Hommage à nos maîtres et membres de jury

A nos maîtres et juges :

Cher Maître **M. Moustapha DIAGNE,** Enseignant chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques. C'est un grand privilège de vous avoir comme président de jury. Votre pédagogie d'enseignement, votre rigueur, votre sens de partage des connaissances avec sagesse nous ont motivés à vous inviter à présider ce jury. Veuillez trouver ici cher Maître l'expression de nos sincères remerciements et de notre profonde gratitude.

Cher **Professeur Bécaye FALL,** chef de service Biologie Médicale de l'Hôpital Principal de Dakar, sans votre accueil au sein de votre laboratoire et votre soutien et encadrement inconditionnel, l'élaboration de ce document ne serait pas aboutie. Vous n'avez ménagé aucun effort pour répondre à toutes nos questions. Vos suggestions et remarques ont apporté de la valeur à ce document. Vous voir siéger dans ce jury est un grand honneur pour nous. Soyez encore remercier pour votre grande disponibilité.

A notre Maître **M. Arfang DIAMANKA,** Mâitre-assistant au département de Biologie Animale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Ce travail ne serait pas mené à terme sans votre encadrement et votre soutien inconditionnel. Votre disponibilité et les conseils fructueux que vous nous avez prodigués ont été très précieux. Votre bonté, votre modestie et le respect vis-à-vis du prochain témoignent vos qualités humaines et professionnelles. Vos idées fleurissantes, la confiance placée à notre juste personne nous ont permis de trouver tout le soutien nécessaire. Tout ceci suscite nos profonds remerciements.

Cher Maître **M. Malick FALL,** Maître de conférences, professeur de parasitologie de rang exceptionnelle au département de Biologie animale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Vous nous avez fait l'honneur de siéger à ce jury, malgré vos nombreuses occupations. Vos qualités scientifiques et votre grande sagesse nous ont poussé à faire appel à votre humble personne. Nous sommes convaincus que vos contributions apporteront beaucoup de qualités à ce document.

Cher Maître **M. Cheikhna DIEBAKATE** Maître-assistant au département de Biologie Animale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger à ce jury. Vous nous donnez l'opportunité de vous écouter à nouveau et de profiter de vos connaissances scientifiques pour améliorer ce travail. Recevez ici l'expression de nos sincères remerciements.

Liste des abréviations

Acb : Acinetobacter calcoaceticus-baumannii

ADN : Acide désoxyribonucléique

BGN : Bacille à gram négatif

BGP : Bacille à gram positif

C+ : Cocci à gram positif

CAPE : Centre Autonome des Prélèvements Externes

CGH : L'hybridation génomique comparative

CHCA : Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid

CO2 : Dioxyde de carbone

CVV : Candidose vulvovaginale

HPD : Hôpital Principal de Dakar

Hz : Hertz

IVD : In vitro diagnosis

IRD : Institut de recherche pour le développement

KDa : Kilodalton

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LDC : Lysine-décarboxylase

MGG : May-Grünwald Giemsa

PCR : Polymerase chain reaction

rRNA : Ribosomal ribonucleic acid

RUO : Research Use Only

SCN : Staphylocoques à coagulase négative

TDR : Test de diagnostic rapide

Listes des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Exemple de galerie API® 4
Figure 2 : Test de diagnostiques rapide 5
Figure 3 : Principe d'ionisation par la technique MALDI. 8
Figure 4 : Matériel pour isolement des colonies 11
Figure 5 : Isolat de colonie bactérienne 11
Figure 6 : Le VITEK MS et son système de pilotage 12
Figure 7 : La Prep Station 14
Figure 8 : lame DS 15
Figure 9 : Préparation de l'échantillon pour l'analyse en MALDI–TOF. 15
Figure 10 : Tableau d'interprétation des résultats 15
Figure 11 : Tableau interprétatif du niveau de confiance d'identification 15
Figure 12 : Répartition des patients suivant le sexe 16
Figure 13 : Répartition des patients selon les tranches d'âge. 16
Figure 14 : Répartition des patients selon le département 17
Figure 15 : Les échantillons reçus au laboratoire 18
Figure 16 : Répartition des produits pathologiques en fonction du département de provenance 18
Figure 17 : Répartition de différentes bactéries suivant leur typologie 20
Figure 18 : Principaux types de cooci retrouvés. 20
Figure 19 : Les différents types de staphylocoques identifiés 21
Figure 20 : Les différentes espèces de staphylocoques identifiées. 21
Figure 21 : Les différents types de streptocoques identifiés 22
Figure 22 : Les différents bacilles Gram positif identifiés. 24
Figure 23 : Taux de contributivité du MALDI-TOF 25
Figure 24 : Schéma de conservation de la souche calibrant. II

