

# Place des outils moléculaires dans le diagnostic et la prise en charge des infections bactériennes

# Place des outils moléculaires dès J0 ?

---

J0

examen microscopique



A votre avis ?

réfléchissez y

...

réponse après la  
pause !

# Place des outils moléculaires dès J0 ?

---

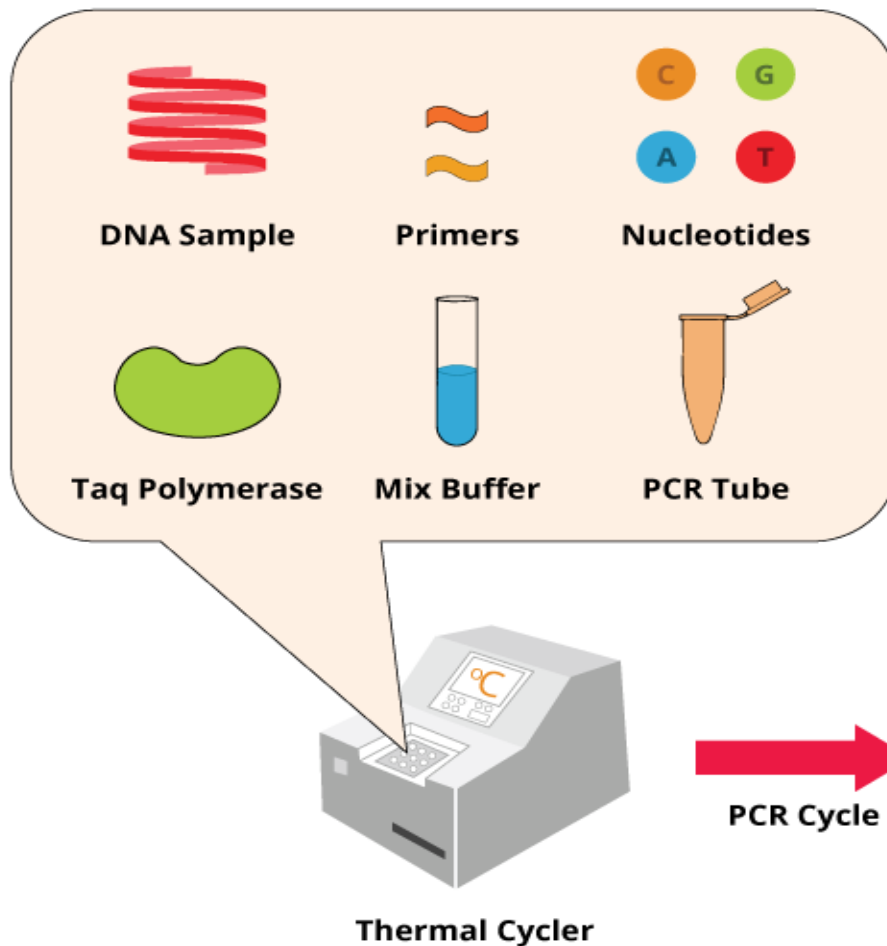
- techniquement possible
  - PCR « classique »
  - PCR en temps réel
  - « maison » / commercialisés
  - unitaire / syndromique
- dans certaines indications, mais lesquelles:
  - malade grave ?
  - infection certaine décapitée par une antibiothérapie ?
- dans certaines indications, à éviter ?

# PCR (définition et principe)

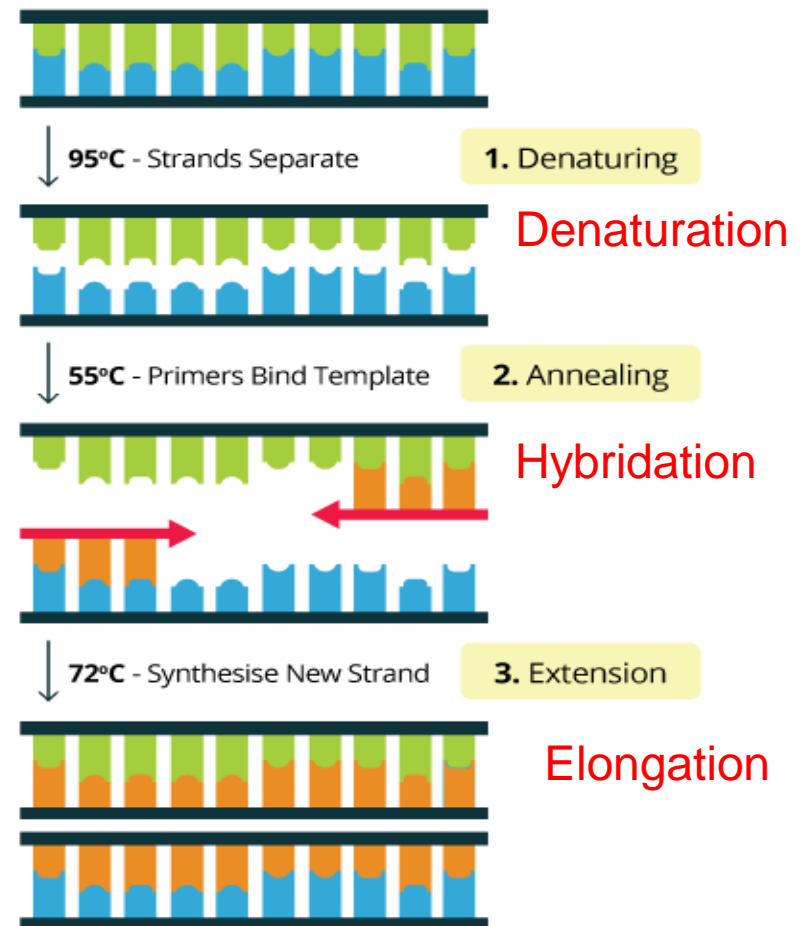
---

- Polymerase Chain Reaction
  - Réaction de Polymérisation (d'amplification) en Chaîne
  - bactériologie : ADN  
(virologie ADN et ARN, ARN plus fragile)
1. choix d'une **cible spécifique** (portion de gène) de la bactérie recherchée et d'un **couple d'amorces oligonucléotidiques** qui va se fixer aux deux extrémités de cette cible
  2. **amplification** de cette cible (1 milliard de copies)
  3. permettant sa **détection**

