

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE 2015

N°03

## Etude comparative d'identification des souches de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* isolées dans les IRA par méthodes d'identification classiques et MALDI-TOF

Mémoire de  
Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT  
Le 28 Novembre 2015

PAR  
Mr Abdessamad Nadir  
Né le 10 Janvier 1984 à Kelaa (Maroc)

### MEMBRES DU JURY

---

<b>PRESIDENT :</b>	Cheikh Saad-Bou BOYE	: Professeur
<b>MEMBRES :</b>	Mme. COUMBA TOURE KANE	: Professeur
	M. MAKHTAR CAMARA	: professeur
<b>DIRECTEUR DE THESE:</b>	M. Abdoulaye SECK	: Maître Assistant

# **DEDICACES**

*Louange et gloire à ALLAH le Tout Puissant qui m'a permis de mener à bien ce travail.*

*A notre PROPHETE MOUHAMED, Paix et Salut sur Lui, à toute Sa famille, à tous Ses compagnons.*

*Après avoir rendu grâce à DIEU.*

*Je dédie ce travail*

*À MA GRANDE MERE*

*À MES CHERS PARENTS*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.*

*Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*A MES CHERS FRERES*

*A MA CHERE FEMME*

*A TOUS MES ONCLES ET TANTES*

*A TOUS MES CAMARADES DE PROMOTION*

*A tout le personnel du laboratoire de l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne de l'HALD*

*A Amadou Diop, Abdoulaye Diop, Thiané Diop, Dior, Amy, Fatou bintou*

*A tout le personnel de la salle de stérilisation et de préparation des milieux de culture de l'HALD*

*Remerciements particuliers à Tonton Omar, Tonton Djiby et Michel.....*

*A tout le personnel du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'HALD*

*A tout le personnel du Laboratoire de Bactériologie de l'HPD en particulier Dr Bissoum.*

**A NOS MAÎTRES ET JUGES**

*A notre Maître et Président du jury*

*Le Professeur CHEIKH SAAD BOU BOYE*

*Cher Maître, c'est un grand honneur et un réel plaisir que vous nous avez fait en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations.*

*Votre rigueur scientifique, votre compétence pédagogique font de vous un maître exemplaire et respecté.*

*Recevez cher maître l'expression de nos respectueux hommages.*

*Que Dieu vous donne longue vie.*

*A notre Maître et Juge*

*Le Professeur COUMBA TOURE KANE*

*C'est un grand privilège que vous nous avez accordé en acceptant de juger ce travail.*

*Votre simplicité et votre courtoisie nous ont toujours fascinées. Nous profitons de ce jour solennel pour vous témoigner toute notre considération. Soyez assuré de notre grande admiration.*

*A notre Maître et Juge*

*Le professeur MAKHTAR CAMARA*

*Nous avons été touchées par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. C'est un grand honneur que vous nous faites.*

*Et nous vous remercions vivement de votre disponibilité.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et notre considération.*

*A notre Maître et Directeur de mémoire  
Le Professeur CHEIKH SAAD BOU BOYE*

*Cher maître, notre vocabulaire n'est pas assez riche pour qualifier tout l'effort que vous avez consenti pour la réalisation de ce travail qui est le vôtre. Votre simplicité, votre compétence et votre souci du travail bien fait sont les atouts qui nous ont fascinés et dont nous avons bénéficié en vous côtoyant.*

*Cher maître, croyez ici à notre profonde gratitude, notre sincère reconnaissance et nos remerciements.*

*Puisse Dieu vous accorder une longue vie et une brillante carrière.*

*A notre Maître et Co-directeur de mémoire*

*Nous ne saurons vous remercier pour votre soutien sans faille, votre patience, vos conseils et votre disponibilité qui nous ont permis de mener à bien ce travail qui est également le vôtre.*

*Soyez assurée, de notre attachement, notre reconnaissance et de notre profonde  
gratitude.*

## Liste des abréviations

**Api** Appareil pour Identification

**ATCC** American Type Culture Collection

**BHS** Bouillon hyper salé

**CHCA** Acide  $\alpha$  cyano-4-hydroxycinnamique

**CIE** Contre immunoélectrophorèse

**COA** Co-agglutination

**DHP** Acide 2,5 dihydroxybenzoïque IRA Infections Respiratoires Aigües

**GSC** Gélose au Sang Cuit

**GSO** Gélose au Sang Ordinaire

**LCR** Liquide Céphalorachidien

**LPS** Lipopolysaccharides

**MALDITOF** Matrix-Assisted LASER Desorption And Ionisation, Time Of Flight

**MH** Mueller-Hinton

**MS** Spectromètre de masse

**NAD** Nicotinamide Adénine Dinucléotide

**PRP** Polyribosyl Ribitol Phosphate

**PVX** gélose au sang cuit, chocolat PolyViteX

## Liste des figures

Figure 1: Principe d'ionisation par la technique MALDI.

Figure 2: Technique Time of flight (TOF)

Figure 3: spectre d'*E.coli* sur MALDI-TOF

Figure 4 : Aspect de *S. pneumoniae* après coloration Gram

Figure 5: Aspect d' *H. influenzae* après coloration Gram

Figure 6 : spectromètre de masse VITEK MS® et son unité informatique.

Figure 7: Organisation de la paillasse de travail pour une analyse VITEK MS®.

Figure 8: Interface de création MYLA®.

Figure 9: Support de plaque VITEK MS®.

Figure 10: dépôt du contrôle de qualité sur plaque BIOMERIEUX

Figure 11: dépôt de matrice

Figure 12: insertion du support de plaque dans l'automate VITEK MS®.

## Liste des tableaux

Tableau I : Espèces d'*Haemophilus* et exigence en facteurs de croissance X et V

Tableau II: tableau interprétatif du score d'identification.

Tableau III : Identification des souches d'*Haemophilus influenzae* avec MALDI-TOF

Tableau IV : Identification des souches de *Streptococcus pneumoniae* avec MALDI-TOF

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE.....	2
I. La spectrométrie de masse.....	3
II. La spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	4
II.1. Principe .....	4
II.2. La matrice .....	4
II.3. Désorption-Ionisation.....	5
II.4. La spectrométrie à temps de vol (TOF) .....	6
II.5. Le spectre.....	6
II.6. Avantages et inconvénients du MALDI-TOF .....	7
III. Prise en charge d'un prélèvement bactériologique au laboratoire .....	8
IV. Les infections respiratoires aiguës.....	9
V. Les pathogènes responsables d'IRA.....	9
V.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	9
V. 1.1. Taxonomie et nomenclature [11,8].....	9
V.1 .2. Caractères bactériologiques [23] .....	10
V.1.3. Habitat .....	10
V.1.4. Identification formelle de l'espèce.....	11
V.1.5. Facteurs de virulence et pouvoir pathogène .....	12
V.1.6. Vaccination [14] .....	13
V.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	13
V.2.1. Taxonomie et nomenclature [8,5].....	13
V.2.2. Caractères bactériologiques [16] .....	14
V.2.3. Habitat.....	16
V.2.4. Facteurs de virulence et pouvoir pathogène .....	16
V.2.5. Vaccination [19] .....	18
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	19
I. Cadre de l'étude.....	20
II. Population d'étude.....	20
III. Matériels et méthode.....	20
III.1. Matériel .....	20
III.2. Spectromètre de masse : Vitek MS .....	21

III.3. Méthodes.....	25
III.3.1. Méthodes d'identification classiques .....	25
III.3.2. Méthodes d'utilisation du MALDI-TOF : .....	27
IV. Résultats.....	30
IV.1. Identification des souches d' <i>Haemophilus influenzae</i> par MALDI –TOF .....	30
Tableau III : Identification des souches d' <i>Haemophilus influenzae</i> avec MALDI-TOF.....	30
IV.2. Identification des souches de <i>Streptococcus pneumoniae</i> avec MALDI-TOF: .....	31
V. Discussion .....	32
Conclusion .....	34
BIBLIOGRAPHIE.....	35

# **INTRODUCTION**

Depuis des décennies, les micro-organismes impliqués dans les pathologies infectieuses étaient identifiés par des techniques classiques basées sur l'étude du métabolisme bactérien (galeries, Api, etc.), qui présentaient certains inconvénients (délai d'identification d'au moins 24 heures). Ces techniques reposaient essentiellement sur les caractères biochimiques des bactéries. C'est dans cette optique, que des techniques d'identification à l'aide d'automates ont fait leur apparition pour raccourcir le délai d'identification.

Les premières études d'identification des micro-organismes par la méthode d'analyse MALDI-TOF (*matrix-associated laser desorption and ionisation, time of flight*) ont débuté dans les années 1990.

La technologie MALDI-TOF ne nécessite qu'une petite quantité de colonie pure du micro-organisme à tester et une goutte de matrice pour réaliser l'identification bactérienne en quelques minutes.

