THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue

Le Vendredi 27 Novembre 2020

Par
Mlle FUSTER Léa
Née le 20 Octobre 1994 à Marseille

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

EPIDEMIOLOGIE ET OPTIMISATION DU DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE DES ABCES CEREBRAUX

----oOo----

JURY :

Président: Madame le Professeur Laurence CAMOIN-JAU
Directeur: Monsieur le Professeur Pierre-Edouard FOURNIER
Membres: Monsieur le Professeur Michel DRANCOURT
Monsieur le Professeur Philippe COLSON
Monsieur le Docteur Grégory DUBOURG

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue

Le Vendredi 27 Novembre 2020

Par
Mlle FUSTER Léa
Née le 20 Octobre 1994 à Marseille

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

EPIDEMIOLOGIE ET OPTIMISATION DU DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE DES ABCES CEREBRAUX

----oOo----

JURY :

Président: Madame le Professeur Laurence CAMOIN-JAU
Directeur: Monsieur le Professeur Pierre-Edouard FOURNIER
Membres: Monsieur le Professeur Michel DRANCOURT
Monsieur le Professeur Philippe COLSON
Monsieur le Docteur Grégory DUBOURG

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité :	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS	
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES	
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.	
PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury,

A Madame la Professeur Laurence Camoin, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir accordé de votre temps et donné de précieux conseils depuis mes premiers jours à la faculté de Pharmacie, je vous en suis très reconnaissante. Vous êtes une personne que j'admire.

A Monsieur le Professeur Pierre Edouard Fournier, qui a accepté d'être mon Directeur de Thèse. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe pour mon master II et d'avoir encadré mon travail de thèse. Je vous suis reconnaissante pour votre disponibilité, votre gentillesse, votre bienveillance de chaque instant.
Votre compétence et vos connaissances m'inspirent le plus grand respect.

A Monsieur le Professeur Philippe Colson, qui a accepté de faire partie de ce jury. Je vous remercie pour l'attention que vous portez à mon travail.

A Monsieur le Professeur Michel Drancourt, qui me fait l'honneur de siéger à ce jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir intégrée dans votre laboratoire et d'avoir contribué à ce travail.

Au Professeur Gregory Dubourg, qui a gentiment accepté de faire partie de mon jury de thèse. A mes débuts, tu m'as appris la bactériologie et tu m'as donné envie de continuer dans cette voie.
Je te remercie pour tes conseils et ta gentillesse.

Aux membres de l'IHU, de m'avoir accueillie dans ce laboratoire.

A l'équipe de recherche du Pr FOURNIER, ce fut un réel plaisir de travailler avec vous, **A Sabrina** dévouée et toujours disponible et **A Ludivine** pour son aide.

A ma famille,

A mes parents, pour votre amour, votre écoute et votre soutien inconditionnel, **A une maman** complice et dévouée, **A un papa** protecteur et attentionné.
Merci d'être toujours là pour nous.

A ma sœur, Julie, quel bonheur d'avoir grandie à tes cotés ! Je suis fière de toi. Merci pour ton soutien indéfectible. Loin des yeux mais très près dans mon cœur.

A Julian, mon athlète préféré, je crois en toi comme tu as cru en moi !

A mes grands-parents, pour votre amour bienveillant, votre générosité, votre disponibilité. Merci pour l'amour que vous nous portez chaque jour.

A Jobi et Joba, pour leur compagnie au quotidien.

J'ai de la chance d'avoir une famille comme la nôtre.

A ma belle-famille, qui m'a accueillie à bras ouverts, **A Milo, Renaud, Florian, Elsa, Elisabeth** pour les liens forts qu'on a tissés malgré la distance, **A Éric**…

A tous les amis qui font partie de ma famille, A la grande famille des Camoins, **A toutes mes taties de cœur.**

A mes amies, toujours présentes,

A Clémentine, ma cousine de cœur depuis toujours, à nos souvenirs et à nos futurs moments partagés, **A Cassandre,** ma cassou présente depuis ma plus tendre enfance, sur qui je peux toujours compter, **A Pauline,** ma nénette, une amitié qui dure depuis nos premières années de gym et qui n'est pas prête de se terminer, **A Mathilde J.,** une amie en or avec un grand cœur et beaucoup de générosité, j'ai beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés **!, A Astrid,** notre passage en biochimie et nos footing matinaux ont fait naitre une grande amitié avec une belle devise «petit pas par petit pas on finit tout !», **A Mathilde S.,** ma tinounou qui me manque un peu trop, à notre amitié pleine d'affection.

A mes amies de la fac, **Fleur, Célia, Jade, Margaux R, Tessa, Elise, Clarisse, Camille** que j'ai eu la chance de croiser sur mon chemin, grâce à qui mes années d'études ont été si agréables et ont permis de faire naître une si belle amitié.

A tous mes copains, copines qui rendent ma vie, mes soirées et mes week ends encore plus enjoués et festifs, **A Gaelle,** ma danseuse préférée remplie de bonne humeur**, A Tom & Léa,** les Bbnets toujours présents, **A Geo & Linda,** nos meilleurs organisateurs de week-ends, **A mes amis pharmaciens,** pour leur joie de vivre, vous êtes mes fêtards préférés !, **A Max & Lise,** notre coup de cœur de Bali, **A Laurence,** pour ta gentillesse et ta bienveillance, **A Ella,** une belle rencontre récente aux histoires croustillantes.

Aux internes que j'ai pu rencontrer pendant mon internat.

A tous les membres des laboratoires de bactériologie-virologie, d'hématologie, de biochimie, d'immunologie de l'AP-HM. Je remercie les biologistes de ces services pour les enseignements et leur disponibilité au cours de mon internat.
A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à mes recherches et à l'élaboration de cette thèse.

A Maxime, toi qui partages ma vie depuis mes 17 ans. Tu m'as soutenue et réconfortée, avec patience, humour, flexibilité et gentillesse. A nos souvenirs, à nos vacances et à tous les projets qui nous attendent.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Table des matières

I. RESUME 3

II. ARTICLES 4

III. INTRODUCTION 5

A. Définition de l'abcès cérébral 5
B. Physiopathologie de l'abcès cérébral 5
C. Définition clinique et épidémiologie de l'abcès cérébral 6
D. Agents étiologiques des abcès cérébraux 7
E. Diagnostic étiologique des abcès cérébraux 9
F. Expansion du spectre microbiologique des abcès cérébraux 10
G. Résumé des objectifs 13

IV. MATERIELS ET METHODES 14

A. Présentation synthétique du déroulement de l'étude 14
B. Patients et échantillons cliniques 15
C. Analyse statistique 15
D. Culture 15
E. Détection par amplification en chaîne par polymérase 16
F. Microscopie électronique 16
G. Séquençage métagénomique à haut débit (Illumina, MiSeq) 16
H. Séquençage métagénomique à haut débit en temps réel (Oxford Nanopore, GridION) 17

V. RESULTATS 18

A. Patients 18
B. Sources d'infection 19
C. Agents pathogènes microbiens isolés dans les abcès cérébraux 20
D. Analyses statistiques 21
E. Microscopie électronique 22
F. Séquençages métagénomiques à haut débit (Illumina, MiSeq) et en temps réel (Oxford Nanopore, GridION) 24
G. Comparaison des méthodes diagnostiques usuelles et du séquençage métagénomique à haut débit en temps réel (Oxford Nanopore, GridION) 25
H. Microorganismes identifiés seulement par la technique GridION 28

VI. DISCUSSION 31

VII. CONCLUSION 35

VIII.ANNEXES 36

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 38

Table des illustrations

Tableau 1: Le spectre des organismes diffère selon la source anatomique..... 8
Tableau 2: Comparaison des techniques moléculaires réalisées sur 20 abcès cérébraux. 11
Tableau 3: Agents microbiens isolés dans les abcès cérébraux dans notre cohorte..... 20
Tableau 4: Comparaison des germes identifiés suite au séquençage métagénomique à haut débit (Illumina, MiSeq) et en temps réel (Oxford Nanopore, GridION). En gras, les espèces que l'on retrouve avec les deux méthodes. 24
Tableau 5: 24 échantillons dans lesquels les germes (en gras) ont été identifiés par culture et/ou PCR au laboratoire ou par séquençage métagénomique en temps réel (Oxford Nanopore, GridION). 26
Tableau 6: 7 prélèvements ayant un diagnostic négatif obtenu avec les différentes techniques. 27
Tableau 7: 7 prélèvements pour lesquels les germes identifiés avec les méthodes usuelles, culture et/ou PCR différaient de ceux obtenus avec la technique de séquençage métagénomique (Oxford Nanopore). 27
Tableau 8: Panel de germes identifiés par le séquençage GridION. En gras, ceux n'ayant pas été identifiés par les techniques usuelles (culture et/ou PCR). 28

Figure 1: Composition microbienne des abcès cérébraux telle qu'identifiée par Lin et al. par métagénomique totale. 13
Figure 2: Déroulement pratique de l'étude..... 14
Figure 3: Distribution du nombre d'abcès cérébraux en fonction de l'âge et du sexe des patients sur la série de cas à l'IHU de 2014 à 2020. 18
Figure 4: Les différentes sources d'infections des abcès cérébraux dans la série de cas obtenue à l'IHU de 2014 à 2020. 19
Figure 5: Analyse en composante principale des patients étudiés. 21
Figure 6: Examen au microscope électronique à balayage en temps réel de différents pus d'abcès cérébral de patient à l'aide d'un microscope TM4000 (Hitachi). Les flèches indiquent des cellules microbiennes. La barre d'échelle varie entre 5 à 10,0µm..... 23
Figure 7: Diagramme de Venn permettant de visualiser le panel de germes identifiés à l'aide de la culture, les PCR et le séquençage métagénomique en temps réel (technique GridION). 27

I. RESUME

Contexte : Les abcès cérébraux sont des infections focales du parenchyme cérébral rares mais potentiellement mortelles. Les méthodes usuelles de diagnostic microbiologique ne permettent pas de documenter avec suffisamment de précision les agents responsables de ces infections, par conséquent la prise en charge médicale en reste souvent empirique.

Méthodes : Dans ce travail, nous avons d'abord étudié 115 abcès cérébraux adressés de 2014 à 2020 à l'IHU Méditerranée Infection pour tenter d'identifier des associations entre agents pathogènes identifiés au laboratoire en routine et étiologies. Ensuite, pour les échantillons toujours disponibles en biobanque, nous avons utilisé une combinaison de deux techniques innovantes dont le séquençage à haut débit en temps réel (GridION, Oxford Nanopore) et la microscopie électronique en temps réel (TM 4000, Hitachi) pour l'exploration de ces infections.

Résultats : Parmi les 115 échantillons étudiés, un diagnostic microbiologique par culture usuelle et/ou PCR a été obtenu chez 86 (75%) patients dont 19 chez lesquels l'infection était polymicrobienne (17%). Aucun pathogène n'a été détecté chez 28 patients, soit 25% des patients dont l'abcés cérébral était supposé infectieux. Nous avons mis en évidence trois assocations entre l'immunodépression et les abcès cérébraux à *Nocardia* sp, les infections supra-diaphragmatiques et les abcès cérébraux polymicrobiens et enfin les gestes neurochirurgicaux et les entérobactéries.

Parmi les 15 patients pour lesquels nous avons pu réaliser une analyse en microscopie électronique en temps réel, nous avons détecté des microorganismes chez 8 patients (53%). Nous avons également analysé 38 échantillons avec la méthode de séquençage métagénomique à haut débit GridION (Oxford Nanopore) que nous avons comparée à la culture et à la PCR réalisées au laboratoire en routine. Pour 82% des échantillons (31/38), nous avons obtenu un résultat cohérent entre les différentes méthodes diagnostiques. Le séquençage métagénomique à haut débit a permis d'identifier 37 microorganismes, dont 38% n'avaient pas été détectés par culture et/ou PCR. De plus, l'analyse en microscopie électronique et le séquençage métagénomique à haut débit en temps réel ont permis d'obtenir des résultats dans les 6 heures suivant le prélèvement, réduisant de près de 42 heures le temps nécessaire au diagnostic étiologique tel qu'obtenu par les techniques usuelles.

Conclusion : La combinaison de la microscopie électronique et du séquençage métagénomique à haut débit en temps réel est compatible avec le temps du soin et peut remplacer la culture et la PCR standard pour le diagnostic des abcès cérébraux.

II. ARTICLES

1) Brief case : Early diagnosis of brain abscess using real-time electron microscopy and metagenomics

Léa Fuster[1,2], Ludivine Bréchard[2], Olivia Ardizzoni[2], Jeremy Delerce[2], Henry Dufour[3], Pierre-Hugues Roche[4], Didier Raoult[2,5], Pierre-Edouard Fournier[1,2]*

[1] UMR VITROME, Aix-Marseille Université, IRD, Service de Santé des Armées, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Marseille, France.
[2] Institut Hospitalo-universitaire Méditerranée Infection, Marseille, France.
[3] Service de Neurochirurgie, Hôpital de la Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France.
[4] Service de Neurochirurgie, Hôpital Nord, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France.
[5] UMR MEPHI, Aix-Marseille Université, IRD, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Marseille, France.