Liste des tableaux

Tableau I : Les différents types d'échantillons étudiés 17
Tableau II : Répertoire des germes identifiés par le MALDI-TOF 19
Tableau III : L'ensemble des staphylocoques identifiés par le MALDI-TOF. 21
Tableau IV : Les différents streptocoques identifiés: 22
Tableau V : Récapitulatif des principales entérobactéries identifiées 23
Tableau VI : Récapitulatif des différentes bactéries non fermentaires. 24
Tableau VII : Les différentes levures identifiées par le MALDI-TOF. 25

INTRODUCTION

La prise en charge d'un patient suspect d'infection bactérienne repose classiquement sur l'identification de l'agent pathogène au site d'infection et sur le choix du meilleur traitement antibiotique, basé sur l'antibiogramme (DESCY *et al.*, 2010). Le laboratoire doit mettre en évidence et identifier l'agent pathogène responsable, étudier sa sensibilité aux différentes molécules antimicrobiennes, rechercher la présence de facteurs de virulence et, le cas échéant, comparer les différentes souches isolées afin d'établir un lien de clonalité notamment en cas d'épidémies. La réponse à toutes ces demandes nécessite la mise en route de différentes techniques dont certaines sont laborieuses, coûteuses et difficiles à réaliser en routine. Elles requièrent d'autre part un certain temps de manipulation, et ces délais ne sont pas toujours compatibles avec une prise en charge thérapeutique optimale du patient. Actuellement, l'identification et l'étude de la sensibilité des microorganismes nécessitent plusieurs étapes qui reposent principalement sur la détection des caractéristiques phénotypiques du germe étudié. L'utilisation de colorations (coloration de Gram par exemple), la morphologie des colonies, l'examen au microscope, l'isolement en culture sur différents milieux, les tests biochimiques, qu'ils soient réalisés manuellement ou par des automates, sont les principes sur lesquels se basent la classification et l'identification des pathogènes étudiés. Cependant, ces techniques présentaient certains inconvénients tels que de nécessiter plusieurs heures de délai d'analyse ou encore de devoir disposer de suffisamment de matériel biologique issu des cultures pour être réalisées (CARBONNELLE et NASSIF, 2011). L'apparition de la biologie moléculaire, méthode de référence dans bien des cas, a certes permis une identification bactérienne plus rapide et précise mais se caractérise par le coût élevé des intrants nécessaires.

Ces difficultés ont conduit au développement de méthodes alternatives avec des applications récentes de technologie émergente comme la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le MALDI-TOF est une révolution technique utile pour l'identification rapide des bactéries, virus, champignons et arthropodes. Il est déjà utilisé depuis une vingtaine d'années dans différents domaines d'application et en particulier dans les laboratoires de chimie pour la détection de molécules diverses comme les sucres, les acides nucléiques et les protéines. Plus récemment, la technique s'est élargie au diagnostic vétérinaire et au niveau environnemental (POLET *et al.*, 2013). Aujourd'hui, la SM-MALDI-TOF (MS-MALDI-TOF) est adaptée à une utilisation dans les laboratoires de microbiologie, où elle sert de méthode révolutionnaire, rapide et robuste

pour une identification microbienne (bactéries et champignons) précise (CLARCK *et al.*, 2013).

En effet, au lieu des 18 à 24 heures nécessaires par les méthodes classiques, cet identification se fait ici en quelques minutes et de façon précise (FALL *et al.*, 2013). Dans le cadre de la coopération scientifique entre l'HPD, l'IRD et la Fondation Méditerranées Infections, un spectromètre de masse " MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight), premier spécimen du genre dans la sous-région, a été installé à l'Hôpital Principal (HPD) depuis 2012 (FALL *et al.*, 2013). L'objectif de notre mémoire est d'évaluer l'apport du MALDI-TOF dans l'identification des bactéries et levures isolées au laboratoire de l'Hôpital Principal de Dakar.

