196,197). Concernant les kits commerciaux, le Film Array® décrit précédemment combine l'extraction, la PCR et l'hybridation de la puce pour la détection de plusieurs agents du bioterrorisme. Les séquences d'oligonucléotides fixés sur la puce servent d'amorce pour la seconde PCR.

2.2.3.2.1.2.6.4. Détection par les phages

Un bactériophage est un virus affectant les bactéries. L'infection d'une bactérie par un phage peut aboutir, lors d'un cycle lytique, au bout de vingt minutes, à la lyse complète de la bactérie avec la libération de centaines de particules phagiques. C'est à partir de cette propriété que des tests de détection ont été imaginés. En effet, il est possible de modifier génétiquement les bactériophages en insérant dans leur génome un gène codant pour une protéine fluorescente : la luciférase. Une fois ce gène exprimé, l'intensité de fluorescence ou la quantité de lumière émise peut être mesuré à l'aide d'appareil de détection (238).

La compagnie Guild Associate Inc. (239) développe ce genre de test de détection pour *B. anthracis* et *Y. pestis*, chacune de ces bactéries possédant des phages qui leur sont spécifiques.

Cette méthode, encore au stade de développement pourrait s'avérer intéressante si elle permettait de détecter rapidement (une vingtaine de minute) la présence de ces agents dans des échantillons environnementaux. De plus, cette technique ne permet pas la détection des virus et des toxines. Enfin, l'utilisation d'au moins un phage par bactérie est nécessaire, ce qui oblige à aliquoter les prélèvements dans le cadre d'un criblage de plusieurs agents.

2.3. Challenge pour les sapeurs-pompiers et recommandations

2.3.1. Le VDIP pour qui, pourquoi ?

La mise en place du VDIP fait suite au souhait de renforcement des méthodes de détection et d'identification en matière de risques NRBC-E. Au sein des sapeurs-pompiers, la gestion des risques chimiques et radiologiques a continuellement été améliorée et des équipes expertes avec des véhicules équipés, des procédures définies, des formations adéquates et des entraînements réguliers. Jusqu'à présent, le risque biologique n'avait qu'une petite place au sein de ces spécialités avec seulement une dotation en matériels de protection et de prélèvement dans les véhicules spécialisés pour le risque chimique et très peu de formation spécialisée.

Cependant il est important de noter qu'un prélèvement mal effectué ou mal acheminé peut rendre l'analyse difficile voire impossible. Il faut également garder à l'esprit que la manipulation d'agents biologiques et notamment ceux susceptibles d'être utilisés pour des attentats bioterroristes est dangereuse et doit répondre à des règles de biosécurité stricte. Le personnel doit donc suivre une formation adéquate afin de travailler en toute sécurité, pour lui, la population et l'environnement.

L'arrivée du VDIP et plus particulièrement la présence d'outils de détection biologique, ajoute de nouvelles exigences aux équipes sapeurs-pompiers : ces dernières doivent être mobiles et opérationnelles, tout en se conformant aux bonnes pratiques de laboratoire. De plus, alors que l'obtention et l'interprétation d'un résultat en microbiologie est longue et demande une grande réflexion et souvent des tests de confirmation, ces équipes doivent rendre un résultat rapidement avec des tests simples d'utilisation, et ceci de manière fiable. Cela pourrait paraître incompatible avec la complexité même de la manipulation du vivant, si l'on ne pouvait pas compter sur l'évolution extrêmement rapide des biotechnologies, qui pourrait répondre aux exigences opérationnelles.

Les enjeux actuels par rapport à ce véhicule ne sont donc pas seulement matériels mais aussi humains et organisationnels. En effet, il n'est pas envisageable d'équiper un VDIP en matériels de détection biologique, si le personnel chargé de mettre en œuvre ces derniers n'est que faiblement formé au rudiment de la biologie, aux techniques et aux risques qui y sont associés.

2.3.2. Armement actuel

Les SDIS ayant été dotés des VDIP ont déjà reçu de l'équipement concernant le risque biologique. Nous avons choisi de décrire l'armement actuel du VDIP du département du Rhône (composition en Annexe 2). Ces équipements peuvent différer d'un département à l'autre et vont certainement évoluer dans le temps. Les petits matériels (pipettes, flacons, flasques, tenues de protection…) ne sont pas détaillés ici.

2.3.2.1. Prélèvements

Concernant le prélèvement, à une dotation de petit matériel comme des pipettes, des éponges, des spatules et des flacons, vient s'ajouter un collecteur d'air le Coriolis® RECON (Bertin Technologies, France).

Il permet la récupération dans l'air des bactéries, virus, toxines et spores. Utilisant la technologie « cyclone », le collecteur permet la récupération de particule de 0.5 à 10µm. Grâce à une rotation rapide de l'air, les fines particules solides peuvent être séparées et récupérées dans un liquide (Figure 21). Le Coriolis® RECON permet de récupérer des échantillons dans 20 à 25 mL et le flux d'aspiration est de 600 L/min. Le temps de collection peut être réalisé en 5 à 15 minutes pour une utilisation ponctuelle ou jusqu'à six heures pour

une surveillance continue de l'air. Il est facilement transportable, léger et facile d'utilisation. Le prélèvement est compatible avec les analyses par PCR et immuno-essais.

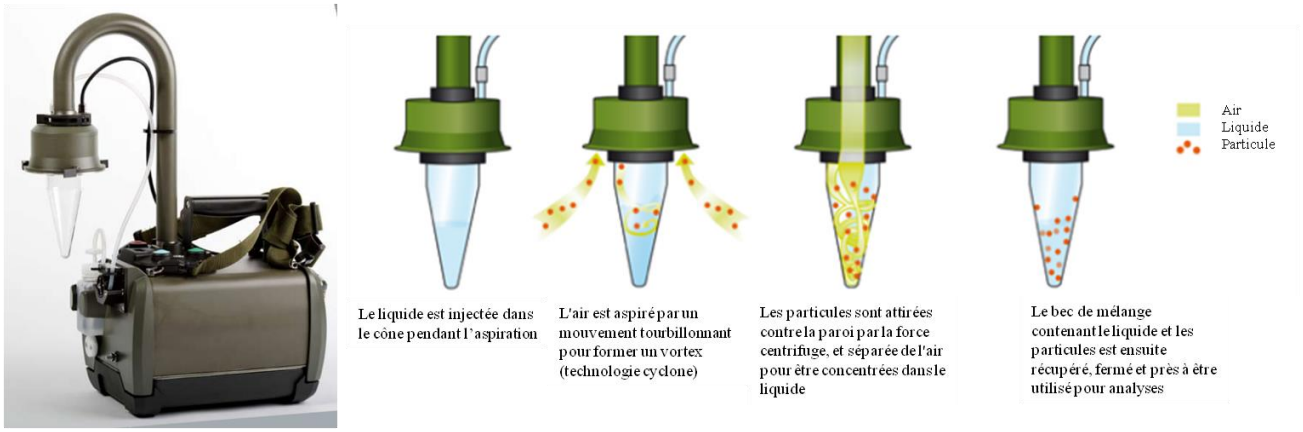


Figure 21 : Le Coriolis® RECON de Bertin technologies : structure générale et schéma d'utilisation (Tableau 4)

2.3.2.2. Détection et identification

Il n'y a actuellement aucun test non spécifique de détection dans le VDIP. En revanche, pour l'identification, le véhicule est équipé de deux tests différents. Tout d'abord, la valise KDTB® Gold de NBCsys (Groupe Nexter), développée en partenariat avec le CEA, contient des bandelettes immunochromatographiques de détection de terrain pour les toxines : ricine, SEB et toxines botuliques A, B et E. Des bandelettes pour les bactéries *B. anthracis* et *Y. pestis* sont disponibles mais ne sont pas utilisées dans le VDIP. La valise est composée de cinq tests par toxine et des kits de prélèvements environnementaux (Annexe 3). Après dépôt de l'échantillon sur la cassette, le résultat est visible en 15 minutes. La lecture peut être réalisée à l'œil nu ou par un lecteur cependant absent dans le VDIP. De nombreux tests ont été réalisés, financés par la SGDSN, afin d'évaluer l'efficacité des bandelettes toxines. Avec une limite de détection pour le test ricine de 1 ng/mL, le test fait partie des meilleurs parmi

ceux décrits dans le Tableau 12. Il en va de même pour les autres toxines, avec des limites de détection respectivement de 5 et 1 ng/mL pour les toxines botuliques et SEB.

Le second test disponible est basé sur le principe de la PCR. Le GeneXpert® de Cepheid a été choisi afin d'identifier la présence de *B. anthracis*. Le kit utilisé est le kit Biothreat BA 4-plex qui permet l'identification de *B. anthracis*, avec deux cibles correspondant aux deux plasmides de virulence et deux types de témoin.

Ce test permet de réaliser une PCR en toute sécurité puisque le prélèvement est réalisé par écouvillonnage. L'écouvillon est ensuite introduit dans le boitier où l'extraction de l'ADN, la purification et l'amplification sont réalisées sans intervention extérieur. Le boitier est installé dans le thermocycleur (GeneXpert®) afin de réaliser ces étapes et le résultat est disponible en 45 min. C'est un test très spécifique et sensible (Tableau 12) cependant il ne permet de détecter qu'un seul agent du bioterrorisme.

2.3.3. Les enjeux matériels

Grâce aux propriétés uniques des micro-organismes, la détection du risque biologique est différente de celle des risques chimiques et radiologiques. En effet, lors d'un attentat bioterroriste, en cas d'absence de revendication ou de signes extérieurs permettant d'envisager un acte de bioterrorisme et en absence de victimes immédiates, la probabilité de penser rapidement à un tel acte est sans doute très faible. Ainsi, les maladies issues de la contamination par des micro-organismes ou toxines n'apparaissent qu'après une période d'incubation plus ou moins longue et les symptômes ne sont jamais instantanés. Si l'attentat n'est pas revendiqué, plusieurs indicateurs épidémiologiques décrits peuvent faire penser à un cas de dissémination intentionnelle (240) le principal étant l'augmentation du nombre de cas ;

seule la surveillance épidémiologique permettra de mettre ce type d'incident en évidence. Les sapeurs-pompiers n'auront donc qu'à intervenir dans des situations suivantes :

- l'attentat est revendiqué ;
- la contamination est visible (poudre suspecte, fioles ou tubes divers) ;
- un contexte conduisant à la forte suspicion d'un attentat.

La détection et l'identification devront être réalisées avant même l'apparition des premiers symptômes qui auraient pu orienter le test sur un pathogène en particulier. Les recherches devront donc être le plus large possible. Ainsi, les premiers prélèvements ne seront pas réalisés sur les victimes mais dans l'environnement (air contaminé, poudre, eau ou nourriture contaminée). A partir de ce constat, plusieurs questions se posent afin de choisir le type d'appareil qui pourra être utile dans le VDIP.

Tout d'abord, il existe de très nombreux d'agents biologiques potentiellement pathogènes pouvant être disséminés ou se retrouver dans l'environnement au milieu d'agents de l'environnement connus et même encore inconnus.

Le premier enjeu est donc la définition du type d'organismes à cibler. Une des principales activités du VDIP serait alors la mise en évidence d'agents du bioterrorisme. C'est pourquoi l'utilisation d'un outil de criblage de plusieurs pathogènes permettrait un premier tri et une première orientation. Ces premiers résultats devant bien sûr être confirmés au sein des laboratoires de référence.

De plus, compte tenu de l'émergence ou la ré-emergence de pathologies infectieuses du fait de l'apparition de nouveaux organismes pouvant causer des épidémies (par exemple *E. coli* O104 :H4…), il pourrait être intéressant d'envisager le VDIP comme un outil de détection précoce d'épidémies naissantes.

Ceci implique de pouvoir faire évoluer les appareillages en fonction de l'amélioration des connaissances sur les risques biologiques : les systèmes choisis ne doivent donc pas être trop

« fermés » et doivent être adaptables à la mise sur le marché de nouveaux tests. Le choix initial du système est fondamental et doit être prendre en compte non seulement l'existant, mais aussi la capacité intrinsèque de ces systèmes à pouvoir être modifié. Les équipes des VDIP devront envisager un partenariat avec les industriels développant les outils de détection, tout en veillant à conserver leur indépendance, ainsi qu'avec les laboratoires de références du réseau Biotox-Piratox en tant que conseillers. Ces partenariats permettraient dans le premier cas le suivi d'évolution des appareils et dans le second le suivi des innovations, l'application des tests de références ainsi que la formation continue.

2.3.3.1. Choix et recommandations pour le matériel de détection et d'identification

Il existe deux grands groupes de méthodes pour une utilisation dans le cadre du bioterrorisme : les méthodes non-spécifiques et les méthodes spécifiques.

Les tests non spécifiques comme les bio collecteurs-analyseurs, l'ATPmétrie, la fluorescence ou encore la détection de protéine permettent d'obtenir une réponse rapide mais n'apportent pas d'information concernant ce qui est détecté. Elles ne sont pas spécifiques et sont souvent à l'origine de faux positifs. Elles nécessitent l'utilisation d'une partie de l'échantillon, et même s'il est facile de les utiliser, cette étape peut prendre du temps qui pourrait être utilisé autrement.

Les méthodes spécifiques peuvent permettre de mettre en évidence différents critères selon le type de méthode utilisée (Tableau 14).

L'utilisation dans le VDIP de méthodes comme la mise en culture, la microscopie, les tests *in vivo* sont inenvisageables pour des raisons évidentes de sécurité, de temps, de coût, de place et de niveau de formation requis.

Tableau 14 : description des différents critères pouvant être recherchés pour l'identification et les méthodes associées.

Critères	Méthodes pouvant être utilisées
Mise en évidence d'une cible caractéristique et connu d'un micro-organisme	Détection des acides nucléiques (amplification, séquençage) Détection des protéines (immuno-essais et SM)
Recherche du caractère vivant	Mise en culture
Recherche du caractère pathogène	Infection de modèles cellulaires et animales

De plus, les VDIP étant situés souvent autour de grandes métropoles, le temps d'acheminement de l'échantillon vers un laboratoire de référence paraît négligeable par rapport à la durée de ces analyses complémentaires. La réalisation de ces tests est bien sûr obligatoire pour une identification formelle mais ils sont réservés aux laboratoires de références qui ont l'équipement et la formation nécessaires à leur réalisation. En revanche la mise en évidence d'une cible caractéristique connue d'un agent biologique peut être réalisée au sein du VDIP. Plusieurs méthodes ont été décrites et parmi elles, on peut déjà en exclure certaines comme l'utilisation de la cytométrie en flux, la spectrométrie de masse et le séquençage. Ce sont des méthodes de haut débit qui nécessitent une importante préparation de l'échantillon, plusieurs heures voir jours d'analyse et une grande expérience en matière d'interprétation des résultats. De plus, le coût des appareils et réactifs est trop important pour pouvoir envisager leur achat pour le VDIP. De la même façon, l'utilisation de phages pourrait être une méthode d'identification spécifique mais qui doit encore être développée.

Enfin, l'utilisation de biopuces reste encore difficile à envisager dans le VDIP due à la durée d'analyse et à la très haute technicité requise. Cependant, avec l'apparition du Film array® de

BioFire, les *labs-on-chip* auront probablement un rôle important à jouer dans l'identification des agents biologiques.

Parmi les méthodes restantes se trouve les tests de biologie moléculaire par amplification (PCR) et les immuno-dosages.

L'utilisation d'un test rapide et efficace, c'est-à-dire sensible et spécifique, nécessite une validation sur plusieurs matrices, et doit permettre la détection de plusieurs cibles tout en privilégiant une automatisation afin de limiter les biais de manipulation.

A partir de ces critères, il est également facile d'éliminer les méthodes dites « maisons » qui sont souvent décrites dans la littérature et qui, pour être utilisées, devraient être validées au sein du VDIP. De plus, ces tests ne sont souvent pas automatisés et nécessite non seulement la préparation de l'échantillon, mais aussi celle des réactifs.

A l'inverse, les kits commerciaux ont l'avantage d'être standardisés et ont déjà été testés sur plusieurs matrices et cibles. Ils combinent le plus souvent les étapes de préparation de l'échantillon et l'analyse, les rendant très facile d'utilisation. De plus, les résultats sont rendus de façon binaire (positif/négatif) ce qui facilite la prise de décision. Enfin, la plupart des kits sont livrés avec des kits d'entraînement permettant ainsi une meilleure formation du personnel qui peut manipuler en conditions réelles.

De plus, pour un même agent biologique il existe plusieurs tests « maisons », en général développés par les laboratoires de référence, il est donc impossible de comparer les résultats d'un laboratoire à l'autre car les tests de performances ne sont pas toujours connues. En revanche, l'utilisation d'un test industriel dont les tests de performances sont connus peut être utile au laboratoire de référence qui peut ainsi comparer les résultats du VDIP à ceux obtenus avec leurs tests.

Quant au choix de la méthode, il est bien décrit que les systèmes basés sur la PCR sont beaucoup plus sensibles et détectent des concentrations très faibles de micro-organismes à

l'inverse des tests immunologiques. Cependant les tests PCR nécessitent d'extraire et de purifier l'ADN du reste de l'échantillon et ne permettent pas la détection des toxines. Enfin, l'analyse est souvent longue, soit environ une heure.

A l'inverse les tests immunologiques, notamment les ICT, sont plus robustes que les tests PCR, ils ne nécessitent pas de préparation de l'échantillon et permettent la détection des toxines. L'analyse est très rapide, de l'ordre de quelques minutes, et la lecture des résultats peuvent être faite à l'œil nu ne nécessitant pas l'utilisation d'un appareil de lecture ou d'un ordinateur. Cependant, un lecteur peut être ajouté afin d'augmenter la sensibilité du test.

En outre, bien que plusieurs technologies répondent à la plupart des critères de choix d'une méthode, aucune ne les combine tous.

Concernant le choix de la méthode de détection pour les toxines, aucun problème ne se pose ici puisque ne pouvant pas être détecté par PCR, l'utilisation de bandelettes immunologiques est l'unique choix restant. Le kit KDTB® Gold choisit pour le VDIP semble correspondre parfaitement à une utilisation de terrain, rapide et performant, facile à mettre en œuvre et pouvant être accompagné d'un lecteur afin d'augmenter la sensibilité du test. Les principales toxines sont détectées et un kit de prélèvement est fournit avec la mallette et qui permet un travail dans différentes matrices.

En revanche, concernant le choix de l'appareil d'identification pour les bactéries et virus, le GeneXpert® de Cepheid™ a été choisi. Utilisant la technologie PCR, ce test permet d'extraire, purifier, amplifier et analyser à partir d'un écouvillon d'échantillon pouvant provenir de plusieurs matrices. Cependant, le principal problème de ce test est le nombre de cible qu'il détecte. Seul le test pour la bactérie *B. anthracis* est disponible. Si l'appareil est fiable et largement utilisé en biologie médicale pour son automatisation, le fait qu'un seul test existe pour les agents du bioterrorisme justifie peu le coût de l'acquisition du GeneXpert®, ni celui de la maintenance.

Aujourd'hui il existe des produits comme le Film array®, le BioSeeq® ou encore le T-COR4® qui montrent les mêmes avantages en terme de facilité d'utilisation et qui utilisent le même type d'appareils voir plus simple pour le BioSeeq® mais qui permettent la détection de plusieurs agents. Les tests de performances peuvent être demandés voir financés le cas échéant afin de permettre une utilisation de matériel efficace et utile au sein du VDIP.