Running title: Real-time diagnosis of brain abscess
Keywords: brain abscess; diagnosis; electron microscopy; metagenomics; Oxford Nanopore

2) **Real-time genomics applied to the diagnosis of infectious diseases** (en cours)

III. INTRODUCTION

A. DEFINITION DE L'ABCES CEREBRAL

Les abcès cérébraux sont des infections focales rares mais potentiellement mortelles du parenchyme cérébral. Au cours de ces dernières décennies, le taux de mortalité des abcès cérébraux a diminué de 40% à 10% mais il reste encore un nombre considérable de patients avec des séquelles neurochirurgicales sévères (1). Les méthodes usuelles de diagnostic microbiologique, telles que la culture et la PCR, ne permettent pas de documenter avec suffisamment de précision les agents responsables de ces infections, et par conséquent la prise en charge médicale reste souvent empirique (2). Le traitement des abcès cérébraux nécessite une antibiothérapie multiple, et le plus souvent un drainage chirurgical (3).

Parmi les trois principales infections du système nerveux central, les abcès cérébraux sont les infections les moins étudiées en termes de recherche. En effet, à l'aide de Pubmed, nous avons identifié 122 851 articles avec le mot clé « méningite », 67 244 avec « encéphalite » et seulement 11 457 avec « abcès cérébral ». Cependant, ce type d'infection implique des défis diagnostiques et potentiellement thérapeutiques, qui restent encore complexes.

B. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ABCES CEREBRAL

Le principal mécanisme de défense du cerveau est l'intégrité de la barrière hémato-méningée. Une fois cette barrière passée, le cerveau est moins bien défendu que d'autres tissus, du fait d'un défaut d'opsonisation lié à une concentration limitée en complément et lysozyme (4–6). Lors de la phase initiale, précédant le ramollissement, l'infection génère un infiltrat inflammatoire constitué de polynucléaires neutrophiles, plasmocytes et monocytes, et un œdème périphérique. Dans un second temps, l'infiltrat s'enrichit de macrophages et de fibroblastes. Autour de la lésion initiale, qui nécrose, se forme alors une capsule de collagène entourée de gliose hypervascularisée (7) puis se forme l'abcès cérébral défini par une zone d'infection parenchymateuse contenant du pus encapsulée par une membrane vascularisée (8).

L'abcès cérébral est le plus souvent secondaire à un foyer infectieux (9–12).
Les germes pathogènes pénètrent dans le cerveau le plus souvent par propagation contiguë à partir d'un foyer infectieux loco-régional (sinusite, otite, ou mastoïdite) ou bien, suite à une fracture du crâne avec brèche méningée ou à une intervention neurochirurgicale. Le second mécanisme est la formation d'un abcès cérébral à partir d'un foyer infectieux distant comme les infections dentaires ou pulmonaires. Le troisième mécanisme est la dissémination hématogène de microorganismes, en particulier dans le cas de l'endocardite infectieuse. (13). Ces dernières années, les interventions neurochirurgicales et les traumatismes crâniens sont devenus d'importants facteurs de prédisposition à l'abcès cérébral (2).

Cependant, certains abcès cérébraux sont cryptogéniques, c'est-à-dire que la porte d'entrée n'est pas retrouvée. Ces patients n'ont pas d'antécédents ni de signes physiques particuliers, ce qui entraîne une plus grande difficulté de diagnostic (14). D'après les rapports, le nombre de cas cryptogéniques serait en augmentation : 19% des cas d'abcès cérébral en 2000 (15) et 48% en 2014 (16).

C. DEFINITION CLINIQUE ET EPIDEMIOLOGIE DE L'ABCES CEREBRAL

Un abcès cérébral est une collection circonscrite d'exsudat purulent dans le cerveau. Le diagnostic clinique d'un abcès cérébral n'est pas toujours évident. Le développement d'un abcès cérébral peut être insidieux (et passer inaperçu), ou brutal (abcès fulminant). Dans la majorité des cas (environ 75 %), les symptômes durent environ 15 jours. Ces symptômes vont dépendre de nombreux facteurs dont le type de microorganisme en cause, la localisation de l'abcès et le statut immunitaire du sujet. Les manifestations les plus fréquentes sont des céphalées chez environ 70 % des patients, une hyperthermie chez la moitié des patients (~51%) et des crises comitiales chez 25 à 50 % des patients (16).

L'incidence a été estimée de 0.3 à 0.9 pour 100 000 habitants par an dans les pays développés. L'abcès cérébral touche majoritairement les hommes (rapport homme/femme : 3/1), il peut se produire à tout âge mais l'âge médian est de 30 à 40 ans (13).

Quasi-toujours mortels jusqu'à la fin du XIXème siècle, les abcès cérébraux ont vu leur pronostic transformé par l'antibiothérapie, le développement de meilleures techniques neurochirurgicales et l'introduction de nouvelles méthodes d'imagerie (scanner, IRM) permettant, outre le diagnostic nosologique et la surveillance, le diagnostic étiologique par ponction-biopsie stéréotaxique ou chirurgicale. Cependant, en dépit de ces progrès et de l'utilisation systématique des antibiotiques, les résultats thérapeutiques de l'abcès cérébral n'ont pas montré d'amélioration statistiquement significative au cours des vingt dernières années (2).

D. AGENTS ETIOLOGIQUES DES ABCES CEREBRAUX

Les microorganismes les plus fréquemment isolés sont les cocci à Gram positif (staphylocoques, streptocoques), les bacilles à Gram négatif (entérobactéries, *Haemophilus* sp.), et les bactéries anaérobies principalement dans des flores polymicrobiennes (15). Les entérobactéries (*Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp.) sont isolées dans 23 à 33% des cas (2,17). D'autres bactéries sont plus rarement rencontrées : *Haemophilus* sp., *Listeria monocytogenes* (12,18,19), de même que les champignons, levures et parasites.

Cependant, un délai d'acheminement trop long du prélèvement au laboratoire, l'absence de milieu de transport spécifique (comme pour les bactéries anaérobies) ou l'administration précoce d'antibiotiques permettent d'expliquer l'absence de culture d'une partie des bactéries identifiées. Il apparaît clairement que les méthodes de culture usuelles des abcès cérébraux ne permettent l'identification que d'une faible proportion des bactéries en cause.

Les différents agents pathogènes d'abcès cérébral varient avec leur porte d'entrée (Tableau 1).

L'abcès otogène est le plus souvent associé au *Proteus*, aux organismes du groupe *Streptococcus milleri* et au *Streptococcus pneumoniae*. Les cultures de ces abcès otogéniques sont fréquemment négatives ou polymicrobiennes et il n'est pas rare de retrouver des organismes anaérobies dans ces échantillons.

La sinusite paranasale est souvent associée à des complications intracrâniennes dues à des streptocoques, des staphylocoques, et moins fréquemment à des entérobactéries. En effet, les streptocoques sont des agents pathogènes communs dans les infections de la tête et du cou

et ont été associés à des abcès cérébraux causés par une propagation contiguë à partir de l'oreille ou du sinus paranasal (19).

Les organismes les plus fréquemment rencontrés dans les abcès faisant suite à des lésions cérébrales traumatiques sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et les entérobactéries (*Pseudomonas aeruginosa* étant l'agent pathogène le plus courant dans cette famille). De même, *S aureus, S epidermidis, P aeruginosa* et *Propionibacterium acnes* sont associés aux abcès liés à des procédures neurochirurgicales. Les abcès peuvent également être formés suite à une diffusion hématogène des agents pathogènes. Les organismes les plus couramment isolés dans ces abcès sont *Staphylococcus aureus, Streptococcus viridans et Klebsiella pneumoniae* (8).

Sources	**Organismes les plus couramment cultivés**
Infection des sinus paranasaux	Streptococcus spp Staphylococcus spp Enterobacteriaceae (Hemophilus spp, *Pseudomonas aeruginosa*)
Infection otogène	*Proteus mirabilis* Organismes du groupe *Streptococcus milleri* *Streptococcus pneumoniae* *Staphylococcus aureus*
Infection dentaire	Streptococcus spp *Bacteroides fragilis*
Traumatisme crânien	*Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis* Enterobacteriaceae (*Pseudomonas aeruginosa,* Enterobacter spp)
Geste neurochirurgical	*Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis* *Pseudomonas aeruginosa* *Propionibacterium acnes* Streptococcus spp.
Dissémination hématogène	*Staphylococcus aureus* *Streptococcus virudans* *Klebsiella pneumoniae*

***Tableau 1**: Le spectre des organismes diffère selon la source anatomique.*

E. DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE DES ABCES CEREBRAUX

Si les techniques modernes d'imagerie (scanner et/ou IRM montrant une image « en cocarde », nécrotique au centre et à contraste réhaussé en périphérie) et de culture ont révolutionné la prise en charge des abcès cérébraux, le diagnostic étiologique reste souvent difficile à établir. Pourtant, l'identification de l'agent causal permet d'optimiser la prise en charge des patients concernés, à la fois pour l'antibiothérapie et pour les soins chirurgicaux.

Dans la prise en charge des abcès cérébraux, les hémocultures aérobies et anaérobies doivent être systématiquement réalisées mais leur rendement est faible. Le diagnostic microbiologique d'un abcès cérébral repose en priorité sur l'analyse du liquide d'abcès prélevé stérilement et de préférence avant toute antibiothérapie. Cet échantillon doit faire l'objet d'une coloration de Gram systématique, et d'une étude cytologique. La mise en culture est réalisée sur milieux aérobie et anaérobie, et doit être prolongée au moins 10 jours. Néanmoins, les cultures sont non contributives dans 9 à 63% des cas (20)**.** Ce taux important d'échec diagnostique peut s'expliquer par une administration d'antibiotiques avant la réalisation du prélèvement ou un délai trop important avant la mise en culture.

En 1991, la mise en évidence dans le gène codant la fraction 16S de l'ARN ribosomal (ARNr 16S) de zones conservées encadrant des zones variables a ouvert des perspectives nouvelles pour la détection moléculaire par polymerase chain reaction (PCR) (21). L'intérêt de cibler l'ARNr 16S est que ce gène est présent chez toutes les bactéries et qu'il est possible d'utiliser des amorces de PCR permettant d'amplifier dans un échantillon les ARNr 16S de toutes les bactéries qui s'y trouvent. La PCR ciblant l'ARNr 16S, couplée au séquençage, a été appliquée à la détection et à l'identification des bactéries pathogènes dans de nombreux échantillons cliniques (22–24). L'amplification par polymerase chain reaction (PCR) suivie de séquençage de l'ARN ribosomal (ARNr 16S), présent chez toutes les bactéries, a été utilisée pour la détection de pathogènes dans les abcès cérébraux (25). Cette approche est utile en particulier pour identifier des germes bactériens à croissance lente et fastidieuse (26,27).

Cependant, en cas de flores polymicrobiennes complexes comme les flores dentaires, vaginales ou intestinales, les séquences d'ARN 16S sont difficiles à analyser (28–31). L'étude exhaustive des flores complexes par identification génétique, nommée analyse métagénomique,

a notamment permis l'exploration des déséquilibres de la flore dans de nombreuses pathologies, en particulier au cours de l'obésité (32). Les études ont montré que les abcès cérébraux sont des infections souvent causées par plusieurs bactéries à la fois. Dans ces cas, la PCR ne permet pas toujours d'identifier les espèces en cause.

Les progrès dans la recherche moléculaire, notamment le séquençage multiple de gènes d'ARNr 16S et la métagénomique, ont progressivement élargi le répertoire des bactéries détectées dans les abcès cérébraux.

F. EXPANSION DU SPECTRE MICROBIOLOGIQUE DES ABCES CEREBRAUX

Dans les abcès cérébraux, les études métagénomiques ont permis d'identifier de nombreux microorganismes que la culture ou la PCR standard n'avaient pas mis en évidence (26). Ces travaux ont mis en lumière la forte proportion de bactéries anaérobies et incultivées dans ce type d'infection. Ils ont également montré l'inadéquation chez plusieurs patients de l'antibiothérapie empirique utilisée dans les abcès cérébraux.

L'utilisation du clonage, séparant l'ADN amplifié à partir des différentes bactéries présentes, a permis de surmonter ce problème pour les flores polymicrobiennes complexes comme les flores dentaires, vaginales ou intestinales (28–31). La plupart des études métagénomiques utilisaient une étape de clonage avant le séquençage. Cependant, cette étape de clonage nécessite une quantité de travail et de temps importante.