Il s'agit plus spécifiquement :

- d'estimer la contribution du MALDI-TOF dans l'identification des bactéries et levures isolées au laboratoire de février jusqu'à juillet 2018 ;
- de déterminer la répartition des principaux germes identifiés en fonction des départements ;
- d'établir la répartition des patients selon l'âge et selon le sexe.

Notre mémoire comporte trois chapitres : le premier est consacré à la synthèse bibliographique sur les techniques d'identification classiques des bactéries et levures. Un deuxième chapitre traite du matériel et de la méthodologie utilisés et un troisième chapitre présente les résultats obtenus et leur discussion. En fin une conclusion sera tirée du travail réalisé avant d'annoncer les perspectives qu'offre le MALDI-TOF dans l'avenir de la microbiologie.

Chapitre I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Eléments de Microbiologie médicale

1.1 Historique de la Bactériologie

La bactériologie médicale, comme d'autres sciences, est étroitement liée à l'évolution des techniques. Malgré des intuitions parfois anciennes sur l'origine infectieuse de certaines maladies (Fracastor et ces théories de la contagion, au XVIe siècle, Semmelweis et son concept sur la transmissibilité de la fièvre puerpéral dans les maternités de Vienne en 1844), ce sont des faits d'observation puis des faits expérimentaux (grâce à la mise au point de l'outil essentiel le microscope dont A .Van . Leeuwenhoek est l'inventeur) qui ont permis d'aboutir à la véritable révolution microbiologique de l'ère pasteurienne. La découverte de quelques bactéries agents de maladies infectieuses dominantes, de leur pouvoir pathogène et des mécanismes de défense de l'hôte infecté, ont fait qu'en quelques décennies de la seconde moitié du XIXe siècle est née la bactériologie médicale et, avec elle, l'immunologie (MOUSSAOUI, 2012).

1.2 Classification des bactéries d'intérêt médical

La taxonomie permet de nommer les organismes vivants et les classer en unités (taxons) au sein desquels, ils partagent un grand nombre de caractéristiques communes (Annexe 1).

2. Méthodes d'identification bactérienne au laboratoire

2.1 Méthodes d'orientation

L'intérêt de la culture bactérienne porte sur le développement de la bactérie, son isolement et la détermination de ses caractéristiques culturales. Cela nécessite de regrouper des conditions d'atmosphère (aérobie, anaérobie, enrichi en CO2), de température et de culture favorable au développement microbien. L'ensemble de ces informations donne une orientation qui permettra de guider la démarche pour l'identification bactérienne. Ainsi deux méthodes permettent d'orienter l'identification :

2.1.1 La coloration de GRAM

Elle permet de déterminer la morphologie (cocci ou bacille) et le type de paroi de la bactérie (Gram positif ou Gram négatif).

2.1.2 Les tests rapides d'orientation

L'étude de l'aspect des colonies sur gélose ainsi que la capacité de croissance sur des milieux sélectifs, pouvant être complétée par l'observation de la mobilité entre lame et lamelle, fournissent des éléments d'orientation étiologique. La réalisation de tests rapides directement à partir des colonies bactériennes tels que l'oxydase et la catalase, oriente l'identification selon les caractéristiques du métabolisme bactérien (NOCON, 2013).

2.2 Galeries miniaturisées

2.2.1 Principe de fonctionnement

Chaque espèce bactérienne possède des substrats préférentiels et exprime des caractéristiques métaboliques propres à son mode de vie. Ces caractères métaboliques définissent des groupes à la base de la taxonomie bactérienne. Les industriels ont créé des galeries constituées de cupules remplies de substrats lyophilisés que l'on réhydrate par une suspension mono-bactérienne de concentration standardisée dans un bouillon prédéfini. Après incubation d'une durée de 12 heures, la croissance bactérienne fournit un profil réactionnel que l'on peut lire de façon manuelle ou automatisée. Pour aboutir à une identification, ce profil est ensuite comparé à une base de données du fournisseur qui a été établie à partir de souches de référence (NOCON, 2013).

2.2.2 Galeries basées sur l'analyse du métabolisme bactérien

Il faut disposer d'un isolat bactérien suffisant et respecter un délai de culture de 24-48 heures à 37°C avant la lecture. La lecture est réalisée soit par mesure de la turbidimétrie qui est proportionnelle à la croissance bactérienne, soit par virage colorimétrique par la génération lors du métabolisme bactérien d'un substrat coloré. A titre d'exemple, les galeries API® commercialisées par la société BIOMERIEUX sont une miniaturisation de ces techniques (Figure 1).

