



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département : de Microbiologie Générale**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes**

**Intitulé:**

**MALDI -TOF spectrométrie de masse : Un  
outil efficace pour l'identification rapide  
et fiable des souches bactériennes**

**Présenté et soutenu par :**

**Soutenu le : 19/06/2016**

**- BENDOUKHANE HADJER**

**- DJAAFER KAOUTHER**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente : Mme. MERGOUD L.**

**M.A.A.U.F.Mentouri Constantine**

**Rapporteur : Melle MEZIANI M.**

**M.A.A.U.F.Mentouri Constantine**

**Examineur: Melle BELMASSIKH A.**

**M.A.A.U.F.Mentouri Constantine**

**Année universitaire  
2015 - 2016**

## *Remerciement*

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a aidés et menés vers le chemin du savoir*

*Nous adressons notre remerciement à mademoiselle MEZIANI MERIEME l'encadreur de notre mémoire pour l'effort fournis et pour ses précieux conseils, sa confiance et sa persévérance dans la suivi ,tout au long de la réalisation de ce travail .*

*Nos vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par Mme MERGOUD LILIA qui nous a fait l'honneur de présider notre jury. A Melle BELMESSIKH AICHA d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail .*

*Nous adressons également nos remerciements , à tous nos enseignants, qui nous ont données les bases de la science .*

*A toute personne qui a participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail .*

*H.Bendoukhane,K.Djaafer*

## *Dédicace*

*Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous avoir guidé vers le droit chemin.*

*Je dédie ma chère mère , mon très cher père pour leur amour inestimable , leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

*A mes chers frères: Trek, Nabil, et Fouzi .*

*A mes chères sœurs: Lebna, et Houda .*

*A mes chères amies: Hadjer, Marwa ,et Meriem .*

*A tous ma famille maternelle et paternelle .*

*A mon binôme Kaouther*

*A tous ce qui me sont chères*

*A tous mes camarades de promotion, surtout Faiza, Hassiba, Assia, Lina et Amina.*

**BENDOUKHANE HADJER**

## *Dédicace*

*Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous avoir guidés vers le droit chemin.*

*J'exprime ma profonde affection:*

*À mes parents Mohamed saleh et Habiba pour leur soutien constant, leur amour et leurs mots d'encouragement qui m'ont permis de me rendre ici aujourd'hui.*

*À ma soeur Houda.*

*À mes frères Ahmed et Abdel aziz et Sofiane.*

*À toute la famille DJAAFER et la famille BENDOUKHANE et surtout ma tante Mouna .*

*À mon binôme Hadjer*

*À mes amies Imane, Amina , Zahra et*

*Bouchra pour m'avoir soutenu, encouragé et conseillé.*

*À tous ce qui me sont chères.*

**DJAAFER KAOUTHER**

## TABLE DES MATIERES

### **PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: Les <i>Enterobacteriaceae</i> .....	4
<b>I. Les <i>Entérobactéries</i></b> .....	4
1. Définition .....	4
2.taxonomie.....	4
2.1.Historique.....	4
2.2. Habitat.....	5
2.3.Classification.....	5
3.Les caractères bactériologiques.....	6
3.1. Caractères morphologiques .....	6
3.2. Caractères cultureux.....	6
3.3. Caractères biochimiques .....	6
4.Caractères antigéniques .....	8
<b>II. Etude principale d'espèce ( <i>Escherichia coli</i> )</b> .....	9
1.Historique .....	9
2.Définition .....	10
3.Classification .....	10
4.Habitat et réservoir .....	12
5.Caractères bactériologiques .....	12
5.1.Caractères morphologiques et cultureux .....	12
5.2.Caractères biochimiques .....	12
6.Caractères antigéniques .....	13
7.pouvoir pathogène.....	13
CHAPITRE II: Méthodes d' identification.....	14
1.Galerie des testes biochimique classique.....	14
1.1.Mise en évidence du type respiratoire.....	14
1.2. Recherche de la catalase.....	14
1.3. Recherche de l'oxydase.....	15
1.4. Recherche de la nitrate-réductase.....	15
1.5. Les tests biochimiques du catabolisme des glucides.....	16