Mieux que de choisir entre l'une ou l'autre des méthodes (PCR ou immunologique), il serait intéressant de combiner les 2 types. Une partie du prélèvement pourrait être utilisé pour les tests ICT en utilisant par exemple des kits comme le IMASS™ Biothreat, le RAMP®, le biothreat alert®, le RAID™ multi test strip ou encore ajouter les bandelettes disponibles pour *B. anthracis, Y. pestis* et *F. tularensis* du kit KDTB® Gold. Ces tests rapides donnent des résultats en quelques minutes. En parallèle, les tests basés sur la PCR, plus sensibles, peuvent être utilisés afin d'obtenir un résultat final sûr et s'affranchir du risque de faux positifs ou faux négatifs.

Une autre solution serait le développement avec les laboratoires de références des tests à mettre en place dans le VDIP, identiques à ceux utilisés dans ces laboratoires, et ainsi permettre une continuité entre le prélèvement, l'identification provisoire et l'identification formelle. Le VDIP pouvant être ainsi considéré comme le lien privilégié entre le terrain et les laboratoires de références.

Enfin, un autre paramètre très important est la validation du test pour une utilisation dans le VDIP. Là encore, les partenariats avec les laboratoires de référence permettraient la réalisation de cette validation ainsi que la mise en place de contrôles positifs et négatifs validant l'utilisation des tests sur les différentes matrices et les différentes cibles. Il est facile d'envisager le développement de contrôles positifs pour chaque cible permettant de s'affranchir de l'interférence du prélèvement sur l'analyse.

Quant au choix des cibles, il est difficile d'obtenir un test permettant la détection et l'identification de tous les agents du bioterrorisme. Par ailleurs, choisir des amorces publiées ou commercialisées expose l'équipe du VDIP à la possibilité d'être face à des agents biologiques génétiquement modifiés échappant aux méthodes d'identification classique. Cependant, la réalisation des premiers tests dans le VDIP pourrait orienter les laboratoires de référence, le cas échéant, sur le type d'agent en cause. On pourrait alors parler de pré-détection ou de pré-identification.

2.3.3.2. Choix et recommandations pour le matériel de prélèvement

Le prélèvement est une étape critique pour la détection et l'identification d'agents pathogènes. La qualité du prélèvement va conditionner celle du résultat. Dans le cadre du VDIP, le prélèvement est à effectuer en plusieurs copies pour deux destinataires différents.

Tout d'abord le prélèvement pour les laboratoires de référence qui doit être réalisé en triple exemplaires et conditionné dans un triple emballage pour l'envoi.

Afin de répondre au mieux aux exigences des laboratoires de référence, il serait intéressant de pouvoir entrer en contact avec eux et réaliser des protocoles de prélèvement selon la matrice et avec du matériel convenant à une utilisation dans leur laboratoire et assurant la meilleure conservation de l'échantillon.

Pour une utilisation dans le VDIP, des précautions doivent également être prises afin de limiter la dégradation du prélèvement mais également protéger les intervenants qui aurait à entrer en contact avec.

L'utilisation de matériel stérile à usage unique, l'entrainement à la manipulation de faibles quantités d'échantillon comme les poudres par exemple, savoir où prélever pour récupérer le moins possible de contaminants extérieurs, apprendre à utiliser les kits de prélèvement

disponibles avec les kits d'analyse ainsi que penser à noter toutes les informations utiles lors du prélèvement comme les conditions météorologiques, les observations de couleurs ou de quantité, sont des critères à prendre en compte et doivent donc faire l'objet d'une formation particulière.

C'est à ce niveau qu'une collaboration interministérielle pourrait être très intéressante. Plusieurs véhicules mobiles ou laboratoires projetables équipés sont disponibles au sein de l'armée mais aussi de la gendarmerie nationale et une coordination des moyens de lutte contre le bioterrorisme semble plus que nécessaire.

Enfin, il faut aussi être conscient des limites du VDIP en termes d'analyse par rapport à un laboratoire de référence. La circulaire 750 décrit les modalités de prélèvement, et priorise le prélèvement avant toute autre manipulation de l'objet suspect. En particulier, les analyses éventuelles par des méthodes de terrain ne doivent être entreprises qu'après la collecte en quantité suffisante d'échantillons réservés aux laboratoires (30).

C'est pourquoi, dans le cas d'une très faible quantité d'échantillon disponible, la priorité doit être donnée à la sauvegarde de l'échantillon en vue d'analyse au laboratoire.

CHAPITRE III : Mise en œuvre

Les acteurs

La formation

La réglementation

Exemples de protocole d'utilisation

3. Mise en œuvre

Après avoir montré que certaines techniques étaient plus adaptées que d'autres à la détection et à l'identification de terrain, nous allons à présent nous intéresser aux enjeux humains et organisationnels de l'intégration de la biologie chez les sapeurs-pompiers. Cette organisation résulte principalement des caractéristiques des agents biologiques pathogènes et des différents matériels évoqués précédemment, du prélèvement à l'identification. Nous proposerons également quelques exemples de protocoles de mise en œuvre.

3.1. Les acteurs : missions et formations

Par définition, un acteur est toute personne qui joue un rôle essentiel et déterminant dans une action. Dans le cadre du VDIP, les acteurs doivent être choisis en fonction des missions relatives à une intervention à caractère NRBC. La formation, quant à elle, se définit comme l'action de donner à quelqu'un ou à un groupe les connaissances nécessaires à l'exercice d'une activité. Il faut prendre en compte deux types de formation, la formation initiale et la formation continue. Dans le cadre d'une intervention mettant en œuvre des agents biologiques, deux missions sont à effectuer. La première est la réalisation du prélèvement. C'est le point de départ fondamental de la mission et dans une certaine limite le principal rôle confié au VDIP. Le prélèvement est généralement effectué par un binôme de reconnaissance ou d'intervention.

La seconde mission est la réalisation des tests de détection/identification sur l'échantillon prélevé. Il est évident pour des raisons pratiques que ces deux missions ne peuvent pas être réalisées par les mêmes personnes. Le choix des intervenants doit donc prendre en compte plusieurs paramètres :

- le type de mission (scénario, présence de victimes ou non,…)
- le niveau de formation opérationnelle (formation sapeur-pompier par exemple),

- le niveau de formation théorique et technique à la manipulation des agents biologiques,
- l'expérience personnelle,
- Le niveau d'expertise reconnu permettant à l'intervenant de valider des résultats d'une part, et d'assumer un rôle de conseiller d'autre part.

3.1.1. Le prélèvement

Forts de leurs expériences sur les risques chimiques et radiologiques, les sapeurs-pompiers possèdent une grande compétence dans les techniques de prélèvement. Des doctrines d'intervention et des recommandations ont été établies et sont aujourd'hui parfaitement intégrées. Cette expérience est un avantage certain pour une future application aux prélèvements environnementaux pouvant contenir des micro-organismes. De plus, certaines techniques de prélèvement pour l'envoi aux centres de référence sont déjà en place dans les C.M.I.C. et sont intégrées dans le Guide Nationale de Référence sur les Risques Chimiques, document de référence des formations de la sécurité civile.

Cependant, dans le cadre des analyses biologiques, le prélèvement est une étape clé. En effet, c'est la qualité du prélèvement qui conditionne directement celle des résultats.

Le prélèvement pourrait être effectué, comme c'est le cas actuellement, par un binôme de sapeurs-pompiers formé aux risques chimiques, radiologiques et biologiques. Comme l'action de prélèvement et de conditionnement des échantillons ne nécessitent qu'une formation de quelques heures, le binôme chargé de réaliser celui-ci peut être le même que celui pour les risques chimiques et radiologiques. Ces intervenants doivent être capables, de s'équiper avec les différents équipements de protection individuelle, allant de la simple combinaison avec un demi-masque de protection respiratoire au scaphandre étanche en surpression avec appareil respiratoire isolant, de délimiter et de baliser une zone dite d'exclusion, de mettre en œuvre

les moyens de prélèvement et d'acheminer ces derniers jusqu'au VDIP. L'opérateur du VDIP doit alors s'assurer du respect du conditionnement des échantillons avant l'analyse par celui-ci et son envoi vers les laboratoires de référence.

La formation initiale des équipes chargées des prélèvements devrait comprendre une formation complète aux risques biologiques ainsi qu'aux prélèvements biologiques environnementaux avec le matériel contenu dans le VDIP. Ces formations doivent être organisées et animées par du personnel spécialisé dans le risque biologique comme par exemple les médecins et pharmaciens sapeurs-pompiers mais également par les professionnels des laboratoires de référence des zones de défense. Dans ces derniers, la formation doit être dispensée par des biologistes ou des techniciens de laboratoires de biologie, c'est-à-dire ceux qui connaissent le devenir d'un prélèvement biologique et qui sont capables de distinguer un échantillon qui pourra être exploité de celui qui ne pourra pas l'être. Dans cette formation supplémentaire seront enseignées des méthodes de prélèvement appliquées aux spécificités des échantillons biologiques et les personnels seront sensibilisés à l'aspect critique de cette étape. Quant à la formation continue, des exercices de mise en condition permettant de mettre en applications les différentes techniques de prélèvement selon la matrice environnementale doivent être organisés à intervalles réguliers.

Les protocoles de prélèvement devront être établis, rédigés et validés non seulement par les sapeurs-pompiers spécialisés mais aussi par les personnels du/des laboratoires référents de la zone de défense à laquelle appartient le VDIP. Ainsi, ce prélèvement sera adapté d'une part aux moyens dont dispose le VDIP mais aussi d'autre part aux techniques d'analyses des laboratoires de référence.

Ainsi, une fois prélevés, conditionnés et annotés, les échantillons doivent être envoyés en priorité au(x) laboratoire(s) de référence de la zone de défense. Il est nécessaire de bien

séparer les échantillons réglementaires répondant aux exigences de la circulaire 750 des échantillons qui seront exploités par le VDIP. Ces derniers devront être traités dans les mêmes conditions que celles mises en œuvre au sein des laboratoires de références. Cette étape repose sur l'opérateur du VDIP, dans son véhicule, qui vérifie que tous les éléments réglementaires d'identification de l'échantillon sont bien inscrits et que le conditionnement répond à la réglementation en vigueur pour le transport des échantillons biologiques.

3.1.2. L'analyse et le rendu des résultats

Pour des raisons de coût et de gestion des ressources humaines, il paraît peu vraisemblable que l'opérateur chargé des analyses biologiques soit une personne différente de celle qui réalise les analyses chimiques et radiologiques. En effet, pour chaque VDIP, il est nécessaire de disposer de plusieurs opérateurs afin d'être en mesure d'assurer une permanence. L'expérience du Bataillon de Marins-Pompiers de Marseille, qui dispose d'un laboratoire mobile spécialisé en chimie analytique, montre que cinq personnes sont nécessaires pour assurer des gardes de 24 heures, lorsque l'on prend en considération les temps de repos et les congés. Comme la polyvalence de cet opérateur doit être privilégiée, il semble peu envisageable de recruter un technicien en analyses biologiques, néanmoins idéal pour cette fonction. En revanche, il existe des formations plus polyvalentes telles que des Diplômes Universitaires de Technologie (DUT) et des Licences Professionnelles dans le domaine de l'hygiène, la sécurité et l'environnement, qui pourraient être un bon compromis : ces formations abordent en général les trois risques et les titulaires de ces diplômes sont de surcroît formés à la gestion des risques. Cependant, en ce qui concerne la gestion des risques biologiques, une formation complémentaire est nécessaire afin d'atteindre le niveau d'expertise requis : celle-ci peut se décliner en une formation générale en microbiologie et en biosécurité, une formation spécifique sur les appareillages utilisés et une expérience pratique

comme par exemple des stages réguliers en laboratoire de biologie. En outre, les appareils doivent être testés, calibrés et contrôlés selon les spécifications des fabricants, ce qui permet aux opérateurs de les manipuler quotidiennement.

L'opérateur du VDIP doit être capable de mettre en œuvre rapidement la détection et l'identification tout en travaillant en sécurité. Il doit être capable de valider techniquement les résultats obtenus, de les interpréter, et de les exposer à son échelon hiérarchique supérieur (Commandant des Opérations de Secours ou COS, par exemple). Il devra être en contact avec le laboratoire référent de la zone de défense. Il est donc aussi le conseiller technique de l'intervention et ses actions doivent toujours mettre en priorité la sécurité de la population et des intervenants.

Pour exemple, le VDIP de Paris est armé avec du personnel de la Brigade des Sapeurs-Pompiers de Paris (BSPP) mais également avec deux ingénieurs du Laboratoire Centrale de la Préfecture de Police de Paris (LCPP) qui ont l'expertise scientifique et judiciaire pour intervenir sur des événements à caractère NRBC. Cependant, il est également nécessaire que les personnes formées au sein du VDIP aient une connaissance du milieu des sapeurs-pompiers afin de pouvoir entretenir le lien de communication entre les laboratoires de références et les responsables de l'intervention.

En plus de l'opérateur, nous pourrions également imaginer le recrutement d'une personne faisant fonction d'ingénieur, titulaire d'un Master voire d'un Doctorat d'Université dans le domaine de la biologie, et qui serait formée dans un second temps au métier de sapeur-pompier. Cet ingénieur qui pourrait être recruté au sein du vivier de sapeurs-pompiers volontaires, ce qui représenterait un coût moindre pour le SDIS.

En outre, pour accomplir cette fonction, il ne faut pas oublier la présence dans les SDIS de médecins et de pharmaciens, membres du Service de Santé et de Secours Médical, qui reçoivent tous une formation complémentaire sur les risques NRBC. En intervention, leur

connaissance médicale permet une action rapide de soutien aux victimes. Les médecins ont une connaissance des maladies infectieuses permettant un tri et un diagnostic clinique. Les pharmaciens jouent essentiellement le rôle de logisticiens de la réponse sanitaire et médicale en particulier. Dans ce cas, en amont des interventions, un pharmacien sapeur-pompier assure et est responsable de la préparation des lots médico-secouristes. Au cours d'un plan de secours, il peut être appelé à organiser sur place la délivrance des médicaments et exerce le rôle de conseil auprès des autres acteurs de santé. Enfin, pendant et après l'intervention, c'est lui qui est chargé de l'approvisionnement du matériel médical, du ravitaillement en produits de santé des véhicules. Par ailleurs, dans son SDIS, c'est souvent le responsable ou le conseiller en matière d'hygiène en intervention, c'est-à-dire celui qui est chargé de la formation des équipes de secouristes, de la rédaction de procédures de nettoyage et de désinfection/décontamination du matériel médico-secouriste et des véhicules sanitaires.

Ses fonctions de logisticien, d'hygiéniste et son intégration dans la chaîne opérationnelle des sapeurs-pompiers d'une part, ainsi que ses connaissances universitaires en chimie, microbiologie, pharmacologie, pathophysiologie, pharmacologie, toxicologie et thérapeutique d'autre part, font du pharmacien une ressource précieuse ayant sa place au sein de l'équipe du VDIP (241). Il est aisément envisageable de lui proposer une spécialisation aux outils de détection et d'identification dans les domaines des risques chimiques, biologiques et radiologiques par des formations complémentaires, universitaires ou non, qui lui assureront un socle de connaissances théoriques et pratiques concernant ces trois risques et plus particulièrement la sensibilisation aux spécificités des agents hautement pathogènes et aux règles de biosécurité qui s'appliquent autour de leur manipulation.

Certains choisissent de se spécialiser plus particulièrement sur ces risques en effectuant des formations universitaires. Nous vous en citons quelques-unes à titre d'exemple :

- Le Master de Sciences et Technologies Mention Santé publique et Sciences sociales, Spécialités : Risques sanitaires Radionucléaires, Biologiques et Chimiques, et le diplôme d'Université NRBC (Riques nucléaires, radiologiques, biologiques, chimiques), organisés par l'Ecole du Val-de-Grâce et l'Université Pierre et Marie Curie à Paris ;
- Le Master Spécialisé Gestion des risques et menaces N.R.B.C.E. et le Diplôme d'Université Tactiques et techniques d'intervention face aux risques et menaces NRBC, organisés par l'Université de Haute-Alsace, l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse et l'Ecole Nationale Supérieure de Officiers Sapeur-Pompiers ;
- Le Certificat d'Etude Universitaire Bioterrorisme et agents contagieux hautement pathogènes organisé par Aix Marseille Université ;
- Diplôme d'Université « la sécurité et la sûreté biologiques », organisé par l'Université Pierre et Marie Curie à Paris, le Service de Santé des Armées, l'ANSM et l'Institut Pasteur de Lille.

La personne faisant fonction d'ingénieur et de conseiller en risques biologiques devra être en relation très étroite avec le laboratoire de référence appartenant à la zone de défense du SDIS. Ceci permettrait d'assurer le maintien et l'actualisation des connaissances en matière de risque biologique, mais aussi de permettre de participer au développement de nouveaux outils susceptibles d'être utilisés dans le VDIP.

3.1.3. Conducteur/logisticien du VDIP

Le VDIP est l'un des véhicules les plus imposants du parc automobile des sapeurs-pompiers, si bien qu'une formation spécifique à la conduite est nécessaire, d'autant plus que le véhicule contient du matériel lourd et sensible aux secousses. L'arrivée sur les lieux de l'intervention

doit être organisée car il faut que le véhicule puisse déployer ses matériels sans gêner les autres véhicules opérationnels.

Le conducteur doit participer à la mise en place des matériels dans le VDIP afin d'aider l'opérateur qui doit dans un premier temps se présenter au C et prendre les informations nécessaires à la conduite de l'opération. Par exemple, dans les VDIP actuels, les réactifs et instruments d'analyse se trouvent dans les coffres extérieurs à la cellule où se déroule les analyses, le conducteur pourrait être en charge de l'installation de ce matériel dans les différents postes de travail. De plus, à l'extérieur du VDIP, doivent être mises en place des zones d'habillage/déshabillage pour les intervenants et de décontamination pour lesquelles l'intervention du conducteur pourrait également être sollicitée.

Le conducteur doit avoir suivi d'une part une formation minimale de conducteur de niveau 3 (COD3) équivalent à un moniteur de conduite, d'autre part une formation spécifique sur la mise en place du matériel du VDIP ainsi qu'une formation générale sur le risque biologique et le port des tenues de protection inhérentes à ce risque.

A titre d'exemple, la figure ci-dessous est une proposition de résumé concernant les missions, les acteurs, la formation et les rôles de chacun au sein du VDIP.