Des études réalisées avec cette technique ont montré son efficacité pour l'identification des bactéries isolées en routine en microbiologie et que cette technologie était prometteuse pour l'identification des micro-organismes difficiles à identifier, des levures des anaérobies et des micro-organismes de culture fastidieuse.

Depuis Juillet 2012, l'Hôpital Principal de DAKAR s'est équipée d'un spectromètre de masse VITEK MS® (BIOMERIEUX).

L'objectif de notre étude était de comparer les performances de l'identification classique sur des souches d' *Haemophilus influenzae*, et de *Streptococcus pneumoniae* isolées d'infections respiratoires aiguës à celles du spectromètre de masse type MALDI-TOF de l'automate VITEK MS.

**PREMIERE PARTIE : REVUE DE  
LA LITTERATURE**

## **I. La spectrométrie de masse**

La technique de la spectrométrie de masse consiste à séparer et à identifier des molécules selon leur masse et leur charge [26]. Les applications de la spectrométrie de masse sont nombreuses et touchent divers domaines tels que la biotechnologie pour l'analyse des peptides ou oligonucléotides, la pharmacologie pour le dosage de médicaments, l'environnement pour l'analyse de l'eau, en médecine légale pour la recherche de drogues et de toxines, etc.

Il existe plusieurs types de spectromètre de masse pour séparer des molécules plus ou moins grandes et ont toutes en commun les étapes suivantes [27]:

- Préparation et introduction de l'échantillon
- Ionisation des molécules d'intérêt
- Séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge
- Détection et amplification du signal
- Analyse des données et identification de l'échantillon

Les premiers spectromètres de masse dataient du début du 20<sup>ème</sup> siècle et ont servi en physique pour rechercher les différents isotopes d'un élément chimique. C'est Francis William Aston qui conçut le premier spectromètre de masse en 1922. Il réussit à démontrer l'existence des isotopes en les séparant selon leur masse et leur charge [28].

Au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, la spectrométrie de masse prenait de plus en plus d'ampleur et de nombreuses nouvelles techniques d'ionisation et de séparation des ions ont été mises en place. Le développement de la méthode MALDI-TOF s'est accru dans les années 80. Durant cette période, l'ionisation se faisait sur des molécules ayant une taille d'environ 1000 Daltons et il était impensable d'ioniser des molécules excédant 10 000 Daltons du fait de leur fragilité [29]. En 1985, Koichi Tanaka, chimiste japonais (Prix Nobel en 2002), constatait que des macromolécules pouvaient être séparées en mélangeant l'échantillon avec une solution contenant de la poudre métallique ultrafine et du glycérol [30]. Il réussit à ioniser la molécule de lysozyme d'une taille de 14 300 Daltons. Durant la même période, Michael Karas et Franz Hillenkamp réussissaient à ioniser l'albumine d'une taille de 66 600 Daltons [31].

Les différentes recherches menées par les équipes de K. Tanaka et Karas/Hillenkampf ont permis de mettre au point la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF utile dans l'analyse des biomolécules.

## II. La spectrométrie de masse MALDI-TOF

### II.1. Principe

Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur à temps de vol (TOF = *Time-Of-Flight*) [32]. La séparation des molécules par cette technique est plus douce qu'avec les autres méthodes. Elle permet d'ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans les dégrader [33]. La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides [34].

L'échantillon est mélangé à la matrice puis placé sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions ainsi obtenus sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettraient plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites vont arriver plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre [31].

### II.2. La matrice

La matrice est constituée de molécules cristallisées dont les plus utilisées sont l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide sinapinique et l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA). Ces molécules sont ajoutées à un solvant (acétonitrile, éthanol ou acide trifluoroacétique) [32]. Le DHB convient pour l'analyse des échantillons organiques hydrophobes ou des polymères aromatiques, tandis que l'acide sinapinique et l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique sont destinés pour l'analyse des protéines [35].

Un solvant composé d'eau et d'acétonitrile est ajouté à la matrice afin de permettre aux substances de l'échantillon de se dissoudre dans le mélange : les substances hydrophobes de l'échantillon auront une affinité pour l'acétonitrile alors que les substances hydrophiles auront une affinité pour l'eau [32].

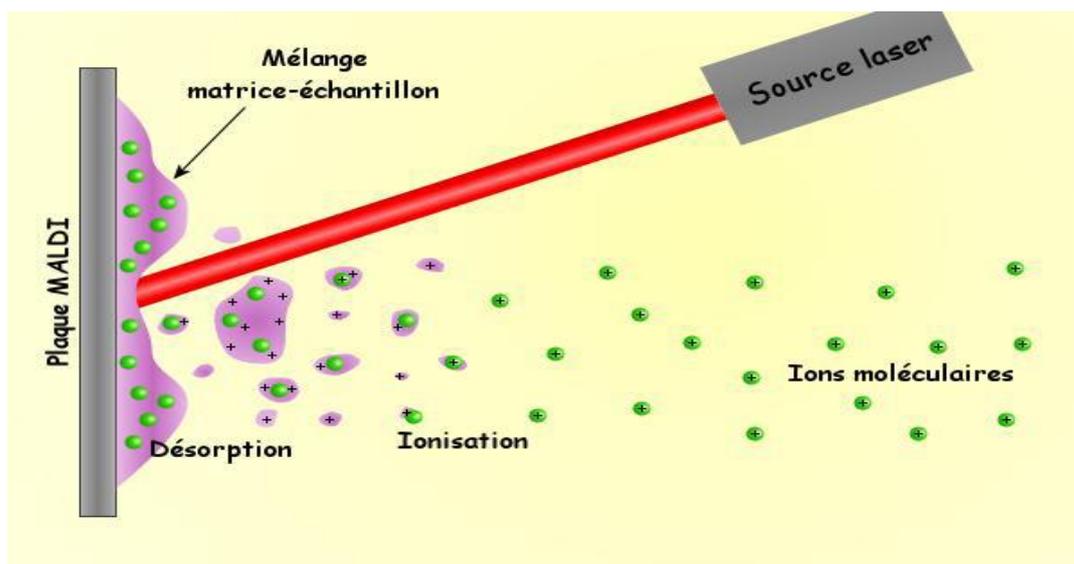
Après avoir mélangé la matrice à l'échantillon, le spot obtenu est séché à l'air pour permettre au solvant de s'évaporer et il ne restera que l'analyte dans la matrice cristallisée.

Les composants de la matrice doivent avoir plusieurs caractéristiques [32,36]:

- pouvoir se mélanger avec les solvants organiques et l'eau
- être assez grands afin de ne pas s'évaporer lors de la préparation de l'échantillon ou lorsque celui-ci est introduit dans le spectromètre
- être assez petits afin d'avoir une bonne volatilité et se vaporiser sous l'action du rayon laser
- être acides afin de transmettre des protons à l'analyte et ainsi l'ioniser
- pouvoir absorber fortement et rapidement les rayons ultra-violet du laser

### II.3. Désorption-Ionisation

Un laser UV (de longueur d'onde égale à 337 nm) d'azote (N<sub>2</sub>) est pulvérisé en direction de la cible. La matrice ayant une grande réactivité pour l'absorption de la lumière UV absorbe l'énergie du laser protégeant ainsi les molécules protéiniques de la dégradation. L'énergie du laser produit deux phénomènes : tout d'abord, la matrice se vaporise libérant les peptides (désorption), ensuite, elle transfère ses protons à l'analyte qui s'ionise [36].



**Figure 1: Principe d'ionisation par la technique MALDI. (L'analyte en vert est cristallisé dans la matrice en violet).**

Selon leur nature, les ions peuvent être chargés positivement ou négativement. Les protéines et peptides ont des groupements accepteurs de protons et sont ionisés positivement. Les oligonucléotides et les saccharides ont des groupements qui perdent un proton et sont ionisés négativement [34].

Peptides :  $R-NH_2 + H^+ \rightarrow R-NH_3^+$  (ionisation positive)

Saccharides : Acides carboxyliques  $R-CO_2H \rightarrow R-CO_2^-$  (ionisation négative)

Fonction alcoolique  $R-OH \rightarrow R-O^-$  (ionisation négative)

#### II.4. La spectrométrie à temps de vol (TOF)

La spectrométrie à temps de vol est une technique séparant les substances ionisées en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. La séparation se fait entre une anode et une cathode dirigeant ainsi les molécules ionisées vers l'électrode portant la charge inverse des ions à analyser [36]. Les ions passent ensuite à travers un champ électrique de force connue accélérant leur progression [31]. 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 [36].