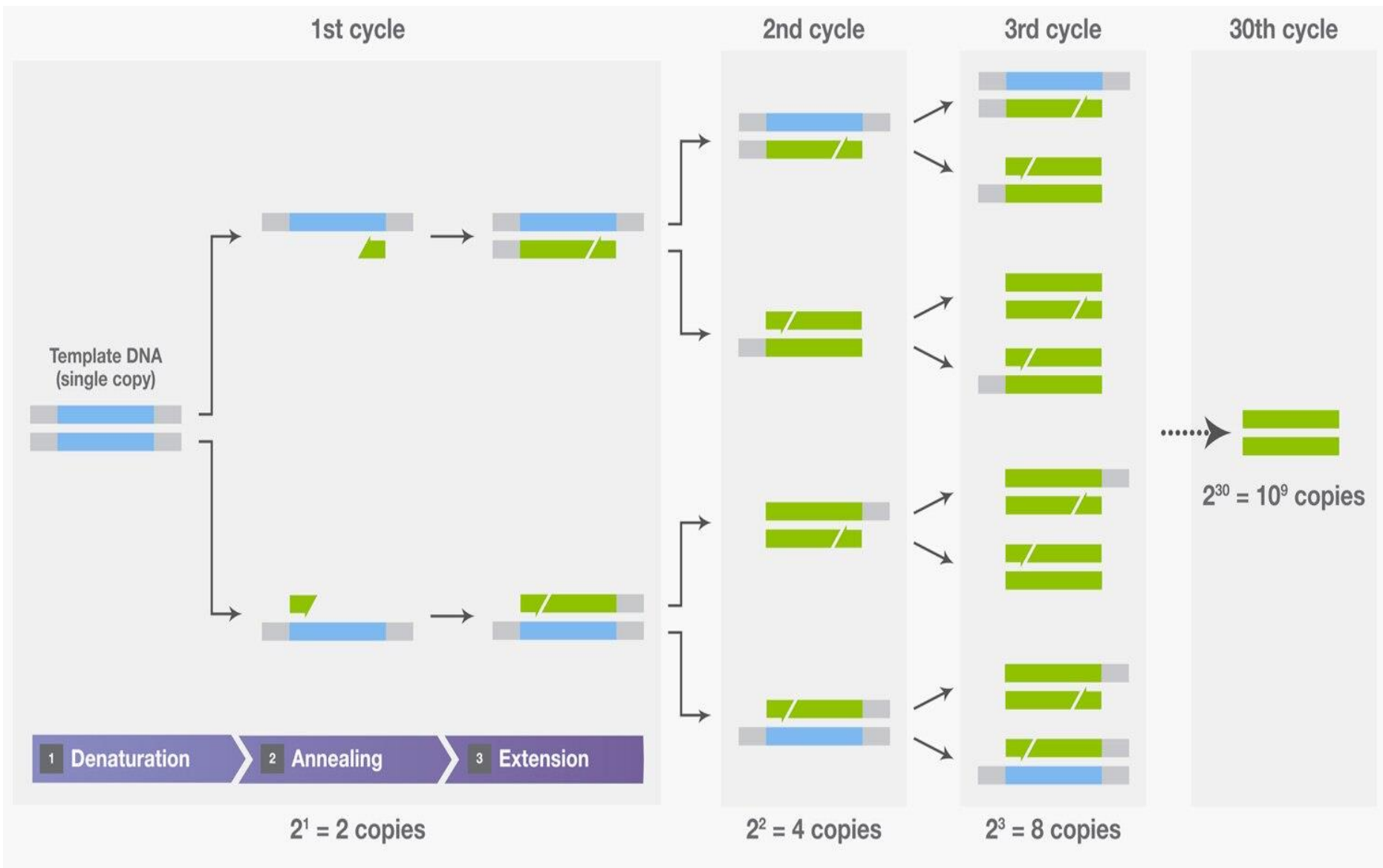
## PCR Components



## PCR Process (One Cycle)

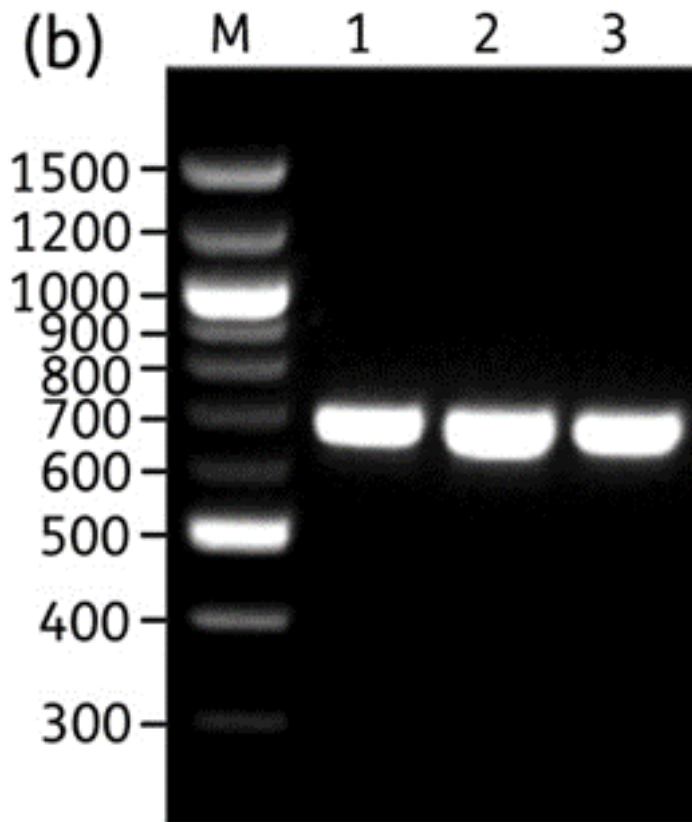


*Thermus aquaticus* : sources d'eau chaude



# PCR « classique »

Méthode traditionnelle : électrophorèse en gel d'agarose



Vitesse migration (f) taille

Visualisation : « GelRed »

