



**HAL**  
open science

# Application de la PCR digitale à la détection et à la quantification de la résistance aux fluoroquinolones chez *Legionella pneumophila*

Aurélie Hennebique, Marie Bidart, Sophie Jarraud, Laetitia Beraud, Carole Schwebel, Max Maurin, Sandrine Boisset

## ► To cite this version:

Aurélie Hennebique, Marie Bidart, Sophie Jarraud, Laetitia Beraud, Carole Schwebel, et al.. Application de la PCR digitale à la détection et à la quantification de la résistance aux fluoroquinolones chez *Legionella pneumophila*. Journée de la Recherche Médicale de Grenoble, Jun 2017, Grenoble, France. hal-04960106

**HAL Id: hal-04960106**

**<https://hal.science/hal-04960106v1>**

Submitted on 21 Feb 2025

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

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

Hennebique A<sup>1, 2</sup>, Bidart M<sup>1, 3</sup>, Jarraud S<sup>4, 5</sup>, Beraud L<sup>4</sup>, Schwebel C<sup>6</sup>, Maurin M<sup>1, 2</sup>, Boisset S<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie et de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Grenoble, France.

<sup>2</sup>Université Grenoble Alpes, TheREx, TIMC-IMAG, CNRS, UMR5525, Grenoble, France.

<sup>3</sup>Université Grenoble Alpes, Braintech Lab, CEA, INSERM U1205, Grenoble, France.

<sup>4</sup>Centre National de Référence des Légionelles, Institut des Agents Infectieux, Groupe Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

<sup>5</sup>Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Université Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS, Lyon, France.

<sup>6</sup>Réanimation, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Grenoble, France ; Radiopharmaceutiques Biocliniques, INSERM U1039, La Tronche, France.

Contact : Aurélie Hennebique : Institut de Biologie et de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, 38043 Grenoble, cedex 9, France. E-mail : [ahennebique@chu-grenoble.fr](mailto:ahennebique@chu-grenoble.fr)

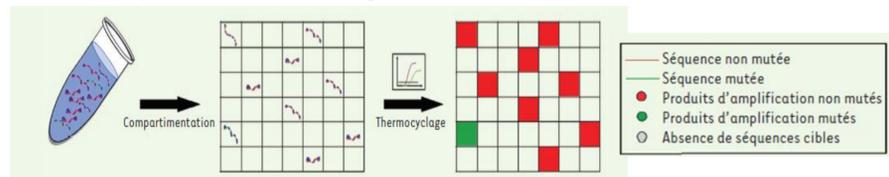
## CONTEXTE

### Légionellose

- La légionellose est une pneumopathie potentiellement grave.
- Le traitement (macrolides ou fluoroquinolones (FQ)) est instauré sans que la sensibilité de la bactérie soit évaluée (recommandations actuelles).
- Données récentes : des mutations dans le gène de l'ADN gyrase (*gyrA*), responsables de la résistance aux fluoroquinolones ont été mises en évidence par séquençage de nouvelle génération (NGS) chez 2 patients pris en charge au CHUGA<sup>1</sup>.

### PCR digitale (dPCR)

- Nouvelle technologie de PCR basée sur la partition de l'échantillon en milliers de réactions individuelles.
- Principal avantage : augmentation de la sensibilité → capacité de **détection de mutations rares diluées dans des séquences sauvages.**



Principe de la dPCR<sup>2</sup>

## OBJECTIF

Développer une technique de dPCR permettant la détection et la quantification de sous-populations de *L. pneumophila* résistantes aux FQ au sein de prélèvements respiratoires.

## METHODE

### 1. Mise au point et évaluation des performances de la dPCR

- Développement de 3 tests de dPCR capables de différencier et de quantifier la séquence sauvage et une des 3 mutations de *gyrA* associées à la résistance aux FQ : **248C>T (T83I) / 259G>A (D87N) / 259G>C (D87H)**.
- Etude de mélanges d'ADN (séquences sauvage et mutantes) en différentes proportions (1:1, 1:10, 1:100, 1:500 et 1:1000).
- Comparaison de la sensibilité de la dPCR à celles du séquençage Sanger et de la PCR en temps réel (qPCR).

### 2. Corrélation dPCR / NGS sur prélèvements cliniques

- Prélèvements respiratoires de 6 patients atteints de légionellose et préalablement analysés par NGS.
- Résultats de NGS : 1 patient avec 85% de mutants T83I après 5 jours de traitement par FQ.  
→ Ré-analyse par dPCR (essai T83I).

### 3. Analyse de prélèvements respiratoires de patients atteints de légionellose

- 38 prélèvements respiratoires provenant de 23 patients  
→ Analyse par dPCR (essai T83I).



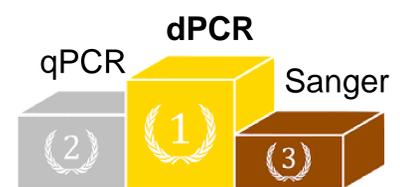
Les étapes de réalisation d'une dPCR

## RESULTATS

### 1. Mise au point et évaluation des performances de la dPCR

Technique	Séquençage de Sanger	qPCR	dPCR
Résultat	Détection de séquences mutantes pour des mélanges de ratio mutant:sauvage 1:1	Détection de séquences mutantes jusqu'à des mélanges de ratio mutant:sauvage 1:10	Détection de séquences mutantes jusqu'à des mélanges de ratio mutant:sauvage 1:1000
Sensibilité	50 %	10 %	0.1 %

Excellente sensibilité de la dPCR !



### 2. Corrélation dPCR / NGS sur prélèvements cliniques

- Résultats NGS et dPCR comparables.**
- Confirmation par dPCR de l'émergence *in vivo* d'une sous-population résistante aux FQ chez 1 patient : **passage d'une proportion de 0.38% de mutants *gyrA* T83I à 99,67% en 5 jours de traitement par FQ.**

### 3. Analyse de 38 prélèvements respiratoires de patients atteints de légionellose

Faibles proportions de mutants *gyrA* T83I (0,13% à 1,13%) détectées dans 4 (10,5%) échantillons provenant de 3 (13,0%) patients.

## DISCUSSION – CONCLUSION

dPCR = outil puissant, adapté à la détection et à la quantification de sous-populations mutantes.

→ Facilement intégrable dans la routine du laboratoire de bactériologie.

→ Pourrait être utilisée pour **détecter et quantifier la résistance aux FQ de *L. pneumophila* à partir des prélèvements respiratoires de patients infectés.**

→ Permettrait de **détecter les patients à risque d'échec thérapeutique et d'adapter leur antibiothérapie.**

1. Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones in vivo: the case of legionella pneumophila in humans. *Ebiomedicine*. 2015 Jul 17;2(9):1179-85.  
2. Caen O, Nizard P, Garrigou S, Perez-Toralia K, Zonta E, Laurent-Puig P, Taly V. Digital PCR compartmentalization II. Contribution for the quantitative detection of circulating tumor DNA. *Med Sci (Paris)*. 2015 Feb;31(2):180-6.