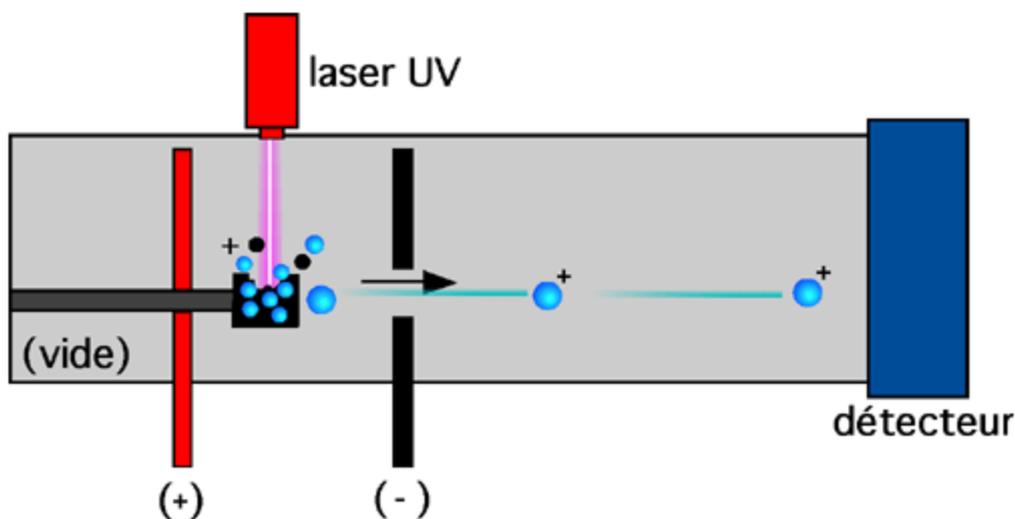


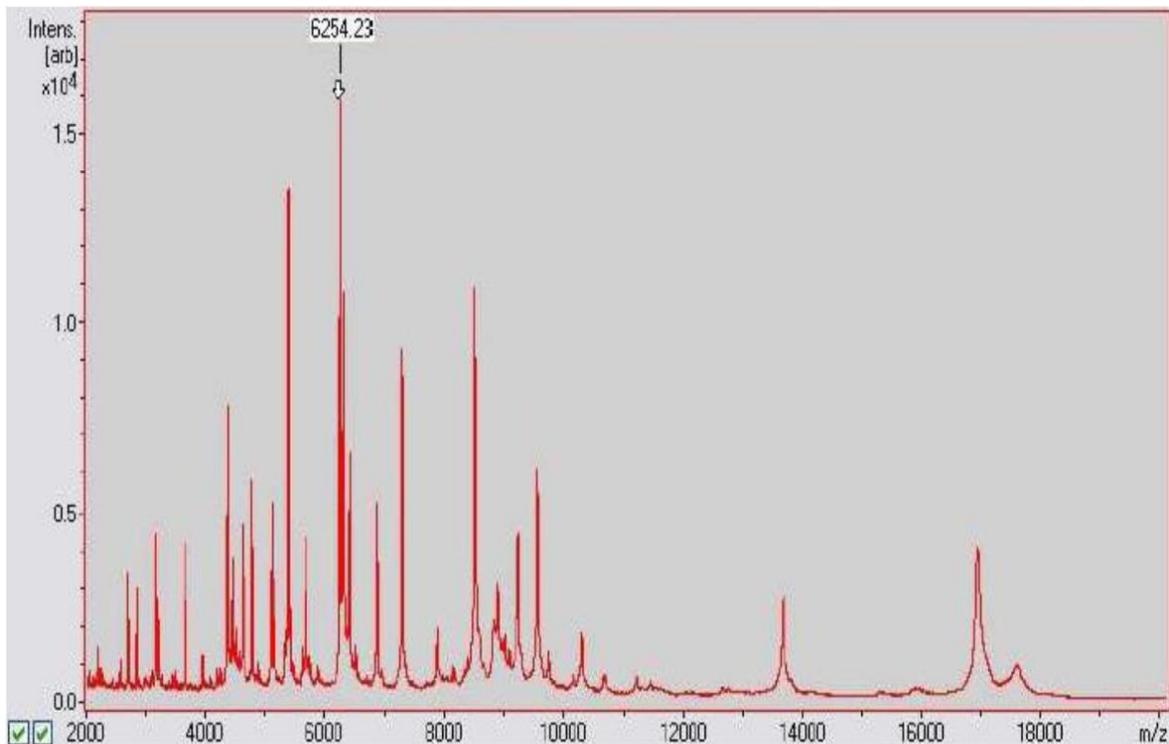
Figure 2: Technique Time of flight (TOF)

Le détecteur envoie ensuite les informations enregistrées à l'analyseur qui va traiter les données et les présenter sous forme de spectre.

#### II.5. Le spectre

Les données enregistrées sont calculées afin de transposer les résultats en un spectre où chaque pic correspond à un type de molécule. L'axe des ordonnées représente l'intensité relative du signal et l'axe des abscisses indique la taille de la molécule en Daltons.

L'appareil intègre les différents pics enregistrés et recherche dans la base de données l'identification du germe correspondant.



**Figure 3: spectre d'*E.coli* sur MALDI-TOF**

## **II.6. Avantages et inconvénients du MALDI-TOF**

### ➤ Avantages :

- Rapidité de l'identification : le MALDI-TOF est la technique d'identification la plus rapide. Alors qu'il faut entre 4 et 18 heures sur les galeries de tests biochimiques, avec le MALDI-TOF, une demi-heure suffit pour lire une lame contenant 24 échantillons.
- Simplicité de l'analyse : la préparation de l'échantillon est simple à réaliser. Contrairement ou aux galeries, il n'y a pas besoin de faire de suspension du germe à analyser ou de plaque de pureté.
- Petit volume d'échantillon nécessaire : il faut très peu de matériel pour effectuer le dépôt. En général, une colonie bien isolée suffit, parfois plusieurs si elles sont très petites. Avec les galeries, il faut assez de colonies pour effectuer un Mac Farland de 0.5, voire plus pour certains germes ayant du mal à pousser.
- Coûts : moins cher par rapport aux autres méthodes
- Découverte de nouvelles espèces bactériennes

➤ Inconvénients :

- Le MALDI-TOF ne convient pas à identifier certaines espèces qui ne sont pas dans la base de données du Vitek MS, notamment les *Actinomyces* et les *Legionella* autre que *pneumophila*. En revanche, la liste de la base de données est exhaustive et peut être mise à jour afin d'élargir le panel des espèces pouvant être identifiées par le MALDI-TOF.
- Germes difficiles à prélevés ou trop muqueux : Les bactéries trop muqueuses (*Klebsiella*, pneumocoque, etc.) ne sont pas bien identifiées par le MALDI-TOF. Ce problème n'est pas dû à l'appareil, mais à la qualité de l'étalement. L'échantillon doit être bien étalé sur le puits et mélangé à la matrice de façon homogène. Si ce n'est pas le cas, le MALDI-TOF ne peut pas identifier le germe. La qualité de l'étalement est un point important à respecter pour l'identification correcte des germes.

### III. Prise en charge d'un prélèvement bactériologique au laboratoire

La prise en charge des prélèvements bactériologiques au laboratoire comporte classiquement 5 étapes [22,2] :

- le prélèvement : il doit être adapté et acheminé dans un délai court au laboratoire pour être techniqué.
- les milieux de culture (solides ou liquides) sont choisis en fonction du micro-organisme que l'on cherche à mettre en évidence de l'origine du prélèvement, en fonction de la clinique, de la nature du prélèvement (seringue, écouvillons etc.), mais également des exigences métaboliques et nutritionnelles des micro-organismes potentiellement impliqués.
- les conditions culturales : les milieux sont ensuite incubés, selon les exigences de la bactérie recherchée, dans des étuves d'environ 35°C à 37°C, sous atmosphère aérobie, anaérobie ou sous atmosphère microphile.
- l'identification : l'orientation de l'identification de la bactérie repose sur les caractères morphologiques (Gram positif ou négatif), culturels (exigence en facteurs de croissance, atmosphère d'incubation etc.), caractères biochimiques (oxydase, catalase, etc.) et éventuellement des caractères antigéniques.
- l'étude de la sensibilité aux antibiotiques : elle est réalisée en milieu liquide ou solide. Elle consiste à tester la capacité de croissance de la bactérie cultivable en présence de différentes

molécules antibiotiques, afin de prédire la probabilité de leur échec ou de leur succès thérapeutique.

#### **IV. Les infections respiratoires aiguës**

Les infections bactériennes sont très fréquentes en pathologies humaines. Elles peuvent être communautaires ou nosocomiales.

Leur gravité peut être très variable, de la simple infection locale à celle gravissime telle que la bactériémie voire le choc septique, engageant le pronostic vital.

Les infections respiratoires aiguës regroupent les infections des voies respiratoires hautes (les angines aiguës, les épiglottites, les otites, les sinusites) et les infections des voies respiratoires basses (trachéites, bronchites aiguës, bronchiolites du nourrisson et pneumopathies).

Les infections respiratoires aiguës (IRA) sont une des causes de décès les plus importantes chez les jeunes enfants dans les pays en voie de développement. Selon des données récentes de l'OMS, les IRA sont à elles seules responsables de 18,1% des décès chez l'enfant, dans le monde [18].

Les IRA sont à 80% d'origine virale et sont souvent prédisposées à des complications bactériennes [12].