Prélèvement	Analyse & rendu des résultats		Logistique d'intervention
• **Acteurs** Sapeur-pompier volontaire ou professionnel	• **Acteurs** Opérateur détenteur d'un DUT ou d'une licence professionnelle dans le domaine de l'hygiène, la sécurité et l'environnement	• **Acteurs** Ingénieur ou personne diplômé d'un niveau Master en Biologie, Doctorat en Science, Doctorat en Pharmacie ou Médecine avec spécialisation par un Master en Biologie ou dans le domaine de l'hygiène, la sécurité et l'environnement	• **Acteurs** Sapeur-pompier volontaire ou professionnel
• **Formation Initiale** Formation aux risques biologiques Formation aux prélèvements biologiques environnementaux	• **Formation Initiale** DUT/ Licence professionnelle Formations RCH et RAD complètes Expérience de manipulation en laboratoire	• **Formation Initiale** Master / Doctorat Formations RCH et RAD complètes Expérience de manipulation en laboratoire	• **Formation Initiale** Formation minimum COD3
• **Formation Continue** Manœuvres spécifiques Entraînement et participation à des exercices réguliers	• **Formation Continue** Travail en partenariat avec un laboratoire de référence Manœuvres spécifiques Entraînement et participation à des exercices réguliers	• **Formation Continue** Travail en partenariat avec un laboratoire de référence Manœuvres spécifiques Entraînement et participation à des exercices réguliers	• **Formation Continue** Manœuvres spécifiques Entraînement et participation à des exercices réguliers
• **Rôles** Aide au déploiement du VDIP, Prélèvement, acheminement du prélèvement au VDIP et décontamination externe du prélèvement	• **Rôles** Responsable de l'acheminement du prélèvements aux laboratoires de référence Analyse des échantillons et rendu des résultats Rédaction des protocoles de prélèvement et d'utilisation des appareils Conseils sur l'intervention Implication dans les formations aux risques biologiques Maintenance, organisation et gestion de l'entretien du VDIP Développement de nouveaux tests de détection et d'identification au sein des laboratoires de référence	• **Rôles** Soutien de l'opérateur Responsable de l'acheminement du prélèvements aux laboratoires de référence Analyse des échantillons et rendu des résultats Rédaction des protocoles de prélèvement et d'utilisation des appareils Conseils sur l'intervention Implication dans les formations aux risques biologiques Maintenance, organisation et gestion de l'entretien du VDIP Développement de nouveaux tests de détection et d'identification au sein des laboratoires de référence	• **Rôles** Conduite du véhicule Mise en place du matériel du VDIP

Figure 22 : Définition des acteurs, la formation et les rôles de chacun dans le VDIP

La coordination entre les différents secteurs, chimique, radiologique et biologique est essentielle afin d'obtenir une action efficace.

3.2. Installation, maintenance et coût

Après l'installation des appareils dans le VDIP, leur qualification d'installation et opérationnelle doit être effectuée afin de vérifier leur bon fonctionnement. Des tests de validation doivent également être réalisés ainsi que la vérification du matériel disponible et si celui-ci correspond bien aux besoins en matière d'analyse. Par exemple, si dans le protocole de préparation de l'échantillon une étape de centrifugation est nécessaire, il faut que le VDIP soit équipé d'une centrifugeuse. Ces tests et vérifications peuvent être effectués par l'opérateur du VDIP. A cela s'ajoute la vérification quotidienne du fonctionnement du

matériel, la vérification des dates de péremptions pour les réactifs, l'intégrité des contenants du matériel stérile de prélèvement, l'inventaire et la gestion des stocks ainsi que des validités des contrôles de maintenance le cas échéant.

Enfin, pour les équipes du VDIP, il est aussi important de suivre les évolutions d'une part de la réglementation vis-à-vis des micro-organismes pathogènes et des toxines, d'autre part des technologies d'identification biologique. En partenariat avec des laboratoires de références, les opérateurs et ingénieurs responsables du véhicule peuvent modifier des protocoles, participer à la réflexion sur l'acquisition de nouveaux matériels et à leur éventuelle mise en place au sein du dispositif, afin d'améliorer les performances du VDIP, tout en prenant en compte les coûts importants de telles acquisitions. En effet, au prix initial du VDIP, il faut ajouter les coûts des matériels et réactifs consommés et/ou périmés, de la maintenance des appareils ainsi que le coût d'acquisition de nouveaux outils. Afin que le VDIP puisse évoluer en fonction des besoins et des innovations, il faudrait assurer à ces unités des budgets de fonctionnement et d'équipement prenant en compte l'ensemble de ces coûts.

3.3. Transport des matières biologiques - Réglementation

Un autre rôle qui pourrait être dévolu au VDIP serait l'acheminement des prélèvements du site d'intervention vers les laboratoires de référence. Selon l'accord européen ADR du 30 septembre 1957, aujourd'hui remplacé par l'article 26 de l'arrêté du 29 mai 2009 (242) relatif aux transports de marchandises dangereuses par voies terrestres, le transport des matières biologiques doit être réalisé par un transporteur agréé et non plus par les véhicules de sapeurs-pompiers comme cela a pu être le cas durant la crise des enveloppes contenant de la poudre en 2001(33). La gestion des transports des matières dangereuses fait l'objet de recommandations actualisées chaque année par la Commission Economique pour l'Europe des Nations Unies (UNECE : *United Nations Economics Comission for Europe*), la dernière

datant de 2013 est consultable en ligne sur le site de l'UNECE (243). Les prélèvements doivent être acheminés à 4°C, le plus rapidement possible, dans un triple emballage compatible avec une entrée au laboratoire. Aucun objet ne doit être envoyé au laboratoire. Les recommandations concernant la procédure de triple emballage sont données en annexe (Annexe 4) selon les recommandations du guide PCT (37). Nous pourrions concevoir de faire agréer le VDIP pour ce type de transport voire de faire modifier la réglementation, afin de permettre au VDIP d'acheminer le prélèvement vers les laboratoires référents, ce qui permettrait de diminuer le coût de transport et de raccourcir les délais. Des protocoles permettant l'acheminement dans de bonnes conditions des différents échantillons devraient alors être réalisés.

3.4. Sécurité, décontamination et gestion des déchets

La manipulation d'agents biologiques implique des règles de sécurité strictes et sont soumis à réglementation. Après prélèvement, les différents flacons d'échantillons sont emmenés dans le VDIP où trois d'entre eux seront conditionnés pour l'envoi au(x) laboratoire(s). Dans la mesure du possible un prélèvement pour le VDIP est également effectué. La manipulation de cet échantillon doit se faire dans des conditions de sécurité en considérant la possibilité qu'il contienne des agents de classe 3 ou 4. Selon l'arrêté du 16 juillet 2007 (244) **«** *les niveaux de confinement à mettre en œuvre dans les salles dédiées aux activités techniques sont choisis selon la classification des agents biologiques recherchés, sauf lorsque l'évaluation des risques permet la prise en compte des cas particuliers* ». La réglementation française impose donc, à partir du moment où l'on suspecte la présence d'un agent pathogène de classe 3 ou 4, de les manipuler dans les conditions correspondant à la classe de ces agents, c'est-à-dire respectivement des laboratoires de niveau de sécurité biologique 3 et 4. Dans ce cas, le VDIP ne répond pas aux exigences de la réglementation puisque ce n'est pas un laboratoire confiné

au sens réglementaire. Cependant, les cas particuliers évoqués par la réglementation, c'est-à-dire les agents du groupe 3 non infectieux par voie aérienne et dont la quantité manipulée est faible, méritent d'être pris en considération car une place est tout de même réservée à une analyse de risque préliminaire. Si la réglementation française est assez stricte, elles peuvent être plus nuancées ailleurs : par exemple, selon les recommandation des CDC (13), la manipulation des agents biologiques dépend de la quantité de pathogène présent dans l'échantillon. Dans le cadre d'un attentat bioterroriste, si la quantité de pathogène dans un échantillon est faible, l'échantillon peut être manipulé sous un confinement de sécurité biologique de niveau 2 (NSB2). En revanche, dans le cadre de manipulation de grande quantité d'agent, comme dans le cas lors d'une mise en culture, l'agent doit être manipulé sous un confinement correspondant à la classe de l'agent soit un laboratoire NSB3 pour *B. anthracis* par exemple. Enfin, il faut aussi prendre en compte la voie de transmission de l'agent, qui, dans le cas d'une dissémination terroriste, est majoritairement par aérosol. Dans ce dernier cas, la manipulation de l'échantillon, quel que soit la quantité présente, doit être effectué afin de générer le moins d'aérosol possible. Dans le cas contraire (étapes de centrifugation nécessaire par exemple), l'échantillon doit être manipulé dans les conditions NSB3. Par exemple, *B. anthracis* peut être manipulé en NSB2 si aucune étape ne générant des aérosols ou de mise en culture n'est à effectuer ; dans le cas contraire, les conditions type NSB3 sont nécessaires (13). Finalement, une des solutions serait l'inactivation de l'échantillon (en général par la chaleur) n'empêchant pas son utilisation pour les techniques de biologie moléculaire et immunologiques mais ne permettant plus la mise en culture. Dans le contexte d'emploi du VDIP, les matrices sont environnementales et non biologiques d'une part, et les échantillons ne sont pas destinés à être mis en culture dans la cellule du VDIP. Le véhicule est aujourd'hui équipé d'une hotte à flux laminaire appelée poste de sécurité

microbiologique (PSM) de type II[27]. Afin d'assurer une cohérence entre le risque envisagé et l'équipement du VDIP, il serait judicieux d'opter pour l'installation d'une boîte à gants étanche en dépression ou PSM de type III et dans laquelle la manipulation de l'échantillon non inactivé pourrait être réalisée. Le niveau de sécurité appliqué au VDIP est un point sur lequel il sera nécessaire de beaucoup travailler.

En revanche, il est indispensable que les moyens de protection individuels et collectifs mis en œuvre à l'intérieur du VDIP soient en adéquation avec ceux déployés à l'extérieur. Par exemple, il serait incohérent que l'équipe chargée du prélèvement soit en scaphandre en surpression et que l'échantillon ne soit pas manipulé dans les conditions de sécurité maximale. Dans tous les cas, le personnel doit revêtir une tenue de protection adaptée à l'image de celles utilisées dans les laboratoires NSB3 c'est-à-dire une combinaison imperméable jetable résistante adaptée pour le risque biologique (comme par exemple le Tyvek® de type 4B assurant la protection contre les liquides et poussières contaminées), le port de bottes ou sur-bottes imperméables, 2 paires superposées de gants, une cagoule ou une charlotte, des lunettes de protection ainsi qu'un demi-masque de protection respiratoire de type *Filtering Facepiece Particule* (FFP) 2 ou FFP3. L'habillage/déshabillage se fait selon un protocole strict et l'ensemble des équipements de protection individuelle est jetable.

Les procédures de manipulation sous hotte sont ensuite appliquées afin de limiter la contamination. Il est important de bien suivre les règles de sécurité pour la manipulation des échantillons, le VDIP n'est pas conçu pour être un laboratoire de type NSB3. En effet, il est destiné à la manipulation d'agents chimiques et comporte une hotte à charbon actif. En cas

[27] Il existe trois types de PSM en fonction des objectifs de protection souhaités : le PSM I protège le manipulateur et l'environnement par la création d'un flux d'air entrant filtré à la sortie mais ne protège pas l'échantillon. Le PSM II protège l'environnement et le manipulateur ainsi que l'échantillon par filtration de l'air entrant dans la hotte. Le PSM III est une enceinte close, l'échantillon est manipulé par l'intermédiaire de manchons. L'air est filtré en sortie, l'échantillon est protégé mais pas des contaminations croisées car il n'y a pas de flux dans l'enceinte.

d'intervention, il sera donc nécessaire de hiérarchiser les risques et de se protéger par rapport au risque le plus grave pour l'intervenant. Par exemple, s'il s'agit d'une suspicion d'un toxique, le port du masque de protection respiratoire avec une cartouche filtrante sera alors privilégier, même si le VDIP ne doit en aucun cas être déployé en zone supposée contaminée.

Des procédures de régulations concernant l'entrée dans le VDIP sont donc à établir avant de procéder à la manipulation des échantillons. De plus, des procédures en cas d'accident biologique (contamination par du matériel souillé par exemple) sont également à définir. Un sas à l'entrée du VDIP avec une possibilité de décontamination en cas d'accident doit également être envisagé. La mise en place de ce sas pourrait également permettre l'habillage et déshabillage du personnel mais également servir d'interface de communication avec les autres intervenants. Les entrées/sorties au niveau du véhicule doivent être limitées puisque l'ouverture de la porte donne directement sur le laboratoire.

Les surfaces du poste de travail et les matériels utilisés devront être décontaminés. Les matériels à usage unique et/ou non décontaminables devront être éliminés par la voie des déchets. Pour la désinfection des surfaces l'utilisation d'un détergent/désinfectant répondant aux normes de virucidie, bactéricidie et sporicidie, en général sous forme de spray déjà reconstitué, sera privilégiée. Il est cependant indispensable de bien respecter les dilutions, le temps de contact, la compatibilité avec les matériels utilisés, certains désinfectants étant particulièrement corrosifs, et aussi de ne pas mélanger les désinfectants entre eux. Nous ne listerons pas de manière exhaustive les différents désinfectants utilisables, les principaux étant à base d'hypochlorite de sodium ou d'acide peracétique, l'éthanol n'étant pas actif sur les spores. Pour la décontamination de la cellule, une désinfection par voie aérienne via un diffuseur peut être mise en œuvre après un bionettoyage des surfaces (245).

Le traitement des déchets infectieux est soumis à réglementation et doit être effectué selon les procédures décrites dans l'arrêté du 24 novembre 2003 modifié par l'arrêté du 6 janvier 2006 relatif aux emballages des déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés et des pièces anatomiques d'origine humaine. De façon générale, le traitement des déchets infectieux doit être assuré par une entreprise spécialisée. Un protocole de gestion des déchets au sein du VDIP doit donc être établi avec ce type d'entreprise. Le cas échéant, l'entreposage des déchets est autorisé mais doit suivre les conditions décrites dans l'arrêté du 7 septembre relatif aux modalités d'entreposage des déchets d'activité de soins à risque infectieux et assimilés et des pièces anatomiques.

3.5. Exemple de protocoles d'utilisation

3.5.1. Les champs d'action du VDIP

Comme son nom l'indique, le VDIP est un véhicule dont les principaux rôles sont le prélèvement de matrices pouvant être souillées par du matériel chimique, radioactif ou biologique et réaliser la détection et l'identification de ce matériel.

Dans le cadre de ses attributions actuelles, l'intervention du VDIP sera requise en cas de suspicion d'un attentat bioterroriste ou après une revendication (37). Dans le premier cas, lorsqu'il existe des victimes présentant des symptômes conduisant à une suspicion d'acte bioterroriste, ce sont en général les investigations cliniques et épidémiologiques qui vont conduire à l'identification de l'agent pathogène et les premiers prélèvements seront biomédicaux. Dans ce cas, nous pouvons aisément imaginer que la découverte de l'agent sera réalisée au sein d'un laboratoire de biologie médicale. La détection environnementale par le VDIP viendrait alors seulement pour tenter de confirmer l'origine des cas. Mais son rôle dans ce cadre-là resterait à définir, mais il est plus probable qu'il se cantonnerait probablement à une mission de prélèvements et de leur acheminement vers les laboratoires de référence. Il

faut noter que la frontière entre l'enquête de police judiciaire réalisée par la police ou la gendarmerie et la mission de protection de la population par la sécurité civile est étroite. Le VDIP pourrait même agir sur réquisition judiciaire.

Dans le cas d'un attentat suspecté ou revendiqué, la mission du VDIP est d'infirmer ou confirmer la réalité de la menace via l'identification du ou des agents en cause. Les analyses se feront sur place permettant ainsi de prendre des mesures rapides sur les personnes impliquées et sur les biens en cas de résultat positif. Les missions secondaires sont ensuite de délimiter des zones contaminées et de vérifier l'efficacité de la décontamination de ces zones (37).

Les missions initiales du VDIP décrites ci-dessus sont pour l'instant limitées au risque bioterroriste. Cependant, des interventions d'un autre type comme dans le cadre d'une dissémination accidentel d'agent biologique pourraient être envisagées. Par exemple, dans le cas d'un accident d'un véhicule transportant du matériel biologique, le VDIP pourrait être appelé afin de vérifier l'étendue de la contamination et le cas échéant la qualité de la décontamination. Il faut rappeler que les différents laboratoires mobiles avaient été mis en place chez les pompiers pour l'identification précoce des toxiques de guerre dans le cadre d'un attentat chimique notamment suite à l'attentat au sarin de Tokyo en 1995. Puis, ces outils très performants ont montré un intérêt dans la gestion des risques chimiques technologiques et autres accidents mettant en œuvre des substances chimiques de toutes sortes (industriel, routier, pollution…). C'est aujourd'hui, la principale activité de ces laboratoires mobiles. Les missions du VDIP dans le cadre de l'identification biologique pourraient s'élargir dans l'avenir aux risques biologiques autres que le bioterrorisme.

3.5.2. Organigramme des acteurs

La figure ci-dessous est un exemple d'organisation concernant les acteurs pouvant œuvrer dans le VDIP. Dans le cas présenté ici (Figure 23), la responsabilité du véhicule est donnée au binôme opérateur /ingénieur défini précédemment. Le binôme sera en charge, pour les trois domaines, de la gestion de l'intervention mais également de l'identification et d'un technicien qui aidera à la réalisation des tests. Le binôme sera accompagné d'un binôme d'intervention et d'un conducteur. Un renfort d'un personnel spécialisé plus particulièrement dans l'un des risques pourra être demandé: par exemple un médecin, pharmacien ou biologiste pour le risque biologique, un ingénieur chimiste ou un toxicologue pour le risque chimique ou un spécialiste de la radioprotection pour le risque radiologique.

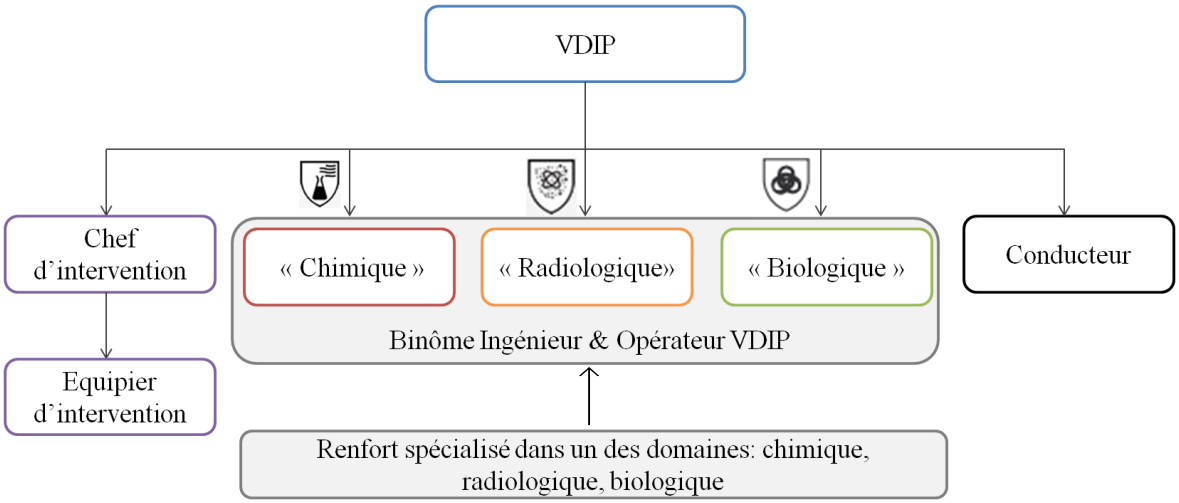


Figure 23 : exemple d'organisation des acteurs du VDIP - 1 binôme responsable de l'intervention épaulé par les renforts du risque mis en évidence

Une autre possibilité liée directement aux coûts et à l'organisation des astreintes serait d'intervenir avec un VDIP armé par un opérateur, un conducteur et un binôme d'intervention (Figure 24). Une fois sur place, les premiers tests sont réalisés et à partir du résultat obtenu, un ingénieur du domaine voulu est appelé en renfort.