Figure 1 : Exemple de galerie API®
Source : (Gaudin, 2017)

2.2.3 Galeries basées sur des tests enzymatiques

Le principe de fonctionnement de ces galeries est basé sur la détection de la présence ou de l'absence d'enzyme préexistant dans l'inoculum bactérien. Exemple : rapID® (BIOMERIEUX) (NOCON, 2013).

2.3 Technique d'agglutination

L'identification bactérienne peut également se faire en recherchant certains antigènes spécifiques de l'espèce. Le principe est basé sur une réaction d'agglutination fonctionnant grâce à un anticorps spécifique contenu dans le réactif réagissant vis-à-vis d'antigènes de surface de la bactérie à identifier. Par exemple il existe dans le commerce des kits pour identification de *Streptococcus pneumoniae*, des espèces groupables du genre *Streptococcus*, de *Staphylococcus aureus*, des Legionelles (NOCON, 2013).

2.4 Technique de diagnostic rapide immuno-chromatographique

La détection rapide d'antigènes parasitaires, bactériens ou viraux par immunochromatographie sur membrane consiste à déposer l'échantillon à tester (sang, urines, selles, LCR, pus, ...) à l'une des extrémités d'une membrane de nitrocellulose fixée sur un support plastique ou carton (Figure 2). Si l'antigène recherché est présent, il se lie avec un anticorps marqué le plus souvent à l'or colloïdal. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une ligne colorée, l'apparition d'une seconde ligne colorée ou ligne de contrôle valide le bon fonctionnement de la réaction. En cas de réaction négative, seule la ligne contrôle est colorée (AUBRY et GAÜZERE, 2018).

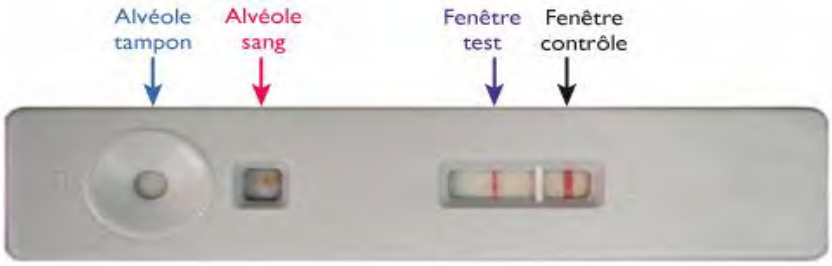

Figure 2 : Test de diagnostiques rapide
source : (D'ACREMONT *et al.*, 2011)

2.5 Automates (Méthodes conventionnelles automatisées)

L'automatisation de l'identification bactérienne a concerné d'abord l'inclusion de tests phénotypiques, biochimiques pour la plupart, dans des supports miniaturisés, avec lecture et interprétation intégrées. On peut citer le Vitek ® (bioMérieux), le Phoenix® (BD) et le MicroScan® (Siemens puis Beckman), GeneXpert® (Cepheid) etc. Bien que ces automates

aient des performances tout à fait acceptables, ils sont limités par des souches parfois peu réactives et par une base de données reflétant difficilement l'hétérogénéité de certaines espèces. C'est notamment le cas pour des espèces non fermentaires ou avec peu de souches connues (RIEGEL *et al.*, 2016).

2.6 Biologie moléculaire

Elle permet d'obtenir un résultat en quelques heures dans les situations d'urgence (identification et typage du germe, et détection des résistances antibiotiques) (ROUX et ROLAIN, 2014).

2.6.1 PCR (Polymérase Chain Réaction)

La PCR permet d'obtenir d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique de longueur définie. La technique consiste en une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Ainsi il est possible de détecter l'ADN de presque n'importe quelle bactérie (ou champignon) à l'aide d'amorces ciblant un gène très conservé (16S rRNA par exemple pour les bactéries) (JATON et GREUB, 2007).