L'étiologie bactérienne de ces infections est dominée par *Haemophilus influenzae*, et *Streptococcus pneumoniae* qui sont responsables des pathologies bactériennes respiratoires majeures.

#### **V. Les pathogènes responsables d'IRA**

##### **V.1. *Streptococcus pneumoniae***

##### **V. 1.1. Taxonomie et nomenclature [11,8]**

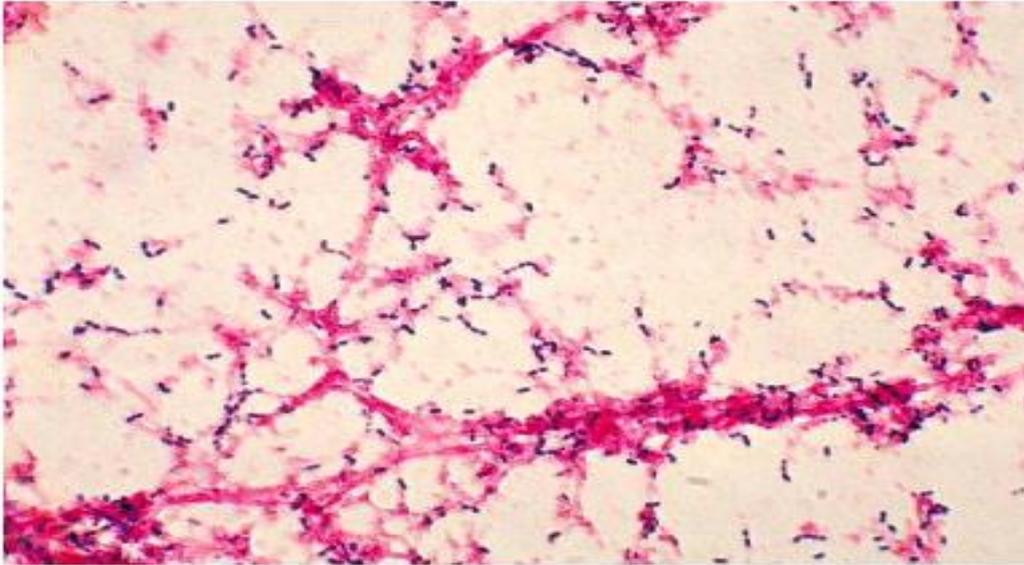
*S. pneumoniae* appartient à la famille des *Streptococcaceae* regroupant plus de 80 espèces bactériennes classées en plusieurs genres :

- *Streptococcus* et *Enterococcus*
- *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc*
- *Lactococcus* et *Pediococcus*

## V.1 .2. Caractères bactériologiques [23]

### a) Caractères morphologiques

Ce sont des cocci à Gram positif, capsulés (souches virulentes), lancéolée disposés en mode diplocoques ou parfois en courtes chaînettes.



**Figure 4 : Aspect de *S. pneumoniae* après coloration Gram**

### b) Caractères cultureux

La culture de *S. pneumoniae* nécessite des facteurs de croissance. Les milieux les plus couramment utilisés sont la gélose trypticase soja ou la gélose Columbia enrichies en sang de mouton ou de cheval à 5%.

L'addition de gentamicine à la concentration de 6 µg/ml rend le milieu sélectif au pneumocoque.

Une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (5 à 10%) avec une température optimale de 35°C à 37°C favorise la croissance du pneumocoque et l'expression de l'hémolyse au bout de 24 heures.

Les pneumocoques se présentent sous forme de petites colonies transparentes, rondes de 0,5 à 1,5 mm de diamètre avec une hémolyse de type alpha. Les pneumocoques en culture sont sujets à une autolyse spontanée.

## V.1.3. Habitat

Le pneumocoque est une bactérie commensale des voies aériennes supérieures. Il colonise le rhinopharynx très précocement où il est en portage chez 50% des enfants âgés de 2 ans [17,10].

#### **V.1.4. Identification formelle de l'espèce**

L'identification formelle du pneumocoque repose sur trois critères :

- La sensibilité à l'optochine (test d'orientation) pour la majorité des souches
- La lyse par la bile
- La mise en évidence d'une capsule.

##### **a) Sensibilité à l'optochine**

L'optochine est l'éthylhydrocupréine dérivé proche de la quinine.

Un disque de 6 mm de diamètre chargé de 5 µg d'optochine provoque sur une culture de pneumocoque sur gélose au sang une zone d'inhibition dont le diamètre est compris entre 12 et 35 mm.

Les autres streptocoques sont résistants à l'optochine. Cependant, 0,5 à 5% des pneumocoques sont résistants à l'optochine et quelques streptocoques viridans sont sensibles à l'optochine.

Il est donc nécessaire de pratiquer des tests complémentaires.

##### **b) La lyse par la bile**

Les pneumocoques provenant d'une culture sur gélose sont lysés par une solution de désoxycholate de sodium de 2 à 10%. La lyse se traduit par un éclaircissement du milieu en quelques minutes. Selon les auteurs 86 à 100% des pneumocoques sont lysés par la bile.

##### **c) Mise en évidence de l'antigène capsulaire [4,1]**

Elle s'effectue à l'aide d'un sérum anti-pneumococcique polyvalent, dirigé contre tous les types d'antigènes capsulaires. La réaction peut s'effectuer soit à partir des cultures, soit à partir des produits pathologiques. Il existe plusieurs méthodes :

- Réaction du « gonflement capsulaire » ou réaction de Neufeld (méthode de référence)
- Réactions d'agglutination,
- Procédé des particules de latex sensibilisés,
- Procédé de co-agglutination (COA) avec des staphylocoques tués,
- La contre immunoélectrophorèse (CIE).

## **V.1.5. Facteurs de virulence et pouvoir pathogène**

### **V.1.5.1. Facteurs de virulence [11]**

#### **V.1.5.1.1. La capsule**

La majorité des souches de *S. pneumoniae* possèdent des capsules recouvrant la paroi cellulaire. Jusqu'ici, 84 sérotypes de *S. pneumoniae* ont été différenciés grâce aux polysides capsulaires immunologiquement distincts.

La capsule constitue chez les pneumocoques le facteur essentiel de virulence. Elle empêche l'opsonisation et l'ingestion du germe par les cellules phagocytaires, en masquant les récepteurs pariétaux où se fixent les fragments C3b du complément.

#### **V.1.5.1.2. La pneumolysine**

La pneumolysine appartient à la famille des thiols-activables. Apparentée à la streptolysine O de *Streptococcus pyogenes*, sa pathogénicité est multifonctionnelle.

Elle est liée d'une part à son activité cytotoxique directe vis-à-vis des cellules respiratoires par activation du complément et une baisse des battements ciliaires des cellules épithéliales permettant l'envahissement de l'arbre respiratoire et d'autre part à un effet pro-inflammatoire. Ce dernier effet est dû à sa capacité de liaison au fragment Fc des immunoglobulines et de fixation au fragment C1q du complément.

La localisation de cette pneumolysine nécessite sa libération dans le milieu extérieur par l'action d'une autolysine.

Elle est responsable de l'hémolyse *alpha* observée sur gélose au sang.

#### **V.1.5.1.3. La protéine A de surface**

La protéine A est présente sur la plupart des souches de *S. pneumoniae*, elle assure l'adhésion aux cellules ciliées de l'arbre bronchique.

### **V.1.5.2. Pouvoir pathogène naturel [17]**

Des infections très sévères sont décrites à tous les âges, mais avec une extrême gravité chez les enfants âgés moins de deux ans et les adultes plus de soixante ans. Les mécanismes expliquant d'une part la translocation bactérienne et d'autre part le développement des lésions tissulaires sont multiples et pourraient varier en fonction des différents sérotypes capsulaires de pneumocoque.

Le pneumocoque est l'agent pathogène le plus fréquent des pneumonies communautaires bactériennes ; c'est également l'une des bactéries les plus impliquées dans les otites moyennes aiguës de l'enfant (moins de 2 ans), les mastoïdites ; les sinusites et les conjonctivites.

Il est responsable aussi d'infections invasives telles que les méningites où il est le principal agent causal chez les personnes âgées. Chez l'enfant de moins de 5 ans, en dehors de la période néonatale dans laquelle *S. agalactiae* est l'agent dominant et depuis l'introduction de la vaccination anti-*Haemophilus b*, sa fréquence est similaire à celle de *Neisseria meningitidis*.

Certains facteurs prédisposent aux pneumonies à pneumocoques:

- les atteintes des voies respiratoires (infections virales, obstructions, etc.) ;
- l'alcoolisme ;
- les dysfonctions cardio-circulatoires, rénales ;
- l'anémie à hématies falciformes ;
- l'âge (enfants, personnes d'âge supérieur à 65 ans) ;
- la splénectomie, les dysfonctions spléniques ;
- la résistance aux pénicillines, aux tétracyclines et aux macrolides est en constante propagation.