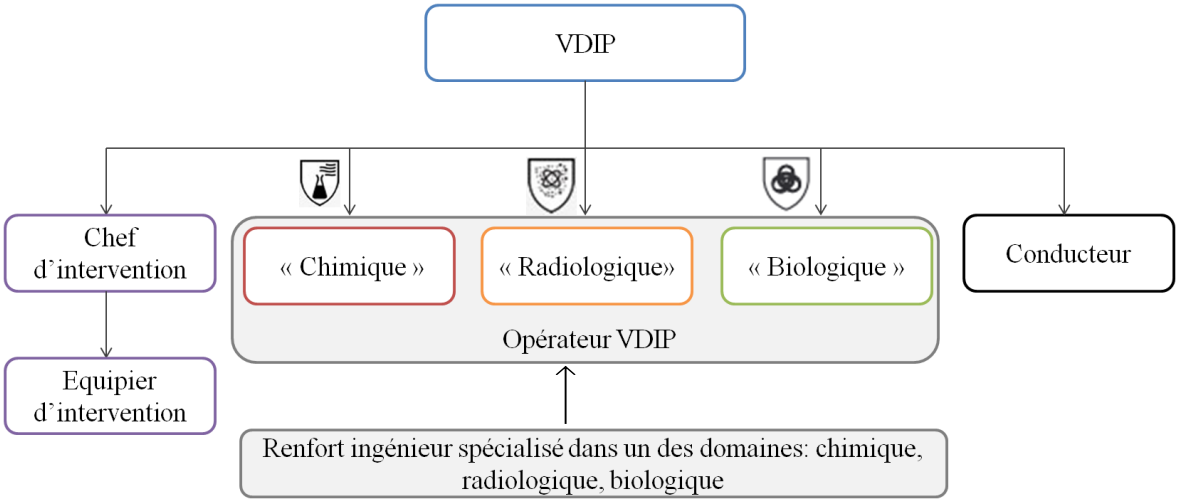


Figure 24 : Exemple d'organisation des acteurs du VDIP – L'opérateur effectue les premiers tests et demande en renfort un ingénieur spécialiste du risque mis en évidence

Dans le premier cas le travail en binôme permet une mise en place du matériel et une analyse plus rapide de l'échantillon. Il permet également une meilleure gestion de l'intervention. Cependant ce type d'organisation nécessite la mise en place d'astreinte de deux personnels en continue, les coûts ainsi que la disponibilité des personnes peuvent être un frein à cette mise en œuvre.

Dans le second cas, l'armement du véhicule avec un opérateur seul permet de réduire ces coûts et permet l'intervention d'un ingénieur spécialiste dans le risque identifié. Cependant, selon la localisation de l'intervention, les délais pour rejoindre les lieux peuvent être plus ou moins longs, l'opérateur peut donc rester des heures à gérer seul son intervention.

3.5.3. Organisation générale

3.5.3.1. Mise en place du matériel

A l'arrivée sur les lieux de l'intervention, le responsable du VDIP prend en compte la situation et évalue les besoins. Le matériel est ensuite mis en place par le binôme d'intervention et le conducteur.

Une zone d'habillage (Figure 25) à proximité de l'ouverture peut être organisée pour le binôme d'intervention ainsi que toute personne amenée à entrer dans le VDIP lorsque l'analyse a débuté. La zone d'habillage contient donc les tenues spéciales d'intervention de type scaphandre et équipements de protection individuelle pour le laboratoire. Elle contient également le matériel de prélèvement et d'échantillonnage.

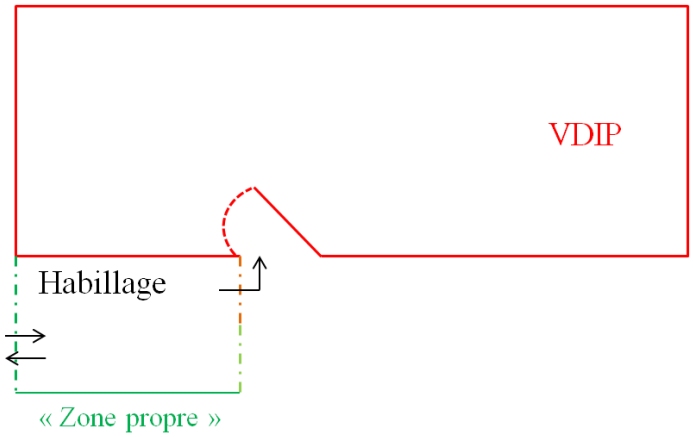


Figure 25 : Zone d'habillage

A partir du moment où des échantillons potentiellement contaminés sont manipulés dans le VDIP, la sortie du laboratoire se fait obligatoirement par le passage dans une zone équipée d'une douche (Figure 27) et de bacs de déshabillage (Figure 26). La douche n'est pas obligatoire mais peut être utilisée en cas d'incident entrainant une contamination du personnel du VDIP. Le personnel sort du véhicule, retire sa première paire de gants, puis plus loin, la tenue et les sur-chaussures, et enfin la seconde paire de gants et le masque. Si du matériel doit être sorti du véhicule, des produits de décontamination doivent être à disposition dans la zone de déshabillage.

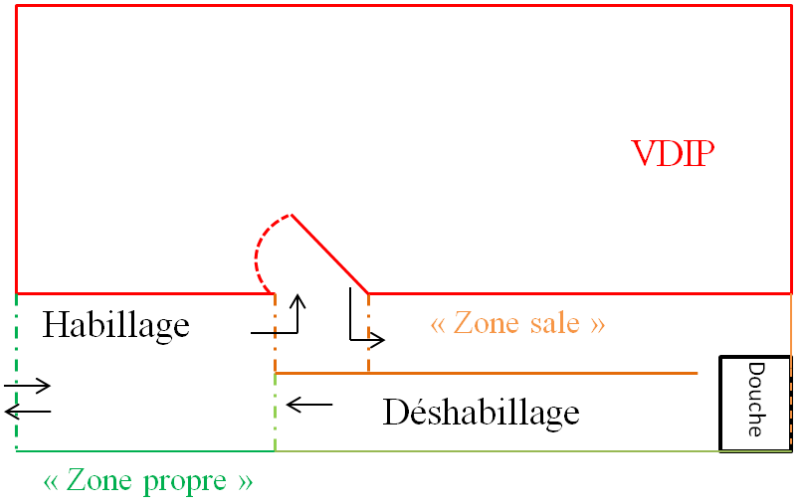


Figure 26 : Sortie du VDIP – La zone sale contient un bac de réception pour la première paire de gant ainsi que du produit pour décontaminer le matériel sortant. La zone de déshabillage contient quant à elle des bacs prévus à la réception de la tenue restante.

Le binôme d'intervention en sortie de la zone d'intervention doit obligatoirement procéder à une douche de décontamination avant de retirer leurs équipements de protection. La boîte hermétique contenant les échantillons doit être elle aussi décontaminée. A travers le balisage, un seul passage est gardé pour la sortie de zone. Celle-ci peut se faire par un passage dans la douche de décontamination (Figure 28) suivi du déshabillage dans la zone prévue à cet effet. Dans le même temps, ce passage permet de décontaminer le matériel utilisé et la boîte contenant les échantillons.

Figure 27 : exemple de douche de décontamination commercialisée par Vetter (246)

En sortie du sas de déshabillage, la boîte contenant les trois échantillons à destination des laboratoires de références peut soit être prise en charge pour le transport soit reconstituer à l'intérieur du VDIP si les échantillons à destination du véhicule ont été conditionnés dans la même boîte.

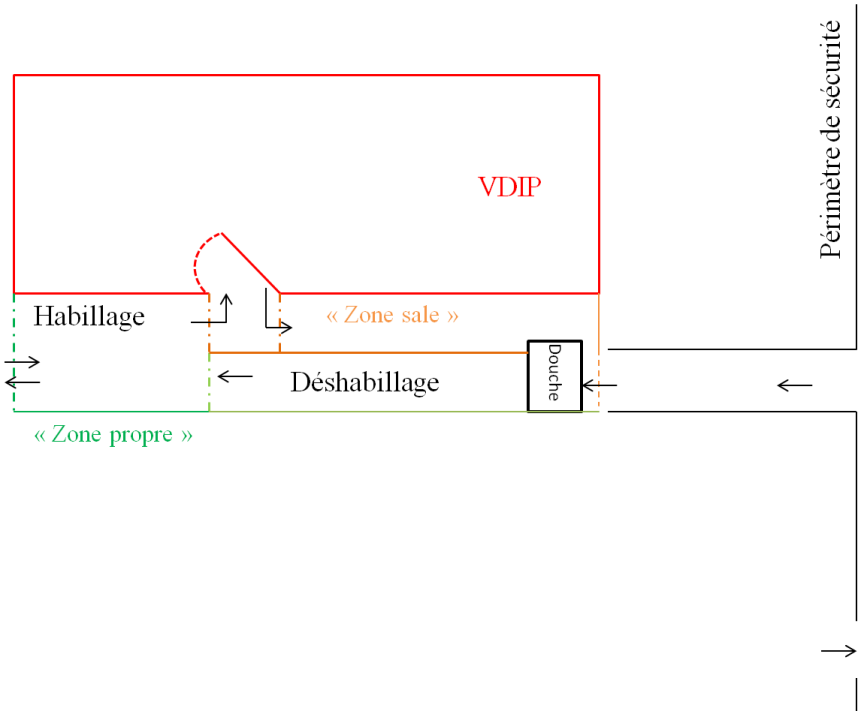


Figure 28 : Schématisation de la sortie de la zone d'intervention avec le prélèvement

Enfin, une zone d'échange et de discussion peut être aménagée à distance de la zone de mouvement du personnel et des échantillons potentiellement contaminés (Figure 29). Elle peut être installée à l'arrière du véhicule et pourrait contenir les documents d'intervention, les fiches de protocoles et tous les documents réglementaires nécessaires au transport ainsi que les moyens de communication (radio, téléphone). Elle permettrait les échanges entre les acteurs du VDIP et les responsables de l'intervention.

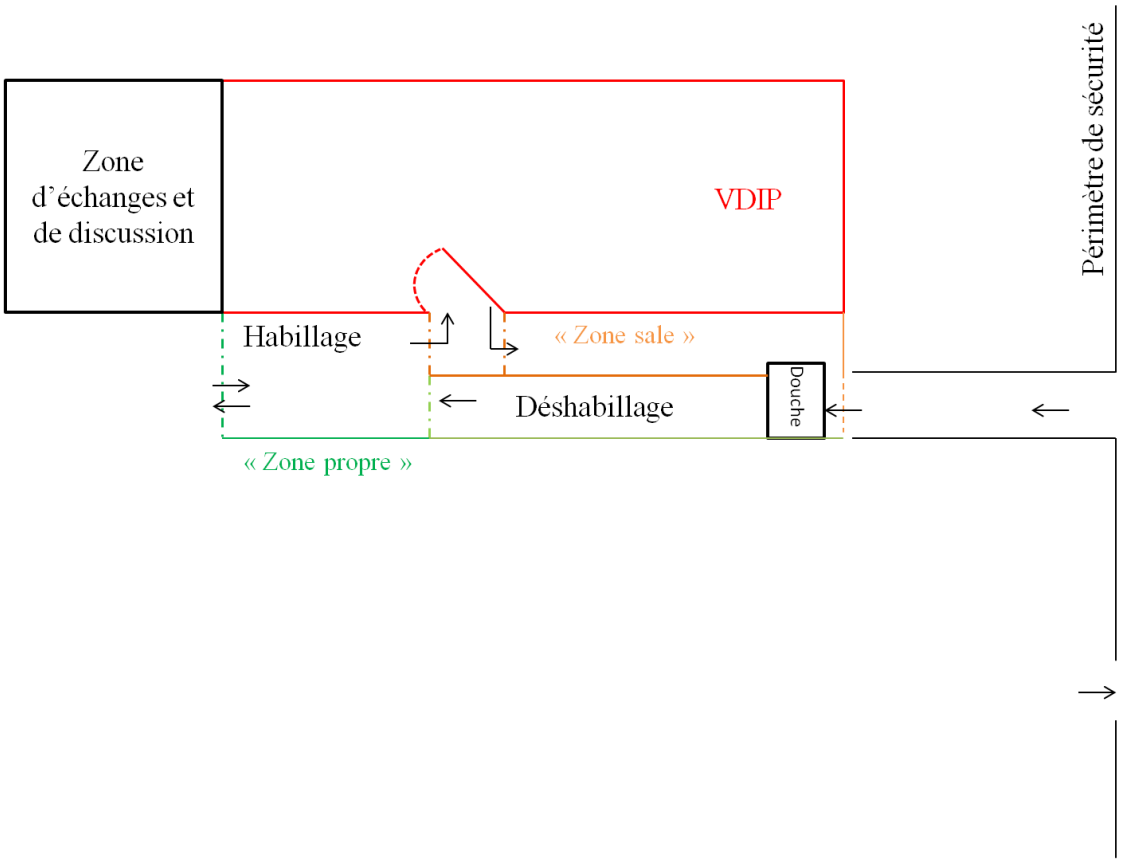


Figure 29 : Schéma de l'organisation générale avec l'ajout de la zone d'échange et de communication

3.5.3.2. Missions

Pour chacune des missions que sont le prélèvement, l'analyse et les actions mises en œuvre après les résultats, un exemple d'organisation est donné sous la forme d'un organigramme.

3.5.3.2.1. Prélèvement et analyse

Le prélèvement doit être réalisé dans des conditions stériles avec du matériel à usage unique. Une fois que les échantillons destinés aux centres de références sont prélevés, le reste du prélèvement sera utilisé pour l'identification dans le VDIP.

Selon le type de matrices, différentes procédures de prélèvement sont disponibles (Figure 30).

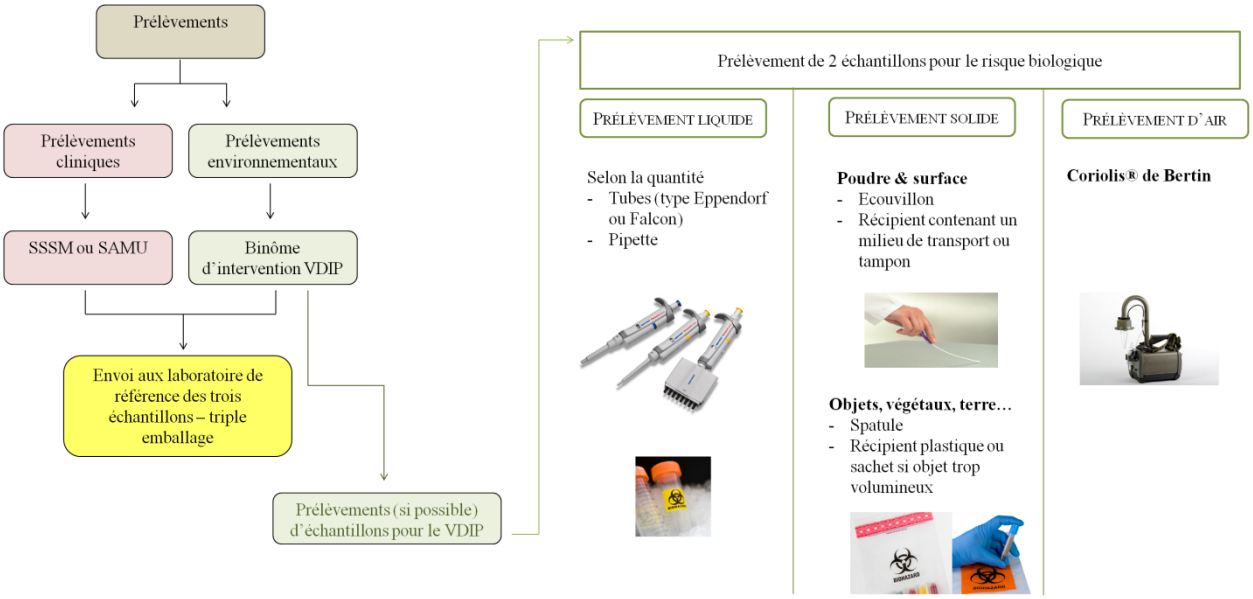


Figure 30 : Schématisation des différentes procédures de prélèvement

Les tests disponibles à l'heure actuelle dans le VDIP sont fournis avec du matériel de prélèvement, essentiellement des écouvillons. La solution de suspension est également apportée par le kit KDTB® Gold. Il suffit de déposer une goutte à l'aide du flacon verseur sur la cartouche à l'endroit prévu. Pour le test de Cepheid®, l'écouvillon est simplement inséré dans le boitier, les étapes suivantes se font automatiquement.

3.5.3.2.2. Conduite à tenir face aux différents résultats

La difficulté d'une approche terrain du risque biologique est l'utilisation des résultats. Un exemple de mise en œuvre de la réponse après l'obtention des différents résultats est schématisé sur la Figure 31.

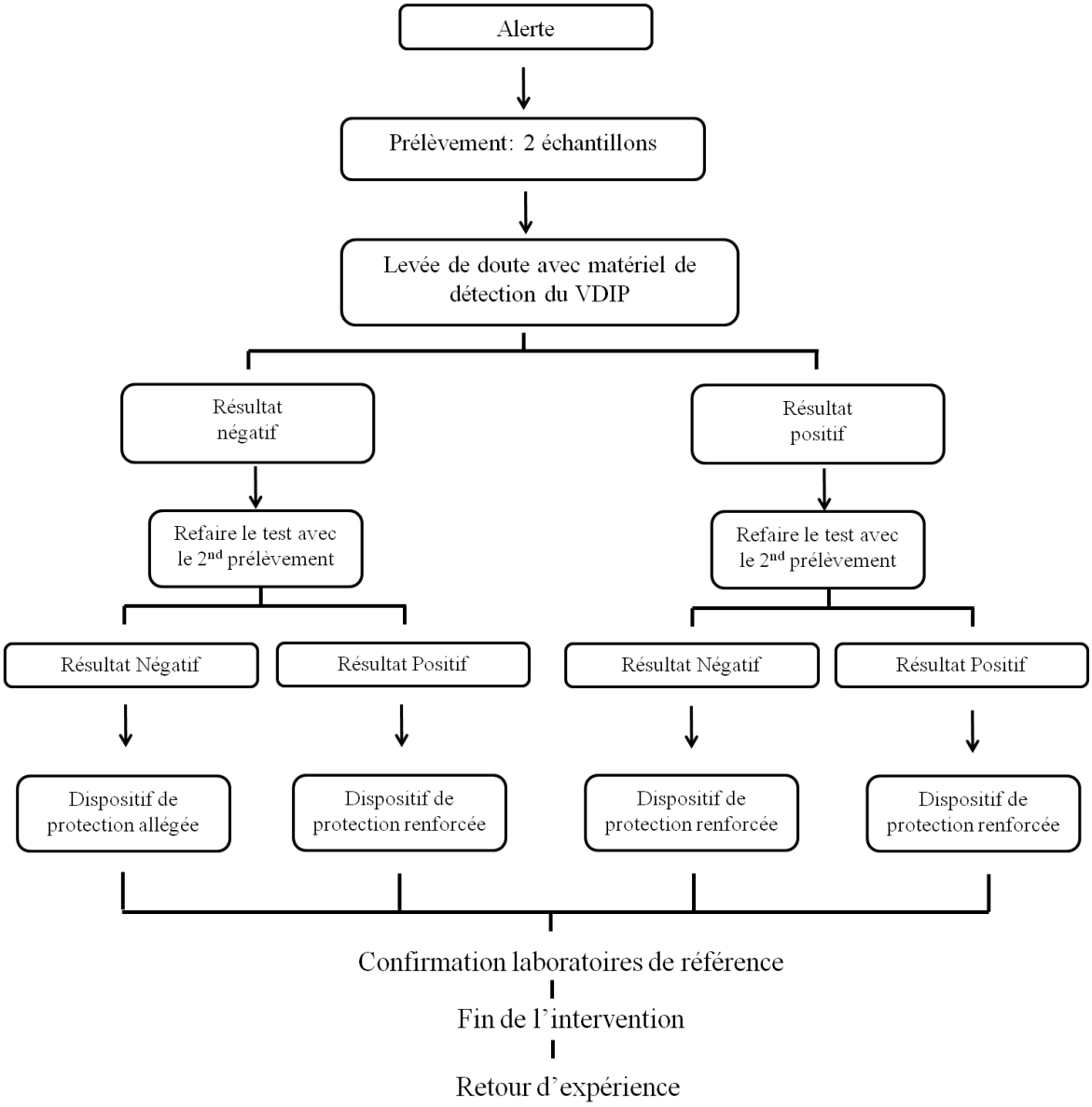


Figure 31 : Exemple d'organisation de la réponse selon les résultats obtenus

Pour résumé, un premier test est effectué sur un échantillon et confirmé via l'utilisation du second. En cas de double résultat négatif, la présence des agents recherchés peut être écartée et le résultat rendu en tant que tel aux autorités, les décisions de lever le dispositif étant prises

par le préfet et non par les sapeurs-pompiers. Cependant, la présence d'un autre agent non recherché ou modifié pourra être envisagée mais pas au niveau du VDIP. La mise en place d'un dispositif de protection allégée ou réduite implique cependant la surveillance des personnes qui ont été en contact avec le produit. Une décontamination des personnes peut ne pas être envisagée mais la levée du dispositif ne pourra être effectuée qu'après la confirmation par le laboratoire de référence. L'objectif à terme est de permettre au VDIP de réaliser cette levée de doute qui permettrait d'exclure la présence d'un agent pathogène dans le prélèvement et de procurer aux autorités préfectorales des résultats fiables leur laissant le choix de mettre fin à l'intervention.