2.6.2 Séquençage de l'ARN 16 S

La cible universelle la plus fréquemment utilisée en bactériologie pour le diagnostic de genre ou d'espèce est l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). La technique est basée sur l'incorporation à l'échantillon contenant le germe à identifier d'une séquence d'amorce universelle (courte chaine de nucléotide complémentaire de la séquence d'ADN connue à amplifier) qui se fixe en amont de la zone d'intérêt à séquencer. Cette amorce permet l'accrochage de l'enzyme de synthèse qu'est l'ADN polymérase (SUAREZ, 2013).

2.6.3 Puce à ADN

Les puces à ADN sont des multi capteurs permettant de caractériser et quantifier un acide nucléique dans un échantillon (GLASER, 2005). La technologie par «puces à ADN» utilise le principe de l'hybridation génomique comparative (CGH) et consiste à Cohybrider une même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin contrôle, marqués chacun par un fluorochrome de couleur différente, sur un réseau de séquences d'ADN (puce à ADN) représentant l'entier du génome (FERRARINI *et al.*, 2010).

3. La spectrométrie de masse MALDI-TOF

3.1 Historique

La spectrométrie de masse est une technique ancienne dont la première description du principe par Thompson remonte à 1899 (DESCY *et al.,* 2010).

Le MALDI est une méthode d'ionisation introduite en 1988 par KARAS et HILLENKAMP permettant d'analyser des molécules de hautes masses moléculaires, supérieures à 300 kDa. Elle s'utilise pour analyser les peptides et les protéines (HILLENKAMP *et al*., 1991). Par la suite, HOLLAND *et al*., (1996) ont réalisé les premières analyses par le MALDI-TOF MS à partir de bactéries intactes. Ainsi, le MALDI-TOF a initialement évalué sur des entérobactéries des souches bactériennes impliquées dans le bioterrorisme et les staphylocoques et mycobactéries. Ainsi on peut citer quelques agents du bioterrorisme identifiés par le MALDI-TOF comme *Bacillus anthracis, Brucella melitensis, Yersinia pestis* et *Francisella tularensis* (KRISHNAMURTHY *et al*., 1996). Depuis ces premiers travaux, les performances de cette technologie ont évolué ainsi que l'exhaustivité des banques de données et de ses applications en routine.

3.2 Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant d'identifier différents types de molécules ionisées par mesure de leur rapport masse/charge (m/z) (SAUGET, 2016). La première étape consiste à mélanger l'échantillon à la matrice, l'évaporation des solvants conduisant à la cristallisation de la matrice avec l'échantillon. Le mélange ainsi formé est déposé sur un support (plaque métallique) (CARBONNELLE et NASSIF, 2011). Le complexe ainsi formé est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. L'irradiation du mélange cristallin conduit à la désorption d'ions caractéristiques de l'échantillon (MALDI). Les molécules ionisées sont alors accélérées dans un champ électrique et dirigées vers un analyseur séparant les ions selon leur temps de vol (TOF). Ainsi, en fonction de leur rapport m/z, les ions atteignent plus ou moins rapidement le détecteur où ils sont alors transformés en un signal électrique qui sera amplifié puis analysé (SAUGET, 2016).

3.2.1 Appareillage

On peut schématiser un spectromètre de masse comme suit :

- Le système d'introduction de l'échantillon ;
- La chambre d'ionisation produisant des ions en phase gazeuse ;

- L'analyseur séparant les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) ;
- Le détecteur, transformant le courant ionique en courant électrique ;
- Une unité informatique comportant les logiciels d'acquisition, de traitement et de Comparaison des spectres obtenus à sa base de données.

3.2.1.1 Source d'ionisation

L'échantillon à analyser est déposé sur une cible et est traité par une matrice appropriée. Après introduction de la cible dans le système, elle est bombardée par un laser (337nm, 20Hz). Les ions ainsi générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige dans un tube de vol vers l'analyseur (DESCY *et al.*, 2010) Figure 3.