1.5.1. Etude de la voie d'attaque des glucides.....	16
1.5.2. Milieux glucidiques pour bactéries fermentatives.....	16
1.5.3. Milieu mannitol-mobilité.....	18
1.5.4. Le milieu RM-VP (bouillon Clark et Lubs).....	19
1.5.5. L'utilisation du citrate de sodium.....	19
1.6. Les tests biochimiques du catabolisme des protéines.....	20
1.6.1. La désamination.....	20
1.6.2. La décarboxylation.....	20
1.7. Milieu urée-indole.....	21
1.7.1. Recherche de l'uréase.....	21
1.7.2. Recherche de l'indole.....	21
1.7.3. Test TDA.....	21
2. Le système API.....	22
2.1. Galerie API 20 E.....	22
2.1.1. Objet du test.....	22
2.1.2. Principe.....	22
3. La spectrométrie de masse MALDI TOF.....	24
3.1. Introduction.....	24
3.2. Principe .....	26
3.3. La matrice .....	26
3.4. Désorption-Ionisation .....	28
3.5. La spectrométrie à temps de Vol ( TOF).....	28
3.6. Le spectre.....	30

## **PARTIE II : MATERIEL ET METHODES**

1. Matériel.....	31
1.1. Les souches étudiées.....	31
2. Méthodologie.....	31
2.1. Analyse bactériologique.....	31
2.1.1. Coloration de GRAM.....	31
2.1.2. Préparation de la suspension bactériennes.....	32
2.1.3. Les tests biochimiques.....	32
2.2. Etudes moléculaires .....	34
2.2.1. Spectromètre MALDI-TOF ( Microflex).....	34

**PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

**1. Résultats.....36**

**2. Discussion.....41**

**PARTIE IV : CONCLUSION.....44**

**PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....45**

**ANNEXE.....**

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADH** : Arginine di hydrolase

**API** : interfacede programmation applicative

**CHCA** : l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique

**DHB**: dihydroxybenzoïque

**LDC** : Lysine décarboxylase

**m/z**: Masse/charge

**MALDI-TOF**: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight

**MS Mass**: Spectrometry

**ODC** : Ornithine décarboxylase

**ONPG** : Orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside

**pH** : potentiel hydrogène

**RM** : Rouge de Méthyle

**TDA** : Tryptophane désaminase

**TSI** : Triple Sugar Iron

**VF** : viande foie

**VP** : Vosges-Proskauer



## LISTES DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Classification des espèces d'entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine .....	6
<b>Tableau 02 :</b> Les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés .....	9
<b>Tableau 03:</b> Classification d' <i>Escherichia coli</i> .....	10
<b>Tableau 04:</b> Caractères biochimiques d' <i>E. coli</i> .....	12

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01:</b> Observation microscopique de la morphologie des Entérobactéries x100.....	3
<b>Figure 02:</b> Observation microscopique de la morphologie des Enterobacteries mobile par flagelle péritriches x1000.....	3
<b>Figure 03:</b> Schéma représentant les différents antigènes (K,O,H) des Enterobacteries.....	7
<b>Figure 04:</b> <i>Escherichia coli</i> sous microscope électronique.....	11
<b>Figure 05:</b> systèmes d'identification Spectrométrie de Masse de type MALDI-TOF microflex.....	23
<b>Figure 06:</b> Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF..	25
<b>Figure 07:</b> Principe d'ionisation par la technique MALDI.....	27
<b>Figure 08:</b> Technique Time of flight (TOF).....	27
<b>Figure 09:</b> Spectre MALDI-TOF.....	29
<b>Figure 10:</b> Observation microscopique après coloration de Gram.....	36
<b>Figure 11:</b> Aspect du milieu TSI.....	37
<b>Figure 12:</b> l'aspect milieu mannitol -mobilité.....	37
<b>Figure 13:</b> Aspect du test VP positif.....	38
<b>Figure 14:</b> Test RM.....	38
<b>Figure 15:</b> Aspect du milieu citrate de Simmons.....	39
<b>Figure 16:</b> Test uréase.....	39
<b>Figure 17:</b> Test d'indole.....	40
<b>Figure 18:</b> Test de la catalase.....	40