Dans le cas inverse, un résultat doublement positif doit entraîner la mise en place d'un dispositif de protection renforcée, avec la décontamination des impliqués ainsi que la mise en place des traitements prophylactiques. L'apport du VDIP permet donc aux autorités de confirmer un dispositif sécuritaire pour la protection de la population et des intervenants qui n'auront pas tendance à relâcher les mesures de protection.

Entre ces deux cas de figure, un résultat douteux doit dans le doute conduire à la mise en place d'un dispositif de protection renforcée en attendant la confirmation par le laboratoire de référence. Après intervention, lors d'un retour d'expérience et pour l'amélioration continue, la recherche de l'origine de ces faux positifs/négatifs doit être entreprise et les mesures de correction devront être prises si possibles.

DISCUSSION

Ce travail est le fruit d'une réflexion commune impliquant les différents acteurs inhérents à l'activité du VDIP tels que les sapeurs-pompiers professionnels ou volontaires, qu'ils soient hommes du rang ou officiers, mais également les membres des laboratoires de référence appartenant au réseau Biotox-Piratox. Nous avons essayé de répondre à plusieurs questions critiques et opérationnelles pour la mise en œuvre de ce véhicule d'intervention : le choix du matériel à utiliser, sa validation, l'utilisation des résultats, le type de cibles recherchées mais également la formation des acteurs directs. Le choix des techniques doit prendre en compte les contraintes d'utilisation (facilité d'utilisation, portabilité), les exigences inhérentes à la qualité mais également le contexte d'intervention.

Il est important de connaître les performances et les limites des outils d'analyse mis à disposition, de savoir par qui et à qui les résultats seront rendus les résultats, comment ils seront interprétés, et surtout la façon dont ils seront pris en considération pour la conduite opérationnelle. L'ensemble de ces éléments reste à définir. Si l'équipement des VDIP est aujourd'hui incomplet pour permettre de répondre à ces attentes, la confirmation de la détection et de l'identification repose encore sur les laboratoires référents.

Afin de rendre progressivement opérationnel les VDIP dans le domaine de la détection biologique et de les intégrer au réseau des laboratoires Biotox-Piratox, nos propositions sont donc les suivantes :

1- Nommer dans les SDIS des référents sur le risque biologique rattachés directement ou indirectement au VDIP ;
2- Constituer autour de ces référents un réseau de personnels compétents et spécialistes du domaine issus du réseau des laboratoires Biotox-Piratox, c'est-à-dire des équipes formées aux techniques de biologie et expérimentées dans la manipulation d'agents

biologiques pathogènes, servant de support technique et scientifique pour la formation initiale et l'amélioration continue des équipes des VDIP ;

3- Elaborer des conventions de partenariat et d'accueil entre chaque SDIS détenteur d'un VDIP et un laboratoire de référence de la zone de défense ;
4- Former des sapeurs-pompiers aux techniques de biologie par des stages réguliers dans les laboratoires référents partenaires, et dont la durée dépendra du niveau d'expertise souhaité (de quelques jours pour un simple opérateur à plusieurs semaines pour un ingénieur responsable) tout en gardant à l'esprit que ces individus devront conserver aussi des compétences dans les risques chimiques et radiologiques ;
5- Procéder à des évaluations régulières des nouvelles techniques de détection et d'identification non ciblées permettant la mise en évidence d'un très large panel d'agents biologiques. Ces études pourront être coordonnées par le conseil scientifique du réseau des laboratoires Biotox-Piratox qui devra alors faire appel à un réseau d'experts indépendants plus élargi possédant une réelle expérience d'utilisation du matériel visé. Ce conseil scientifique n'a pas de rôle de décideur. Ces évaluations devront en outre prendre en compte non seulement les aspects techniques, mais aussi logistiques et financiers. Les équipes des VDIP devront alors participer à ces études et aux évaluations de ces matériels avant leur éventuelle acquisition ;
6- Expliciter le domaine d'emploi de chaque technique retenue ainsi que ses limites ;
7- Elaborer une doctrine d'emploi des VDIP en matière de risque biologique qui devra être validée par des instances telles que le SGDSN ;
8- Maintenir les compétences acquises au sein de chaque SDIS détenteur d'un VDIP.

En procédant ainsi, les VDIP pourraient alors constituer le bras armé, mobile et très réactif du réseau des laboratoires Biotox-Piratox chargés des prélèvements, du conditionnement des

échantillons, de la levée de doute et de l'alerte ou de la confirmation de l'alerte. Les mises en culture et analyses complémentaires seraient à la charge des laboratoires d'infrastructure référents. Ainsi, n'arriveraient dans ces derniers les seuls échantillons dont le doute n'aurait pu être levé par le VDIP.

Enfin, dans un but de pérennité de ces structures, avec le retour de près de vingt ans d'expérience des unités mobiles d'analyse chimique telles que celle du Bataillon de Marins-Pompiers de Marseille en place depuis 1995, il semble important de garder à l'esprit qu'environ dix ans sont nécessaires avant d'atteindre une compétence comparable à celle de laboratoires spécialisés. La fidélisation des personnels est la pierre d'angle de cette pérennité, c'est pourquoi une immersion de ces derniers dans des laboratoires de biologie référents est susceptible de maintenir chez eux une motivation liée à un apprentissage permanent et à une amélioration continue des compétences. En effet, allant bien au-delà du module de formation théorique existant actuellement, cette formation doit être qualifiante, allant de données théoriques sur la biologie à la pratique en laboratoire, et dispensée puis validée au sein de laboratoires référents, par des experts reconnus dans le domaine de l'analyse biologique. Ainsi pour maîtriser les étapes d'une identification biologique, il est nécessaire de comprendre la spécificité du vivant qui ne peut être acquise qu'après une expérience de laboratoire, par la manipulation de ces agents pathogènes et la mise en œuvre régulière des outils permettant de les identifier. Comme ceci n'est réalisable qu'en laboratoire, il pourrait être envisagé d'organiser des formations et des stages de pratique destinés aux sapeurs-pompiers servant dans les VDIP dans des laboratoires du réseau Biotox-Piratox.

Si jusqu'à aujourd'hui, la mission des sapeurs-pompiers consistait au prélèvement d'échantillons pour envoi aux laboratoires de référence, elle est appelée à s'étendre à l'analyse de terrain au même titre qu'elle s'est développée ces dix dernières années pour les analyses chimiques et la détection radiologique, devenues très performantes d'un point de vue

opérationnel. Ainsi, progressivement, grâce aux collaborations permettant d'acquérir l'expérience, le VDIP pourrait devenir un outil clé dont les compétences ne se limiteraient pas seulement au cadre du bioterrorisme.

POUR LA CONCLUSION DE VOTRE THESE ,
INDICATIONS A RECOPIER (*).

THESE SOUTENUE PAR : AVANZI Charlotte

LE VEHICULE DE DETECTION, D'IDENTIFICATION ET DE PRELEVEMENT DES SERVICES DEPARTEMENTAUX D'INCENDIE ET DE SECOURS : NOUVELLE REPONSE FACE A LA MENACE BIOTERRORISTE ?

CONCLUSION

VU ET PERMIS D 'IMPRIMER
Grenoble, le 26/5/2014

LE DOYEN

Professeur Christophe RIBUOT

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE 1 UFR PHARMACIE

LE PRESIDENT DE LA THESE

Dr R GERMI

CONCLUSION

Les attentats aux lettres contenant l'agent du charbon de l'automne 2001 aux USA ont constitué un tournant dans la prise de conscience générale d'une menace biologique réelle pour les populations, cibles non préparées et non protégées. Une des réponses à cette menace a été l'apparition de nouveaux outils de défense aussi bien au niveau national qu'international. Le Livre Blanc sur la défense et la sécurité nationale de 2008 prévoit la mise en place dans les principales agglomérations françaises d'un véhicule sapeur-pompier (VDIP) permettant la détection, l'identification et les prélèvements de produits chimiques, radiologiques et biologiques.

Les expériences passées concernant le risque chimique et radiologique ont montré que les sapeurs-pompiers étaient capables de s'adapter aux besoins et aux nouveaux risques. Leur persévérance et leur entrainement leur ont permis de devenir performants dans ces domaines.

Cependant, le risque biologique souffre d'un déficit d'information ce qui engendre une difficulté dans la conduite des opérations de secours : il n'existe pas de détecteurs instantanés permettant d'orienter vers le possible emploi d'agents biologiques pathogènes, contrairement à ceux existants pour les risques chimiques et radiologiques. C'est pourquoi, à ce jour, le principal scénario d'exercice biologique est celui de l'enveloppe contenant une poudre suspecte : le risque est alors visible et matérialisé, le prélèvement et le balisage faciles à réaliser. Cependant la menace biologique ne se restreint pas à ce scénario et la présence de véhicules et de personnels capables de répondre à celui-ci n'est plus suffisante face aux différents aspects des risques actuels.

Ainsi, le VDIP et ses équipes doivent servir de pilier pour une meilleure intégration de la prise en charge du risque biologique chez les sapeurs-pompiers, qu'il soit accidentel ou agressif. L'amélioration de son emploi réside dans la réalisation d'un partenariat avec les laboratoires du réseau Biotox-Piratox afin de bénéficier de leur appui et de leur expertise ; la

mise en place d'une formation des intervenants sur le risque biologique intégrée au sein des laboratoires de référence ; et enfin dans l'utilisation d'un équipement performant accompagné de doctrines d'intervention testées et validées. Actuellement, il n'existe pas de méthode d'identification rassemblant tous les critères nécessaires à une détection de terrain (rapidité, sensibilité, spécificité, ubiquité). Mais la vitesse d'évolution des biotechnologies est telle qu'il est permis d'espérer gagner en qualité d'analyse, en robustesse, miniaturisation et portabilité, en fiabilité…De plus, alors qu'à ce jour, seuls les agents biologiques ciblés sont identifiés, les technologies de séquençage haut-débit ou de spectrométrie de masse sont susceptibles de détecter et d'identifier l'ensemble des agents du spectre biologique et laissent entrevoir un certain potentiel d'utilisation sur le terrain dans l'avenir, sachant que ces technologies qui sont désormais devenues incontournables et sont employées en routine dans de nombreux laboratoires, n'existaient pas il y a seulement une dizaine d'années.

La mise en applications des différentes solutions proposées dans cette thèse garantirait un suivi des actions du VDIP par du personnel formé et compétent mais également l'amélioration continue des techniques et doctrines d'utilisation en fonction de l'évolution des technologies et des situations.

L'ajout de la composante biologique aux VDIP représente donc un nouveau challenge à relever pour les pompiers, dont l'adaptabilité ne fait aucun doute. Certes des délais importants seront nécessaires avant l'accession à un niveau d'expertise reconnu et à un caractère opérationnel fiable, mais c'est seulement en franchissant progressivement l'ensemble des étapes que nous avons proposées qu'un tel programme s'inscrira dans la durée. L'effort doit donc être réalisé dès à présent, c'est-à-dire à l'aube de la mise sur le marché de nouvelles technologies « ultra-performantes », rapides, sensibles, faciles à mettre en œuvre et dont les l'interprétation des résultats sera simple, couvrant un très large panel d'agents biologiques, qui permettront aux VDIP, non pas de se substituer aux laboratoires référents, mais de

proposer aux autorités un premier outil rapide et sûr d'aide à la décision, dont la vocation est la protection de la population et la préservation des moyens de secours.

BIBLIOGRAPHIE

1. Curé, M. Le risque biologique. 3rd ed. Masson; 2004.

2. Spencer RC. Potential bio-terror agents. J Hosp Infect. 2007 Jun;65, Supplement 2:19–22.

3. SGDSN. Plan national de prévention et de lutte ’pandémie grippale". n°850/SGDSN/PSE/PSN Octobre 2011.

4. CSS. Risque biologique: protection contre les pandémies et le bioterrorisme [Internet]. 2007 [consulté le 2014 Mar 18]. Consultable sur: http://www.css.ethz.ch/publications/pdfs/CSS-Analysen-5-FR.pdf

5. (US) NI of H, Study BSC. Understanding Emerging and Re-emerging Infectious Diseases [Internet]. 2007 [consulté le 2014 Mar 18]. Consultable sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20370/

6. Horowitz N. H. On the origin of life. Engineering and science. 1956;21–5.

7. Riedel S. Biological warfare and bioterrorism: a historical review. Proc Bayl Univ Med Cent. 2004 Oct;17(4):400–6.

8. Resnik DB. H5N1 Avian Flu Research and the Ethics of Knowledge. Hastings Cent Rep. 2013 Mar 1;43(2):22–33.

9. Enserink M, Malakoff D. Biosecurity. Will flu papers lead to new research oversight? Science. 2012 Jan 6;335(6064):20, 22.

10. Anderson PD, Bokor G. Bioterrorism: pathogens as weapons. J Pharm Pract. 2012 Oct;25(5):521–9.

11. Direction générale politiques interne de l’Union. Note: la biodefense: répondre à la menace des armes biologiques [Internet]. 2009 [consulté le 2014 Mar 18]. Consultable sur: http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/note/join/2009/410696/IPOL-LIBE_NT(2009)410696_FR.pdf

12. Article R4421-3. Code du travail. 2008

13. CDC - Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition [Internet]. [consulté le 2014 May 11]. Consultable sur: http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm

14. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep Cent Dis Control. 2000 Apr 21;49(RR-4):1–14.

15. Décret n° 2010-736 du 30 juin 2010 relatif aux micro-organismes et toxines. 2010-736 juin, 2010.

16. Atlas RM. Bioterrorism and biodefence research: changing the focus of microbiology. Nat Rev Microbiol. 2003 Oct;1(1):70–4.

17. Kaufmann AF, Meltzer MI, Schmid GP. The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? Emerg Infect Dis. 1997;3(2):83–94.

18. Commission de la défense nationale et des forces armées. Rapport d'information déposé en application de l'article 145 du sur le bioterrorisme. Report No.: 1097.

19. Broché. Risques chimiques et biologiques - Equipier reconnaissance.

20. Manchee RJ, Broster MG, Melling J, Henstridge RM, Stagg AJ. Bacillus anthracis on Gruinard Island. Nature. 1981 Nov 19;294(5838):254–5.

21. Bossi P, Guihot A, Bricaire F. Bioterrorisme/Maladies infectieuses - Infections émergentes ou ré-émergentes utilisables pour le bioterrorisme. Datarevues0755498200342-C2149 [Internet]. 2008 Jan 3 [consulté le 2014 May 3]; Consultable sur: http://www.em-consulte.com/en/article/102609

22. Roy CJ, Reed DS, Hutt JA. Aerobiology and inhalation exposure to biological select agents and toxins. Vet Pathol. 2010 Sep;47(5):779–89.

23. sgdsn.gouv.fr webmestre [at]. Secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale - Plans d'intervention "Pirate" [Internet]. [consulté le 2013 Oct 5]. Consultable sur: http://www.sgdsn.gouv.fr/site_rubrique99.html

24. sgdsn.gouv.fr webmestre [at]. Secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale - Pour approfondir [Internet]. [consulté le 2014 Mar 25]. Consultable sur: http://www.sgdsn.gouv.fr/site_rubrique129.html

25. Le ministère de l'intérieur, de l'outre mer, des collectivités territotiales et de l'immigration. Déclinaison territoriale du plan gouvernementale nucléaire, radiologique, biologique et chimique. NOR/IOC/A/11/04281/C février, 2011.

26. Ministère des affaires sociales et de la santé. Les 7 zones de défense et de sécurité en France métropolitaine [Internet]. 2010 [consulté le 2014 Mar 25]. Consultable sur: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/zonesdepart_2010.pdf

27. SGDN. CIRCULAIRE relative à la doctrine nationale d'emploi des moyens de secours et de soins face à une action terroriste mettant en œuvre des matières radioactives. février, 2011.

28. SGDN. CIRCULAIRE relative à la doctrine nationale d'emploi des moyens de secours et de soins face à une action terroriste mettant en œuvre des matières chimiques. Nov 7, 2008.

29. Circulaire interministérielle n° 007/SGDN/PSE/PPS du 8 octobre 2009, relative au dispositif interministériel d'intervention face à la menace ou à l'exécution d'actes de terrorisme nucléaire, radiologique, biologique ou chimique (NRBC). NOR : P R M D 0 8 3 1 3 9 9 C.

30. Secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale. CIRCULAIRE relative à la découverte de plis, colis, contenants et substances suspectés de renfermer des agents radiologiques, biologiques ou chimiques dangereux. N° 750/SGDSN/PSE/PPS février, 2011.

31. Liens utiles Biotox - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [consulté le 2014 Mar 25]. Consultable sur: http://ansm.sante.fr/Dossiers/Biotox-Piratox-Piratome/Liens-utiles-Biotox/(offset)/3

32. Livre Blanc de la Défense et la Sécurité Nationale [Internet]. 2013 [consulté le 2014 Mar 25]. Consultable sur: file:///C:/Users/brigitte/Downloads/Livre-blanc-sur-la-Defense-et-la-Securite-nationale%202013.pdf

33. François Thibault, Forcet Samuel, Lachenaud Lionel, Vidal Dominique. Réponse à la menace biologique : le réseau des laboratoires Biotox-Piratox. 2009;71–5.

34. C. N. Peyrefitte, F. Thibault, S. P.M. Peyrefitte, N. Tordo, D. Garin, P. Marianneau. Approche intégrée pour une réponse à la menace bioterroriste en France. EuroReference. 2012;(cahier N°7).