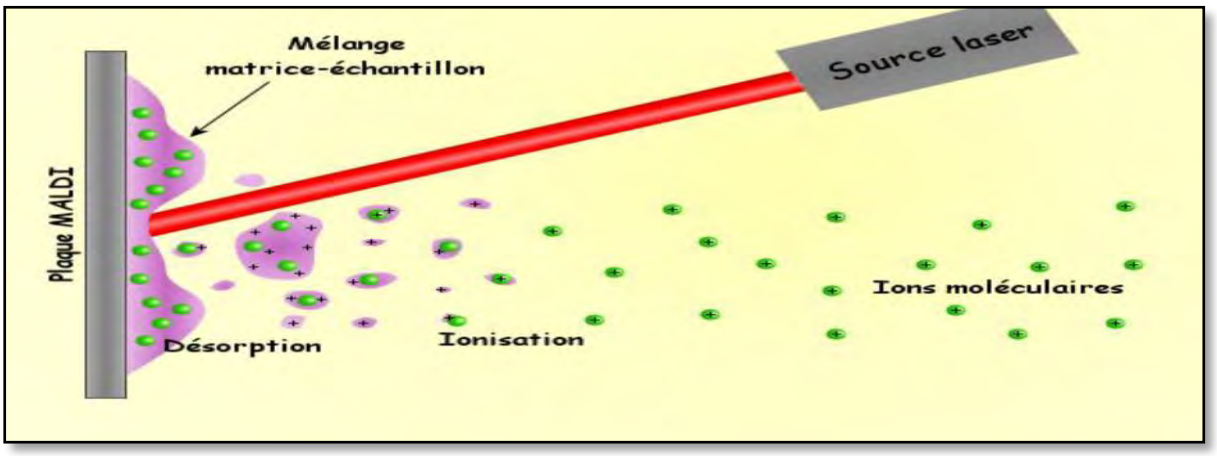

Figure 3 : Principe d'ionisation par la technique MALDI
Source : (VERGNE, 2014)

3.2.1.2 Analyseur

Il permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF : Time-Of-Flight) et de produire un spectre de masse. Le spectre de masse obtenu est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé, qui peut être comparé à une banque de données de spectres (DESCY *et al.,* 2010). Le spectromètre mesure le temps que mettent les différents ions à atteindre le détecteur. Les grosses molécules mettent plus de temps à atteindre le détecteur que les petites molécules. Elles sont ainsi séparées en fonction de leur rapport masse/charge (CARIELLO, 2012).

3.2.1.3 Détecteur

Celle-ci est réalisée grâce à un multiplicateur d'électrons. Le signal est amplifié par la formation d'électrons secondaires à l'aide de tubes en verre dopés au plomb (dynode). Lorsqu'un composé ionisé entre dans un canal et percute sa paroi, il provoque l'émission de plusieurs électrons qui sont accélérés par la tension de polarisation. Les électrons émis vont à

leur tour frapper la paroi et provoquer l'émission d'autres électrons. Ainsi, plus la quantité d'ions de rapport m/z est importante, plus le nombre d'électrons secondaires est important et plus l'intensité du pic de même rapport m/z est importante. Les pics enregistrés sont représentés sous la forme d'un spectre, spécifique d'espèce. Ce spectre de masse peut alors être comparé aux milliers de spectres de référence contenus dans la base de données de l'appareil (CARIELLO, 2012).

3.2.1.4 Système informatique

Il comporte les logiciels d'acquisition, de traitement et de comparaison des spectres obtenus à sa base de données.

3.3 Avantages et limites

Les avantages de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sont notamment :

- la rapidité et la fiabilité de l'identification (quelques minutes Vs 24 heures) ;
- la réalisation plus ciblée des antibiogrammes ;
- l'économie en temps de travail et en consommables ;
- la possibilité de découverte de nouvelles espèces (les NO matches+++) ;
- la connaissance de l'espèce bactérienne, même si son antibiogramme n'est pas encore disponible ;
- la possibilité d'identifier les espèces rarement isolées comme les agents du bioterrorisme (*Brucella sp, Coxiella burnetii, Francisella tularensis* et *Bacillus anthracis*), certains bacilles à gram négatif (*Pasteurellaceae*, le groupe *Acinetobacter baumannii, Yersinia sp, Legionella sp*), les anaérobies, ou les bactéries difficiles à identifier car ne prenant pas le Gram (*Leptospira sp, Mycobacterium sp*) (LAVIGNE et RIEGEL, 2015).

Les limites de la spectrométrie de masse sont les suivants :

- l'appareil est sensible aux variations de température, aux vibrations, et à l'empoussièrement ;
- l'identification erronée de certains germes ;
- un mauvais entretien de la maintenance de l'appareil peut altérer la performance des résultats attendus ;
- le coût élevé de la spectrométrie de masse ;
- l'importance de construire des bases de données de qualité, en particulier pour les bactéries anaérobies.