## ملخص

تم عزل 200 سلالة بكتيرية من عدة عينات تم الحصول عليها من مخبر الميكروبيولوجيا وعلم الجراثيم (بالمستشفى الجامعي ابن باديس قسنطينة). وقد تم تحديدها والتعرف على انواعها بواسطة الاساليب الميكروبيولوجية القياسية (البيوكيميائية) وبواسطة الاساليب الجزيئية بقياس الطيف الكتلي (Maldi TOF. MS). الـ 200 سلالة المدروسة بواسطة الاساليب البيوكيميائية, كل السلالات تنتمي الى سلالات الامعائيات *Enterobacteriaceae* وكلها عصيات سلبية الغرام التي تتوافق مع النوع *Escherichia coli*. وحددت هذه السلالات بواسطة خصائصها البيوكيميائية. تحديد ثاني بواسطة الاساليب الجزيئية باستعمال قياس الطيف الكتلي (Maldi TOF. MS) للتأكيد. التحليل أثبت أن من بين 200 سلالة, 160 سلالة تتوافق مع النوع *Escherichia coli* و 40 سلالة تتوافق مع الانواع الاتية:

*Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoneae*, *Enterobacter cloacae*.

اذن قياس الطيف الكتلي هو اداة فعالة لتحديد سريع ودقيق وموثوق بها للسلالات البكتيرية.

**الكلمات المفتاحية:** الامعائيات, النمط الظاهري البيوكيميائي, قياس الطيف الكتلي (Maldi TOF. MS)

## RESUME

Deux-cents souches bactériennes ont été isolées à partir des prélèvements cliniques fournies par le laboratoire de bactériologie (CHU). Elles ont été identifiées par les méthodes microbiologiques standardisées (galerie biochimique) et par des méthodes moléculaires spectrométrie de masse MALDI ToF.MS .Toutes les souches ont été étudiées par la galerie biochimique, elles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et sont tous des bacilles à Gram négatif qui sont compatibles avec l'espèce *Escherichia coli*. Ces souches ont été identifiées présomptivement selon leurs caractères biochimiques. Une seconde analyse ont été réalisé par les méthodes génotypiques, en utilisant le spectromètre de masse Maldi ToF.MS pour la confirmation. L'analyse montré que Parmi les souches, 160 souches correspondent à l'espèce *Escherichia coli* et 40 souches correspondent aux espèces suivantes:

*Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* , *Enterobacter cloacae*.

donc la spectrométrie de masse Maldi TOF MS est un outil efficace pour l'identification rapide et fiable des souches bactériennes .

**Mots clés :** Entérobactéries, phénotype biochimique, spectromètre de masse Maldi TOF. MS

## **ABSTRACT**

Two hundred bacterial strains were isolated from clinical specimens provided by the bacteriology laboratory (CHU). They were identified by standard microbiological methods (biochemical gallery) and molecular mass spectrometry methods MALDI TOF. All strains were studied by biochemical gallery, all strains belong to the family *Enterobacteriaceae* and are all Gram-negative bacilli that are consisted with the species *Escherichia coli* strains . These were presumptively identified by their biochemical characters. A second analysis was performed by genotypic methods, using the MALDI TOF mass spectrometer for confirmation. The analysis showed that among the strains, 160 strains correspond to the species *Escherichia coli* and 40 strains correspond to the following species:

*Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* , *Enterobacter cloacae*.

So the MALDI TOF mass spectrometry is an effective tool for the rapid and reliable identification of bacterial strains.

**Key-words:** Enterobacteria, Biochemical phenotype, mass spectrometry MALDI TOF.MS .

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Les techniques d'identification de microorganismes mises à la disposition des microbiologistes ne cessent de progresser. Généralement, les méthodes d'identification utilisées en routine dans les laboratoires de microbiologie sont des méthodes dites conventionnelles et reposent essentiellement sur des tests phénotypiques et/ou biochimiques.