Les travaux réalisés à l'IHU utilisaient une approche métagénomique pour l'exploration des abcès cérébraux par amplification de la fraction 16S du gène codant l'ARN ribosomal, suivi du séquençage par pyroséquençage à très haut débit (33). Cette technique ne nécessitait pas d'étape de clonage et permettait d'effectuer un séquençage rapide automatisé avec lecture directe de la séquence obtenue. Elle a été comparée aux techniques de séquençage direct et multiple après clonage. Ces travaux ont montré la présence concomitante de plusieurs bactéries dans chaque échantillon. De nombreuses espèces n'avaient pas été isolées en culture ni détectées par PCR simple (Tableau 2). Vingt-sept espèces n'avaient jamais été décrites auparavant dans ce type d'infection ce qui démontre que la flore des abcès cérébraux est plus complexe que ce que les études précédentes ne le laissaient penser. De plus, l'isolement à deux

reprises de *Mycoplasma hominis* démontre qu'il doit être considéré comme un agent pathogène émergent des abcès cérébraux. Pour la première fois, les approches moléculaires nous ont permis d'associer *Mycoplasma Faucium,* habitant de l'oropharynx primate, au développement d'abcès cérébraux (33)**.**

							Multiple sequencing			
							Cloning			
								Anaerobic bacteria		
Predisposing factor, patient	Sex/ age, years	Treatment	Outcome	Duration of follow-up, months	Culture finding	Single sequencing	Aerobic bacteria	GP firmicutes	GN bacilli	Pyrosequencing
Postneurosurgery										
1[a]	M/52	Imi followed by oral Amox	Death	…	Sterile	*Acinetobacter calcoaceticus*	*A. calcoaceticus*	…	…	…
2	F/41	Doxy	Favorable	32	Sterile	*Mycoplasma hominis*	*M. hominis*	…	…	…
3	M/76	Imi followed by oral Amox	Death	…	*Serratia marcescens*	*S. marcescens*	*S. marcescens*	…	…	…
4	M/55	Rif and a FQ	Favorable	13	*Staphylococcus aureus*	*S. aureus*	*S. aureus*	…	…	…
Sinusitis or dental abscesses										
5	M/38	Imi	Favorable	23	*Klebsiella oxytoca*	*Bacteroides fragilis*	*Mycoplasma faucium, K. oxytoca*	…	*B. fragilis, Fusobacterium naviforme,* uncultured bacterium 1, uncultured bacterium 2, uncultured bacterium 3	…
6	F/76	Imi	Favorable	23	*Streptococcus constellatus, Escherichia coli*	Polymicrobial	*S. constellatus, M. faucium*	*Micromonas micros, Peptostreptococcus stomatis, Mogibacterium timidum,* uncultured bacterium 6	*Fusobacterium nucleatum, Prevotella intermedia, Prevotella oris, Prevotella tannerae, Prevotella baroniae,* uncultured bacterium 7, uncultured bacterium 8, uncultured bacterium 9	…
7	M/47	Imi followed by oral Amox	Sequelae	30	*Streptococcus intermedius, Eikenella corrodens*	Polymicrobial	*S. intermedius, E. corrodens*	*M. micros*	…	…
8	M/14	Imi	Favorable	31	*S. intermedius*	*S. intermedius*	*S. intermedius*	…	…	…
9	M/68	Imi	Favorable	30	*S. intermedius*	*S. intermedius*	*S. intermedius, M. faucium*	…	*B. fragilis,* uncultured bacterium 1	…
10	M/53	Imi	Sequelae	27	*S. constellatus, Gemella haemolysans*	Polymicrobial	*S. constellatus, G. haemolysans*	*M. micros, Eubacterium brachy*	*P. oris, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas endodontalis, Porphyromonas gin-*	*S. constellatus, M. micros, Eubacterium brachy, F. nucleatum P. gingivalis, Campylobacter rectus, Treponema*
11	M/14	Ceph-Vanc-Met	Favorable	20	*Streptococcus pneumoniae*	*S. pneumoniae*	*S. pneumoniae*	…	…	…
12	M/61	Ceph-Vanc-Met	Favorable	1	*S. intermedius, S. epidermidis*	Polymicrobial	*S. intermedius, E. corrodens, Campylobacter gracilis*	*M. micros*	*Capnocytophaga* species, *F. naviforme, F. nucleatum*	…
13	M/66	…	Death	…	*Streptococcus* species	Polymicrobial	*Streptococcus anginosus, Gemella morbillorum*	*M. micros*	*Prevotella* species, *P. intermedia, F. nucleatum*	…
Congenital heart disease: 14	F/49	…	Death	…	*S. intermedius, S. epidermidis*	*S. intermedius*	*S. intermedius, M. hominis, E. corrodens*	*M. micros*	*F. nucleatum*	…
Cancer										
15	F/69	Imi	Favorable	9	*Nocardia* species	Negative		…	…	…
16	M/62	Ceph-Vanc-Met	Lost to follow-up	…	*Nocardia cyriacigeorgia*	*N. cyriacigeorgia*	*N. cyriacigeorgia*	…	…	…
17[a]	M/5	Imi	Favorable	19	Sterile	*Neisseria* species	*Neisseria* species	…	…	…
Not known										
18	M/62	Ceph-Vanc-Met	Death	…	*Aggregatibacter aphrophilus*	*A. aphrophilus*	*A. aphrophilus*	…	…	…
19	M/45	Imi	Favorable	29	*S. intermedius*	*S. intermedius*	*S. intermedius*	…	…	…
20	M/50	Imi	Favorable	28	*S. intermedius*	*S. intermedius*	*S. intermedius*	…	…	…

NOTE. The pus specimen was analyzed using bacteriologic tools, direct 16S rDNA sequencing, 16S rDNA library sequencing, and high-throughput pyrosequencing in one case. The total number of strains identified was 22 for culture, 14 for single sequencing, and 72 for multiple sequencing; the total number of specimens was 14, 11, and 49, respectively. Amox, amoxicillin; Ceph-Vanc-Met, third-generation cephalosporin plus vancomycin plus metronidazole; Doxy, doxycycline; FQ, fluoroquinolone; GN, gram-negative; GP, gram-positive; Imi, imipenem; Rif, rifampin.

[a] Patient received antibiotic treatment prior to specimen collection.

Tableau 2*: Comparaison des techniques moléculaires réalisées sur 20 abcès cérébraux.*

En 2012, un travail réalisé dans le laboratoire, utilisant la métagénomique basée sur l'ARNr 16S, a permis de confirmer le caractère fréquemment polymicrobien des abcès cérébraux et d'identifier de nombreux microorganismes, en particulier des bactéries anaérobies et incultivées (34). La métagénomique, par l'identification de 80 espèces bactériennes différentes dans les abcès cérébraux, s'est montrée significativement plus discriminante ($P < 10^{-2}$) que la culture et la PCR 16S suivie de séquençage standard (34). Cinquante-six pour cent de ces 80 espèces n'avaient jamais été décrites dans les abcès cérébraux (14). Un nombre aussi élevé d'espèces bactériennes impliquées dans les abcès cérébraux a conduit à l'étude de 51

nouveaux spécimens dans le but de décrire plus en détail la flore associée aux abcès cérébraux et leurs étiologies.

Cependant, ces techniques ont négligé les méthanogènes, procaryotes résistants aux antibiotiques, qui échappent à la détection de routine dans les laboratoires de microbiologie clinique et dont la culture est très fastidieuse. Dans notre laboratoire, des techniques de détection et de culture spécifiques pour la recherche de méthanogènes pathogènes ont été mises en place, en supposant qu'ils pouvaient être détectés dans des tissus malades infectés par des bactéries anaérobies orales, comme c'est le cas pour les abcès cérébraux. Ces études ont montré que les archées font partie du microbiote responsable de certains cas d'abcès cérébraux (35). Le modèle murin a indiqué que *Methanobrevibacter oralis* seul était responsable d'une mortalité aiguë et serait pathogène pour le tissu neural. En effet, il produit du méthane, un gaz neurotoxique puissant, suggérant que les méthanogènes pourraient participer à la pathogénicité des lésions cérébrales en partie par toxicité neuronale. Suite à cette découverte, le choix des traitements est remis en cause afin d'incorporer des agents actifs contre ces microorganismes (35)**.** Cette étude a montré que les bactéries représentaient 71% des microorganismes présents dans les abcès cérébraux, les archées 22% et que des virus étaient également présents ce qui confirme une réelle biodiversité dans la totalité des échantillons.

Récemment, les chinois ont mené une étude sur la composition microbienne des abcès cérébraux en utilisant le séquençage métagénomique total. Ils ont montré que cette technique offrait des possibilités d'explorer une communauté microbienne dans un contexte élargi (36)**.** En effet le séquençage métagénomique a révélé une plus grande diversité taxonomique des bactéries mais également la présence de communautés de champignons et de virus (Figure 1). Au total, le microbiome représentait 36,1 % des séquences obtenues, tandis que la contamination humaine et la lecture de la cartographie en occupent 29,6 % et 34,2 %. Les lectures du microbiome sont ensuite classées en communautés de bactéries (97,5 %), de champignons (1,5 %) et de virus (1 %). Parmi les champignons, les trois genres dominants étaient *Debaryomyces, Aspergillus* et *Malassezia*. *Aspergillus* et *Malassezia* sont des commensales de la peau difficiles à cultiver et des agents pathogènes connus des abcès cérébraux. L'*herpèsvirus* est le plus fréquemment retrouvé dans cette étude et il est l'une des causes virales les plus courantes d'encéphalite. Ceci implique que la compréhension actuelle des abcès cérébraux doit tenir compte d'une plus grande diversité des microorganismes.

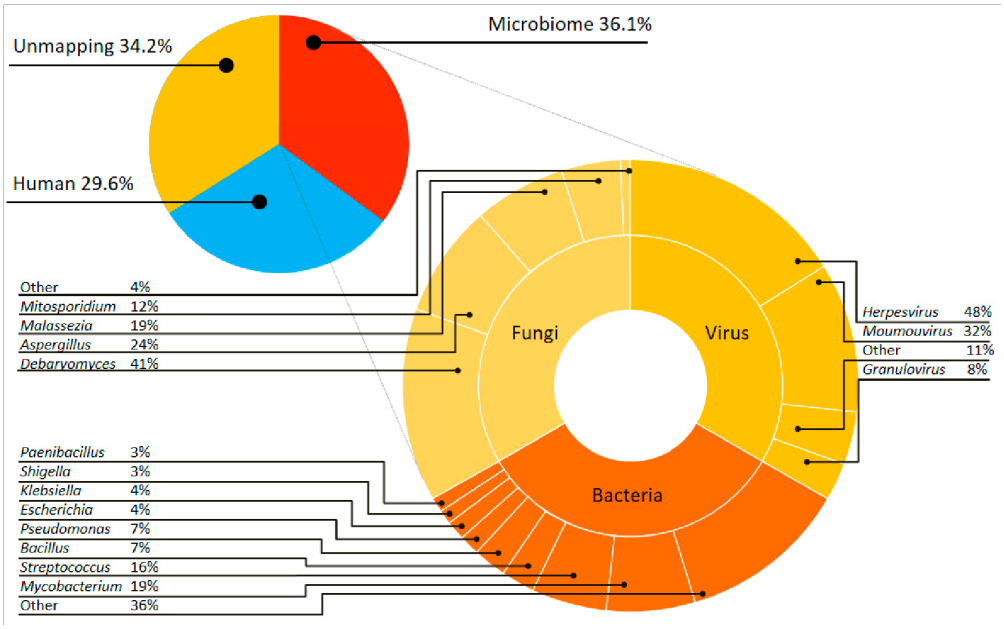


***Figure 1**: Composition microbienne des abcès cérébraux telle qu'identifiée par Lin et al. par métagénomique totale.*

G. RESUME DES OBJECTIFS

A partir du diagnostic habituel réalisé au laboratoire, nous décrivons l'épidémiologie des abcès cérébraux adressés de 2014 à 2020 à l'IHU Méditerranée Infection puis nous identifions des associations entre agents pathogènes identifiés et étiologies de chaque abcès cérébral (sepsis, infection loco-régionale, infection post-opératoire).

Dans le but de réduire le temps et d'améliorer le taux de diagnostic des abcès cérébraux, nous avons évalué une combinaison de techniques innovantes telles que le séquençage à haut débit en temps réel (GridION, Oxford Nanopore) et la microscopie électronique en temps réel (TM 4000, Hitachi) pour l'exploration de ces infections. Nous attendons de cette stratégie un rendement plus élevé, non seulement en termes de temps mais aussi en termes de pouvoir de discrimination entre les espèces pathogènes. Cette combinaison de méthodes nous permettrait de fournir un diagnostic étiologique lorsque l'agent causal est fastidieux, ou lorsque le patient a reçu un traitement antimicrobien.

Ce projet prolonge la stratégie développée au sein de la Fédération de Microbiologie Clinique des hôpitaux de l'AP-HM depuis plus de 30 ans, consistant à utiliser des outils nouveaux de biologie fondamentale pour les appliquer à la microbiologie clinique afin de découvrir de nouveaux pathogènes.

IV. MATERIELS ET METHODES

A. PRESENTATION SYNTHETIQUE DU DEROULEMENT DE L'ETUDE

Nous utilisons des techniques innovantes telles que le séquençage à haut débit en temps réel (GridION, Oxford Nanopore) et la microscopie électronique en temps réel (TM 4000, Hitachi). Elles sont systématiquement comparées à la culture et la détection moléculaire par PCR habituellement utilisées pour le diagnostic des abcès cérébraux (16S rRNA; *Mycoplasma* sp. ; *Mycoplama faucium ; Mycoplasma hominis ; Streptococcus intermedius ;* Archaea ; *Aspergillus* sp. *; Candida* sp. ; *Cysticerca* sp. ; *Cryptococcus* sp. ; *Histoplasma* sp) (Figure 2).