35. Catherine TROENDLE. Projet de loi de finances pour 2012 : Sécurité civile [Internet]. 112 p. 22–7. Consultable sur: http://www.senat.fr/rap/a11-112-20/a11-112-20.html

36. Budowle B, Schutzer SE, Burans JP, Beecher DJ, Cebula TA, Chakraborty R, et al. Quality Sample Collection, Handling, and Preservation for an Effective Microbial Forensics Program. Appl Environ Microbiol. 2006 Oct;72(10):6431–8.

37. DGS. Circulaire N°DGS/DEUS/2007/2082 du 13 juillet 2007 relative au guide Peste-Charbon-Tularémie.

38. North Atlantic Treat Organisation, Militatory agence, SIBCA group. Nato Handbook for Sampling and identification of biological and chemical agents -6ème édition. 2005. Report No.: 450823.

39. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and Developing Technologies for Monitoring Agents of Bioterrorism and Biowarfare. Clin Microbiol Rev. 2005 Oct;18(4):583–607.

40. BLATNY, Janet Martha. Early and reliable detection and identification: an important element for efficient biodefense preparedness and response. Report No.: FFI/rapport-2005/02581.

41. U.S. Environmental Protection Agency. Selected Analytical Methods for Environmental Remediation and Recovery (SAM) 2012. 2012. Report No.: EPA/600/R-12/555.

42. U.S. Environmental Protection Agency. Comparison of Ultrafiltration Techniques for Recovering Biothreat Agents in Water. 2011. Report No.: EPA/600/R-11/103.

43. Hodges LR, Rose LJ, O'Connell H, Arduino MJ. National validation study of a swab protocol for the recovery of Bacillus anthracis spores from surfaces. J Microbiol Methods. 2010 May;81(2):141–6.

44. Boissinot M, Bergeron MG. [Genomics and bioterrorism]. Médecine Sci MS. 2003 Oct;19(10):967–71.

45. Bergeron MG. Rapid polymerase chain reaction detection of bacteria and their antibiotic resistance genes: Improved management, better treatment, and less resistance. Curr Infect Dis Rep. 2001 Jun;3(3):201–2.

46. Boissinot M, Bergeron MG. Toward rapid real-time molecular diagnostic to guide smart use of antimicrobials. Curr Opin Microbiol. 2002 Oct;5(5):478–82.

47. Bergeron MG, Ouellette M. Preventing Antibiotic Resistance through Rapid Genotypic Identification of Bacteria and of Their Antibiotic Resistance Genes in the Clinical Microbiology Laboratory. J Clin Microbiol. 1998 Aug 1;36(8):2169–72.

48. FBI — Amerithrax Investigation [Internet]. [consulté le 2014 Mar 15]. Consultable sur: http://www.fbi.gov/about-us/history/famous-cases/anthrax-amerithrax

49. Welcome to the United States Department of Justice [Internet]. [consulté le 2014 Mar 15]. Consultable sur: http://www.justice.gov/

50. Lord Jopling. Détection chimique, biologique, radiologique ou nucléaire (CBRN): apperçu des technologies. 2005. Report No.: 167CDS05F.

51. Leask A, Delpech V, McAnulty J. Anthrax and other suspect powders: initial responses to an outbreak of hoaxes and scares. New South Wales Public Health Bull. 2003 Dec;14(11-12):218–21.

52. Wade MM, Campbell MS, Niyogi K, Rogers JE, Coughlin J, Coursey B, et al. Evaluation of an Inexpensive Field Test for Ruling Out the Presence of Biological Threat Agents in Suspicious Powders. 2006 Feb.

53. Lee J, Deininger RA. A rapid screening method for the detection of viable spores in powder using bioluminescence. Lumin J Biol Chem Lumin. 2004 Aug;19(4):209–11.

54. Poore C, Clark P, Emanuel PA. An evaluation of suspicious powder screening tools for first responders. J Hazard Mater. 2009 Dec 30;172(2-3):559–65.

55. Dominique Champiat. Atp-metrie pour detecter et denombrer les virus [Internet]. EP1812587 A1 [consulté le 2014 Mar 15]. Consultable sur: http://www.google.com/patents/EP1812587A1?cl=fr

56. Rapid assay, method and system for detecting biowarfare agents.

57. Simard J-R, Buteau S, Lahaie P, Mathieu P, Roy G, Nadeau D, et al. BioSense/SR-BioSpectra demonstrations of wide area/early warning for bioaerosol threats: program description and early test and evaluation results. 2011 [consulté le 2014 Mar 9]. p. 81890E–81890E–11. Consultable sur: http://dx.doi.org/10.1117/12.894631

58. GenPrime—Prime Alert Tech Specs [Internet]. [consulté le 2014 Mar 9]. Consultable sur: http://www.genprime.com/products_primealert_techspecs.asp

59. Method and apparatus for prokaryotic and eukaryotic cell quantitation.

60. The BioCheck Powder Screening Test Kit | BioCheck Suspicious Powder Test Kit [Internet]. [consulté le 2014 Mar 9]. Consultable sur: http://biocheckinfo.com/test-kit/

61. Sorin Sonea, Maurice Panisset. Introduction a la nouvelle bacteriologie. Presses de l'Universite de Montreal; 1980.

62. Rollins SE, Rollins SM, Ryan ET. Yersinia pestis and the plague. Am J Clin Pathol. 2003 Jun;119 Suppl:S78–85.

63. cdc gov. Table 6: presumptive Bacillus anthracis identification and similar organisms [Internet]. [consulté le 2014 Sep 3]. Consultable sur: http://www.bt.cdc.gov/documents/PPTResponse/table6anthraxid.pdf

64. Orenga S, James AL, Manafi M, Perry JD, Pincus DH. Enzymatic substrates in microbiology. J Microbiol Methods. 2009 Nov;79(2):139–55.

65. Sherlock Microbial Identification System | MIDI Inc. [Internet]. [consulté le 2014 Mar 9]. Consultable sur: http://www.midi-inc.com/pages/microbial_id.html

66. Arrêté du 11 juin 2013 modifiant l'arrêté du 23 janvier 2013 relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques mentionnées à l'article R. 5139-18 du code de la santé publique.

67. Baltimore D. Expression of animal virus genomes. Bacteriol Rev. 1971 Sep;35(3):235–41.

68. Schweitzer B, Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection. Curr Opin Biotechnol. 2001 Feb;12(1):21–7.

69. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique. Nucleic Acids Res. 1992 Apr 11;20(7):1691–6.

70. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Proc Natl Acad Sci. 1991 Jan 1;88(1):189–93.

71. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature. 1991 Mar 7;350(6313):91–2.

72. Collins ML, Irvine B, Tyner D, Fine E, Zayati C, Chang C, et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. Nucleic Acids Res. 1997 Aug 1;25(15):2979–84.

73. Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. Emerg Infect Dis. 2001;7(2):312–8.

74. Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. Nat Genet. 1998 Jul;19(3):225–32.

75. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263–73.

76. Erlich HA. Polymerase chain reaction. J Clin Immunol. 1989 Nov 1;9(6):437–47.

77. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. Lancet Infect Dis. 2004 Jun;4(6):337–48.

78. Luna VA, King D, Davis C, Rycerz T, Ewert M, Cannons A, et al. Novel Sample Preparation Method for Safe and Rapid Detection of Bacillus anthracis Spores in Environmental Powders and Nasal Swabs. J Clin Microbiol. 2003 Mar 1;41(3):1252–5.

79. Anslinger K, Bayer B, Rolf B, Keil W, Eisenmenger W. Application of the BioRobot EZ1 in a forensic laboratory. Leg Med Tokyo Jpn. 2005 May;7(3):164–8.

80. Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner-Greiner S, Anders P, Henske B, et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. Forensic Sci Int. 2005 Aug 11;152(1):13–22.

81. Greenspoon SA, Ban JD, Sykes K, Ballard EJ, Edler SS, Baisden M, et al. Application of the BioMek 2000 Laboratory Automation Workstation and the DNA IQ System to the extraction of forensic casework samples. J Forensic Sci. 2004 Jan;49(1):29–39.

82. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol. 2004 Feb;26(2):133–46.

83. Mao F, Leung W-Y, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. BMC Biotechnol. 2007 Nov 9;7:76.

84. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 15;88(16):7276–80.

85. Koshkin AA, Singh SK, Nielsen P, Rajwanshi VK, Kumar R, Meldgaard M, et al. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. Tetrahedron. 1998 Apr 2;54(14):3607–30.

86. Johansson MK, Cook RM. Intramolecular Dimers: A New Design Strategy for Fluorescence-Quenched Probes. Chem – Eur J. 2003;9(15):3466–71.

87. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol. 1996 Mar;14(3):303–8.

88. Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, Schuster D, Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. Nucleic Acids Res. 2002 May 1;30(9):e37.

89. Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat Biotechnol. 1999 Aug;17(8):804–7.

90. Haff LA. Improved quantitative PCR using nested primers. PCR Methods Appl. 1994 Jun;3(6):332–7.

91. Malek L, Sooknanan R, Compton J. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA™). In: Isaac PG, editor. Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes [Internet]. Humana Press; 1994 [consulté le 2014 Jan 3]. p. 253–60. Consultable sur: http://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-254-X%3A253

92. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, et al. Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. J Clin Microbiol. 2005 Jan;43(1):199–207.

93. Renvoisé A, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Broad-range PCR: past, present, or future of bacteriology? Médecine Mal Infect. 2013 Aug;43(8):322–30.

94. Chenau J, Fenaille F, Caro V, Haustant M, Diancourt L, Klee SR, et al. Identification and validation of specific markers of Bacillus anthracis spores by proteomics and genomics approaches. Mol Cell Proteomics. 2013 Dec 29;mcp.M113.032946.

95. Koehler TM. Bacillus anthracis Genetics and Virulence Gene Regulation. In: Koehler TM, editor. Anthrax [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2002 [consulté le 2014 Jan 2]. p. 143–64. Consultable sur: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-05767-4_7

96. Mock M, Fouet A. Anthrax. Annu Rev Microbiol. 2001;55:647–71.

97. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a Bacillus cereus associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 1;101(22):8449–54.

98. Lampel KA, Orlandi PA. Polymerase chain reaction detection of invasive Shigella and Salmonella enterica in food. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2002;179:235–44.

99. Wang R-F, Cao W-W, Cerniglia CE. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. J Appl Microbiol. 1997;83(6):727–36.

100. Hu Q, Lyu D, Shi X, Jiang Y, Lin Y, Li Y, et al. A Modified Molecular Beacons-Based Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Eight Foodborne Pathogens in a Single Reaction and Its Application. Foodborne Pathog Dis. 2013 Dec 14;

101. Janse I, Hamidjaja RA, Bok JM, Rotterdam BJ van. Reliable detection of Bacillus anthracis, Francisella tularensis and Yersinia pestis by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. BMC Microbiol. 2010 Dec 8;10(1):314.

102. Charrel RN, de Lamballerie X. Arenaviruses other than Lassa virus. Antiviral Res. 2003 Jan;57(1-2):89–100.

103. Drosten C, Kümmerer BM, Schmitz H, Günther S. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. Antiviral Res. 2003 Jan;57(1-2):61–87.

104. Ellerbrok H, Nattermann H, Özel M, Beutin L, Appel B, Pauli G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic Bacillus anthracis by real-time PCR. FEMS Microbiol Lett. 2002;214(1):51–9.

105. Qi Y, Patra G, Liang X, Williams LE, Rose S, Redkar RJ, et al. Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of Bacillus anthracis. Appl Environ Microbiol. 2001 Aug;67(8):3720–7.

106. U.S. EPA. Protocol for Detection of Bacillus anthracis in Environmental Samples During the Remediation Phase of an Anthrax Event [Internet]. Washington: U.S. Environmental Protection Agency; 2012. Consultable sur: http://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=247752&fed_org_id=1253&address=nhsrc/&view=desc&sortBy=pubDate&showCriteria=1&count=25&searchall='indoor%20outdoor%20decontamination'

107. Makino S-I, Cheun H i., Watarai M, Uchida I, Takeshi K. Detection of anthrax spores from the air by real-time PCR. Lett Appl Microbiol. 2001;33(3):237–40.

108. Makino S, Cheun H. Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. J Microbiol Methods. 2003 May;53(2):141–7.

109. Mertens K, Freund L, Schmoock G, Hänsel C, Melzer F, Elschner MC. Comparative evaluation of eleven commercial DNA extraction kits for real-time PCR detection of Bacillus anthracis spores in spiked dairy samples. Int J Food Microbiol. 2014 Jan 17;170:29–37.

110. Welcome to BioFire Diagnostics [Internet]. [consulté le 2014 Jan 13]. Consultable sur: http://www.biofiredx.com/

111. TIB MOLBIOL — Oligonucleotides, Design for PCR and LightCycler [Internet]. [consulté le 2014 Jan 13]. Consultable sur: http://www.tib-molbiol.com/

112. Life Technologies [Internet]. [consulté le 2014 Jan 13]. Consultable sur: http://www.lifetechnologies.com/ch/en/home.html

113. TAKARA BIO INC. [Internet]. [consulté le 2014 Jan 13]. Consultable sur: http://www.takara-bio.com/

114. Home : genesig [Internet]. [consulté le 2014 Jan 13]. Consultable sur: http://www.genesig.com/home

115. PositiveID Corporation™ [Internet]. [consulté le 2014 Jan 13]. Consultable sur: http://www.positiveidcorp.com/

116. Welcome to PCR diagnostics.eu by Ecoli - provides more than 500 different types of PCR diagnostic kits for clinical, veterinary diagnostics and GMO — pcrdiagnostics.eu [Internet]. [consulté le 2014 Jan 13]. Consultable sur: http://www.pcrdiagnostics.eu/en/Ecoli.alej

117. Lindström M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of Clostridium botulinum Types A, B, E, and F in Food and Fecal Material. Appl Environ Microbiol. 2001 Dec 1;67(12):5694–9.

118. Hielm S, Hyytiä E, Ridell J, Korkeala H. Detection of Clostridium botulinum in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. Int J Food Microbiol. 1996 Aug;31(1-3):357–65.

119. De Medici D, Anniballi F, Wyatt GM, Lindstrom M, Messelhausser U, Aldus CF, et al. Multiplex PCR for Detection of Botulinum Neurotoxin-Producing Clostridia in Clinical, Food, and Environmental Samples. Appl Environ Microbiol. 2009 Oct;75(20):6457–61.

120. BIOTECON Diagnostics Food Testing [Internet]. [consulté le 2014 Jan 13]. Consultable sur: http://www.bc-diagnostics.com/

121. Bausch DG, Towner JS, Dowell SF, Kaducu F, Lukwiya M, Sanchez A, et al. Assessment of the Risk of Ebola Virus Transmission from Bodily Fluids and Fomites. J Infect Dis. 2007 Nov 15;196(s2):S142–S147.

122. Weidmann M, Mühlberger E, Hufert FT. Rapid detection protocol for filoviruses. J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol. 2004 May;30(1):94–9.

123. Huang Y, Wei H, Wang Y, Shi Z, Raoul H, Yuan Z. Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays. Virol Sin. 2012 Oct;27(5):273–7.

124. Drosten C, Göttig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol. 2002 Jul;40(7):2323–30.

125. Grolla A, Lucht A, Dick D, Strong JE, Feldmann H. Laboratory diagnosis of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. Bull Société Pathol Exot 1990. 2005 Sep;98(3):205–9.

126. Sellek R, Jimenez O, Aizpurua C, Fernandez-Frutos B, Leon PD, Camacho M, et al. Recovery of Francisella tularensis from soil samples by filtration and detection by real-time PCR and cELISA. J Environ Monit. 2008 Mar 1;10(3):362–9.

127. Forsman M, Nyrén A, Sjöstedt A, Sjökvist L, Sandström G. Identification of Francisella tularensis in natural water samples by PCR. FEMS Microbiol Ecol. 1995 Jan;16(1):83–92.

128. Simşek H, Taner M, Karadenizli A, Ertek M, Vahaboğlu H. Identification of Francisella tularensis by both culture and real-time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularemia cases were not previously reported. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2012 Sep;31(9):2353–7.

129. Hauri AM, Hofstetter I, Seibold E, Kaysser P, Eckert J, Neubauer H, et al. Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. Emerg Infect Dis. 2010 Feb;16(2):238–43.

130. Whitehouse CA, Hottel HE. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of Francisella tularensis DNA from spiked soil samples. Mol Cell Probes. 2007 Apr;21(2):92–6.

131. Sofi Ibrahim M, Kulesh DA, Saleh SS, Damon IK, Esposito JJ, Schmaljohn AL, et al. Real-Time PCR Assay To Detect Smallpox Virus. J Clin Microbiol. 2003 Aug;41(8):3835–9.

132. Scaramozzino N, Ferrier-Rembert A, Favier A, Rothlisberger C, Richard S, Crance J-M, et al. Real-Time PCR to Identify Variola Virus or Other Human Pathogenic Orthopox Viruses. Clin Chem. 2007 Apr 1;53(4):606–13.

133. Hong-Geller E, Valdez YE, Shou Y, Yoshida TM, Marrone BL, Dunbar JM. Evaluation of Bacillus anthracis and Yersinia pestis sample collection from nonporous surfaces by quantitative real-time PCR. Lett Appl Microbiol. 2010 Apr;50(4):431–7.

134. Woron AM, Nazarian EJ, Egan C, McDonough KA, Cirino NM, Limberger RJ, et al. Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of Yersinia pestis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Nov;56(3):261–8.

135. Dauphin LA, Stephens KW, Eufinger SC, Bowen MD. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of Yersinia pestis DNA from bacterial suspensions and spiked environmental samples. J Appl Microbiol. 2010 Jan;108(1):163–72.

136. Doganay GD, Doganay M. Brucella as a potential agent of bioterrorism. Recent Patents Anti-Infect Drug Disc. 2013 Apr;8(1):27–33.

137. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet Microbiol. 2002 Dec 20;90(1-4):435–46.

138. Salles JF, De Souza FA, van Elsas JD. Molecular Method To Assess the Diversity of Burkholderia Species in Environmental Samples. Appl Environ Microbiol. 2002 Apr;68(4):1595–603.

139. Gilad J, Harary I, Dushnitsky T, Schwartz D, Amsalem Y. Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. Isr Med Assoc J IMAJ. 2007 Jul;9(7):499–503.

140. Price EP, Dale JL, Cook JM, Sarovich DS, Seymour ML, Ginther JL, et al. Development and Validation of Burkholderia pseudomallei-Specific Real-Time PCR Assays for Clinical, Environmental or Forensic Detection Applications. PLoS ONE. 2012 May 18;7(5):e37723.

141. Limmathurotsakul D, Dance DAB, Wuthiekanun V, Kaestli M, Mayo M, Warner J, et al. Systematic Review and Consensus Guidelines for Environmental Sampling of Burkholderia pseudomallei. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Mar 21;7(3):e2105.

142. Trung TT, Hetzer A, Göhler A, Topfstedt E, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, et al. Highly Sensitive Direct Detection and Quantification of Burkholderia pseudomallei Bacteria in Environmental Soil Samples by Using Real-Time PCR. Appl Environ Microbiol. 2011 Sep 15;77(18):6486–94.

143. Arizona Department of health services. Psittacosis - Bioterrorism agent profile for health care worker [Internet]. [consulté le 2014 Sep 3]. Consultable sur: http://www.azdhs.gov/phs/emergency-preparedness/documents/zebra-manual/zm-s5-psittacosis.pdf

144. Fach P, Popoff MR. Detection of enterotoxigenic Clostridium perfringens in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. Appl Environ Microbiol. 1997 Nov 1;63(11):4232–6.