Plus spécifiquement, la microbiologie se consacre à l'identification et à la caractérisation des micro-organismes, à l'étude de leur origine et de leur évolution, à définir leurs caractéristiques, les produits de leurs activités et leurs besoins, et à comprendre les relations qu'ils entretiennent entre eux et avec leur milieu naturel ou artificiel. L'identification des bactéries se fait suivant une clé dichotomique qui va des caractères les plus vastes aux plus pointus pour aboutir à une espèce bactérienne donnée.

Le pouvoir discriminant des méthodes conventionnelles reste assez limité et présente un délai d'identification d'environ 1 à 3 jours.. De plus, ces méthodes donnent seulement une identification au niveau du genre et/ou de l'espèce et ne sont souvent pas applicables pour une identification au niveau de la sous-espèce (typage), ce qui peut être important lors de la suspicion ou de risque de situation épidémique dans le domaine médical. Au cours des dix dernières années, des méthodes génotypiques ont été proposées en utilisant des techniques de biologie moléculaire. Leur pouvoir de discrimination est généralement élevé par rapport aux techniques phénotypiques. Cependant, ces méthodes génotypiques ont également leurs limites, à savoir la complexité des protocoles, le savoir-faire nécessaire pour maîtriser ces systèmes, le coût des réactifs, l'utilisation de sondes ou de séquences nucléotidiques spécifiques pour chaque espèce, et enfin le délai important nécessaire pour l'identification. Il faut noter également qu'il n'existe pas de méthode moléculaire générale pour tous les microorganismes et pour la majorité de ces techniques moléculaires, leur valeur comme outils épidémiologiques n'a été que partiellement établie [39]. Ces difficultés ont conduit au développement de méthodes alternatives, le plus souvent des méthodes de chimie analytique.

Parmi les applications récentes de technologies émergentes figure la spectrométrie de masse [40]. Cette technique permet de définir des masses différentes à une précision moléculaire. Elle peut théoriquement s'appliquer à la définition des microorganismes grâce à l'exploration des protéines abondantes qui font l'objet des plus grandes attentions pour ce type d'applications donc est une méthode analytique simple et rapide qui permet d'analyser ce genre de molécules en spectrométrie de masse [41].

Nous nous concentrons dans ce travail sur les capacités d'un système d'identification MALDI-TOF spectrométrie de masse pour identifier les isolats bactériens cliniques, par rapport au système d'identification classiques utilisé en routine dans les laboratoires médicales.

Par rapport à cette situation, nous avons tracé les objectifs suivants:

- Réaliser une identification présomptive de 200 souches bactériennes en se basant sur le phénotype biochimique par l'analyse d'un ensemble de caractères liés aux activités enzymatiques et aux différentes voies métaboliques de ce groupe bactérien .

- Faire une analyse moléculaire des résultats grâce à système d'identification MALDI-TOF.



# BIBLIOGRAPHIE

## Chapitre 1: Les *Enterobacteriaceae*

### I. Les Entérobactéries

#### 1. Définition

La famille des *Enterobacteriaceae* est une famille hétérogène, elle comprend de nombreux genres bactériens qui sont rassemblés selon leurs caractères bactériologiques communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif ( Figure 01 ), non sporulés, ils sont aérobies-anaérobies facultatifs et se développent sur milieu ordinaire (18 à 24 heures à PH neutre à 37°C ). Ils sont dépourvus d'oxydase, possédant une catalase et ont la faculté de fermenter le glucose en acides avec ou sans production de gaz, mais aussi de réduire les nitrates en nitrites. Ils ont une mobilité variable en fonction de la présence ou non de flagelles ( Figure 02 ) [1] .

Les entérobactéries ont une composition caractéristique des bases constituant leur ADN (GC% compris généralement entre 50% et 60%), ce qui permet de les différencier des *Pseudomonas* et des *Vibrionaceae* [2] .

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production ou non des sulfures, la production d'indole, la production d'uréase, la présence ou l'absence d'enzyme du métabolisme (désaminase, décarboxylase)...etc [3] .

La famille des entérobactéries regroupe de nombreuses espèces qui sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux où ils sont retrouvés soit à l'état de colonisateurs normaux de ce tube digestif soit à l'état de pathogènes. Les Entérobactéries sont très répandues dans la nature, on les retrouve également dans le sol et les eaux en raison de la contamination de l'environnement par l'intermédiaire des matières fécales animales et humaines et des eaux d'égout [1].