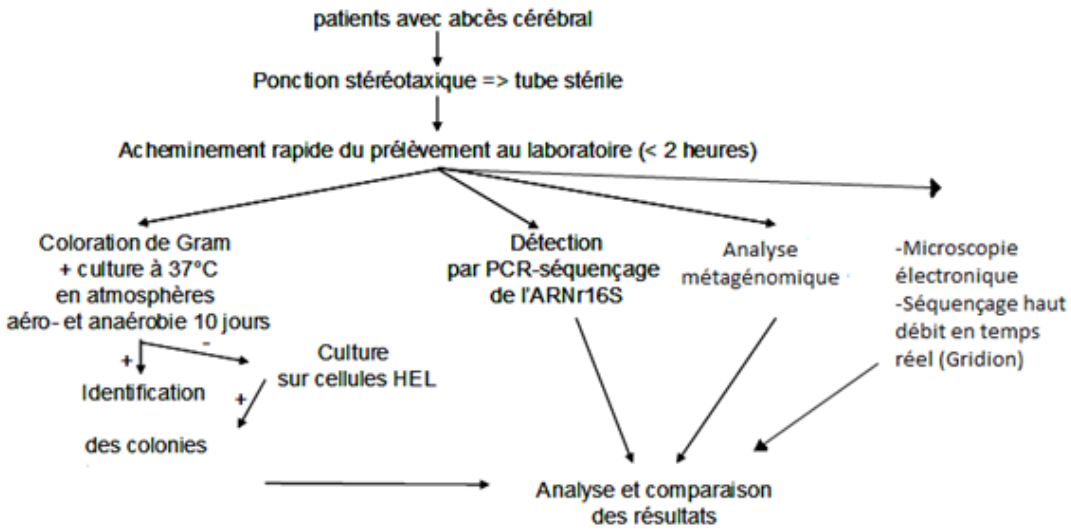


***Figure 2**: Déroulement pratique de l'étude.*

B. PATIENTS ET ECHANTILLONS CLINIQUES

Du 1er janvier 2014 au 1er septembre 2020, nous avons reçu au laboratoire de microbiologie de l'Institut Méditerranéen des Infections, Marseille, France, 186 prélèvements cérébraux pour analyse microbiologique. Parmi ceux-ci, 115 avaient été prélevés chez 115 patients dont l'origine des abcès était suspectée être infectieuse. Les patients ont donné leur consentement éclairé, et l'étude a été validée par le Comité d'éthique de l'Institut Méditerranéen d'Infection sous la référence 2017-015. Les données démographiques collectées anonymement pour chaque patient comprenaient l'âge, le sexe et la source potentielle de contamination. Les échantillons de pus utilisés ont été prélevés de manière chirurgicale et aseptique dans le cadre du diagnostic étiologique systématique des abcès cérébraux. Chaque échantillon d'abcès cérébral a été placé dans un tube stérile puis transporté au laboratoire de microbiologie.

C. ANALYSE STATISTIQUE

Les statistiques multivariées sont un outil permettant d'examiner la relation de plusieurs variables simultanément. L'analyse en composantes principales (ACP) est une technique d'analyse multivariée non supervisée qui simplifie la complexité des données en montrant leurs tendances et leurs corrélations. Une approche d'analyse multivariée a été appliquée à l'aide de XLSTAT (Addinsoft, New York, USA). L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les étiologies des abcès cérébraux et la clinique des patients pour analyser les relations possibles entre ces deux variables (37).

D. CULTURE

Chaque échantillon a été cultivé sur une gélose Columbia enrichie de sang de mouton à 5 % et une gélose Chocolat-Polyvitex à 37°C dans des conditions aérobies et anaérobies enrichies en CO_2 à 5 %, pendant 10 jours.

E. DETECTION PAR AMPLIFICATION EN CHAINE PAR POLYMERASE

L'extraction de l'ADN des échantillons d'abcès cérébraux a été réalisée à l'aide du kit EZ1 DNA Tissue (Qiagen, Hiden, Allemagne), après une lyse à la protéinase K (10µl de protéinase K + 200µl de tampon de lyse + 100 µl d'échantillon) 2h à 56°C, suivie d'une agitation FastPrep (vitesse 6,5 m/s pendant 40 sec.) et enfin d'une incubation à 100°C pendant 10 min. Après le séquençage, les séquences d'ARNr 16S ont été identifiées par comparaison avec celles actuellement disponibles dans GenBank. La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et le séquençage ont été réalisés en utilisant un séquenceur analyseur génétique 3500 (Applied Biosystems, Ville, Pays). Pour chaque échantillon, nous avons tenté la détection de l'ARNr 16S ainsi que la détection spécifique de *Mycoplasma* sp. ; *Mycoplama faucium ; Mycoplasma hominis ; Streptococcus intermedius ;* Archaea ; *Aspergillus* sp. *; Candida* sp. ; *Cysticerca* sp. ; *Cryptococcus* sp. ; *Histoplasma* sp. (29–31).

F. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Nous avons fixé 100 µl de chaque échantillon dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% pendant 1 heure. Ensuite, nous avons réalisé une cytospin de la suspension à 800 tr/min pendant 7 minutes sur une lame de microscope recouverte de poly-l-lysine. La lame est ensuite recouverte d'acide phosphotungstique (PTA) à 1 % en solution aqueuse (pH=2) pendant 2 minutes pour augmenter la qualité et le contraste de l'image. Elle est placée à l'air pour sécher et enfin être examinée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) de table TM4000, Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Japon, (Annexe 1).

G. SEQUENÇAGE METAGENOMIQUE A HAUT DEBIT (ILLUMINA, MISEQ)

L'ADN génomique des 6 abcès cérébraux a été quantifié par Qubit avec le kit haute sensibilité (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) à 0,2 ng/µl. Le séquençage a été réalisé sur système MiSeq (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) avec la technique dite « paired-end ». Les séquences d'ADN sont indexées par un code-barre unique afin d'être mélangées avec 9 autres projets, tous préparés avec le kit ADN Nextera XT (Illumina). Pour préparer les librairies, une dilution a été effectuée afin d'obtenir 1ng de chaque génome. L'étape de « tagmentation » a permis de fragmenter et de mettre en place les adaptateurs nécessaires à la fixation des index.

Ensuite, une amplification PCR de 12 cycles permet d'ajouter les codes-barres et les adaptateurs nécessaires au passage sur la flow cell. Après purification sur billes AMPure XP (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA), les librairies ont ensuite été normalisées sur billes spécifiques selon le protocole Nextera XT (Illumina). Les librairies ainsi normalisées sont poolées. Ce pool unique est chargé sur une cassette de réactifs qui est insérée dans l'instrument MiSeq en simultané de la flow cell. La génération des clusters et lecture des paires se réalisent en 39 heures, par lecture 2x250-bp. Une information totale de 4,46G a été obtenue à partir d'une densité de 459 K/mm^2 avec un pourcentage de clusters analysables de 97,40%. Dans cette série, la représentation des abcès cérébraux sur la flow cell est la suivante : 1 : 8.81%; 2 : 8.12%; 3 : 6.28%; 4 : 4.83%; 5 : 6.85%; 6 : 6.93% Les 8 911 413 reads totaux ont été filtrés en fonction de leur qualité.

H. SEQUENÇAGE METAGENOMIQUE A HAUT DEBIT EN TEMPS REEL (OXFORD NANOPORE, GRIDION)

Après avoir ajouté 10 µl de protéinase K, et fait incuber à 56°C pendant 20 min à 2 h dans le thermomixeur, nous procédons à un traitement mécanique qui a d'abord été effectué par des billes de verre lavées à l'acide (G4649-500g Sigma) à l'aide d'un broyeur FastPrep-24™ 5G (mpBio) à la vitesse maximale (6,5m/s) pendant 40 s. Ensuite, l'ADN est extrait sur le biorobot EZ1 (Qiagen) à l'aide du kit de tissus d'ADN EZ1. Le volume d'élution est de 200µL. L'ADNg est quantifié par un test Qubit avec le kit haute sensibilité (Life technologies, Carlsbad, CA, USA).

Nous avons utilisé une méthode de séquençage à haut débit nommée GridION (Oxford Nanopore, ONT, Oxford, UK). La technique permet de séquencer des fragments très longs (jusqu'à 5 kb) en un temps très court et permet d'avoir en temps réel l'identification des agents responsables des abcès cérébraux par comparaison des séquences obtenues avec une base de données. Les durées de run peuvent être très courtes (20min).

Le séquençage métagénomique a été réalisé sur l'ADN total extrait de chaque abcès cérébral avec le dispositif GridION en utilisant le kit SQK-LSK109 (Oxford Nanopore). La banque de clones a été construite à partir de 1,5 µg d'ADN génomique sans fragmentation et sans réparation des extrémités. Des adaptateurs ont été fixés aux deux extrémités de l'ADN génomique. Après purification sur des billes AMPure XP (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA), la banque a été quantifiée par un test Qubit avec le kit haute sensibilité (Life technologies, Carlsbad, CA, USA). Le séquençage a été effectué sur un séquenceur GridION X5 (Oxford Nanopore Technologies).

Le nombre de pores actifs a été détecté pour le séquençage. Le logiciel epi2me (Oxford Nanopore) a été choisi pour l'analyse bioinformatique en direct. Nous avons également analysé les données avec Kraken et Bracken qui sont des logiciels accessibles à tous, après retrait des séquences humaines.

V. RESULTATS

A. PATIENTS

Les 115 patients étudiés comprenaient 67 patients de sexe masculin (58 %) d'âge moyen 49 ans et 48 patients de sexe féminin (42 %) d'âge moyen 49 ans (Figure 3).

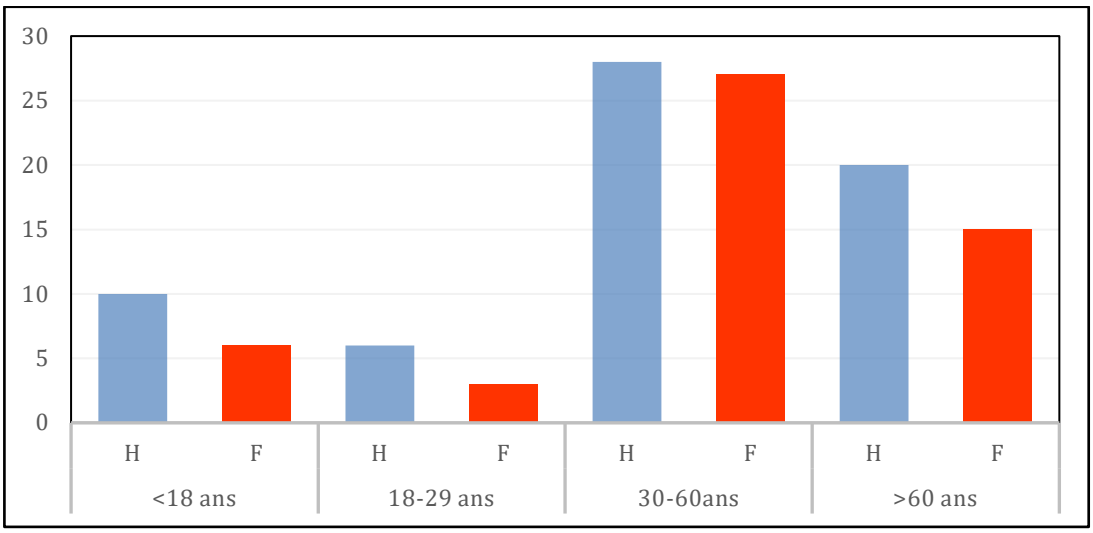


***Figure 3**: Distribution du nombre d'abcès cérébraux en fonction de l'âge et du sexe des patients sur la série de cas à l'IHU de 2014 à 2020.*

B. SOURCES D'INFECTION

L'étude de ces 115 cas d'abcès cérébraux (Figure 4) a révélé que la porte d'entrée des germes pathogènes dans le cerveau la plus fréquemment retrouvée était par propagation contiguë. En effet, les conditions prédisposantes les plus courantes étaient des infections des sinus paranasaux, de l'oreille moyenne et des zones mastoïdes : otite (4%), sinusite (13%) ou bien secondaire à une neurochirurgie récente (25%) ou un traumatisme crânien (16%).

Dix pour cent des abcès cérébraux étaient provoqués par des foyers infectieux plus éloignés comme des infections dentaires ou des abcès pulmonaires, 7% par diffusion hématogène, en particulier dans le cas d'endocardites infectieuses, tandis que 25% de ces abcès cérébraux étaient cryptogéniques. Il est intéressant de noter que parmi ces derniers, 38% des patients étaient immunodéprimés.