#### **V.1.6. Vaccination [14]**

Des vaccins contenant les sérotypes les plus fréquemment associés aux infections invasives à pneumocoque sont disponibles; le vaccin polysaccharidique contenant 23 sérotypes est disponible et peut être administré à partir de 2 ans (PNEUMO 23®).

### **V.2. *Haemophilus influenzae***

#### **V.2.1. Taxonomie et nomenclature [8,5]**

Le genre *Haemophilus* appartient à la famille des *Pasteurellaceae*, avec les genres *Pasteurella* et *Actinobacillus*. Le genre *Haemophilus* comprend seize espèces d'origine animale et humaine, dont quelques unes sont pathogènes pour l'homme *Haemophilus influenzae* est l'espèce type.

*H. influenzae* a été décrite à tort par Pfeiffer en 1892 comme étant l'agent causal de la grippe sur les bases de données épidémiologiques. En fait, cette bactérie était tout simplement isolée de façon plus fréquente chez les patients atteints de grippe, quelquefois comme agent de surinfection.

La taxonomie des bactéries du genre *Haemophilus* a été souvent remaniée. Le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* répertorie 16 espèces dans le genre *Haemophilus* en fonction des exigences en facteurs X et V.

**Tableau I : Espèces d'*Haemophilus* et exigence en facteurs de croissance X et V**

espèces exigeant facteurs X et V	espèces exigeant facteur X	espèces exigeant facteur V
- <i>H. influenzae</i>	- <i>H. haemoglobinophilus</i>	- <i>H. parainfluenzae</i>
- <i>H. aegyptius</i>	- <i>H. ducreyi</i>	- <i>H. parahaemolyticus</i>
- <i>H. haemolyticus</i>		- <i>H. paraphrohaemolyticus</i>
		- <i>H. pleuropneumoniae</i>
		- <i>H. paracuniculus</i>
		- <i>H. parapprophilus</i>
		- <i>H. segnis</i>
		- <i>H. parasuis</i>
		- <i>H. paragallinarum</i>
		- <i>H. avium</i>

## V.2.2. Caractères bactériologiques [16]

### a) Caractères morphologiques

Dans un produit pathologique ou dans une culture, *H. influenzae* apparaît sous la forme d'un bacille à Gram négatif, immobile, non sporulé, de petite taille (0,5 à 2,4  $\mu$  sur 0,2 $\mu$ ), polymorphe, souvent coccobacillaire, parfois filamenteux.

Le polymorphisme s'observe sur une culture âgée. Certaines souches peuvent présenter une capsule.



**Figure 5: Aspect d' *H. influenzae* après coloration Gram**

### **b) Caractères cultureux**

Les bactéries du genre *Haemophilus* sont des bactéries à croissance difficile car elles nécessitent des milieux qui apportent le facteur X ou hémine et le facteur V ou NAD (nicotinamide adénine dinucléotide).

Le facteur X ou hémine entre dans la composition des enzymes respiratoires contenant du fer (cytochromes, cytochrome oxydase, catalase, peroxydase). Il est indispensable aux bactéries ne possédant pas les enzymes de la chaîne de transformation de l'acide delta aminolévulinique en protoporphyrine. Il est thermostable.

Le facteur V est une coenzyme de déshydrogénase. Le NAD est détruit par un chauffage de 30 minutes à 120°C et ne supporte donc pas l'autoclavage. Le sang frais contient des inhibiteurs du NAD ; la cuisson 15 minutes à 75°C permet leur destruction.

La gélose au sang cuit apporte suffisamment d'hémine et de NAD, mais doit être supplémentée en complément vitaminique. L'incubation en atmosphère humide de 5 à 10 % de CO<sub>2</sub> est recommandée, et la température optimale est de 35 -37°C.

Sur gélose au sang cuit, les colonies sont petites, fines, transparentes, parfois difficilement visibles en 18 heures. Sur milieu approprié, après 24 heures d'incubation, les colonies d'*H. influenzae* ont un diamètre de 1 mm et augmentent de taille en 48 heures. On peut distinguer différents types de colonies :

- les souches capsulées donnent des colonies muqueuses, volumineuses, blanchâtres, ayant tendance à s'étaler ou des colonies lisses, rondes à bord réguliers, bombées, facilement dissociables, iridescentes sur milieu transparent en transillumination oblique.
- Les souches non capsulées donnent des colonies petites, grisâtres, convexes ou plats sans iridescence ou plus rarement de type rugueux, difficile à prélever.

Certaines souches dégagent une odeur d'indole caractéristique.

### **V.2.3. Habitat**

*H. influenzae* est une bactérie commensale de l'oropharynx et du nasopharynx. Les souches peuvent posséder ou non une capsule. Six types capsulaires (a-f) ont été décrits. Dans la flore normale de ces sites anatomiques, on observe une colonisation par les souches non capsulées chez 50 à 80% des individus. Les souches capsulées sont moins fréquentes. On ne les observe que chez 20 à 40% des sujets pour le type b et moins de 1 à 2% pour les autres types capsulaires.

### **V.2.4. Facteurs de virulence et pouvoir pathogène**

#### **V. 2.4.1. Facteurs de virulence [24]**

##### **V.2.4.1.1. La capsule**

Les souches d' *H. influenzae* avec colonies lisses ou muqueuses sont capsulées et peuvent être caractérisées par agglutination ou par précipitation d'une substance soluble spécifique. Six variétés antigéniques (a, b, c, d, e, f) ont été décrites par Pittman, en fonction de la structure antigénique de la capsule du germe. La spécificité de type dépend de la composition en polysaccharides de la capsule.

Seul le polysaccharide de type b est constitué de polyribosyl ribitol phosphate (PRP) est antigénique. La grande majorité des pathologies invasives chez l'enfant (méningites, épiglottites, arthrites, septicémies) est due aux souches capsulées de type b en raison du rôle majeur du PRP comme facteur de virulence. Le type b présente une plus grande résistance à l'activité bactéricide du complément permettant une survie prolongée et une multiplication des germes dans le sang.

##### **V.2.4.1.2. Les lipopolysaccharides (LPS)**

Comme tous les bacilles à Gram négatif, *H. influenzae* possède une membrane externe constituée de protéines, de porines, de phospholipides, et de lipopolysaccharides. Les LPS sont libérés au cours de la lyse des bactéries et exercent une activité endotoxinique sur de nombreuses cellules de l'organisme.

C'est une endotoxine constituée de lipide A, de 2 céto-3 désoxyoctonate et d'oligosaccharides; c'est la lyse des LPS avec libération de lipide A qui est à l'origine du choc septique à *H. influenzae*.

#### **V.2.4.1.3. Pili**

Les pili, visibles en microscopie électronique, sont des appendices filamenteux, longs, fins; ils sont capables d'hémagglutination.

La présence de pili chez *H. influenzae*, confère à la bactérie des propriétés d'adhésion à la muqueuse nasopharyngée. Leur rôle n'apparaît pas obligatoire dans la colonisation de la muqueuse, ni dans la phase d'invasion ultérieure qui, chez l'animal, s'accompagne de la perte des pili. L'adhésion est de faible affinité et la persistance de la colonisation serait liée à la présence de fibrilles, ayant une structure différente de celle des pili.

En raison de leur localisation en surface et de leurs propriétés antigéniques, les pili sont des antigènes qui peuvent être utilisés dans un futur vaccin.

#### **V.2.4.1.4. Immunoglobulines A protéases**

*H. influenzae* produit une enzyme qui a la propriété de cliver les immunoglobines humaines de type A. C'est une protéase extracellulaire, constitutive, d'origine chromosomique spécifique des IgA humaines de la sous classe des IgA1. Elles n'ont aucune action sur les IgA2. Par hydrolyse, elles libèrent les fragments Fab et Fc. Ainsi, *H. influenzae* peut se protéger de la présence locale des IgA sécrétoires spécifiques.

#### **V.2.4.2. Pouvoir pathogène [3]**

*Haemophilus influenzae* est une bactérie commensale des voies respiratoires supérieures. Environ 50% des enfants sont porteurs d' *H. influenzae* dans le nasopharynx; où elle peut entraîner une infection à partir de cette porte d'entrée.

- Les souches invasives : développent la plus grande pathogénicité grâce à la présence d'une capsule (sérotypes: b, le plus fréquent; a et c-f, moins fréquents).

Elles sont généralement responsables de:

- Méningites
- Epiglottites (enfants inférieure à 6 ans), septicémies
- Infections (souvent surinfections) des voies respiratoires basses (pneumonies, bronchites); ces infections sont aussi provoquées par des souches non capsulées.

- Les souches non invasives : ne sont pas encapsulées, mais leur pathogénicité potentielle est associée à certains biotypes. Elles sont généralement responsables de sinusites, d'otites, de conjonctivites.