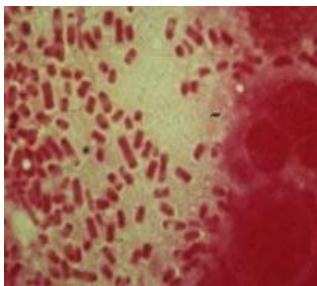


Figure 01: Observation microscopique de la morphologie des *Entérobactéries* x 100

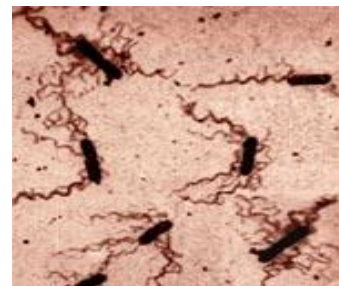


Figure 02: Observation microscopique de la morphologie des *Enterobacteries* mobile par flagelle péritriche x100

## 2. Taxonomie

### 2.1. Historique

La période de naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* se situe entre 1937 lorsque Otto RAHN proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquels on trouvait déjà des noms tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* ou *Shigella*.

Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67. Avec les travaux de DON BRENNER et de PATRICK A.D. GRIMONT, cette famille a connu un essor et beaucoup de nouveaux genres et espèces furent découverts.

- ✓ En 1972, EDWARD et EWING intégraient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*.
- ✓ En 1973, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés.
- ✓ En 1985, FARMER et COLL décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques [4].

### 2.2. Habitat

Les *Entérobactéries* sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux où ils sont retrouvés soit à l'état de pathogène, soit à l'état de commensaux. Mais cette localisation digestive n'est pas exclusive.

On les retrouve également dans l'environnement (sols, eau) où ils participent à la dégradation des matières organiques, à l'altération des plantes suite à des nécroses, à une dégénérescence ou à un ramollissement [5].

### 2.3. Classification

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*. Cette classification est résumée dans le tableau suivante:

Tableau 1 : Classification des espèces d'entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine [6]

<b>Groupes</b>	<b>Familles</b>	<b>Genre</b>	<b>Espèces</b>
GROUPE I	<i>Edwardsiellae</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>S. paratyphi</i> <i>S. enteritidis</i>
GROUPE II	<i>Escherichieae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>Levineae</i>	<i>Levinea</i>	
GROUPE III	<i>Klebsielleae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxymore</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloaceae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Erwinia</i>	
GROUPE IV	<i>Proteae</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	
GROUPE V	<i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>

### 3. Les caractères bactériologiques

#### 3.1. Caractères morphologiques

Toutes les Entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à Gram négatif de 2 à 3µ de long sur 0,6µ de large, généralement polymorphes.

Certaines espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, par contre les autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). Dont le genre de *Klebsiella* est caractérisé par la présence d'une capsule visible au microscope. La plupart des espèces pathogènes chez l'homme possèdent des pili (fimbriae) qui constituent des facteurs d'adhésion [7].

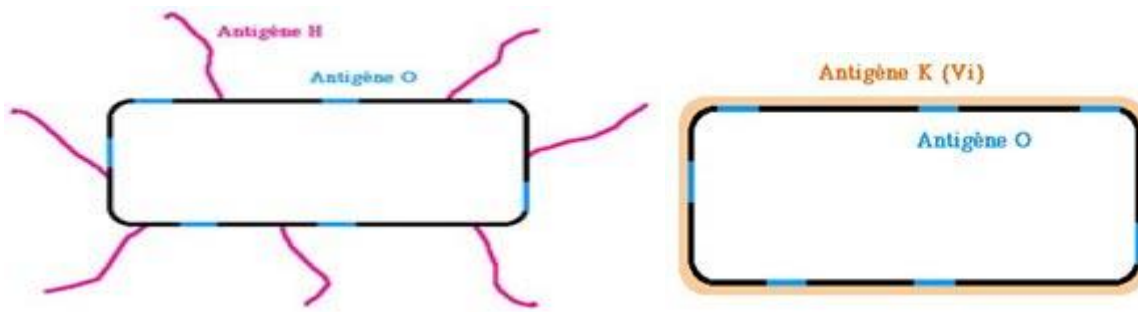


Figure 3: Schéma représentant les différents antigènes (K,O,H) des *Enterobacteries*