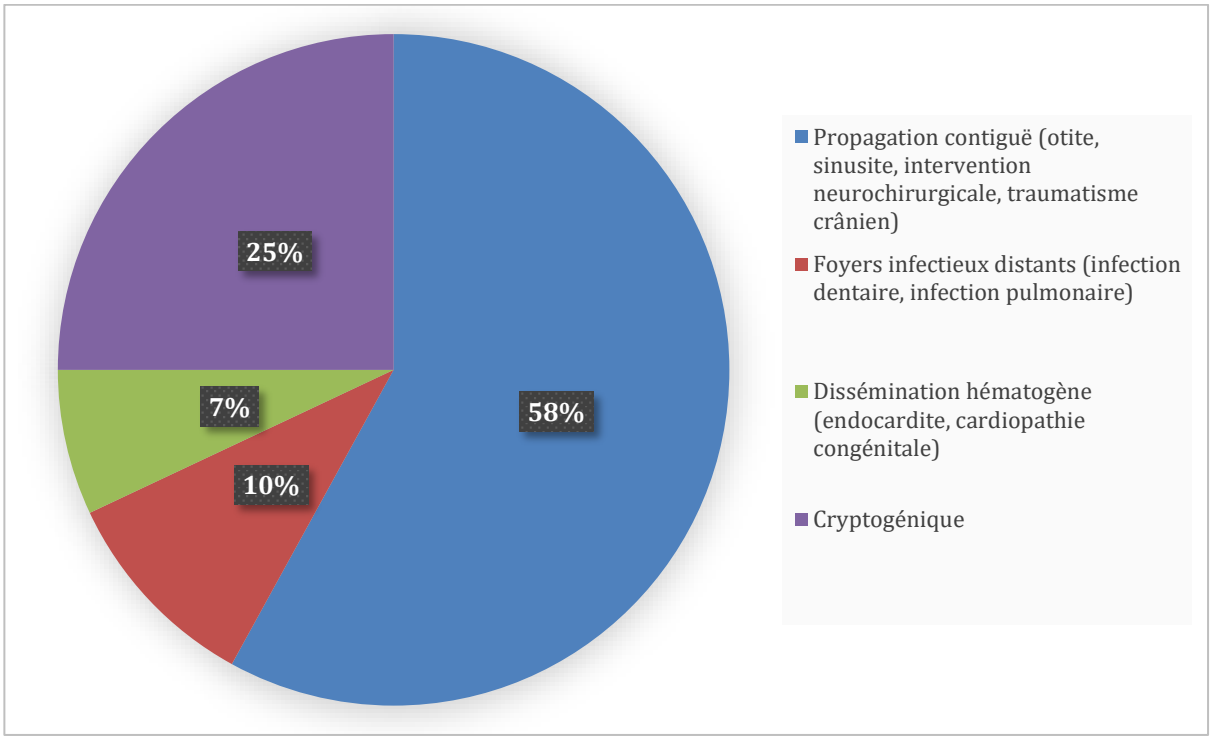


***Figure 4**: Les différentes sources d'infections des abcès cérébraux dans la série de cas obtenue à l'IHU de 2014 à 2020.*

C. AGENTS PATHOGENES MICROBIENS ISOLES DANS LES ABCES CEREBRAUX

Les microorganismes cultivés ou identifiés par détection moléculaire à partir de pus d'abcès cérébral sont répertoriés dans le Tableau 3. Un diagnostic microbiologique par culture usuelle et/ou PCR a été obtenu chez 86 patients (75%). Une infection polymicrobienne a été identifiée chez 19 patients (17%). Les bactéries à Gram positif constituaient le groupe de bactéries le plus couramment identifié. Dans notre série de cas, les agents pathogènes les plus répandus étaient ceux appartenant au groupe *Streptococcus milleri* (15%). Aucun pathogène n'a été détecté chez 28 patients, soit 25% des patients dont l'abcés cérébral était supposé infectieux. Cependant nous n'avons pas pu déterminer avec précision la proportion de patients ayant reçu des antibiotiques avant la chirurgie.

Microorganismes	**Nb**
Bactéries Gram-positives	
Streptococcus milleri group	17
Streptococcus pneumoniae	3
Staphylococcus aureus	8
Enterococcus faecalis	1
Nocardia sp.	11
Propionibacterium acnes	8
Bactéries Gram-négatives	
Enterobactéries	11
Escherichia coli	1
Salmonella sp.	1
Proteus sp.	1
Haemophilus influenzae	1
Citrobacter koseri	1
Pseudomonas sp.	1
Virus	
HSV 1	1
Parasite	
Toxoplasmose	1
Polymicrobiens	19
Résultats négatifs	28

***Tableau 3**: Agents microbiens isolés dans les abcès cérébraux dans notre cohorte.*

D. ANALYSES STATISTIQUES

Nous avons réalisé une analyse en composante principale sur les données de notre série. Cette analyse nous a permis de mettre en avant trois associations entre situation clinique et espèces bactériennes (Figure 5) :

1) L'immunodépression et les *Nocardia* sp.
2) Les infections supra-diaphragmatiques et les abcès cérébraux polymicrobiens.
3) Les gestes neurochirurgicaux et les entérobactéries.

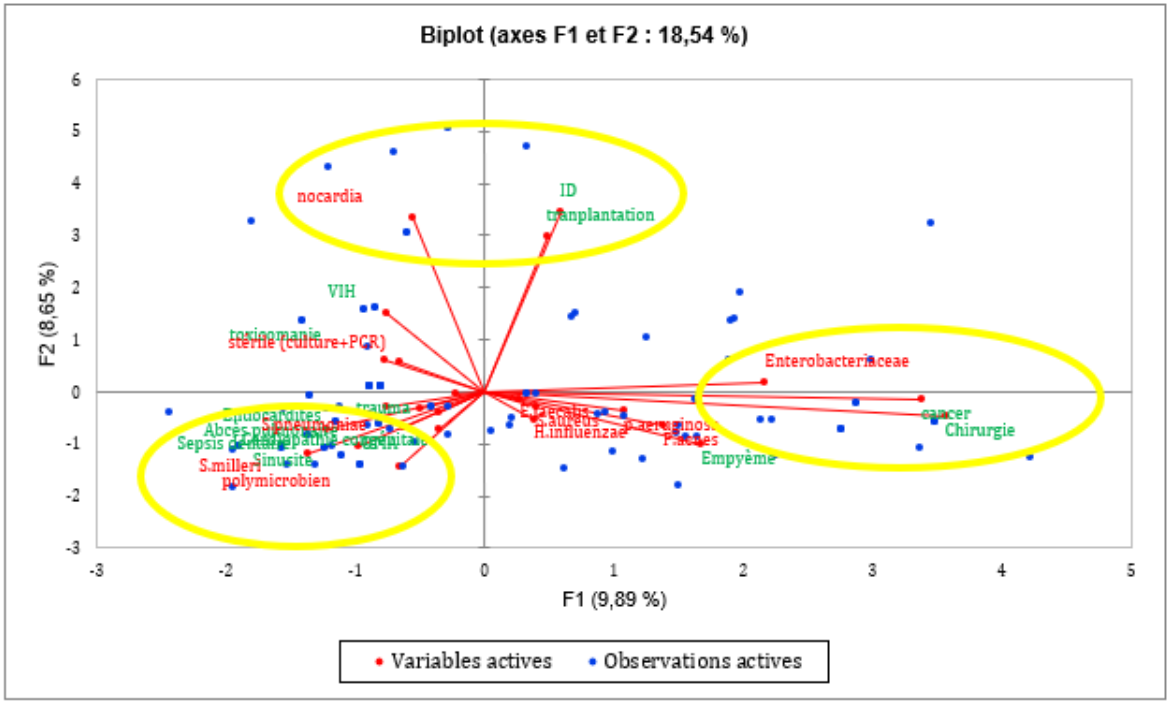


***Figure 5**: Analyse en composante principale des patients étudiés.*

Nous avons, par la suite, calculé les odds ratio et les intervalles de confiance (avec le logiciel R) qui nous permettent de confirmer une corrélation significative entre la clinique et les espèces bactériennes pour chaque hypothèse.

Hypothèse	1	2	3
OR	14,16	2,47	6,14
IC	[3,57-56,22]	[1,18 - 5,19]	[1,86-20,21]

avec OR = Odds ratio, IC = intervalle de confiance

E. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Sur les 115 échantillons d'abcès cérébraux étudiés, nous n'avons pu réaliser l'analyse en microscopie électronique en temps réel seulement chez 15 patients. Ce faible nombre d'échantillons étudiés est expliqué par le fait que notre étude était essentiellement rétrospective et de ce fait les échantillons étudiés étaient congelés, ce qui contre-indiquait leur analyse en microscopie électronique.

L'utilisation de la microscopie électronique en temps réel nous a permis de détecter des microorganismes chez 8 des 15 patients (53%) (Figure 6). Il est à noter que 4 prélèvements pour lesquels nous n'avons détecté aucun microorganisme étaient négatifs avec toutes les autres techniques diagnostiques utilisées, y compris la métagénomique et que les 3 autres étaient solides et ne permettaient pas d'obtenir une lame lisible au microscope électronique.

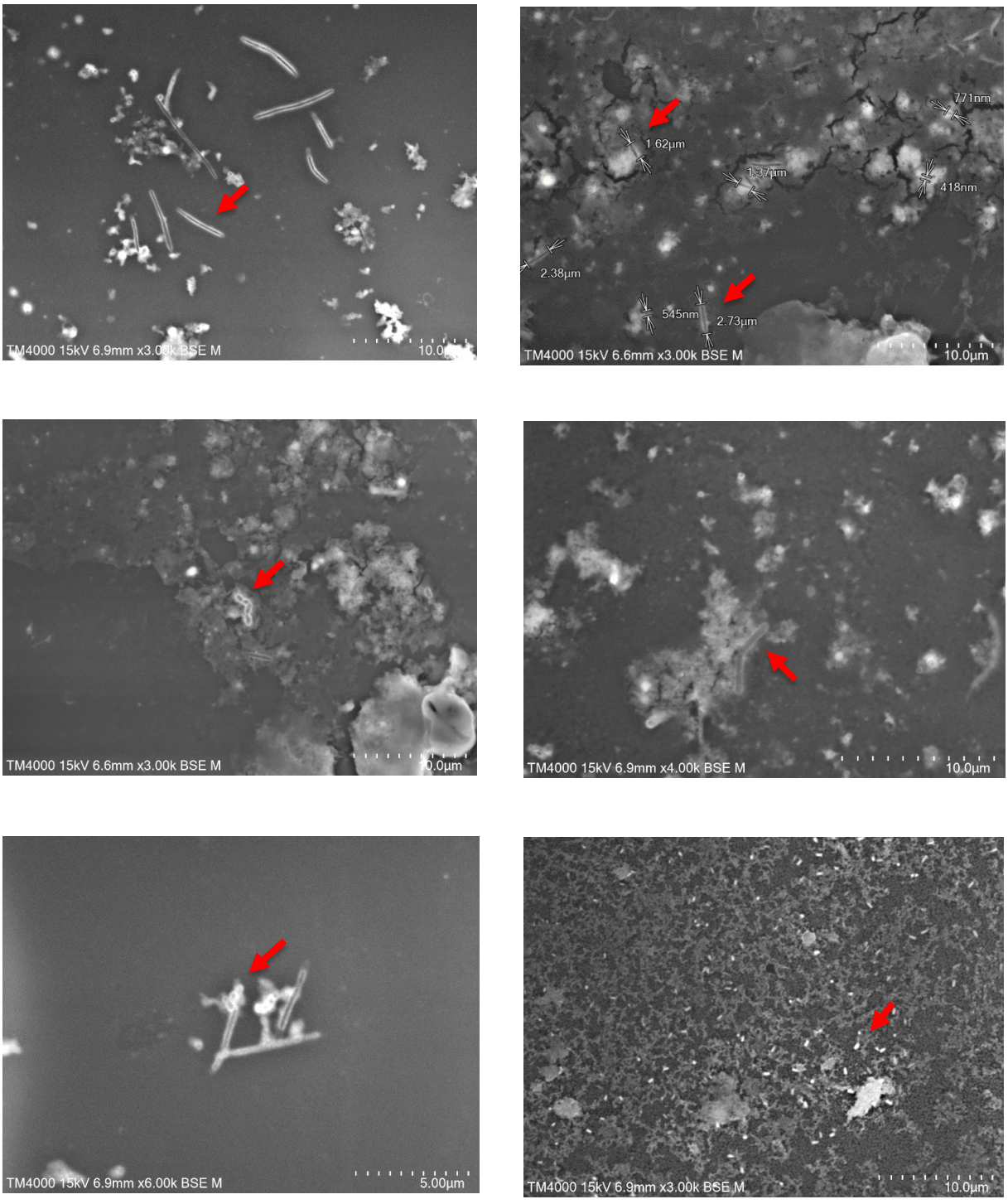


***Figure 6**: Examen au microscope électronique à balayage en temps réel de différents pus d'abcès cérébral de patient à l'aide d'un microscope TM4000 (Hitachi).*
Les flèches indiquent des cellules microbiennes.
La barre d'échelle varie entre 5 à 10,0µm.

F. SEQUENÇAGES METAGENOMIQUES A HAUT DEBIT (ILLUMINA, MISEQ) ET EN TEMPS REEL (OXFORD NANOPORE, GRIDION)

Nous avons effectué une étude séquentielle. Dans un premier temps nous avons séquencé 6 échantillons à l'aide des technologies de séquençage métagénomique à haut débit (Illumina, MiSeq) et en temps réel (Oxford Nanopore, GridION) (Tableau 4). Nous avons volontairement retiré "Bradyrhizobium" et "Delftia" qui sont des contaminants retrouvés dans l'eau puis nous avons comparé les résultats obtenus avec la métagénomique totale par technique GridION avec ceux obtenus avec la métagénomique ARNr 16S par la technique Illumina qui est une méthode de référence. En effet, nous avons établi une preuve de concept qui valide l'utilisation de la technique GridION en routine. Dans 100% des cas, nous retrouvons une concordance intéressante. Les deux techniques ont permis d'identifier les mêmes germes en retirant les contaminations.