Méthode de détection longue et  
peu sensible

**Risque de contamination +++**  
(ouverture du tube)

# Identification moléculaire universelle des bactéries

Extraction ADN



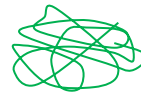
PCR avec amorces universelles pour un gène de ménage = présent chez **toutes** les bactéries (ex. ARN ribosomal 16S ...)



Séquençage



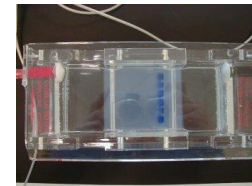
Analyse de la séquence sur bases de données



Colonies ou  
Tissus



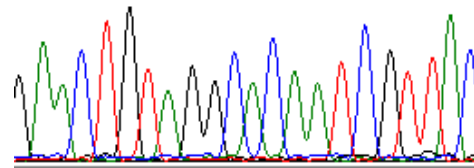
+



Contrôle sur gel



180 190  
3 AAC T G T A G G C A C A A T C G T T A C .



Délai  
≥ 2 j



## PCR « maison » nécessite compétences en BM et temps

---

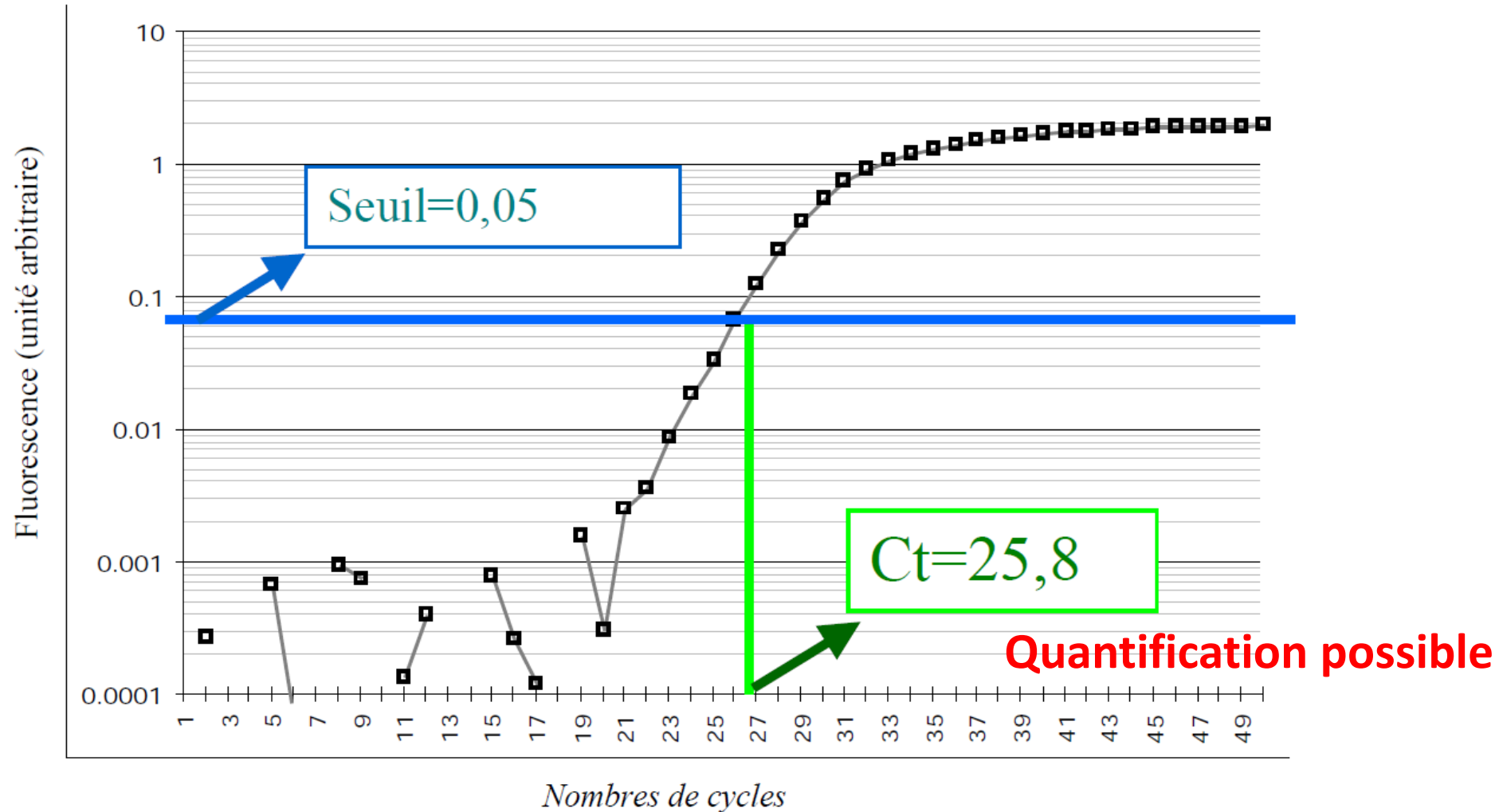
- Optimisation de la technique d'extraction
- Choix des amorces spécifiques
- Optimisation des conditions de PCR
- Maîtrise des risques de contamination
  - préparation des réactifs
  - extraction
  - préparation des tests
  - réaction d'amplification-détection
  - pièces séparées
- Validation technique de la méthode