### V.2.5. Vaccination [19]

Depuis 1990, il existe des vaccins constitués d'extraits polysaccharidiques capsulaires conjugués à des protéines (protéine de la membrane externe de *N. meningitidis*, toxines diphtérique ou tétanique). Ils sont recommandés aux nourrissons à partir de l'âge de 2 mois.

Depuis l'introduction du vaccin contre *H. influenzae* b, il y a une forte baisse des cas de méningites bactériennes à *H. influenzae* b.

**DEUXIEME PARTIE : ETUDE  
EXPERIMENTALE**

## **I. Cadre de l'étude**

Cette étude a été réalisée dans l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie du CHU Aristide Le Dantec de Dakar (HALD) et le service de microbiologie de l'Hôpital Principal de Dakar (HPD).

## **II. Population d'étude**

Les souches utilisées provenaient des souches conservées de la souchothèque du laboratoire.

Ces germes ont été isolés des patients présentant une infection respiratoire aiguë dont la culture bactériologique a permis d'identifier les espèces d'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus pneumoniae*.

Ces souches ont été analysées, identifiées et conservées par les techniciennes du laboratoire de bactériologie-virologie du CHU Aristide Le Dantec de Dakar.

## **III. Matériels et méthode**

### **III.1. Matériel**

#### **Matériels de prélèvement**

- Ecouvillons stériles
- Abaisse-langue
- Seringues
- Sonde
- Aspirateur
- Gants
- Glacière

#### **Matériels d'isolement**

- Anse de platine
- Boîtes de Pétri
- Bec Bunsen
- Jarre d'incubation
- Bougie (Générateur de CO<sub>2</sub>)
- Etuve à 37°C
- Autoclave

### **Matériels d'identification**

- Lames porte-objet
- Violet de Gentiane
- Lugol
- Alcool 95°
- Solution de Fuchsine
- Microscope optique
- Pipettes Pasteur
- Peroxyde d'hydrogène 3%
- Bâtonnets
- Disques d'Optochine
- Désoxycholate de sodium 10%
- Slidex pneumo kit®
- Api NH®
- Disques de facteurs X, V, X+V
- Disque d'oxydase

### **Milieux de culture**

- Gélose au sang (trypticase soja ou Columbia® + Sang de mouton)
- Gélose au sang cuit + facteur de croissance (hémine+ NAD) + Polyvitex®
- Gélose Müeller-Hinton (MH)
- Bouillon hyper salé (BHS)

### **Matériels de conservation des souches**

- Cryotubes (tube Nunc®)
- Ecouvillons
- Lait écrémé

### **III.2. Spectromètre de masse : Vitek MS**

Le spectromètre de masse VITEK MS® est composé d'un automate et d'une unité informatique (Cf. figure 6).

Il est composé d'une chambre d'ionisation, d'une source d'ionisation (laser à azote), d'un tube de vol et d'un détecteur de type TOF.

L'unité informatique permet le traitement des données. La comparaison du spectre obtenu aux spectres de références de la base de données est effectuée par le logiciel MYLA®.



**Figure 6 : spectromètre de masse VITEK MS® et son unité informatique.**

- **Matériels nécessaires pour l'identification par MALDI-TOF**

- Pipettes (0.1-3  $\mu$ l)
- Embouts (0.1-10  $\mu$ l)
- Anses jetables de 1 $\mu$ l
- Lames DS 48 puits (cibles)
- ECAL: Escherichia coli ATCC 8739 pour la calibration
- Matrice : CHCA (Acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique)

La préparation des échantillons est réalisée sur une paillasse dédiée à partir du logiciel MYLA® de BIOMERIEUX (figure 7).



**Figure 7: Organisation de la paillasse de travail pour une analyse VITEK MS®.**

Le code barre de la plaque de dépôt à analyser est scanné au niveau de l'écran sur l'onglet « ID de la cible ».

Le logiciel affiche alors la représentation de la plaque avec les emplacements disponibles pour analyse (figure 8).



**Figure 8: Interface de création MYLA®.**

La plaque est composée de 3 parties de 16 emplacements (soit 48 puits) organisés autour d'un point de dépôt central où il faut déposer la souche d'*Escherichia coli* ATCC8739 « fraîche » de 18 à 24 heures qui sert de contrôle de qualité et qui est déposée de façon centrale par la même technique que celle de la réalisation des dépôts des souches à analyser. Quatre plaques peuvent être introduites simultanément sur le support de plaque qui sera introduit dans la chambre d'analyse de l'automate (figure 9).



**Figure 9: Support de plaque VITEK MS®.**

#### Acquisitions des données et identifications

Le logiciel MYLA® compare le spectre obtenu avec sa base de données et calcule un score de corrélation sur la réalisation de 100 profils. 30 profils constituent le minimum acceptable pour réaliser la comparaison du profil obtenu avec ceux de la base de données.

Les résultats font intervenir deux paramètres, le degré de confiance ou score en pourcentage (figure 10).

**Tableau II: tableau interprétatif du score d'identification.**

score	Degré de confiance
99,9 à 60 %	Bonne identification
< 60 %	Faible probabilité d'identification
Absence de pourcentage	Nombre de profils ou de pics insuffisants

### III.3. Méthodes

#### III.3.1. Méthodes d'identification classiques

Les souches choisies étaient décongelées et repiquées sur des milieux adéquats incubés pendant 24 heures à l'étuve sous atmosphère anaérobie à 37°C. Ces milieux étaient :

- La Gélose Columbia + 5% sang de cheval + gentamicine pour *S. pneumoniae*.
- La Gélose trypticase soja + 5% de sang de cheval + Polyvitex® pour *H. influenzae*.

Ces milieux ont été incubés dans une jarre d'incubation.

#### a) L'identification de *Streptococcus pneumoniae*

##### □ Réalisation des tests d'identification

Les souches étaient ensemencées sur milieu GSC + gentamicine puis incubé à 37°C sous CO<sub>2</sub> pendant 16-18 heures. Des colonies rondes transparentes développant une hémolyse verdâtre type alpha étaient identifiées.

##### - Examen microscopique

L'examen microscopique après coloration Gram des colonies avait montré des diplocoques à Gram positif lancéolés, en flamme de bougie.

##### - Test de catalase

Quelques colonies étaient étalées sur une lame qui, en contact avec quelques gouttes d'eau oxygénée (péroxyde d'hydrogène) il n'y avait pas de production de bulles d'air.

##### - Test d'oxydase

Le chlorhydrate de 4, 4, 4, 4 tétraméthyl-p-phénylène diamine incolore a été oxydé en un composé violet à noirâtre par les bactéries qui possèdent le système cytochrome C. A l'aide d'une pipette pasteur ou un bâtonnet en bois, une colonie était prélevée et étalée sur un disque imprégné de 4, 4, 4,4, tétraméthyl-p-phénylène diamine. Il n'y avait pas de changement de coloration.

##### - Test de sensibilité à l'Optochine

Une colonie alpha-hémolytique a été prélevée avec une anse stérile et ensemencée en stries sur gélose au sang ordinaire. Ensuite, le disque imprégné d'Optochine de 6 mm de diamètre (contenant 5 µg d'éthylhydrocupréine) a été déposé au milieu de la boîte ensemencée. Enfin, le milieu a été incubé pendant 18 à 24 heures à 35°C sous atmosphère riche en CO<sub>2</sub>. Sur la

gélose incubée précédemment, on mesurait le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque d'Optochine. La souche était sensible si le diamètre était supérieur à 14 mm.

#### **- Test de lyse par les sels biliaires**

Une goutte de solution de désoxycholate de sodium à 10% a été déposée sur quelques colonies de la souche. La boîte de Pétri, sans être retournée et à moitié ouverte a été placée à l'étuve en aérobie à 37°C pendant une quinzaine de minutes. On notait la disparition des colonies.

#### **- Test d'agglutination au latex (pneumo kit)**

Sur 2 cercles différents d'une carte d'agglutination, on a déposé une goutte d'eau physiologique pour mettre en suspension quelques colonies prélevées à l'aide de l'anse. Dans le premier cercle, on a déposé une goutte de latex anti pneumoniae (R1) tandis que dans le second cercle, on a déposé une goutte de latex témoin (R2). On mélangeait à l'aide de bâtonnet les colonies en suspension et le réactif latex pendant environ 2 minutes. Le test était positif en présence d'agglutination.

### **b) L'identification de l' *Haemophilus influenzae***

#### **□ Réalisation des tests d'identification**

Les souches étaient ensemencées sur GSC + polyvitex® incubé à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 16-18 heures. Les colonies suspectes étaient de petites tailles, rondes comme des gouttes de rosée et pas d'hémolyse.

#### **- Examen microscopique**

L'examen microscopique des colonies après coloration de Gram, montrait la présence de petits bacilles ou de coccobacilles à Gram négatif.

#### **- Test à la catalase**

Il y avait une libération des bulles d'air en mettant en contact quelques colonies et l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène).

#### **- Test à l'oxydase**

Les colonies étaient oxydase positive en contact avec le disque imprégné de 4, 4, 4,4, tétraméthyl-p-phénylène diamine, provoquant l'apparition d'une coloration violette à noir.