Méthode / Echantillon	Séquençage métagénomique à haut débit (Illumina, MiSeq)		Séquençage métagénomique à haut débit en temps réel (Oxford Nanopore, GridION)	
	Germes identifiés	% non ident	Germes identifiés	% non ident
1	***Fusobacterium nucleatum* 0,06% (907)** ***Prevotella* sp.3e-3% (43)** ***Dialister pneumosintes* 3e-4% (5)** *Parvimonas micra* 9e-4%(14) *Staphylococcus aureus* 7e-4% (11)	1,3	***Fusobacterium nucleatum* 0,1 % (258)** ***Prevotella* sp.0,01 % (15)** ***Dialister pneumosintes* 4e-4 % (1)** *Tannerella forsythia* 1e-3 % (3)	0,89
2	***Staphylococcus aureus* 2e-3% (24)**	1,04	***Staphylococcus aureus* 0,03% (60)**	0,8
3	***Streptococcus intermedius* 0,02% (280)** *Prevotella* sp. 1e-3%(11)	1,25	***Streptococcus intermedius* 0,02 % (38)**	0,64
4	***Prevotella* sp.3e-4% (3)** ***Streptococcus* sp.5e-4% (4)**	1,12	***Prevotella* sp. 3e-3 % (5)** ***Streptococcus anginosus* 6e-4 % (1)**	0,39
5	***Fusobacterium nucleatum* 0,02% (301)** *Staphylococcus aureus* 6e-3% (76)	1,14	***Fusobacterium nucleatum* 0,1 % (230)**	0,56
6	***Nocardia farcinica* 0,01% (191)**	1,1	***Nocardia farcinica* 0,01% (22)** Torque Teno mini 0,01 % (17)	0,47

Tableau 4: *Comparaison des germes identifiés suite au séquençage métagénomique à haut débit (Illumina, MiSeq) et en temps réel (Oxford Nanopore, GridION). En gras, les espèces que l'on retrouve avec les deux méthodes.*

G. COMPARAISON DES METHODES DIAGNOSTIQUES USUELLES ET DU SEQUENÇAGE METAGENOMIQUE A HAUT DEBIT EN TEMPS REEL (OXFORD NANOPORE, GRIDION)

Nous avons séquencé l'ADN de 38 échantillons avec la méthode de séquençage métagénomique à haut débit GridION (Oxford Nanopore) que nous avons comparé à la culture et aux PCR réalisées au laboratoire en routine (16S rRNA ; Mycoplasma sp., *Mycoplama faucium, Mycoplasma hominis, Streptococcus intermedius,* Archaea, *Aspergillus* spp*., Candida* spp., *Cysticerca* spp., *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp). Pour 82% des échantillons (31/38), nous avons obtenu un résultat cohérent.

En effet, 24 échantillons sur 31 se sont révélés positifs en culture ou PCR et après séquençage métagénomique et les bactéries identifiées à l'aide des méthodes usuelles l'ont également été avec cette technique innovante (Tableau 5).

- Pour 14 échantillons, une seule et même bactérie ayant été retrouvée avec ces deux méthodes, le résultat obtenu dans les deux cas était identique
- Pour 6 autres échantillons de culture ou PCR positives polymicrobiennes (plus de deux germes), nous avons retrouvé ce caractère polymicrobien avec plus de germes pathogènes identifiés, notamment des virus.
- 4 échantillons ont eu un diagnostic microbiologique monomicrobien alors que la technique Gridion permettait d'identifier plusieurs pathogènes et de classer l'abcès comme une infection polymicrobienne.

De plus, 7 échantillons sur 31 se sont révélés négatifs à la fois en culture, en PCR et en séquençage métagénomique (Tableau 6). Pour les 7 échantillons restants, les résultats obtenus par la méthode de séquençage métagénomique étaient différents de ceux obtenus en routine au laboratoire (Tableau 7).

Au total, le panel de germes identifiés à l'aide du séquençage métagénomique en temps réel est conséquent. En effet 37 microorganismes ont été identifiés par séquençage métagénomique, dont 38% n'avaient pas été détectées à l'aide de la culture et de la PCR usuelles (Figure 7).

Méthode / Echantillon	Culture	PCR	Séquençage métagénomique à haut débit en temps réel (Oxford Nanopore, technique GridION)		
	Germes identifiés			Durée de run	% Non ident
1	***Staphylococcus aureus***	***Staphylococcus aureus***	***Staphylococcus aureus*** 0,03 % (60)	00h23	0,8
2	*Streptococcus constellatus*	***Fusobacterium nucleatum***	***Fusobacterium nucleatum*** 0,4 % (515)	1h00	1,06
3	***Pseudomonas aeruginosa***	***Pseudomonas aeruginosa***	***Pseudomonas aeruginosa*** 14,34 % (16 518)	00h36	0,32
4	***Nocardia* sp**	***Nocardia pneumoniae***	***Nocardia* sp.** 0,02 % (24)	00h25	0,86
5	***Klebsiella pneumoniae***	***Klebsiella pneumoniae***	***Klebsiella pneumoniae*** 0,67 % (670)	00h18	0,51
6	***Klebsiella pneumoniae***	***Klebsiella pneumoniae***	***Klebsiella pneumoniae*** 0,05 % (155)	1h15	1,26
7	négatif	***Streptococcus pneumoniae***	***Streptococcus pneumoniae*** 0,05 % (103)	00h27	1,32
8	***Staphylococcus aureus***	***Staphylococcus aureus***	***Staphylococcus aureus*** 0,01 % (20)	00h25	0,44
9	*Staphylococcus aureus*	***Streptococcus pyogenes***	***Streptococcus pyogenes*** 0,01 (15)	2h50	0,13
10	négatif	***Streptococcus intermedius***	***Streptococcus intermedius*** 0,01 (20)	00h40	1,24
11	*Streptococcus anginosus*	***Fusobacterium nucleatum***	***Fusobacterium nucleatum*** 0,42 (809)	1h00	0,7
12	***Cutibacterium acnes***	***Cutibacterium acnes***	***Cutibacterium acnes*** 0,37 % (1150)	0h50	0,97
13	***Streptococcus intermedius***	***Streptococcus intermedius***	***Streptococcus intermedius*** 0,02 % (38)	00h47	0,64
14	négatif	***Streptococcus intermedius***	***Streptococcus intermedius*** 0,01 % (18)	0h50	0,92
15	*Enterobacter cloacae* ***Citrobacter freundii***	Polymicrobien	*Fusobacterium nucleatum* 0,7 % (1960) *Prevotella melaninogenica* 0,04 % (119) *Campylobacter gracilis* 0,02 % (57) **Citrobacter sp.** 0,01 % (18) *Eikenella corrodens* 3e-3% (9) *Streptococcus* sp. 3e-3 % (7) *Tannerella* sp. 4e-4 % (1)	1h02	2,44
16	*Actinomyces oris*	***Porphyromonas endodontalis***	*Fusobacterium nucleatum* 0,71 % (2914) ***Porphyromonas* sp.** 0,06 % (237) Prevotella 0,02 % (90) *Campylobacter gracilis* 0,01 % (54) *Eikenella exigua* 0,01 % (41) *Tannerella forsythia* 0,01 % (29) *Parvimonas micra* 0,01 % (23)	00h20	1,77
17	***Streptococcus anginosus*** ***Prevotella* spp**	***Prevotella* spp**	***Prevotella* sp.** 3e-3 % (5) ***Streptococcus anginosus*** 6e-4 % (1)	00h25	0,39
18	***Proteus mirabilis***	*Porphyromonas bennonis*	***Proteus mirabilis*** 0,05 % (85) *Campylobacter ureolyticus* 0,01 % (18) *Peptoniphilus harei* 4e-3 %(7) *Trichomonas vaginalis* 1e-3 %(2) *Streptococcus* sp. 1e-3% (2)	1h00	1,52
19	***Enterobacter cloacae*** ***Peptoniphilus harei***	***Peptoniphilus harei***	***Peptoniphilus harei*** 0,01 % (47) *Finegoldia magna* 0,01 % (29) *Anaerococcus prevotii* 2e-3 % (5) ***Enterobacter cloacae*** 6e-4 % (2)	0h50	0,81
20	***Prevotella corporis*** ***Finegoldia magma***	négatif	***Fineglodia magma*** 0,01 % (19) *Prevotella intermidia* 2e-3 % (6)	0h45	0,8
21	***Streptococcus intermedius***	***Streptococcus intermedius***	*Fusobacterium nucelatum* 0,13 % (359) ***Streptococcus intermedius*** 0,05 % (129) *Parvimonas micra* 4e-3 % (11)	0h50	0,81
22	***Nocardia paucivorans***	***Nocardia paucivorans***	Torque teno virus 11 0,02 % (36) ***Nocardia* sp.** (18) *Acinetobacter haemolyticus* (1)	0h45	0,62
23	***Nocardia farcinica***	***Nocardia farcinica***	***Nocardia farcinica*** 0,01% (22) Torque Teno mini 0,01 % (17)	0h55	0,47
24	***Nocardia farcinica***	négatif	Torque teno virus 22 0,01 % (52) Betaherpesvirus 6B 2e-3% (8) *Mycobacterium tuberculosis* 2e-4 % (1) ***Nocardia farcinica*** 2e-4 % (1)	2h10	1,24

Tableau 5*: 24 échantillons dans lesquels les germes (en gras) ont été identifiés par culture et/ou PCR au laboratoire ou par séquençage métagénomique en temps réel (Oxford Nanopore, GridION).*

Méthode / Echantillon	Culture	PCR	Séquençage métagénomique à haut débit en temps réel (Oxford Nanopore, technique GridION)	
	Germes identifiés		Durée de run	% Non ident
25	négatifs	négatifs	2h24	0,78
26			1h00	0,08
27			1h00	0,12
28			1h08	0,2
29			1h00	0,52
30			2h30	0,45
31			3h50	0,32

***Tableau 6**: 7 prélèvements ayant un diagnostic négatif obtenu avec les différentes techniques.*

Méthode / Echantillon	Culture	PCR	Séquençage métagénomique à haut débit en temps réel (Oxford Nanopore, technique GridION)		
	Germes identifiés			Durée de run	% Non ident
32	Toxoplasma gondii		négatif	2h00	0,38
33	négatif	négatif	*Fusobacterium nucleatum* 0,1 % (230)	00h39	0,56
34	*Cutibacterium acnes*	négatif	*Fusobacterium necrophorum* 0,49 % (1060)	00h39	0,73
35	négatif	négatif	*Lactococcus lactis* 0,01 % (66) *Cutibacterium acnes* 0,01 % (57)	22h	1,12
36	*Streptococcus constellatus*	*Streptococcus intermediusCt=29*	*Fusobacterium nucleatum* 0,1 % (258) *Prevotella* sp.0,01 % (15) *Tannerella forsythia* 1e-3 % (3) *Dialister pneumosintes* 4e-4 % (1)	00h30	0,89
37	*Streptococcus anginosus*	négatif	*Fusobacterium nucleatum* 0,37 % (1290) *Parvimonas micra* 0,01 % (27) *Eikenella corrodens* 2e-3 % (6)	01h15	0,81
38	négatif	négatif	*Staphylococcus hominis* 6e-4 % (1)	1h40	0,35

***Tableau 7**: 7 prélèvements pour lesquels les germes identifiés avec les méthodes usuelles, culture et/ou PCR différaient de ceux obtenus avec la technique de séquençage métagénomique (Oxford Nanopore).*

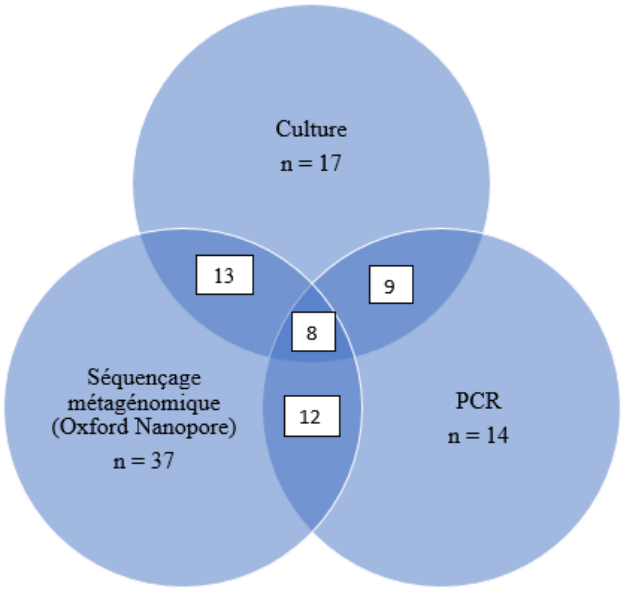


***Figure 7**: Diagramme de Venn permettant de visualiser le panel de germes identifiés à l'aide de la culture, les PCR et le séquençage métagénomique en temps réel (technique GridION).*

H. MICROORGANISMES IDENTIFIES SEULEMENT PAR LA TECHNIQUE GRIDION

La technique GridION a permis l'identification d'un certain nombre de microorganismes (tableau 8).

Microorganismes			
Bactéries	Firmicutes	*Staphylococcus*	*Staphylococcus aureus*
	Firmicutes	*Streptococcus*	*Streptococcus* sp
	Firmicutes	*Streptococcus*	*Streptococcus pneumoniae*
	Firmicutes	*Streptococcus*	*Streptococcus anginosus*
	Firmicutes	*Streptococcus*	*Streptococcus pyogenes*
	Firmicutes	*Streptococcus*	*Streptococcus intermedius*
	Firmicutes	***Dialister***	***Dialister pneumosintes***
	Firmicutes	*Peptoniphilus*	*Peptoniphilus harei*
	Firmicutes	*Finegoldia*	*Finegoldia magna*
	Firmicutes	***Enterococcus***	***Enterococcus faecalis***
	Firmicutes	***Anaerococcus***	***Anaerococcus prevotii***
	Firmicutes	***Parvimonas***	***Parvimonas micra***
	Firmicutes	***Staphylococcus***	***Staphylococcus hominis***
	Fusobacteria	*Fusobacterium*	*Fusobacterium nucleatum*
	Fusobacteria	***Fusobacterium***	***Fusobacterium necrophorum***
	Bacteroidetes	*Prevotella*	*Prevotella* sp
	Bacteroidetes	***Tannerella***	***Tannerella forsythia***
	Bacteroidetes	*Porphyromonas*	*Porphyromonas* sp
	Proteobacteria	***Campylobacter***	***Campylobacter* sp**
	Proteobacteria	*Citrobacter*	*Citrobacter* sp
	Proteobacteria	*Pseudomonas*	*Pseudomonas aeruginosa*
	Proteobacteria	*Klebsiella*	*Klebsiella pneumoniae*
	Proteobacteria	***Eikenella***	***Eikenella exigua***
	Proteobacteria	*Proteus*	*Proteus mirabilis*
	Proteobacteria	*Enterobacter*	*Enterobacter cloacae*
	Proteobacteria	***Acinetobacter***	***Acinetobacter haemolyticus***
	Proteobacteria	***Eikenella***	***Eikenella corrodens***
	Acinetobacteria	***Mycobacterium***	***Mycobacterium tuberculosis***
	Acinetobacteria	*Nocardia*	*Nocardia farcinica*
	Acinetobacteria	*Nocardia*	*Nocardia* sp
	Actinobacteria	*Cutibacterium*	*Cutibacterium acnes*
Virus	***Herpesviridae***	***Roseolovirus***	
	Anneloviridae	***Alphatorquevirus***	

Tableau 8*: Panel de germes identifiés par le séquençage GridION. En gras, ceux n'ayant pas été identifiés par les techniques usuelles (culture et/ou PCR).*

Les 14 microorganismes identifiés seulement par la méthode de séquençage métagénomique Gridion incluent :

Dialister pneumosintes contenu dans la flore mixte peut se comporter comme un agent pathogène mortel, en particulier dans le cerveau, en plus de provoquer des infections parodontales ou opportunistes (38).