145. Kaneko I, Miyamoto K, Mimura K, Yumine N, Utsunomiya H, Akimoto S, et al. Detection of Enterotoxigenic Clostridium perfringens in Meat Samples by Using Molecular Methods▿. Appl Environ Microbiol. 2011 Nov;77(21):7526–32.

146. Wang RF, Cao WW, Franklin W, Campbell W, Cerniglia CE. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of Clostridium perfringens in food. Mol Cell Probes. 1994 Apr;8(2):131–7.

147. Kato N, Kim SM, Kato H, Tanaka K, Watanabe K, Ueno K, et al. [Identification of enterotoxin-producing Clostridium perfringens by the polymerase chain reaction]. Kansenshōgaku Zasshi J Jpn Assoc Infect Dis. 1993 Aug;67(8):724–9.

148. Fitzpatrick KA, Kersh GJ, Massung RF. Practical Method for Extraction of PCR-Quality DNA from Environmental Soil Samples. Appl Environ Microbiol. 2010 Jul 1;76(13):4571–3.

149. Michelle Lockhart. The detection of Coxiella burnetii (Q fever) in clinical and environmental samples. Murdoch University; 2010.

150. Jado I, Carranza-Rodríguez C, Barandika JF, Toledo Á, García-Amil C, Serrano B, et al. Molecular method for the characterization of Coxiella burnetii from clinical and environmental samples: variability of genotypes in Spain. BMC Microbiol. 2012 Jun 1;12(1):91.

151. De Bruin A, de Groot A, de Heer L, Bok J, Wielinga PR, Hamans M, et al. Detection of Coxiella burnetii in complex matrices by using multiplex quantitative PCR during a major Q fever outbreak in The Netherlands. Appl Environ Microbiol. 2011 Sep;77(18):6516–23.

152. Robert E. Levin. Rapid Detection and Characterization of Foodborne Pathogens by Molecular Techniques. CRC Press; 2009. 608 p.

153. Jean-Gilles Beaubrun J, Cheng C-M, Chen K-S, Ewing L, Wang H, Agpaoa MC, et al. The evaluation of a PCR-based method for identification of Salmonella enterica serotypes from environmental samples and various food matrices. Food Microbiol. 2012 Sep;31(2):199–209.

154. Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of Salmonella sp., Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium from environmental swabs of poultry houses. Lett Appl Microbiol. 1999 Feb;28(2):113–7.

155. Elizaquível P, Aznar R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp. and Staphylococcus aureus on fresh, minimally processed vegetables. Food Microbiol. 2008 Aug;25(5):705–13.

156. Kumar S, Balakrishna K, Batra HV. Detection of Salmonella enterica serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of invA, viaB, fliC-d and prt genes by polymerase chain reaction in mutiplex format. Lett Appl Microbiol. 2006 Feb;42(2):149–54.

157. Matjaž Ocepek, Mateja Pate, Darja Kušar, Barbara Hubad, Jana Avberšek, Katarina Logar, et al. Comparison Of DNA extraction methods to detect Salmonella spp in tap water. Slov Vet Res. 2011;48(3/4):93–8.

158. QIAGEN Leipzig GmbH (formerly Labor Diagnostik GmbH Leipzig): Announcement [Internet]. [consulté le 2014 Jan 13]. Consultable sur: http://www.lab-leipzig.de/en/home/announcement.html

159. He X, McMahon S, McKeon TA, Brandon DL. Development of a novel immuno-PCR assay for detection of ricin in ground beef, liquid chicken egg, and milk. J Food Prot. 2010 Apr;73(4):695–700.

160. He X, Carter JM, Brandon DL, Cheng LW, McKeon TA. Application of a real time polymerase chain reaction method to detect castor toxin contamination in fluid milk and eggs. J Agric Food Chem. 2007 Aug 22;55(17):6897–902.

161. Sharma NK, Rees CED, Dodd CER. Development of a Single-Reaction Multiplex PCR Toxin Typing Assay for Staphylococcus aureusStrains. Appl Environ Microbiol. 2000 Apr 1;66(4):1347–53.

162. Rajkovic A, Moualij BE, Uyttendaele M, Brolet P, Zorzi W, Heinen E, et al. Immunoquantitative Real-Time PCR for Detection and Quantification of Staphylococcus aureus Enterotoxin B in Foods. Appl Environ Microbiol. 2006 Oct;72(10):6593–9.

163. Jado I, Escudero R, Gil H, Jimenez-Alonso MI, Sousa R, Garcia-Perez AL, et al. Molecular Method for Identification of Rickettsia Species in Clinical and Environmental Samples. J Clin Microbiol. 2006 Dec;44(12):4572–6.

164. Monica Henriquez. The Platinum Path Kit: A Single Nucleic Acid Purification Kit for a Variety of Sample Types, a Tool for Bioterrorism Preparedness. 2009.

165. Lambert AJ, Martin DA, Lanciotti RS. Detection of North American Eastern and Western Equine Encephalitis Viruses by Nucleic Acid Amplification Assays. J Clin Microbiol. 2003 Jan;41(1):379–85.

166. Koch WH, Payne WL, Wentz BA, Cebula TA. Rapid polymerase chain reaction method for detection of Vibrio cholerae in foods. Appl Environ Microbiol. 1993 Feb 1;59(2):556–60.

167. Gubala AJ. Multiplex real-time PCR detection of Vibrio cholerae. J Microbiol Methods. 2006 May;65(2):278–93.

168. Rivera ING, Lipp EK, Gil A, Choopun N, Huq A, Colwell RR. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic Vibrio cholerae O1 and O139 from aquatic ecosystems. Environ Microbiol. 2003 Jul;5(7):599–606.

169. Fykse EM, Skogan G, Davies W, Olsen JS, Blatny JM. Detection of Vibrio cholerae by Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. Appl Environ Microbiol. 2007 Mar;73(5):1457–66.

170. Huq A, Grim C, Colwell RR, Nair GB. Detection, isolation, and identification of Vibrio cholerae from the environment. Curr Protoc Microbiol. 2006 Sep;Chapter 6:Unit6A.5.

171. Liang Z, Keeley A. Detection of viable Cryptosporidium parvum in soil by reverse transcription-real-time PCR targeting hsp70 mRNA. Appl Environ Microbiol. 2011 Sep;77(18):6476–85.

172. Stinear T, Matusan A, Hines K, Sandery M. Detection of a single viable Cryptosporidium parvum oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol. 1996 Sep;62(9):3385–90.

173. Wagner-Wiening C, Kimmig P. Detection of viable Cryptosporidium parvum oocysts by PCR. Appl Environ Microbiol. 1995 Dec;61(12):4514–6.

174. M Nikaeen, AR Mesdaghinia, M Jeddi Tehrani, M Rezaeian, K Makimura. A Nested-PCR Assay for Detection of Cryptosporidium parvum Oocysts in Water Samples. Iranian J Publ Health. 2005;34(1):13–8.

175. Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, Lal A. Molecular Characterization of Cryptosporidium Oocysts in Samples of Raw Surface Water and Wastewater. Appl Environ Microbiol. 2001 Mar;67(3):1097–101.

176. Wiedenmann A, Krüger P, Botzenhart K. PCR detection of Cryptosporidium parvum in environmental samples—a review of published protocols and current developments. J Ind Microbiol Biotechnol. 1998 Sep 1;21(3):150–66.

177. Trombley AR, Wachter L, Garrison J, Buckley-Beason VA, Jahrling J, Hensley LE, et al. Comprehensive Panel of Real-Time TaqMan(TM) Polymerase Chain Reaction Assays for Detection and Absolute Quantification of Filoviruses, Arenaviruses, and New World Hantaviruses. Am J Trop Med Hyg. 2010 May;82(5):954–60.

178. K.P. O'Connell, P.E. Anderson, J.R. Bucher, C. Holmes, T. Howland, L. Boswell. Performance Of A Handheld Pcr Instrument In The Detection Of Bacillus Anthracis, Francisella Tularensis, And Yersinia Pestis: Sensitivity, Specificity, And Effect Of Interferents On Assay Results. U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center, Aberdeen Proving Ground, MD 21010; Smiths Detection, Inc., Edgewood, MD 21040; 2004 Dec p. 1–7. Report No.: OMB No. 0704-0188.

179. Seiner D, Colburn H, Baird C, Bartholomew R, Straub T, Victry K, et al. Evaluation of the FilmArray(R) system for detection of Bacillus anthracis, Francisella tularensis and Yersinia pestis. J Appl Microbiol. 2013 Apr;114(4):992–1000.

180. Baird C, Seiner D, Ozanich R, Colburn H, Straub T, Bruckner-Lea C. Biodetection technologies for first responders. 2012 Nov. Report No.: PNNL-21713.

181. RAZOR® EX BioDetection System | BioFire Defense [Internet]. [consulté le 2014 Jan 19]. Consultable sur: http://biofiredefense.com/razorex/

182. Ulrich MP, Christensen DR, Coyne SR, Craw PD, Henchal EA, Sakai SH, et al. Evaluation of the Cepheid GeneXpert system for detecting Bacillus anthracis. J Appl Microbiol. 2006 May;100(5):1011–6.

183. Cepheid | Biothreat [Internet]. [consulté le 2014 Jan 19]. Consultable sur: http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/reagents-and-accessories/industrial-reagents/biothreat

184. Sanchez JA, Pierce KE, Rice JE, Wangh LJ. Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 17;101(7):1933–8.

185. Bio-Seeq PLUS [Internet]. [consulté le 2014 Jan 19]. Consultable sur: http://www.smithsdetection.com/biological-agents-detection/114-biological-agents-detection/bio-seeq-plus.html#.Utw4KBBKGM8

186. T-COR 4 Real-Time PCR Thermocycler – Southern Scientific Ltd [Internet]. [consulté le 2014 Jan 19]. Consultable sur: http://www.southernscientific.co.uk/catalog/products/t-cor-4-real-time-pcr-thermocycler?category-id=267

187. Sanchez M, Probst L, Blazevic E, Nakao B, Northrup MA. The microfluidic bioagent autonomous networked detector (M-BAND): an update. Fully integrated, automated, and networked field identification of airborne pathogens. 2011 [consulté le 2014 Jan 19]. p. 818907–818907–7. Consultable sur: http://dx.doi.org/10.1117/12.898650

188. PositiveID Corporation Publishes Updated Report on Its M-BAND and Firefly Technologies (NASDAQ:PSID) [Internet]. [consulté le 2014 Jan 26]. Consultable sur: http://investors.positiveidcorp.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=771167

189. PositiveID Publishes Report on Its BioThreat Detection and Diagnostics Solutions (NASDAQ:PSID) [Internet]. [consulté le 2014 Jan 26]. Consultable sur: http://investors.positiveidcorp.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=820759

190. PositiveID Corporation™ - Firefly [Internet]. [consulté le 2014 Jan 19]. Consultable sur: http://www.positiveidcorp.com/products_firefly.html

191. Photo Release -- PositiveID Corporation Launches Development of Firefly Dx to Confirm Biological Threats in the Field Within Minutes (NASDAQ:PSID) [Internet]. [consulté le 2014 Jan 26]. Consultable sur: http://investors.positiveidcorp.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=759947

192. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. CMAJ Can Med Assoc J. 2000 Aug 8;163(3):301–9.

193. Herzog AB, McLennan SD, Pandey AK, Gerba CP, Haas CN, Rose JB, et al. Implications of Limits of Detection of Various Methods for Bacillus anthracis in Computing Risks to Human Health. Appl Environ Microbiol. 2009 Oct;75(19):6331–9.

194. Mifflin TE. Setting Up a PCR Laboratory. Cold Spring Harb Protoc. 2007 Jul 1;2007(7):pdb.top14.

195. Sensors C on M and MP for A, Design B on M and E, Sciences D on E and P, Council NR. Sensor Systems for Biological Agent Attacks: Protecting Buildings and Military Bases. National Academies Press; 2005. 208 p.

196. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci. 1977 Dec 1;74(12):5463–7.

197. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 2008 Oct;26(10):1135–45.

198. Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. Genomics. 2008 Nov;92(5):255–64.

199. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 2012 Aug 28;gks808.

200. Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, Accou-Demartin M, et al. CRISPR Typing and Subtyping for Improved Laboratory Surveillance of Salmonella Infections. PLoS ONE [Internet]. 2012 May 18 [consulté le 2014 Jan 8];7(5). Consultable sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356390/

201. Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen Coxiella burnetii. Proc Natl Acad Sci. 2003 Apr 29;100(9):5455–60.

202. Chain PSG, Hu P, Malfatti SA, Radnedge L, Larimer F, Vergez LM, et al. Complete Genome Sequence of Yersinia pestis Strains Antiqua and Nepal516: Evidence of Gene Reduction in an Emerging Pathogen. J Bacteriol. 2006 Jun 15;188(12):4453–63.

203. Larsson P, Oyston PCF, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius H-H, et al. The complete genome sequence of Francisella tularensis, the causative agent of tularemia. Nat Genet. 2005 Feb;37(2):153–9.

204. Massung RF, Liu LI, Qi J, Knight JC, Yuran TE, Kerlavage AR, et al. Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975. Virology. 1994 Jun;201(2):215–40.

205. McLeod MP, Qin X, Karpathy SE, Gioia J, Highlander SK, Fox GE, et al. Complete Genome Sequence of Rickettsia typhi and Comparison with Sequences of Other Rickettsiae. J Bacteriol. 2004 Sep 1;186(17):5842–55.

206. Ravel J, Jiang L, Stanley ST, Wilson MR, Decker RS, Read TD, et al. The Complete Genome Sequence of Bacillus anthracis Ames “Ancestor.”J Bacteriol. 2009 Jan 1;191(1):445–6.

207. Burkholderia Genome Database: A database for Burkholderia cepacia complex genomes [Internet]. [consulté le 2014 Jan 26]. Consultable sur: http://www.burkholderia.com/

208. Immunoessais | bioMérieux Corporate Website [Internet]. [consulté le 2014 Jan 26]. Consultable sur: http://www.biomerieux.com/fr/immunoessais-technologies

209. Andreotti PE, Ludwig GV, Peruski AH, Tuite JJ, Morse SS, Peruski LF Jr. Immunoassay of infectious agents. BioTechniques. 2003 Oct;35(4):850–9.

210. Peruski AH, Peruski LF. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul 1;10(4):506–13.

211. Beechem JM, Brand L. Time-Resolved Fluorescence of Proteins. Annu Rev Biochem. 1985;54(1):43–71.

212. xMAP Technology Multiplexing for Bioassays - Luminex Corporation [Internet]. [consulté le 2014 Feb 23]. Consultable sur: https://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/

213. Yakub GP, Stadterman-Knauer KL. Immunomagnetic separation of pathogenic organisms from environmental matrices. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2004;268:189–97.

214. Tomaso H, Thullier P, Seibold E, Guglielmo V, Buckendahl A, Rahalison L, et al. Comparison of Hand-Held Test Kits, Immunofluorescence Microscopy, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Flow Cytometric Analysis for Rapid Presumptive Identification of Yersinia pestis. J Clin Microbiol. 2007 Oct;45(10):3404–7.

215. NIDS [Internet]. [consulté le 2014 Feb 16]. Consultable sur: http://www.smithsdetection.com/en/products-solutions/biological-agents-detection/114-biological-agents-detection/nids.html#.UwDfYvl5PW1

216. Biothreat identification IMASS device - BBI DetectionBBI Detection [Internet]. [consulté le 2014 Feb 23]. Consultable sur: http://www.bbidetection.com/products/biothreat-detection-imass-device/

217. RAMP® Biodefense System | Response Biomedical [Internet]. [consulté le 2014 Jan 26]. Consultable sur: http://responsebio.com/biodefense/system#test-kit

218. Battelle, EPA U.S. Environmental Protection Agency. Environmental Technology Verification (ETV) Report for Response Biomedical Corp., RAMP Test Cartridges for detecting anthrax, botulinum toxin, and ricin [Internet]. 2004 [consulté le 2014 Feb 23]. Consultable sur: http://www.epa.gov/etv/pubs/01_vr_ramp.pdf

219. Gessler F, Pagel-Wieder S, Avondet M-A, Böhnel H. Evaluation of lateral flow assays for the detection of botulinum neurotoxin type A and their application in laboratory diagnosis of botulism. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 Mar;57(3):243–9.

220. Heroux Karen, Anderson Patricia, U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center, Aberdeen Proving, Ground, Maryland. Evaluation of a Rapid Immunoassay System for the Detection of Bacillus anthracis Spores [Internet]. Consultable sur: http://www.accutest.net/products/pdf/EdgewoodEvaluation.pdf

221. NEXTER Group - KDTB GOLD® Kit de détection de toxines biologiques [Internet]. [consulté le 2014 Feb 23]. Consultable sur: http://www.nexter-group.fr/en/products/item/101-kdtb-gold%C2%AE-kit-de-d%C3%A9tection-de-toxines-biologiques

222. Alexeter Technologies' Products: Test Strips [Internet]. [consulté le 2014 Feb 23]. Consultable sur: http://www.alexeter.com/biow/products/products/strips/RAID_DX.asp

223. Battelle, EPA (US environmental protection agency). Environmental technology verification (ETV) report - Tetracore, INC Biothreat Alert(r) anthrax, botulinum toxin and ricin immunoassay test strips [Internet]. 2004 [consulté le 2014 Feb 23]. Consultable sur: http://www.epa.gov/etv/pubs/01_vr_biothreat.pdf

224. Townsend MB, MacNeil A, Reynolds MG, Hughes CM, Olson VA, Damon IK, et al. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. J Virol Methods. 2013 Jan;187(1):37–42.

225. Domestic Preparedness Products: BioThreat Alert [Internet]. [consulté le 2014 Feb 23]. Consultable sur: http://tetracore.com/bio-warfare/index.html#

226. Thavaselvam D, Vijayaraghavan R. Biological warfare agents. J Pharm Bioallied Sci. 2010;2(3):179.

227. Kumar PP and O. Integrating Immunobased Detection and Identification Methods for Ricin Analysis: An Overview. J Bioterrorism Biodefense [Internet]. [consulté le 2014 Feb 16]; Consultable sur: http://www.omicsonline.org/integrating-immunobased-detection-and-identification-methods-for-ricin-analysis-an-overview-2157-2526.S2-003.php&&aid=3508

228. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. Anal Bioanal Chem. 2009 Jan;393(2):569–82.

229. Menet M-C. Principes de la spectrométrie de masse. Rev Francoph Lab. 2011 Dec;2011(437):41–53.

230. Seto Y, Kanamori-Kataoka M. Mass spectrometric strategy for the determination of natural and synthetic organic toxins. J Health Sci. 51(5):519–25.

231. Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. Int J Mass Spectrom Ion Process. 1987 Sep 24;78:53–68.

232. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Aug 15;49(4):543–51.

233. Rapid response report: MALDI-TOF Mass spectrometry for bacterial species identification: a review of diagnostic accuracy and clinical and cost-effectiveness [Internet]. Canadian Agency for drugs and technologies in health; 2011. Consultable sur: file:///C:/Users/brigitte/Downloads/L0259_MALDI-TOF_Final.pdf

234. CEA - Jeunes - Thèmes - Micro & nanotechnologies - Le nanomonde - Compléments sur le nanomonde - Principe de fonctionnement d'une biopuce [Internet]. [consulté le 2014 Mar 15]. Consultable sur: http://www.cea.fr/jeunes/themes/micro-nanotechnologies/le-nanomonde/complements-sur-le-nanomonde/principe-de-fonctionnement-d-une-biopuce

235. Uttamchandani M, Neo JL, Ong BNZ, Moochhala S. Applications of microarrays in pathogen detection and biodefence. Trends Biotechnol. 2009 Jan 1;27(1):53–61.