# PCR en temps réel

---

- **amplification / détection couplées**
- détection automatique au cours de la PCR, à chaque cycle d'amplification, sans ouverture du tube
- suivi **en temps réel** du déroulement de l'amplification
- inclusion d'une sonde **fluorescente** spécifique de l'amplifiat (avec émission de fluorescence uniquement quand elle est hybridée) dans la réaction PCR
- ce n'est pas le quantifiat qui est visualisé mais un **marqueur indirect** = quantité de fluorescence émise (proportionnelle quantité d'amplifiat produit)

# PCR en temps réel



# Tests commercialisés

---

**Un des systèmes les plus répandus : GeneXpert®  
(système unitaire « tout en un »)**

- **Manipulation 2 minute**
- **Durée : 45 min à 1h30**



**Nombre de tests limités**

# Ex : applications PCR « unitaire »

---

- *Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae* (**IST**)
- *Mycobacterium tuberculosis* + R rifampicine (**tuberculose**)
- *Clostridium difficile* (CD + toxines A et B)
- **Streptocoque B** (PV peu de temps avant la naissance)
- **SARM** (ex. tout à l'heure)
- **dépistage de bactéries multirésistantes** type BHRe (entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (EPC), entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG))

# PCR « unitaire »

« on ne trouve que ce que l'on cherche »

?



OU EST  
CHARLIE ?

PicColl-f-GB





# La « PCR » dans le diagnostic de la tuberculose : où est l'intérêt ?



J0

examen microscopique

J15-M3

culture / identification

M1-M5

antibiogramme

Tuberculose ou NTM ?

SANS

méthodes  
moléculaires

Réponse à la culture

Traitement empirique  
mixte si VIH ...

AVEC

méthodes  
moléculaires

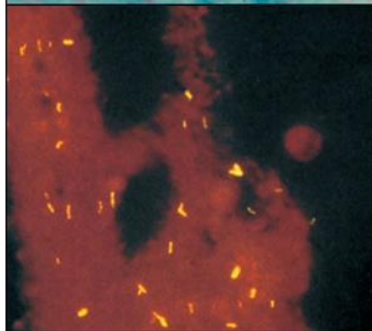
Réponse en 24-48h

Traitement adapté  
d'emblée



⇒ méthodes moléculaires n'ont pas révolutionné le diagnostic de la tuberculose, mais ont transformé les méthodes d'identification au laboratoire et donc améliorent la prise en charge des patients

En cas  
d'examen  
microscopique  
positif






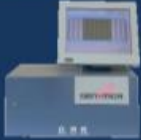


# La PCR multiplex

---

- un patient consulte avec des symptômes orientant vers une pathologie (ex; IST, méningite, pneumonie ...) → détecter la présence de l'ADN d'une des bactéries responsables de cette pathologie
- possibilité dans une réaction PCR de détecter **plusieurs cibles** (plusieurs bactéries, virus, champignons, parasites .... en général < 30)
  - plusieurs couples d'amorces
  - techniquement plus complexe et difficile à optimiser
  - diminution de sensibilité par rapport à PCR « unitaire »



# Gastroentérites : solutions proposées

	Nom	durée	Inclus extraction	Nombre de pathogènes détectés	Coût
	Filmmarray Gastrointestinal panel (Biofire)	1h	oui	23	++++++
	XTAG GPP (Luminex)	5h	Non	15	+++
	RIDA GENE kits (R-Biopharm)	1,5h	Non	3-4 <small>Bactéries , virus ou parasites par test</small>	+
	CLART EnteroBac (Génomica)	5h	Non	8	++
	Allplex Gastrointestinal Full Panel Assay (Seegene-Eurobio)	4-5h	Non	6 virus-7 et 6 bactéries <small>par test</small>	+
	EBP – EBP (BDMAX)	2-3h	Oui	2-4 <small>Bactéries , virus ou parasites par test</small>	+

# ex. du FilmArray panel méningite / encéphalite

Echantillon : LCR / Temps de manip : 2 min / Durée PCR : 1 h  
14 cibles

## ☐ Bactéries (méningites communautaires)

*E. coli K1*

*S. agalactiae*

*L. monocytogenes*

*H. Influenzae*

*N. meningitidis*

*S. pneumoniae*

## ☐ Virus:

Cytomegalovirus (CMV)

Enterovirus

Herpes simplex type 1 (HSV-1)

Herpes simplex type 2 (HSV-2)

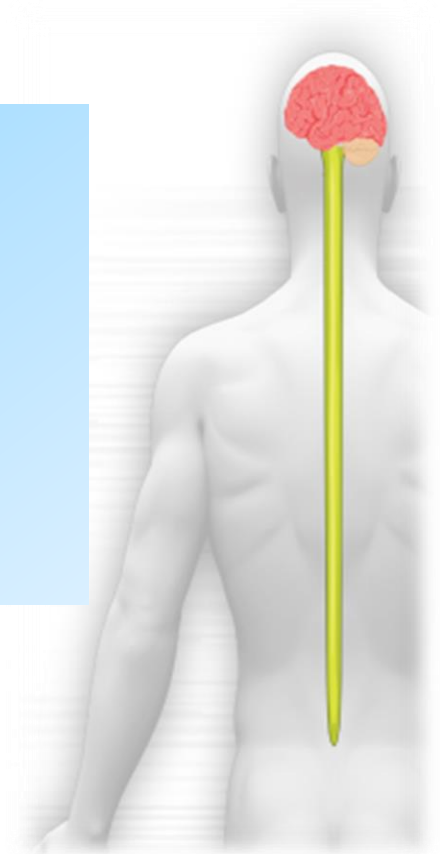
Human herpesvirus 6 (HHV-6)

Parechovirus

Varicella zoster virus (VZV)

## ☐ LEVURES

*Cryptocoque*



Mise en place dans de nombreux hôpitaux (24h/24)

# Place des outils moléculaires pour l'identification ?

---

**J1**  
culture



A votre avis ?

réfléchissez y

...

réponse après la  
pause !