Enterococcus faecalis est un agent causal d'infections dentaires. Il peut également avoir pour source le tube digestif. Une revue de la littérature a révélé trois cas d'abcès cérébraux dans lesquels *E. faecalis* a été isolé (39).

Anaerococcus prevotii est une bactérie commensale de la peau, de la cavité buccale et de l'intestin (40).

Parvimonas micra a été décrit comme un pathogène possible d'abcès cérébraux odontogènes, bien que sa présence ne soit généralement pas détectée par les cultures bactériennes standard. Une série de cas d'abcès cérébraux a montré que la plupart des infections à *P. micra* sont polymicrobiennes (41).

Staphylococcus hominis appartient à la famille des staphylocoques à coagulase négative (CoNS) qui font partie de la flore commensale de la peau humaine. *S. hominis* peut provoquer bactériémies nosocomiales et d'autres infections opportunistes chez l'homme (42).

Fusobacterium necrophorum est une cause inhabituelle de mastoïdite, de sinusite et de méningite, dont un nombre limité de rapports ont été publiés. Il est considéré comme un commensal des voies respiratoires supérieures, du tractus gastro-intestinal et des voies génitales féminines. Il peut provoquer diverses infections chez l'homme, dont le syndrome de Lemierre, une mastoïdite et des infections intracrâniennes telles qu'une méningite, un abcès et une thrombose sinusale (43).

Tannerella forsythia est un agent pathogène associé à la parodontite humaine, une maladie inflammatoire polymicrobienne des tissus entourant les dents (44).

Les bactéries du genre *Campylobacter* ont été associées chez l'homme à certaines maladies inflammatoires de l'intestin (MII), de l'œsophage et au cancer colorectal. Ces bactéries ont également été impliquées dans des manifestations extra-intestinales, notamment des bactériémies, des infections pulmonaires, des abcès cérébraux, des méningites et des arthrites réactives (45).

Eikenella exigua a été isolée à partir d'un abcès cérébral polymicrobien après 3 jours d'incubation en anaérobiose (46).

Eikenella corrodens fait partie de la flore commensale de la bouche et des voies respiratoires supérieures. Elle est de plus en plus reconnue comme un agent pathogène humain et a été impliquée dans diverses infections, notamment la parodontite, les abcès cérébraux, l'endocardite, l'ostéomyélite, les infections intra-abdominales et les infections pleuro-pulmonaires (47).

Bactérie environnementale, *Acinetobacter haemolyticus* a été isolée à partir d'échantillons cliniques (48), principalement comme un agent pathogène humain opportuniste, multirésistant aux médicaments et intra-hospitalier. A ce jour, aucun abcès cérébral à *A. haemolyticus* n'a été rapporté dans la littérature.

Mycobacterium tuberculosis est un agent rare d'abcès cérébral (49).

Deux virus ont été détectés dans notre étude :

Roseolovirus : Le genre Roseolovirus de la sous-famille des bêta-herpèsvirus est composé de trois virus à ADN double brin enveloppés : l'herpèsvirus humain (HHV-) 6A, HHV-6B et HHV-7. Il est difficile d'affirmer que les roséolovirus sont des agents pathogènes responsables de maladies en raison de l'omniprésence de l'infection, de leur latence dans divers types de cellules et de la capacité des HHV-6A et HHV-6B à s'intégrer dans le génome humain (50).

L'alphatorquevirus appartient à la famille des Anelloviridae, de petits virus circulaires à ADN qui sont presque omniprésents dans le sérum et le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA) des patients ayant subi une transplantation pulmonaire. On trouve l'Anellovirus chez les personnes immunodéprimées et transplantées (51).

VI. DISCUSSION

L'abcès cérébral est une infection rare associée à une morbidité et une mortalité élevées, qui présente des difficultés diagnostiques. Pourtant, l'identification de l'agent causal d'un abcès cérébral est cruciale pour une prise en charge optimale du patient. Il est important de noter qu'un patient présentant un abcès traité de manière appropriée se rétablit complètement, le plus souvent sans séquelles neurologiques (8). Dans la majorité des cas, la prise en charge médicale reste empirique en raison de l'absence d'identification du ou des agents responsables, notamment en raison du délai avant obtention des résultats microbiologiques (25).

Dans ce travail, nous avons étudié 115 abcès cérébraux obtenus de 2014 à 2020 pour tenter d'identifier les agents pathogènes en cause. Un diagnostic microbiologique par culture usuelle et/ou PCR a été obtenu chez 75 % des patients. Plusieurs études ont montré la nature polymicrobienne de ces infections (8). Nous avons d'ailleurs retrouvé 17% d'abcès cérébraux polymicrobiens dans notre cohorte. Les résultats microbiologiques ne sont que partiellement informatifs en raison de la complexité de la flore microbienne. De plus, aucun pathogène n'a été détecté dans 25% des cas d'abcès cérébraux supposés infectieux. L'administration aux patients de traitement antimicrobien à large spectre avant la réalisation du prélèvement pourrait expliquer ces résultats. Dans la littérature, l'incidence rapportée des streptocoques est d'environ 70%, mais nous n'avons identifié ces bactéries que dans 18% des cas ce qui va dans le sens d'une antibiothérapie précoce (15).

Nous avons souhaité évaluer le lien entre certains microorganismes et les différentes étiologies dans notre série de cas. Pour cela l'analyse en composante principale a permis de mettre en avant deux associations, déjà retrouvées dans la littérature, entre les infections supra-diaphragmatiques et les abcès cérébraux polymicrobiens, et entre un terrain immunodéprimé et les abcès cérébraux à *Nocardia*. De façon plus surprenante, nous avons mis en évidence une association entre les gestes neurochirurgicaux et les abcès cérébraux à entérobactéries qui n'a pas encore été décrite. Dans un contexte nosocomial, les entérobactéries peuvent causer des infections post-opératoires, même si ce ne sont pas les premiers agents de ce type d'infections dans la littérature.

La culture et la détection moléculaire prennent du temps et les résultats sont obtenus tardivement pour une prise en charge précoce et appropriée. Bien que les techniques de culture aient été largement utilisées pour étudier la composition microbienne des abcès cérébraux, leur résultat diagnostique peut varier en fonction du milieu utilisé ou des conditions d'incubation pour la croissance microbienne. En outre, les cultures conventionnelles manquent de sensibilité pour détecter les bactéries anaérobies (36). Par conséquent, la culture peut manquer de sensibilité pour identifier le(s) pathogène(s) responsable(s) d'abcès cérébraux. En ce qui concerne la PCR, notre stratégie usuelle est basée sur l'utilisation de tests spécifiques qui ne peuvent détecter que les microorganismes qu'ils cherchent et de tests à large spectre telle que la PCR ciblant le gène ARNr 16S dont la capacité de discrimination est limitée dans les infections polymicrobiennes.

L'utilisation de techniques permettant d'améliorer la sensibilité et la rapidité du diagnostic des abcès cérébraux est particulièrement importante afin d'obtenir un diagnostic plus précis et plus complet. Nous rapportons ici la mise en place d'une stratégie de diagnostic innovante combinant la microscopie électronique et la métagénomique en temps réel pour identifier les pathogènes dans les abcès cérébraux en remplacement de la microscopie optique, de la PCR et du séquençage de l'ARNr 16S. L'objectif est de réduire le délai d'identification des germes pathogènes dans les échantillons. En effet, cette stratégie est réalisable dans les 6 heures suivant le prélèvement, réduisant ainsi de près de 42 heures le temps nécessaire au diagnostic étiologique tel qu'obtenu par culture et/ou PCR usuelles. Pour les échantillons compatibles avec l'analyse métagénomique et/ou la microscopie électronique en temps réel, nous avons appliqué ces deux méthodes innovantes et nous les avons comparées aux méthodes usuelles que sont la culture et la PCR.

Dans un premier travail, nous avons étudié un cas d'abcès cérébral dans lequel la mise en œuvre d'une stratégie combinée impliquant la microscopie électronique en temps réel et la métagénomique à haut débit a permis l'identification très rapide de l'agent étiologique de cette maladie. En effet, nous avons pu détecter *Fusobacterium nucleatum* dans les 6 heures suivant le prélèvement de l'échantillon, tandis que les résultats des PCR et du séquençage de l'ARNr 16S n'ont été obtenus qu'en 48 heures. Ce premier échantillon a servi de preuve de concept à la stratégie diagnostique combinant la microscopie électronique et la métagénomique en temps réel.

En effet, l'examen au microscope électronique rapide à l'aide d'un microscope électronique à balayage TM4000 (Hitachi High-Tech Corporation) s'est révélé simple car il nous a permis d'observer les microorganismes présents dans le pus des abcès cérébraux dans les 90 minutes suivant la réception de l'échantillon, y compris la préparation. Ce nouveau microscope électronique s'est donc avéré être un outil très efficace et fiable pour la détection des microorganismes. Notamment pour des espèces de *Treponema* où la mise en évidence dans des échantillons humains a été beaucoup plus rapide qu'avec d'autres techniques (52).
Le microscope TM4000 apparaît comme une meilleure alternative, en termes de vitesse, de sensibilité, de facilité d'utilisation et de mise en œuvre, que les techniques de microscopie optique actuelles (52). Cent % des pus d'abcès, avec agent pathogène détecté par ailleurs, ont été identifiés comme infectieux à l'aide de ce microscope.

Cependant, nous n'avons pas pu observer de microorganismes dans les prélèvements solides, ce qui rend l'utilisation de cet outil sélective en fonction de la consistance de l'abcès cérébral. Les abcès cérébraux ne sont pas des prélèvements fréquents et ceux reçus entre 2014 et 2019 étaient congelés ce qui contre-indiquait l'utilisation de ces derniers. Ceci explique le faible nombre d'échantillons passés au microscope électronique en temps réel. De fait, une étude prospective sera nécessaire pour confirmer l'utilisation en routine de cet outil.

Au cours des cinq dernières années, le séquençage métagénomique à haut débit a permis l'identification rapide d'agents pathogènes directement dans des échantillons cliniques, notamment le virus Ebola, le virus Chikungunya et le virus de l'hépatite C, ainsi que d'autres virus et bactéries dans diverses maladies infectieuses, notamment des pneumonies, abcès du foie ou du cerveau, endocardites, méningites, infections de dispositifs orthopédiques ou bactériémies. Cependant, à ce jour, cette technique n'a pas été utilisée dans le cadre du diagnostic microbiologique de routine.

En 2019, Lin et al. ont démontré l'utilité du dispositif de séquençage Minion (Oxford Nanopore, Oxford, UK) pour tenter de déchiffrer la microflore complexe à l'origine d'un abcès cérébral. Ils ont mis en évidence la supériorité de cette méthode par rapport à la culture et à la PCR standard (36). Nous avons ici évalué la performance du séquençage GridION (Oxford Nanopore, Oxford, UK) par comparaison avec notre stratégie de diagnostic de routine pour tenter d'identifier le(s) micro-organisme(s) responsable(s) des abcès cérébraux**.** La technologie

GridION permet le séquençage de très longs fragments (jusqu'à 5 kb) en quelques heures et permet ainsi l'identification des agents pathogènes en un temps beaucoup plus court que d'autres méthodes de séquençage à haut débit.

Nous avons donc comparé le séquençage métagénomique de 6 échantillons d'abcès cérébraux à l'aide de la technique de référence MiSeq (ARNr 16S) également disponible dans notre institut (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) à la technique GridION (Oxford Nanopore). Nous avons obtenu pour l'ensemble des prélèvements des résultats cohérents, les mêmes germes étant retrouvés avec les deux techniques ce qui permet de faire une preuve de concept que le séquençage GridION est applicable aux échantillons cliniques. De plus, les résultats de la technique GridION ont été obtenus dans les six heures suivant la réception de l'échantillon, alors que la technique de séquençage MiSeq nécessite 48 heures.