236. Avarre J-C, de Lajudie P, Béna G. Hybridization of genomic DNA to microarrays: a challenge for the analysis of environmental samples. J Microbiol Methods. 2007 May;69(2):242–8.

237. VereThreat™ [Internet]. [consulté le 2014 Mar 15]. Consultable sur: http://www.vereduslabs.com/index.php?option=com_content&view=article&id=12&Itemid=65

238. Huahao Fan, Yigang Tong. Potential dual-use of bacteriophage in bioterrorism and biodefense. J Bioterr Biodef. 2012;3(3):1–4.

239. Guild Associates: Biological Sensors for Biological Warfare Agents [Internet]. [consulté le 2014 Mar 8]. Consultable sur: http://www.guildassociates.com/guild_biosciences

240. Radosavljevic V, Finke E-J, Belojevic G. Escherichia coli O104:H4 outbreak in Germany—clarification of the origin of the epidemic. Eur J Public Health. 2014 Apr 15;cku048.

241. Anderson PD. Bioterrorism: toxins as weapons. J Pharm Pract. 2012 Apr;25(2):121–9.

242. Arrêté du 29 mai 2009 relatif aux transports de marchandises dangereuses par voie terrestre (dit "arrêté TMD"). NOR: DEVP0911622A.

243. Rev. 18 (2013) - UNECE [Internet]. [consulté le 2014 Apr 1]. Consultable sur: http://www.unece.org/fr/trans/danger/publi/unrec/rev18/18files_f.html

244. Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en oeuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.

245. Organisation mondiale de la santé. Manuel de sécurité biologique en laboratoire - 3ème édition. 2005.

246. Vetter Emergency - Decontamination showers [Internet]. [consulté le 2014 Apr 13]. Consultable sur: http://www.vetter.de/vetter_emergency/en/Rescue+Products/Pneumatic+tents+and+showers/Decontamination+showers.html

ANNEXES

Annexe 1: Liste des agents biologiques plus particulièrement à risque selon l'arrêté du 15 janvier 2004

Annexe 2 : Liste de l'équipement actuel du VDIP du Rhône

Annexe 3: le kit KDTB Gold de NBC sys

Annexe 4 : Procédure du triple emballage

ANNEXE 1 : Liste des agents biologiques plus particulièrement à risque selon l'arrêté du 15 janvier 2004

Bactéries	*Bacillus anthracis*
	Brucella abortus *Brucella canis* *Brucella melitensis* *Brucella suis*
	Clostridium botulinum
	Francisella tularensis
	Yersinia pestis
Virus	Arenaviridae: - Lassa - Guanarito - Junin - Machupo - Sabia
	Bunyaviridae : - Dobrova
	Coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS).
	Hantavirus : - Hantaan -Séoul
	Nairovirus de la fièvre hémorragique de Crimée/Congo
	Phlebovirus de la fièvre de la vallée du Rift
	Filoviridae : - Ebola - Marburg

	Flaviridae : - de la maladie de la forêt de Kyasanur - de la fièvre hémorragique d'Omsk
	Picoviridae : - virus poliomyélitique
	Orthopoxvirus : - de la variole humaine (majeure et mineure) - de la variole blanche - de la variole du singe - camel poxvirus
Toxines	entérotoxines B du staphylocoque
	ricine
	saxitoxines
	toxines botuliniques
	toxines diphtériques

ANNEXE 2 : Liste de l'équipement actuel du VDIP du Rhône

Désignation articles	Références	Fournisseurs	Quantité Totale
Partie Véhicule			
Chassis RVI MIDLUM 4x2	RVI MIDLUM 4*2	UGAP	1
Aménagement + accessoires (sorbonne, frigo, …)		BEHM	1
Surcoût Sorbonne Bio		BEHM	1

Détection et identification			
Analyse Radiologique			
Détecteur Gaz (Balise)			1
Débimètre/Radiamètre + Sondes	COLIBRI + Sondes	CANBERRA	1
Compteur alpha et béta (Petit passeur)	LB 2046-2	BERTHOLD	1
Analyse Biologique			
PCR	GENEXPERT IV	CEPHEID	1
Biothreat	900-0319	CEPHEID	1
Collecteur biologique	Coriolis RECON FR	BERTIN	1
Bandelettes de detection de terrain	Kits KDTB	NBC Sys	1
Analyse Chimique			
Spectromètre de masse E2M		BRUKER	1
Spectromètre IR	Mobile IR	BRUKER	1
Spectromètre de flamme	AP4C	PRO-ENGIN	1
Détecteur RAMAN	Ahura First Defender	HTDS	1
Photo-ioniseur PID	PpbRAE 3000	RAE	1
Détecteurs Multigaz (O2, Explo, HCN, H2S + Cl2)	DRAGER X-am 5600	DRAGER SAFETY	1
Kits KDTC	Kits KDTC	DRAGER	1

Prélèvement et équipements de cohérence			
Equipement de cohérence			
Flacon pulvérisateur désinfectant anioxy-spray	1756573	help medical	1
trousse à dissection	01498	fisher	1
lunettes de protection	57184	fisher	2
gants (nitrile) - 290mm / taille 9/10	E13056	fisher	1
plateau à instrument inox	10112	fisher	1
plateau inox (43x29x2)	27875	fisher	1
boite à gant de terrain (enceinte pyramide)	8220F	fisher	1
Lot de 100 Spatules stérile en V	50708	fisher	1
Lot de 100 pinces à épiler plastique stérile	87968	fisher	1
spatule inox 150mm	0183D	fisher	1
lot de 400 Pipettes pasteur 3 ml stériles	13988	fisher	1
lot de 40 Seringues 60 ml stérile	88 110	fisher	1
pH mètre électronique (pH, T°)	16498	fisher	1
boite de 25 sachets tampons ph 4,01	16328	fisher	1
boite de 25 sachets tampons ph 10,01	16330	fisher	1
lot de 100 bandelettes 0-14 PH	14909	fisher	1
conductimètre (conduct, TDS et Température) de 0 à 4 4ms	16606	fisher	1
tampons (étalon 500 ml)	93323	fisher	1
lot de 100 quantofix nitrate	53726	fisher	1
Lot de 50 bandelettes semi-quantitative métaux lourds	3868D	fisher	1
Lot de 100 bandelettes semi-quantitative quantofix arsenic	53711	fisher	1
Lot de 100 bandelettes semi-quantitative cyanures	53718	fisher	1
Lot de 50 bandelettes semi-quantitative chlore total	3867R	fisher	1
Lot de 100 bandelettes semi-quantitative quantofix phosphate	53732	fisher	1

Lot de 100 bandelettes semi-quantitative quantofix sulfates	53734	fisher	1
oxygène dissous (ampoule)	10318	fisher	1
lot de 5 fioles 100 ml verre (avec bouchon)	30519	fisher	1
lot de 10 bechers 150 ml	2641p	fisher	1
pipettes (micro pipette de 0,5 à 5 ml)	3102d	fisher	1
lunettes de protection	57184	fisher	2
lot de 50 gants (nitrile) - 290mm / taille 9/10	3839B	fisher	1
lot de 6 piles bouton 1,4 v	80021	Fisher	1
lot de 12 pipettes (10 ml)	09613	Fisher	1
lot de 12 pipettes (5ml)	09611	Fisher	1
lot de 12 pipettes (1 ml)	09606	Fisher	1
pipette pump (10 ml)	29277	Fisher	1
lot de 2 ampoules à décanter 1 litre	4482D	Fisher	1
ampoule à décanter 250	0133R	Fisher	1
lot de 40 tubes à essais 14x100	1912S	Fisher	1
porte tube	15498	Fisher	1
agitateur magnetique chauffant	10515	Fisher	1
lot de 10 barreaux aimantés 20x6mm	5438Y	Fisher	1
lot de 10 Erlenmeyers 250 ml	09082	Fisher	1
antonoir buchner 55mm	2854P	Fisher	1
lot de 100 filtres papier 55mm	1490C	Fisher	1
statif tripod FONTE 135mm	E419C8	Fisher	1
pince pour statif	87782	Fisher	1
Lot de 5 pissettes blanches eau distillée 250 ml	E246ER	Fisher	1
Lot de 5 pissettes vertes méthanol 250 ml	E246EY	Fisher	1
Lot de 5 pissettes rouges acétone 250 ml	E246EX	Fisher	1
Lot de 144 flacons à échantillons (8 ml) 17x63mm	78146	Fisher	1

portoir à simle plateforme diam 18mm - 5x15	11992	Fisher	1
éprouvettes graduée 1 l	52239	Fisher	1
sceaux plastiques 5 l	036.881.20	HALECO	4
conteneurs grande ouverture , haute resistance 3,5l	001.238.95	HALECO	4
plomb pour conteneur	003.752.83	HALECO	1
Canne téléscopique (1 à 3m)	036.861.16	HALECO	1
becher pour canne telescopique	036.861.08	HALECO	1
lampes frontales (petzl ATEX)	039.294.21	HALECO	2
masques FFP3	DS640	HALECO	5
chiffons absorban,ts (résistance chimique)	004.515.73	HALECO	1
Panneaux de signalisation (ridige) Danger de radiation	STG111	HALECO	2
Panneaux de signalisation (ridige) Danger de mort	STG17	HALECO	2
Panneaux de signalisation (ridige) risque biologique	STG12	HALECO	2
combinaison type 4-5-6 - xl (tyvek classic plus)	KCB150-XL	HALECO	4
bottes hypalon (43 et 45)	ET130	HALECO	2
combinaison type 3 xl (tychem f)	KCB510-XL	HALECO	4
gants nitriles épais	MAP130	HALECO	8
Mini station météo Kestrel 3000 Anémomètre (vent, T°, humidité)	kes-0830	kite tek	1
Glacière électrique SMART cooler Electric TE25L 12V CAMPINGAZ + TRANSFORMAT		CAO	2
Rouleau marquage "Biologique"	SJ1330	Labo moderne	1
Bio-Container de 7 litres pour matériel contaminé valable pour chim et bio	AX4110	labo moderne	1
frais de port pour rouleau		Labo moderne	1
tubes de prélèvements bio (lot de 25)	710-0431	ORCHIDIS LABORATOIRE	2
frais de port pour tube		ORCHIDIS LABORATOIRE	1

Eponges de prélèvement bio (3M hydra sponge) - lot de 50	9065061	Grosseron	1
Appareil photo numérique (étanche) -NIKON AW 100 NOIR		FNAC	1
Scaphandre chimique TYCHEM TK		Respirex	2
frais de port		Respirex	1
MASQUE A GAZ RD40 MN FFR FZ PH	1710395	SPERIAN RESPIRATO	2
CARTOUCHE RD40 AL XL ABEK2P3 NRBC	1784003	SPERIAN RESPIRATO	4
Bandelettes métaux lourds	E3868D	fisher	1
bandelettes chlore	E3867R	fisher	1
testeur conductivité	E16606	fisher	1
frais de port		fisher	1
plots	voir 2012		1
Prélèvement			
Fiches de prélèvements modèle IRSN			
Rouleau franchissement INTERDIT avec trisecteur RAD		SIPP	3
Seringues 50 ml par lot de 25	613-4236	VWR	1
Seringues 10 ml par lot de 100	613-4234	VWR	1
Pompe à vide	181-0067	VWR	2
Decon Sweap (frottis) par lot de 500	frottis filtre	SAS VANNEUVILLE	1
Flacons SG 15 T par carton de 200	Pl00041	DELIRE Provence caoutchouc	1

Flacons SG 50 T par carton de 200	Pl00042	DELIRE Provence caoutchouc	1
Flacons SG 500 T par carton de 100	Pl00045	DELIRE Provence caoutchouc	1
Flacons SG 3000 T par carton de 27	Pl00237	DELIRE Provence caoutchouc	1
Sacs plastiques cristal par lot de 500 250 X 320	2180M47	MANUTAN	1
Boussole	1888M469	MANUTAN	1
Pelle US	TRIFOLD	CAO	2
Marteau	376M163	MANUTAN	1
ciseaux de jardinage (Sécateur)	2181M1	MANUTAN	1
ciseaux de jardinage (Cisaille)	1193M643	MANUTAN	1
Pinces en acier inoxydable	231-1001	VWR	2
Sac de déchets vinyle 50L par lot de 500	290M9556	MANUTAN	1
Sac de déchets vinyle 100L par lot de 200	290M9554	MANUTAN	1
Doigt mécanique	F8262	ALBAUT VILLETTE	1
Truelles	1262M134	MANUTAN	2
Rouleau Polyane type 200 6 X 40 m	428M11	MANUTAN	1
Rouleaux TARLATANE de masquage	1773M652	MANUTAN	10
Cutter	376M2151	MANUTAN	2
ALGADE	PA 1000	MPE / Algade	1
Mètre RUBAN	2168M237	MANUTAN	1
Mètre de menuisier	68297264	LEROY MERLIN	1

Feutres indélébiles couleur rouge / noir / bleu / vert	1947M27 / 1947M28 1947M29 / 1947M30	MANUTAN	1
Petites balises plantables	1262M2	MANUTAN	10
Préparation échantillons			
EPI Radiateur	W2500K	Fischer Scientific	1
Plaque chauffante	444-0620	VWR	1
Coupelles par lot de 100	611-1374	VWR	1
Eau déminéralisée en bouteille (10 l)	23597-410	VWR	1
Balance (310 à 6200 g)	2122M71	MANUTAN	1
Table pliante	1778M75	MANUTAN	1
Tabouret pliable	720M137	MANUTAN	2

Divers			
Informatique	Ordinateurs + cables svga	DIVERS	1

ANNEXE 3 : Le kit KDTB Gold® de NBCsys

ANNEXE 4 : Procédure du triple emballage

La procédure décrite ci-dessous et l'image associée sont issues du guide PCT de 2006.

Emballage des échantillons biologiques pouvant contenir des gaents du groupe 3

Objectif :
Emballer les échantillons biologiques pour assurer la sécurité du transport de matières potentiellement infectieuses vers le laboratoire P3 ou le CNR.

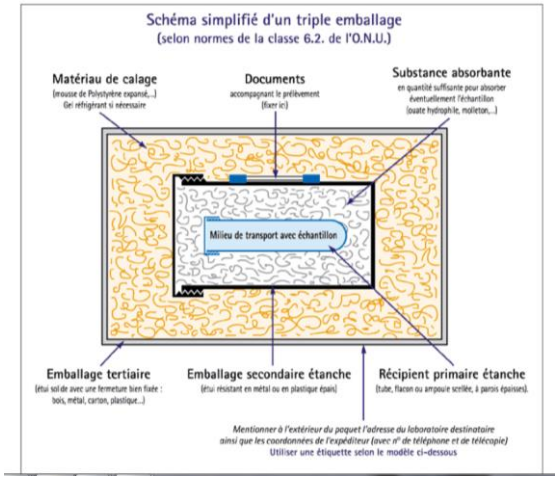
Circonstances :
Les prélèvements biologiques suspects de contenir des agents de groupe 3 doivent être transportés, en triple emballage de sécurité, suivant la réglementation européenne.
Précautions préalables :
Il est recommandé au personnel emballant les échantillons de revêtir une tenue imperméable jetable avec cagoule et fermeture élastique aux poignets et chevilles, des gants non stériles, des bottes ou surbottes imperméables, porter un masque FFP2 et des lunettes de protection.

Matériel nécessaire :
Le triple emballage type UN n° 2814 classe 6-2-2, est constitué :

- d'un récipient primaire contenant l'échantillon prélevé,
- d'un emballage secondaire étanche contenant une mousse absorbante,
- d'un emballage extérieur suffisamment résistant dont la plus petite dimension extérieure ne doit pas être inférieure à 10 cm.

Protocole :
Réalisation du triple emballage :

- Identifier le récipient primaire avec un feutre à encre indélébile,
- L'essuyer avec une compresse imprégnée de liquide de Dakin,
- Le placer tête en haut dans la mousse absorbante protectrice du récipient secondaire. Si plusieurs récipients primaires sont placés dans un emballage secondaire unique, ils doivent être enveloppés individuellement pour éviter tout contact entre eux,
- La mousse doit être en quantité suffisante pour absorber la totalité du contenu des récipients primaires en cas de rupture,
- Fermer hermétiquement l'emballage secondaire (bouchon correctement vissé),
- Placer l'emballage secondaire dans l'emballage extérieur cartonné,
- Glisser l'enveloppe de renseignement dans la poche interne



Faculté de Pharmacie de Grenoble

Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

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 l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser des actes criminels.

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

Le Véhicule de Détection, d'Identification et de Prélèvement des Services Départementaux d'Incendie et de Secours : nouvelle réponse face à la menace bioterroriste ?

Avanzi Charlotte

Les attentats aux lettres contenant l'agent du charbon de l'automne 2001 aux USA ont constitué un tournant dans la prise de conscience générale d'une menace biologique réelle pour les populations. Une des réponses à cette menace a été l'apparition de nouveaux outils de défense aussi bien au niveau national qu'international. Dans ce contexte, le Livre Blanc de la Défense de 2008 prévoit une amélioration de la réponse face aux attentats NRBC par le développement, entre autre, des capacités de réaction des pouvoirs publics. Chez les sapeurs-pompiers, ce renforcement s'est traduit par la mise en place dans les principales agglomérations françaises d'un véhicule (VDIP) permettant la détection, l'identification et les prélèvements de produits chimiques, radiologiques et biologiques.

A l'instar de la gestion des risques chimiques et radiologiques largement développés, celle du risque biologique n'était jusqu'à présent résumée, au sein des sapeurs-pompiers, qu'à des missions de prélèvement et de gestion de l'acheminement de ce prélèvement jusqu'aux laboratoires de références des zones de défense où les analyses d'identification étaient effectuées. Aujourd'hui, des VDIP sont déployés dans Services Départementaux d'Incendie et de Secours et une doctrine d'intervention dans le domaine du risque bioterroriste doit être établie.

Le choix des méthodes de prélèvement, de détection et d'identification doit prendre en compte plusieurs paramètres allant de la performance du test jusqu'aux choix de cibles en passant par la prise en considération de l'environnement de travail et de l'opérateur. Pour l'instant, si les outils d'analyse ne permettent pas encore de transmettre aux autorités des résultats d'analyses fiables et rapides, couvrant un large spectre d'agents biologiques, l'évolution des biotechnologies laisse entrevoir un avenir prometteur à la « biologie de l'avant » dans la prochaine décennie. Afin de garantir un suivi de ces innovations, une immersion dans le secteur de la biologie, il est impératif d'établir des liens avec des personnes compétentes et expertes, comme les laboratoires du réseau Biotox-Piratox. Ces laboratoires pourraient notamment conseiller sur le choix des méthodes d'identification qui peuvent être appliquées au terrain mais également participer à la formation du personnel évoluant au sein du VDIP. Dans l'état actuel, le VDIP n'est pas capable de rendre un résultat pouvant se passer d'une analyse au sein des laboratoires de référence, trop peu de cibles recherchés et un manque de validation des méthodes en sont les causes. Cependant, grâce à la mise en place de partenariats, aux entrainements et à l'expérience, le VDIP pourrait devenir un outil clé dont les compétences ne se limiteraient pas seulement au cadre du bioterrorisme.

Mots clefs : *VDIP, sapeurs-pompiers, menace biologique, bioterrorisme, Biotox-Piratox*