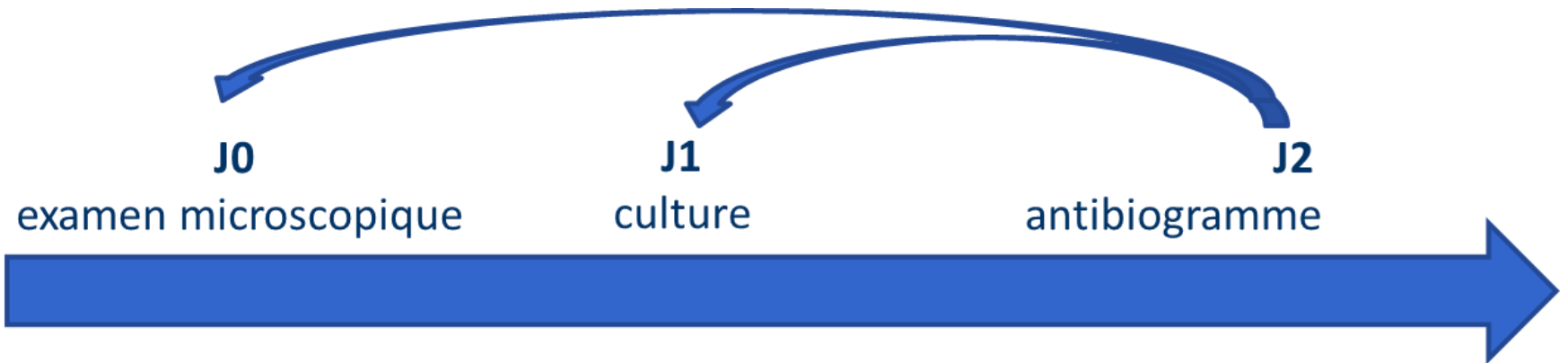
# Place des outils moléculaires pour l'identification ?

---

- échec d'identification par les méthodes « classiques »  
→ nouvelle espèce ?
- identification de bactéries difficilement identifiables par les méthodes « classiques » (cultivent mal ou lentement)  
ex. mycobactéries (routine), *Coxiella burnetii*, *Thropheryma whipplei*, *Bordetella pertussis* (coqueluche) ...)

# Place des outils moléculaires pour l'antibiogramme (dès J0 ?) ?

---



A votre avis ?  
réfléchissez y ... réponse après  
la pause !

# Place des outils moléculaires pour l'antibiogramme (dès J0 ?) ?

---

- infection décapitée par une antibiothérapie préalable (pas de culture)
- bactéries cultivant mal ou lentement pour lesquelles des résistances acquises ont été décrites  
ex. mycobactéries (routine)



# Ex. de détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques

	Résistance	Gène
Staphylocoques	méticilline	<i>mecA</i>
Entérocoques	glycopeptides	<i>vanA</i> , <i>vanB</i>
<i>M. tuberculosis</i>	rifampicine	<i>rpoB</i>

⇒ « on ne trouve que ce que l'on cherche » ≠ antibiogramme phénotypique



« PCR » = la solution magique pour faire le diagnostic des infections bactériennes ?





# Avantages de la PCR par rapport à la culture classique

---

- possibilité de détecter des **bactéries difficilement ou non cultivables**
- possibilité de détection **même si prise d'antibiotiques préalable** (bactéries tuées : ADN « inerte »)
- possibilité de **détection rapide de certaines résistances**
- possibilité de détection de **facteurs de virulence**
  - *Clostridium difficile* et Production des toxines A et B
  - *E. coli* entérohémorragique : recherche de la shigatoxine
- **rapidité** (1 à 5 h pour les techniques commercialisées)
- **seuil de détection ? supérieur à l'examen microscopique ? supérieur à la culture ?**

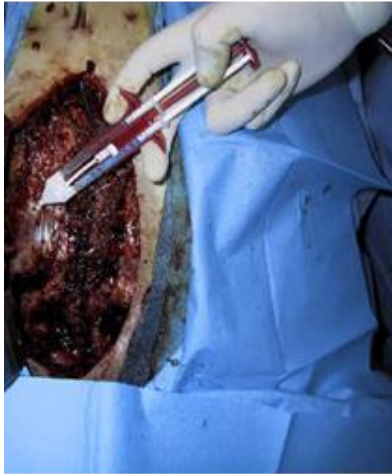
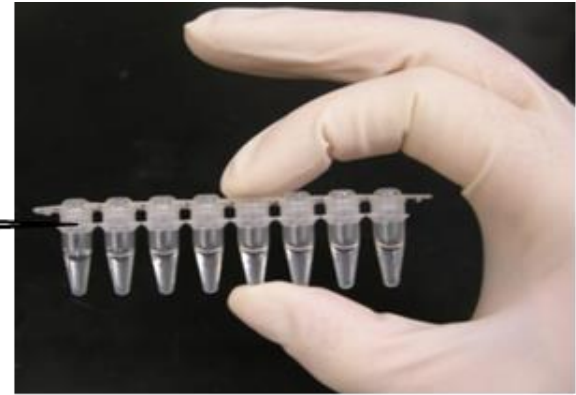
# Avantages de la PCR par rapport à la culture classique

- possibilité de détecter des **bactéries difficilement ou non cultivables**
- possibilité de détection **même si prise d'antibiotiques préalable** (bactéries tuées : ADN « inerte »)
- possibilité de **détection rapide de certaines résistances**
- possibilité de détection de **facteurs de virulence**
  - *Clostridium difficile* et Production des toxines A et B
  - *E. coli* entérohémorragique : recherche de la shigatoxine
- **rapidité** (1 à 5 h pour les techniques commercialisées)
- **seuil de détection =  $10^2$  bactéries /ml ( $10^{3-4}$  pour ARN16s)**