Ensuite, nous avons comparé les données obtenues avec la technique de séquençage GridION et celles fournies par la culture et/ou la PCR. La plupart des résultats ont été cohérents. Cependant, nous avons constaté que le GridION permet d'obtenir une plus grande variété de germes pour les abcès polymicrobiens. En moyenne, le diagnostic effectué au laboratoire a identifié 1 pathogène sur 5 obtenus avec le séquençage GridION, soit 20% seulement. Parmi les 80% restants, certains microorganismes ont déjà été rencontrés dans les abcès cérébraux, ce qui suggère que les techniques habituelles n'ont pas été capables de les détecter. De plus, nous avons identifié pour la première fois dans ce type d'infection, des espèces qui n'y avaient jamais été décrites comme *Tannerella forsythia*. La technique GridION s'avère donc être un outil performant pour décrypter la complexité des flores microbiennes associées aux abcès cérébraux. Il est utile de souligner l'absence de contaminant habituel des techniques de séquençage parmi les microorganismes identifiés seulement par le GridION.

En ce qui concerne les échantillons ayant un résultat négatif avec la culture et/ou la PCR mais qui se sont révélés positifs avec le séquençage métagénomique, les 4 patients avaient reçu une antibiothérapie probabiliste. Cela pourrait expliquer l'absence d'au moins une partie de ces bactéries.

Par ailleurs, une mauvaise qualité de l'ADN ou encore une quantité trop faible d'ADN extrait des échantillons peuvent expliquer les données contradictoires entre les techniques de diagnostic usuelles et la technique GridION.

Contrairement au séquençage de l'ARNr 16S, l'approche GridION s'est révélée beaucoup plus rapide (6 heures contre 48 heures dans notre étude) et polyvalente car elle peut détecter des bactéries mais également des virus. Cette approche semble donc prometteuse pour une utilisation de la plateforme Nanopore dans le diagnostic. Cependant, ces techniques de séquençage à haut débit ont des limites notamment un risque de contamination non négligeable. Il est également nécessaire d'avoir une capacité technique et humaine d'analyse bio-informatique pour interpréter les résultats et améliorer la spécificité de la technique GridION.

VII. CONCLUSION

Nous avons montré, comme les études chinoises (36), que le diagnostic des abcès cérébraux doit tenir compte de la grande diversité des micro-organismes. Nous pensons qu'une telle stratégie de diagnostic est adaptée non seulement au travail de routine des laboratoires de microbiologie clinique, mais peut également être utilisée pour tout autre processus infectieux nécessitant une identification urgente de l'agent pathogène. En effet nos résultats suggèrent un arbre décisionnel diagnostique pratique dans lequel les échantillons de processus infectieux sévères nécessitant un diagnostic étiologique urgent devraient être soumis à un séquençage métagénomique ainsi qu'à une observation en microscopie électronique comme alternative à la microscopie optique, à la PCR et au séquençage de l'ARNr 16S. Cette approche complètera non seulement le paradigme diagnostique actuel, mais permettra également une caractérisation plus complète de l'étiologie des abcès cérébraux. Il serait intéressant de poursuivre l'étude avec de nouveaux échantillons afin d'obtenir une cohorte plus importante.

VIII. ANNEXES



Annexe 1: *Microscope pour analyse TM4000*

La série TM4000 présente des innovations et des technologies de pointe qui redéfinissent les capacités d'un microscope de table.







Annexe 2: *Appareil GridION (Oxford Nanopore)*

Un système de paillasse économique et compact offrant un séquençage à la demande avec traitement intégré des données en temps réel.

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Wu S, Wei Y, Yu X, Peng Y, He P, Xu H, et al. Retrospective analysis of brain abscess in 183 patients. Medicine (Baltimore) 15 nov 2019

2. Lu C-H, Chang W-N, Lin Y-C, Tsai N-W, Liliang P-C, Su T-M, et al. Bacterial brain abscess: microbiological features, epidemiological trends and therapeutic outcomes. QJM Mon J Assoc Physicians. août 2002;95(8):501-9.

3. Lu C-H, Chang W-N, Lui C-C. Strategies for the management of bacterial brain abscess. J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas. déc 2006;13(10):979-85.

4. Casciato DA, Rosenblatt JE, Goldberg LS, Bluestone R. In vitro interaction of Bacteroides fragilis with polymorphonuclear leukocytes and serum factors. Infect Immun. 1 févr 1975;11(2):337-42.

5. Ingham HR, Sisson PR, Middleton RL, Narang HK, Codd AA, Selkon JB. Phagocytosis and killing of bacteria in aerobic and anaerobic conditions. J Med Microbiol. nov 1981;14(4):391-9.

6. Adamu SA, Sperry JF. Polymorphonuclear neutrophil chemotaxis induced and inhibited by Bacteroides spp. Infect Immun. sept 1981;33(3):806-10.

7. Britt RH, Enzmann DR, Yeager AS. Neuropathological and computerized tomographic findings in experimental brain abscess. J Neurosurg. oct 1981;55(4):590-603.

8. Patel K, Clifford DB. Bacterial Brain Abscess: The Neurohospitalist, 10 juill 2014

9. Mathisen GE, Johnson JP. Brain abscess. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. oct 1997;25(4):763-79; 780-1.

10. Heilpern KL, Lorber B. Focal intracranial infections. Infect Dis Clin North Am. déc 1996;10(4):879-98.

11. Yang SY. Brain abscess: a review of 400 cases. J Neurosurg. nov 1981;55(5):794-9.

12. Chun CH, Johnson JD, Hofstetter M, Raff MJ. Brain abscess. A study of 45 consecutive cases. Medicine (Baltimore). nov 1986;65(6):415-31.

13. Sonneville R, Ruimy R, Benzonana N, Riffaud L, Carsin A, Tadié J-M, et al. An update on bacterial brain abscess in immunocompetent patients. Clin Microbiol Infect. sept 2017;23(9):614-20.

14. Zhou W, Shao X, Jiang X. A Clinical Report of Two Cases of Cryptogenic Brain Abscess and a Relevant Literature Review. Front Neurosci. 14 janv 2019

15. Roche M, Humphreys H, Smyth E, Phillips J, Cunney R, McNamara E, et al. A twelve-year review of central nervous system bacterial abscesses; presentation and aetiology. Clin Microbiol Infect. 1 août 2003;9(8):803-9.

16. Zhang C, Hu L, Wu X, Hu G, Ding X, Lu Y. A retrospective study on the aetiology, management, and outcome of brain abscess in an 11-year, single-centre study from China. BMC Infect Dis. 6 juin 2014;14:311.

17. Liliang PC, Lin YC, Su TM, Rau CS, Lu CH, Chang WN, et al. Klebsiella brain abscess in adults. Infection. avr 2001;29(2):81-6.

18. Lorber B. Listeriosis. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. janv 1997;24(1):1-9; quiz 10-1.

19. Brouwer MC, Tunkel AR, McKhann GMI, van de Beek D. Brain Abscess [Internet]. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1301635. Massachusetts Medical Society; 2014

20. Tseng J-H, Tseng M-Y. Brain abscess in 142 patients: factors influencing outcome and mortality. Surg Neurol. juin 2006;65(6):557-62; discussion 562.

21. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. janv 1991;173(2):697-703.

22. Carroll NM, Jaeger EE, Choudhury S, Dunlop AA, Matheson MM, Adamson P, et al. Detection of and discrimination between gram-positive and gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. J Clin Microbiol. mai 2000;38(5):1753-7.

23. Wilbrink B, van der Heijden IM, Schouls LM, van Embden JD, Hazes JM, Breedveld FC, et al. Detection of bacterial DNA in joint samples from patients with undifferentiated arthritis and reactive arthritis, using polymerase chain reaction with universal 16S ribosomal RNA primers. Arthritis Rheum. mars 1998;41(3):535-43.

24. Xu J, Moore JE, Millar BC, Webb H, Shields MD, Goldsmith CE. Employment of broad range 16S rDNA PCR and sequencing in the detection of aetiological agents of meningitis. New Microbiol. avr 2005;28(2):135-43.

25. Mishra AK, Dufour H, Roche P-H, Lonjon M, Raoult D, Fournier P-E. Molecular revolution in the diagnosis of microbial brain abscesses. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. déc 2014;33(12):2083-93.

26. Kupila L, Rantakokko-Jalava K, Jalava J, Nikkari S, Peltonen R, Meurman O, et al. Aetiological diagnosis of brain abscesses and spinal infections: application of broad range bacterial polymerase chain reaction analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. juin 2003;74(6):728-33.

27. Tsai J-C, Teng L-J, Hsueh P-R. Direct detection of bacterial pathogens in brain abscesses by polymerase chain reaction amplification and sequencing of partial 16S ribosomal deoxyribonucleic acid fragments. Neurosurgery. nov 2004;55(5):1154-62.

28. Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade WG. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. J Clin Microbiol. mars 1996;34(3):537-42.

29. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Science. 10 juin 2005;308(5728):1635-8.

30. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. Science. 2 juin 2006;312(5778):1355-9.

31. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. N Engl J Med. 3 nov 2005;353(18):1899-911.

32. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. déc 2006;444(7122):1027-31.

33. Raoultm D, Masalma MA, Armougom F, Scheld WM, Dufour H, Roche P-H, et al. The Expansion of the Microbiological Spectrum of Brain Abscesses with Use of Multiple 16S Ribosomal DNA Sequencing. Clin Infect Dis. 1 mai 2009;48(9):1169-78.

34. Al Masalma M, Lonjon M, Richet H, Dufour H, Roche P-H, Drancourt M, et al. Metagenomic analysis of brain abscesses identifies specific bacterial associations. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 janv 2012;54(2):202-10.

35. Drancourt M, Nkamga VD, Lakhe NA, Régis J-M, Dufour H, Fournier P-E, et al. Evidence of Archaeal Methanogens in Brain Abscess. Clin Infect Dis. 1 juill 2017;65(1):1-5.

36. Lin J-H, Wu Z-Y, Gong L, Wong C-H, Chao W-C, Yen C-M, et al. Complex Microbiome in Brain Abscess Revealed by Whole-Genome Culture-Independent and Culture-Based Sequencing. J Clin Med. 12 mars 2019

37. Vidal NP, Manful CF, Pham TH, Stewart P, Keough D, Thomas RaymondH. The use of XLSTAT in conducting principal component analysis (PCA) when evaluating the relationships between sensory and quality attributes in grilled foods. MethodsX. 22 févr 2020

38. Rousée JM, Bermond D, Piémont Y, Tournoud C, Heller R, Kehrli P, et al. Dialister pneumosintes Associated with Human Brain Abscesses. J Clin Microbiol. oct 2002;40(10):3871-3.

39. Mylona E, Vadala C, Papastamopoulos V, Skoutelis A. Brain Abscess Caused by Enterococcus faecalis following a Dental Procedure in a Patient with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. J Clin Microbiol. mai 2012;50(5):1807-9.

40. LaButti K, Pukall R, Steenblock K, Glavina Del Rio T, Tice H, Copeland A, et al. Complete genome sequence of Anaerococcus prevotii type strain (PC1T). Stand Genomic Sci. 24 sept 2009;1(2):159-65.

41. Prieto R, Callejas-Díaz A, Hassan R, de Vargas AP, López-Pájaro LF. Parvimonas micra: A potential causative pathogen to consider when diagnosing odontogenic brain abscesses. Surg Neurol Int. 6 juin 2020 .

42. Zhang L, Thomas JC, Miragaia M, Bouchami O, Chaves F, d'Azevedo PA, et al. Multilocus Sequence Typing and Further Genetic Characterization of the Enigmatic Pathogen, Staphylococcus hominis. PLoS ONE. 11 juin 2013

43. Creemers-Schild D, Gronthoud F, Spanjaard L, Visser LG, Brouwer CNM, Kuijper EJ. Fusobacterium necrophorum, an emerging pathogen of otogenic and paranasal infections? New Microbes New Infect. mai 2014;2(3):52-7.

44. Zwickl NF, Stralis-Pavese N, Schäffer C, Dohm JC, Himmelbauer H. Comparative genome characterization of the periodontal pathogen Tannerella forsythia. BMC Genomics. 2020

45. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of Campylobacter Infection. Clin Microbiol Rev. juill 2015;28(3):687-720.

46. Stormo KA, Nygaard RM, Bruvold TS, Dimmen G, Lindemann PC, Jordal S, et al. Eikenella exigua sp. nov., isolated from brain abscess and blood. Int J Syst Evol Microbiol. mars 2020;70(3):1478-88.

47. Easow JM, Joseph NM, Tuladhar R, Shivananda P. Empyema Caused by Eikenella Corrodens. J Glob Infect Dis. 2011;3(3):303-5.

48. Khatri I, Singh NK, Subramanian S, Mayilraj S. Genome sequencing and annotation of Acinetobacter haemolyticus strain MTCC 9819T. Genomics Data. 27 nov 2013;2:10-2.

49. Wu S, Wei Y, Yu X, Peng Y, He P, Xu H, et al. Retrospective analysis of brain abscess in 183 patients. Medicine (Baltimore). 15 nov 2019

50. Hill JA, Sedlak RH, Jerome KR. Past, present, and future perspectives on the diagnosis of Roseolovirus infections. Curr Opin Virol. déc 2014;9:84-90.

51. Blatter JA, Takahashi T, Mittler B, Nava RG, Puri V, Kreisel D, et al. Anellovirus Dynamics Are Associated With Primary Graft Dysfunction in Lung Transplantation. Transplant Direct. 13 janv 2020

52. Belkacemi S, Boukhalil J, Ominami Y, Hisada A, Fontanini A, Caputo A, et al. Passive filtration, rapid scanning electron microscopy and MALDI-TOF MS for Treponema culture and identification from the oral cavity. J Clin Microbiol. 24 juill 2019

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes 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, de respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs 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, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 boulevard Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12