### 3.2. Caractères culturels

Les Entérobactéries sont des germes aéro-anaérobies facultatifs poussent facilement sur les milieux ordinaires en 18 heures. La température optimale de croissance est 37°C mais la culture est possible entre 20°C et 40°C. Ce sont des germes mésophiles et neutrophiles (PH optimum voisin de 5,5-8) et ils sont assez tolérants aux variations de la pression osmotique.

Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plus part se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose .sur milieux gélosés, les colonies d'Entérobactéries sont habituellement rondes, lisses, brillantes à contour régulier et leur diamètre est de 2 à 3 mm après 18 heures d' incubation à 35 - 37 °C. En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme [8] .

### 3.3. Les caractères biochimiques

Le diagnostique de genre et d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, après que le diagnostique de famille ait été établi avec certitude. Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres, la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz [9] .

## 4. Caractères antigénique

Au sein de chaque genre on individualise des espèces par l'étude des caractères biochimiques ou antigéniques. Toutes les entérobactéries possèdent des antigènes de paroi (somatiques) ou antigènes O qui correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS) et qui constituent les endotoxines des bactéries à Gram négatif. Les

espèces mobiles possèdent en plus des antigènes de flagelles ou antigènes H de nature protéique, constitués de flagellines. Certaines souches possèdent en plus un antigène K qui masque l'antigène O, et qui correspond à une enveloppe polysidique constituant une véritable capsule et donnant un aspect muqueux (Figure 03) [8] .

Le tableau (02) résume les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés :

**Tableau 02** : Les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés [10]

	Escherichia	citrobacter	Enterobacter	klebsiella	serratia	salmonella	shigella	proteus	providencia	yersinia
lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+*
VP (Acétoïne)	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	+*
Mobilité	+	+	+	-	+	+	-	+	+	
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
PDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H <sub>2</sub> S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

\* à 20°C seulement, (+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif

## **II. Étude principale d'espèce ( *Escherichia coli* )**

### **1. Historique**

En 1885, Theodor Escherich (1857-1911) découvre un bacille qu'il dénomma *Bacterium coli commune* dans des selles de nourrissons. Médecin allemand; il fit une partie de

ses études de médecine (Strasbourg Thèse de doctorat en pédiatrie en 1881 à Munich "A propos des bactéries intestinales des nourrissons et de leur rapport avec la physiologie de la digestion" [11]).

**1904:** Isolement de cette même bactérie dans un cas d'infection urinaire.

**1919:** Castellani et Chalmers donne le nom d'*Escherichia coli* à cette bactérie [12].

## **2. Définition d'*Escherichia coli* (*E. coli*)**

*Escherichia coli*, aussi mentionné comme *E. coli*, est un type de coliforme fécal les bactéries qui sont trouvées dans les intestins d'humains et d'animaux à sang chaud en santé. La plupart d'*E. coli* est inoffensif et sert une fonction utile dans le corps en arrêtant la croissance d'espèce des bactéries nuisible et en faisant des vitamines nécessaires (vitamine K), qui aide à la coagulation sanguine [13].

Cependant, quelques tentions peuvent être des pathogènes opportuniste, tandis que d'autres peuvent causer la maladie gastro-intestinale dans des gens sains quand ingéré. Un opportuniste pathogène est un organisme qui vit normalement à l'intérieur d'un hôte sans causer la blessure, mais peut causer l'infection dans les gens avec des systèmes immunitaires affaiblis.