→ **pourquoi pas 1 bactérie/ml ?**



$\mu$ l



ml



# Inconvénients de la PCR par rapport à la culture classique

---

- **ADN détecté : bactéries vivantes ou mortes ?**
  - patient déjà traité par antibiotiques
  - limitation pour le suivi thérapeutique
- seules les bactéries ciblées peuvent être détectées : « on ne trouve que ce que l'on cherche » avec les tests commercialisés
- **pas de possibilité de réaliser un antibiogramme complet, pas de distinction sur les niveaux de résistance**
- coût supérieur

# Limites du diagnostic moléculaire de la résistance : ex. résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis*

Mutation in <sup>a</sup> :		MIC (μg/ml) <sup>b</sup>			
<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	GAT	MOX	LVX	OFX
No mutation	No mutation	0.25	0.5	0.5	1
No mutation	No mutation	0.25	0.25	0.25	0.25
No mutation	No mutation				
A90V	No mutation	1	2	4	8
D94G	No mutation	1-4	1-8	2-8	16-16
D94H	No mutation	2-4	2	8	16
A90V + D94G	No mutation	ND	ND	ND	>160
A90V	D472H	ND	ND	ND	>160
No mutation	N510D	≥1	2	2	4
T80A + A90G	No mutation	0.12	<0.12	0.5	0.5
T80A + A90G	No mutation	0.25	0.25	1	1
T80A + A90G	No mutation	0.5	0.25	0.5	0.5
T80A + A90G	No mutation	0.12	0.12	0.25	0.25
T80A	No mutation	0.5	1	4	>4
T80A	No mutation	0.5	1	2	2

Différents niveaux  
de résistance

Mutations ne  
conférant pas  
la résistance

Aubry AAC 2006

1. mutation ≠ résistance

2. Niveaux de résistance variables selon mutation

⇒ complexité du diagnostic moléculaire de la résistance

# Faux positifs de la PCR

---

- **contamination** ... comme avec la culture !

# Microbiote → l'autre moi-même

Etre humain = « méta-organisme » :

- ▣ Bactéries
- ▣ Archées
- ▣ Virus
- ▣ Eucaryotes :
  - ▣ Levures, champignons
  - ▣ Protozoaires
  - ▣ ... Cellules humaines

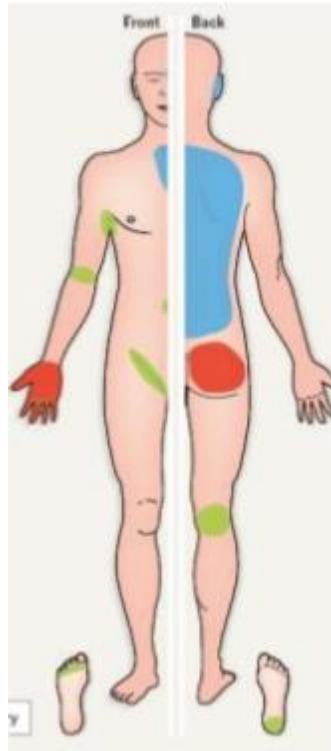


*Homo sapiens, une espèce hybride (P. Sansonetti)*

# Flore commensale cutanée → microbiote cutané

## 1. Variations spatiales

Grice et al. Science 2009; 324:1190



### Zones humides (glandes sudoripares)

- *Staphylococcus à coagulase négative* ( $10^2$  à  $10^6$ /cm<sup>2</sup>)

- *Corynebacterium*

### Zones séborrhéiques (glandes sébacées)

- *Propionibacterium (Cutibacterium)* : acnes +++

### Zones sèches

- Bactéries à Gram négatif (*Acinetobacter*)
- Différents phyla bactériens

2 facteurs :

Hôte

+


Environnement

## 2. Variations temporelles

## 3. Variations inter-individuelles



# Impact médical microbiote à J1

	<b>GH PITIE-SALPETRIERE</b> <b>(CR07) NEURO-CHIRURGIE , PR CORNU</b> BLOC OPÉRATOIRE, BABINSKI, ETAGE -1 75013 PARIS PDT : 066PUY - REA NEUROCHIR BT BABINSKI RDC BA
---	--

Dossier :	1807089427	Unité :
Date de prélèvement :	30/07/18	
Heure de prélèvement :	Non renseigné.	
Date de saisie :	30/07/18	
Heure de saisie :	18h49	

## Informations relatives à l'échantillon : LCR extra-ventriculaire

Délai d'acheminement (en jours) : 1  
Contexte de prélèvement : Prélèvement absent ou erroné (heure à 1'heure de réception).  
Aspect macroscopique : Hémorragique

## EXAMEN

Formule non effectuée, nombre de leucocytes
---

Coloration de Gram	Absence de bactérie visible
--------------------	-----------------------------

<b>Cultures spécifiques</b>	
usuelles	Négatives en 24 h
solides prolongées	Négatives en 48 h
liquides	Négatives en 5 jours
enrichies liquides prolongées	Négative en 5 jours
	Positive après repiquage à 10 j

à J+14 -> Présence de Propionibacterium acnes

= commensal peau = souillure

Idem avec les techniques moléculaires !!!