- **Mise en évidence de l'exigence en facteurs X et V**

Une suspension dense de bactéries à 0.5 Mc Farland a été préparée à partir de colonies pures. La suspension était ensemencée en stries à l'aide d'un écouvillon stérile sur une boîte de gélose MH. Les disques contenant les facteurs X, V et XV étaient déposés sur la gélose à égale distance. Les colonies suspectes ne poussaient qu'autour du disque contenant les deux facteurs X et V.

- **Mise en évidence du phénomène de Satellitisme :**

Ce test a permis de confirmer l'exigence en facteurs V apportés par une souche de *S. aureus* sur gélose au sang de cheval contenant le facteur X. En effet sur une boîte de GSO, on a ensemencé en stries serrées quelques colonies pures d'*H. influenzae* ; puis une strie de souche viable de *S. aureus* de 24 heures au milieu de la boîte. Le milieu GSO a été incubé pendant 24 heures à 37°C sous atmosphère riche en CO<sub>2</sub> (5%). Après incubation, on a observé une pousse tout autour de la strie de staphylocoque et aucune pousse sur le reste de la boîte.

**III.3.2. Méthodes d'utilisation du MALDI-TOF :**

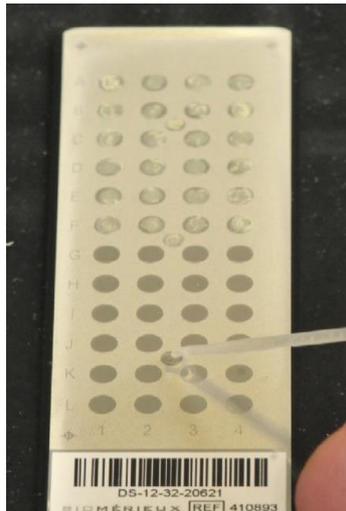
a. Préparations des échantillons pour analyse par MALDI- TOF

Les souches conservées à -20°C sur Cryo-tubes, étaient repiquées sur des milieux enrichis : principalement une gélose sang (sang de cheval) et gélose chocolat Polyvitex pour les germes exigeants.

Les boîtes étaient ensuite incubées à 37°C pendant 15 à 18 heures sous atmosphère anaérobie avant dépôt des colonies pour analyse.

b. identification des souches sur MALDI-TOF

Après réalisation au point de dépôt central d'un fin frottis de la souche d'*Escherichia coli* ATCC8739 « fraîche » de 18-24 heures de culture servait de contrôle de qualité, les souches à analyser étaient ensuite déposées sur les puits de la plaque. Les colonies étaient étalées grâce à une öse en un très fin frottis sur l'emplacement dédié (figure 10).



**Figure 10: dépôt du contrôle de qualité sur plaque BIOMERIEUX**

Ensuite, il faut ajouter immédiatement à cet étalement la matrice CHCA afin que l'échantillon et la matrice co-cristallisent à l'air libre (figure 11).



**Figure 11: dépôt de matrice**

Il faut noter l'identification de l'échantillon à tester dans la zone « ID Echantillon » et préciser d'emblée s'il s'agit de l'analyse d'une souche bactérienne ou bien d'une souche mycologique. En effet, le spectre obtenu était comparé à la base de données selon qu'il s'agit d'une bactérie ou d'une levure.

Une fois que les dépôts successifs des échantillons à analyser ont été réalisés, les données de la plaque doivent être transférées à l'automate de spectrométrie de masse.

La plaque était ensuite introduite dans le spectromètre de masse pour analyse (figure 12).



**Figure 12: insertion du support de plaque dans l'automate VITEK MS®.**

## IV. Résultats

### IV.1. Identification des souches d'*Haemophilus influenzae* par MALDI –TOF

Tableau III : Identification des souches d'*Haemophilus influenzae* avec MALDI-TOF

SOUCHES	MALDI-TOF		Score d'identification
	GENRE	ESPECE	%
N° 1	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	80,7
N° 2	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	75,6
N° 3	<i>Haemophilus</i>	<i>haemolyticus</i>	0
N° 4	<i>Haemophilus</i>	<i>haemolyticus</i>	0
N° 5	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	99,9
N° 6	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	93,8
N° 7	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	99,9
N° 8	<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	77,4
N° 9	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	99,9
N° 10	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	99,9
N° 11	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	75,5
N° 12	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	88,6
N° 13	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	99,9
N° 14	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	0
N° 15	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	0

Sur les 15 souches d'*Haemophilus influenzae* identifiés par les méthodes classiques, seules 12 souches ont donné le profil d'*Haemophilus influenzae* avec Malditof. Cependant 3 souches ont été identifiées comme : *Haemophilus parainfluenzae* (n=1) et *Haemophilus haemolyticus* (n=2) avec un score égal à zéro.

Sur les 12 souches identifiées comme *Haemophilus influenzae*,

- cinq (n=5) souches avaient un score de 99,9 %,
- cinq (n=5) avec un score supérieur à 75%
- deux (n=2) avec un score égal à zéro.

#### IV.2. Identification des souches de *Streptococcus pneumoniae* avec MALDI-TOF:

**Tableau IV : Identification des souches de *Streptococcus pneumoniae* avec MALDI-TOF**

souches	MALDI-TOF		Score d'identification
	genre	espèce	%
N° 1	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	75 ,1
N° 2	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	80,1
N° 3	<i>Streptococcus</i>	<i>pseudopneumoniae</i>	0
N°4	<i>Streptococcus</i>	<i>pseudopneumoniae</i>	0
N°5	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	84,4
N°6	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	80 ,2
N°7	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	76 ,5
N°8	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	85,1
N°9	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	0
N°10	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	84,3
N°11	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	85,5
N°12	<i>Streptococcus</i>	<i>Anginosus</i>	99 ,9
N°13	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	75
N°14	<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus(S.milleri)</i>	99 ,9
N°15	<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus(S.milleri)</i>	0
N°16	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis/oralis/pneumoniae</i>	0
N°17	<i>Streptococcus</i>	<i>Sp</i>	0
N°18	<i>Streptococcus</i>	<i>Sp</i>	0
N°19	<i>Streptococcus</i>	<i>Sp</i>	85

Sur les dix neuf (19) souches de *Streptococcus pneumoniae* identifiées par les méthodes classiques, le Malditof n'a pas pu identifier avec précision les souches testées. Plusieurs espèces ont été identifiées à la fois :

- *Streptococcus mitis/oralis/pneumoniae* (n=11)
- *Streptococcus pseudopneumoniae* (n=2)
- *Streptococcus anginosus* (n=1)
- *Streptococcus anginosus /milleri* (n=2)
- *Streptococcus sp* (n=3)

## V. Discussion

Cette étude a été réalisée au niveau de l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne de l'HALD et au service de Microbiologie de l'HPD, elle avait comme objectif de comparer l'identification des souches d'*Haemophilus influenzae* (n=15) et de *Streptococcus pneumoniae* (n=19), isolées dans les IRA par méthodes d'identification classiques et par l'automate MALDI-TOF.

Le nombre de souches manipulées était faible, cependant cette approche d'étude a pour objet de tester les performances du MALDI-TOF, malgré sa rapidité et sa précision dans l'identification de l'ensemble des souches, l'automate a du mal à identifier l'espèce *Streptococcus pneumoniae* avec acuité. En effet, sur les 19 souches testées et bien identifiées avec les méthodes classiques, le MALDI-TOF n'a pas donné une identification précise pour l'espèce pneumocoque. Cette absence d'identification du pneumocoque par le MALDI-TOF pourrait être liée au problème d'étalement de la colonie sur la cible, en effet, si la colonie est difficile à prélever surtout avec les colonies muqueuses, la lecture au MALDI-TOF donne un mauvais score d'identification.

L'identification des souches d' *Haemophilus influenzae* avec le MALDI-TOF a montré une très bonne identification de cet automate pour cette bactérie (12 souches identifiées). Cependant 2 étaient identifiées par le MALDI-TOF à l'espèce *Haemophilus influenzae* avec un score d'identification égal à zéro, ce qui témoignerait d'un nombre de pics insuffisants.

Les perspectives de développement de cette technique sont nombreuses et les études réalisées semblent encourageantes. Le délai d'identification des septicémies pourrait être encore réduit par la réalisation d'une identification directement à partir du bouillon de cultures des hémocultures [9,13][37,20]. Il semble également possible de détecter directement sur des colonies bactériennes la présence de facteurs de virulence tels que la toxine chez *Staphylocoque aureus* [21,6][25] ou encore le profil de résistance à certains antibiotiques lié à la présence d'une pénicillinase, d'une carbapénémase ou d'une BLSE (bêtalactamase à spectre étendu) [7,15].