**PANIQUE A BORD**



GH PITIE-SALPETRIERE  
(CR67) RÉANIMATION MÉDICALE, PR COMBES  
RÉA. MÉDICALE, CENTRE CARDIOLOGIE, ETAGE 1  
63801 / 63802 / 63803 - 63804/63805/63806  
75013 PARIS  
PDT : 066RM3 - REA MED 3 BAT CARDIOLOGIE ETAGE 1 -  
Fax : 63804/63805/63806

Dossier : 1808032519 Unité  
Date de prélèvement : 15/08/18  
Heure de prélèvement : 06h00  
Date de saisie : 15/08/18  
Heure de saisie : 10h15

#### Informations relatives au patient

Antibiothérapie OUI

#### Informations relatives à l'échantillon : Sang / sur cathéter artériel

Délai d'acheminement (en jours) 0.177  
Contexte de prélèvement Diagnostic d'origine vasculaire(s) (DIV) en  
urgence (ou moins) le jour du

#### HEMOCULTURE

##### Flacon aérobie

Résultat Positive

Automate BacT

##### Flacon anaérobie

Résultat Présence de cocci à Gram positif

##### Flacon aérobie

Résultat Négative

Automate BacT ALERT3D, Biomérieux (Incubateur)

#### Culture et sa identification

en flacon aérobie => Présence de Staphylococcus pettenkoferi

Bactérie commensale de la peau.  
Souillure probable. Résultats à interpréter en fonction du contexte clinique.  
Antibiogramme non réalisé. Merci de contacter le laboratoire dans les 5 jours si un  
antibiogramme est nécessaire.

Idem avec les techniques moléculaires !!!

Staphylocoque à coagulase  
négative = contaminant le  
plus fréquent des  
hémocultures / infection  
seulement si plusieurs Hc  
positives et contexte  
compatible

GH PITIE-SALPETRIERE  
(CR13) URGENCES SAU, PR RIOU  
ACCUEIL MÉDECINE, N.P.U. RDC  
77254/77262/20208 - 77001  
75013 PARIS

Fax : 77001

Dossier :	1808047758	Unité
Date de prélèvement :	22/08/18	
Heure de prélèvement :	12h45	
Date de saisie :	22/08/18	
Heure de saisie :	14h39	

Informations relatives à l'échantillon : Urines / milieu

Délai d'acheminement (en jours)

Contexte de prélèvement

Urinaire positive : leucocytes +,  
positifs

## EXAMEN CYTOBACTÉRIEN

### Numération

Hématies 316 x  $10^3$  /mL

Leucocytes 3700 x  $10^3$  /mL

### Couleur de Gram

Bacilles à Gram négatif /chp

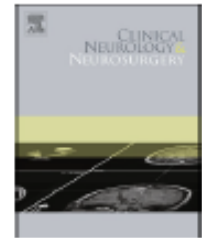
### Culture et ou Identification

1: à J+1 = 1.10\*6 UFC/mL (ou /g) Escherichia coli

⇒ quand prélèvement fait dans site non stérile : comment différencier  
commensal / pathogène ⇒ établissement d'un seuil nécessaire

## Ex. « quand éviter de faire une PCR » (risque d'erreur diagnostique et erreur thérapeutique +++)

- **Pace maker/ défibrilateur implantable** (Pichlmaier, Europace, 2008)
  - 108 malades / 47,2% PCR + → aucune infection à 2 ans de suivi
  - pas de corrélation portage de bactéries sur le matériel / infection
- **Cirrhose** (Frances, Hepatology, 2007 ; Zapater, Hepatology, 2008 ; El-Naggar, J Med Microbiol, 2008)
  - "PCR+" pour toutes les infections du liquide d'ascite
  - mais aussi "PCR+" chez 34% des patients sans infection du liquide d'ascite ...(facteur pronostic ? .... non plus !)



## Detection of bacterial DNA on neurostimulation systems in patients without overt infection



Bujung Hong<sup>a,\*,1</sup>, Andreas Winkel<sup>b,1</sup>, Nico Stump<sup>b</sup>, Mahmoud Abdallat<sup>a</sup>, Assel Saryyeva<sup>a</sup>, Joachim Runge<sup>a</sup>, Meike Stiesch<sup>b</sup>, Joachim K. Krauss<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurosurgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany

<sup>b</sup> Department of Prosthetic Dentistry and Biomedical Materials Science, Hannover Medical School, Hannover, Germany

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Bacterial DNA

Biofilm

Deep brain stimulation

Infection

PCR

Spinal cord stimulation

### ABSTRACT

**Objective:** Hardware-related infection remains a major problem in patients with neurostimulation systems. The role of bacterial colonization and the formation of biofilm on the surface of implanted devices remain unclear. Here, we analysed the incidence of bacterial DNA on the surface of implantable pulse generators (IPGs) using 16S rRNA gene sequencing in a consecutive series of patients who underwent routine IPG replacement without clinical signs of infection.

**Patients and methods:** We included 36 patients who underwent scheduled replacement surgery of 44 IPGs. The removed IPGs were processed and whole genomic DNA was extracted. The detection of bacterial DNA was carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR) using universal bacterial primers targeting the 16S rRNA gene. The DNA strands were analysed by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis.

**Results:** Indications for chronic neurostimulation were Parkinson disease, tremor, dystonia, neuropathic pain and peripheral artery occlusion disease. Mean age of patients at the time of implantation was  $48 \pm 17.6$  years. The mean interval between implantation and replacement of the IPG was 24.8 months. PCR/SSCP detected bacterial DNA of various species in 5/36 patients (13.9%) and in 5/44 pacemakers (11.4%), respectively. There was no evidence of clinical infection or wound healing impairment during follow-up time of  $45.6 \pm 19.6$  months.

**Conclusion:** Bacterial DNA can be detected on the surface of IPGs of neurostimulation systems in patients without clinical signs of infection by using PCR techniques. It remains unclear, similar to other permanently implanted devices, which mechanisms and processes promote progression to the point of overt infection.

# Faux positifs de la PCR

---

- **contamination** ... comme avec la culture !
- **erreur technique à différentes étapes** :
  - extraction (surtout si manuelle)
  - réalisation du test (ex. manipulateur qui tousse au moment de pipeter le LCR pour une PCR syndromique : faux positif ...)



# Faux positifs de la PCR

1. Collect specimen,  
transport to GX area



2. Place Buffers  
in Cartridge.



3. Place swab  
in Cartridge.



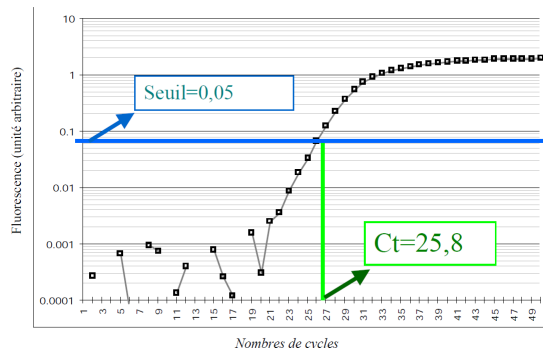
4. Break swab



5. Closed lid, place  
in GeneXpert.

# Faux positifs de la PCR

- **contamination** ... comme avec la culture !
- **erreur technique à différentes étapes** :
  - extraction (surtout si manuelle)
  - réalisation du test (ex. manipulateur qui tousse au moment de pipeter le LCR pour une PCR syndromique : faux positif *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, méningocoque ...)
- « **phénomène naturel** » pour les PCR en temps réel » : les sondes s'hybrident entre elles au bout d'un certain temps, d'où la notion de ct à atteindre dans un temps précis

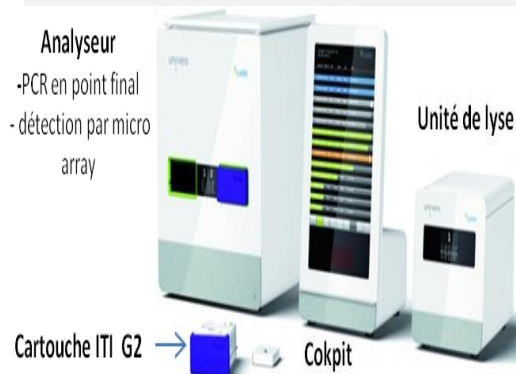




# Faux négatifs de la PCR

- inoculum faible, voire inférieur au seuil de détection de la technique ... (à connaître pour chaque technique !)

ITI (Implant and Tissue Infection)  
G2 Unyvero  
(Curetis®)



Chamber 1	Chamber 2	Chamber 3	Chamber 4
<i>Bacteroides fragilis</i> group <sup>9</sup> (10 <sup>4</sup> )	<i>Abiotrophia defectiva</i> (10 <sup>5</sup> )	aac(6')-aph(2'') (10 <sup>6</sup> )	AacA4 (10 <sup>5</sup> )
<i>ermC</i> (10 <sup>7</sup> )	<i>Coagulase negative staphylococci</i> (CNS) <sup>1</sup> (10 <sup>4</sup> )	<i>Candida albicans</i> (10 <sup>5</sup> )	<i>ermA</i> (10 <sup>4</sup> )
<i>Finegoldia magna</i> (10 <sup>6</sup> )	<i>Corynebacterium</i> spp. <sup>4</sup> (10 <sup>5</sup> )	<i>C. freundii/koseri</i> (10 <sup>5</sup> )*	<i>bla<sub>NDM</sub></i> (10 <sup>4</sup> )
<i>Granulicatella adjacens</i> (10 <sup>5</sup> )	<i>E. faecalis</i> (10 <sup>6</sup> )	<i>Enterococcus</i> spp. <sup>3</sup> (10 <sup>5</sup> )	<i>P.acnes</i> (10 <sup>5</sup> )
<i>S. aureus</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Streptococcus</i> spp. <sup>2</sup> (10 <sup>5</sup> )*	<i>S.agalactiae</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>S.pneumoniae</i> (10 <sup>4</sup> )*
	<i>vanA</i> (10 <sup>5</sup> )	<i>vanB</i> (10 <sup>6</sup> )	<i>S.pyogenes/dysgalatae</i> (10 <sup>4</sup> )
Chamber 5	Chamber 6	Chamber 7	Chamber 8
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex <sup>8</sup> (10 <sup>4</sup> )	<i>E. aerogenes</i> (10 <sup>5</sup> )	Universal bacteria <sup>14</sup> (10 <sup>5</sup> )*	<i>E. cloacae complex</i> <sup>5</sup> (10 <sup>5</sup> )
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> <sup>10</sup> (10 <sup>5</sup> )	<i>bla<sub>IMP</sub></i> <sup>11</sup> (10 <sup>5</sup> )	<i>Candida glabrata</i> (10 <sup>5</sup> )*	<i>E. coli</i> (10 <sup>4</sup> )
<i>K.pneumoniae</i> <sup>7</sup> (10 <sup>5</sup> )	<i>K.oxytoca</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Candida</i> spp. <sup>13</sup> (10 <sup>5</sup> )*	<i>bla<sub>KPC</sub></i> (10 <sup>5</sup> )
<i>K. variicola</i> (10 <sup>4</sup> )*	<i>mecA</i> (10 <sup>5</sup> )	<i>Candida tropicalis</i> (10 <sup>8</sup> )*	<i>mecC</i> (10 <sup>6</sup> )
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Proteus</i> spp. <sup>6</sup> (10 <sup>4</sup> )	<i>Isaatchienka orientalis</i> (C.krusei) (10 <sup>5</sup> )*	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i> (10 <sup>5</sup> )
<i>bla<sub>OXA-24/40</sub></i> (10 <sup>4</sup> )	<i>P.aeruginosa</i> (10 <sup>4</sup> )		<i>bla<sub>OXA-58</sub></i> (10 <sup>5</sup> )
			<i>bla<sub>VIM</sub></i> (10 <sup>6</sup> )

- infection polymicrobienne (avenir = métagénomique ?)
- présence d'inhibiteurs

**Place à la mise en  
pratique de ces notions !**