L'arrivée du spectromètre de masse MALDI-TOF pour l'identification bactérienne dans les laboratoires de bactériologie est une avancée majeure et les perspectives d'adaptation de cette méthode afin d'apporter des diagnostics précis, fiables et plus précoces sont encourageantes. L'acquisition du MALDI-TOF a modifié le processus analytique du laboratoire en permettant

d'identifier les colonies isolées en moins d'une minute, ceci permettra d'identifier le ou les germes responsables de l'infection afin d'améliorer la prise en charge des patients.

De nouvelles études seront cependant nécessaires afin de s'assurer de la pertinence de l'application de ces techniques en bactériologie de routine et afin de permettre d'assurer la qualité des analyses réalisées.

## Conclusion

Cette étude avait pour objectif de comparer l'identification des souches d' *Haemophilus influenzae* (n=15) et de *Streptococcus pneumoniae* (n=19) isolées dans les IRA par les méthodes classiques et le MALDI-TOF.

Le MALDI-TOF donnait une bonne identification d' *Haemophilus influenzae* (12 des 15 souches utilisées).

L'analyse des souches de pneumocoque (identifiées classiquement) n'était pas satisfaisante avec le MALDI-TOF qui n'avait pas identifié l'espèce *Streptococcus pneumoniae*.

L'absence d'identification des souches de pneumocoque aurait été probablement due à l'étalement de la cible. En effet si la colonie est difficile à prélever ou trop muqueuse, le MALDI-TOF ne donnait aucun résultat.

Cependant, des récentes études sur le traitement à l'acide formique 25% des souches permettait une bonne identification de l'espèce *Streptococcus pneumoniae*.

A l'avenir, des améliorations continues apportées sur le MALDI-TOF pourront permettre de surmonter les limites de cet automate pour identifier la plupart des espèces bactériennes.

Ce qui pourrait être une voie dans l'identification de pathogènes bactériens présents dans les produits pathologiques monomicrobiens purs tels que l'hémoculture, le LCR. Ce qui serait un pas important dans la prise en charge des pathologies bactériennes et un gain de temps dans la prise en charge des patients par les cliniciens.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- [1]. **Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, BELLOUNI R.** *Antibiothérapie dans les infections ORL.* Med Maghreb 2001 ; 91: 28-31.
- [2]. **Archambaud M, Clavé D, Grosjean J, Pasquier C.** Bactériologie et virologie pratique. Groupe de Boeck; 2009.
- [3]. **Barthel D, Singh B, Riesbeck K, Zipfel PF.** *Haemophilus influenzae uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity.* J Immunol 2012; 188(1):379-85
- [4]. **Bertha A.** *Streptococcus pneumoniae infections.* X Pharm. 2007, pp. 1-5.
- [5]. **Biberstein, Kilian m. & E. L.** *Haemophilus influenzae In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 1, The Williams & Wilkings . Co., Baltimore, 1917.*
- [6]. **Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain J-M.** MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009;34(5):467-470.
- [7]. **Cai JC, Hu YY, Zhang R, Zhou HW, Chen G-X.** Detection of OmpK36 Porin Loss in Klebsiella spp. by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2179-2182.
- [8]. **Clegbaza SF.** *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae et Moraxella catarrhalis dans les infections respiratoires basses communautaires à Dakar. Isolement bactérien et sensibilité aux antibiotiques.* Thèse Pharm., Dakar, 2000, n°81
- [9]. **Drancourt M.** Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010;16(11):1620-1625.
- [10]. **Ferron A.** *Bactériologie médicale.* 12ème Ed. 1, 1984.
- [11]. **Freney J.** *Précis de bactériologie clinique.* ESKA, 2000. pp. 891-893.
- [12]. **Gueye A, Boye CSB, Edwige H, et al.** *Antimicrobial susceptibility of select respiratory tract pathogens in Dakar, Senegal.* J Infect Dev Ctries 2009; 3(9):660-6.

[13]. **La Scola B, Raoult D.** Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE*. 25 nov 2009;4(11):e8041.

[14]. **Ludwig E, Mészner Z,** Hungarian Society of Infectious Disease and Clinical Microbiology, Vaccinology Section. *Prevention of Streptococcus pneumoniae (pneumococcal) infections in adults*. *Orv Hetil* 2014;155(50):1996-2004.

[15]. **Majcherczyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P.** The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;255(2):233-9.

[16]. **Mangane M.** *Sensibilité aux antibiotiques de Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenzae et Moraxella catarrhalis isolés d'infections respiratoires aiguës*. Thèse Pharm., Dakar, 2004, n°74.

[17]. **Mayaud C, Parrot A, Houacine S, et al.** *Epidémiologie des germes responsables au cours de pneumopathies communautaires*. *Rev Pneumol Clin* 1992 ; 48(3) :101-110.

[18]. **Ngombe LK, Mbombo D, Kameya N, et al.** Infection respiratoire aiguë et statut nutritionnel chez les enfants de 0-5 ans: cas des cliniques universitaires de Lubumbashi, République Démocratique du Congo. *Pan African Medical Journal*. 2014; 19:393.

[19]. **OMS.** Bureau regional pour l'Afrique. *Reseau de surveillance de la méningite à Haemophilus influenzae type b et autres méningites bactériennes en milieu pédiatrique (Hib-MBP)*. Manuel de surveillance. Version d'essai sur le terrain, 2001. pp. 5-17.

[20]. **Prod'hom G, Bizzini A, Durussel, Bille J, Greub G.** Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1481-1483.

[21] **Rose NL, Sporns P, McMullen LM.** Detection of Bacteriocins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65(5):2238-2242.

[22]. **Société Française de Microbiologie.** REMIC. 4ème édition. 2010.

[23]. **Standard Operating Procedure.** *Identification of Streptococcus species, Enterococcus Species And morphologically Similar Organisms*. Health Protection Agency 2003, pp. 1-17.

[24]. **Sulikowska A, Grzesiowski P, Sadowi E, et al.** *Characteristics of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis isolated from the nasopharynges of asymptomatic children and molecular analysis of S. pneumoniae and H. influenzae replacement strain in the nasopharynx.* *J Clin Microbiol* 2004; 42(9):3942-3949.

[25]. **Szabados F, Becker K, Von Eiff C, Kaase M, Gatermann S.** The matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based protein peaks of 4448 and 5302 Da are not associated with the presence of Pantone-Valentine leukocidin. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011;301(1):58-63.

[26] Wikipedia. (17 août 2014). *Wikipedia, L'encyclopédie libre* [Page Web]. Accès : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrom%C3%A8tre\\_de\\_masse](http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrom%C3%A8tre_de_masse) (page consultée le 17 août 2014)

[27] Sellier, N. & Morin, N. (4 novembre 2002). *CultureSciencesChimie* [Page Web]. Accès : <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/quest-ce-que-la-spectrometrie-de-masse-751> (page consultée le 17 août 2014)

[28] Wikipedia. (17 août 2014). *Wikipedia, L'encyclopédie libre* [Page Web]. Accès : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Joseph\\_John\\_Thomson](http://fr.wikipedia.org/wiki/Joseph_John_Thomson) (page consultée le 17 août 2014)

[29] Koichi, T. (8 décembre 2002). *The Official Web Site of the Nobel Prize* [Page Web]. Accès: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2002/tanaka-lecture.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/tanaka-lecture.pdf)(page consultée le 18 août 2014)

[30] The Official Web Site of the Nobel Prize [Page Web]. Accès : [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2002/tanaka-autobio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/tanaka-autobio.html) (page consultée le 18 août 2014)

[31] Tonella, M. & Petrini, O. (27 mai 2011) *Application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans le diagnostic microbiologique* [Présentation power point]. Bellinzona : Cantonal Institute of Microbiology

[32] Wikipedia. (27 mai 2009). *Wikipedia, L'encyclopédie libre* [Page Web]. Accès : [http://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9sorptionionisation\\_laser\\_assist%C3%A9e\\_par\\_matrice](http://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9sorptionionisation_laser_assist%C3%A9e_par_matrice)(page consultée le 24 février 2015)

[33] Young, S. (24 février 2004). The Mauritz Research Group [Page Web]. Accès : <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/maldi.html> (page consultée le 24 février 2015)

[34] Ashcroft, A. E. The Astbury Centre for Structural Molecular Biology [Page Web]. Accès : <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>(page consultée le 24 Février 2015)

[35] Massachusetts Institute of Technology. (12 juin 2008). *Massachusetts Institute of Technology* [Page Web]. Accès : [http://web.mit.edu/speclab/www/PDF/DCIF-MALDI\\_sample\\_prep.pdf](http://web.mit.edu/speclab/www/PDF/DCIF-MALDI_sample_prep.pdf) (page consultée le 2 mars 2015)

[36] Leblanc, B. (15 juillet 2011). Université de Sherbrooke [Page Web]. Accès : <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/6a.html> (page consultée le 10 août 2014)

[37]. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of Bacteria in Blood Culture Broths Using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper(TM) and Time of Flight Mass Spectrometry. PLoS One [Internet]. 2011 [cité 1 mars 2013];6(8). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3156714/>