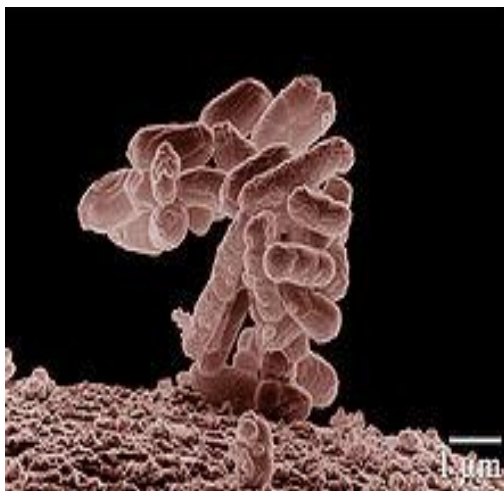
*E. coli* est présent dans le gros intestin, donc il sera aussi dans la matière fécale des gens et des animaux [14].

## **3. Classification:**

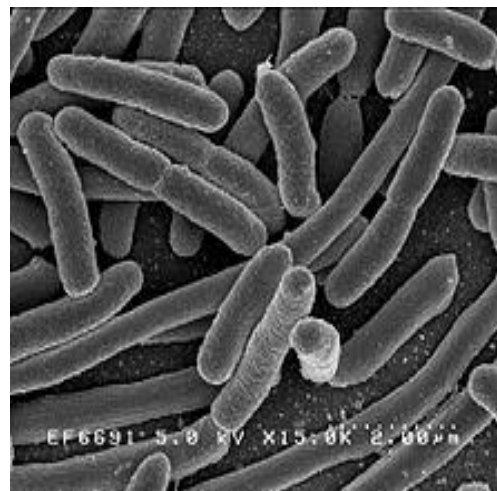
*Escherichia coli* C'est l'une des cinq espèces reconnues dans le genre *Escherichia*. Ce qui rend *E. coli* unique par ses activités biochimiques. elle entre dans l'embranchement Proteobacteria et de classe Gamma proteobacteria, elle inscrit dans la famille des entérobactéries.

Tableau 03: Classification d' *Escherichia coli* [15]

Domaine	Bactéries
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Entérobactéries</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli (E. coli)</i>



*Escherichia coli* grossissement x100



*Escherichia coli* grossissement x100

Figure 04: *Escherichia coli* sous microscope électronique

#### 4.Habitat et réservoir

Bactérie commensale du tube digestif , *E.coli* set l'espèce la plus importante des anaérobies facultatifs de l'intestin :  $10^8$  par gamme de fèces (flore totale :  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par gamme), <1% de la flore totale du colon, 99% représentés par les anaérobies stricts. La présence d'*E. coli* dans l'eau est témoin d'une contamination fécale qui la rend impropre à la consommation (recherche des coliformes), pathogène indiscutable pour l'homme et l'animal [16] .



## 5. Caractères bactériologiques

### 5.1. Caractères morphologique et culturaux

*Escherichia coli* ou colibacille est une bactérie a sporulée mesurant 2 à 4  $\mu$  de long sur 0,4 à 0,6  $\mu$  de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe non exigeant, sur gélose ordinaire donne des colonies lisses, brillantes et homogènes (Figure 04) [17] .

### 5.2. Caractères biochimique

*E. coli* possède une catalase mais est dépourvu d'oxydase. L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries. Ces dernières permettent l'identification de cette bactérie que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille.

Ces caractères sont regroupés dans le tableau suivant:

Tableau 04: Caractères biochimiques d'*E. coli* [15 ,20]

TESTS	G L U	L A C	H 2 S	G A Z	C S	O N P G	G E L	M A L	N I T	L D C	O D C	A D H	U R E	T D A	I N D	R M	V P	E S C
RESULTAT	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-

Légende:

+ : Caractère positif

- : Caractère négatif

+/- : Caractère inconstant

## 6. Caractères antigéniques

L'antigène somatique O, définissant le sérotype, est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne des souches à Gram négatif. L'antigène flagellaire H est de nature protéique entrant dans la structure du flagelle (ciliature péritriche) permettant la mobilité de la bactérie. L'antigène K de surface n'est pas toujours présent mais s'il est présent, il bloque l'agglutinabilité de l'antigène O [18] .

## 7. Pouvoir pathogène

*E. coli* est responsable d'infection extra-intestinales, infections urinaires, infections abdominales et septicémies avec choc septique du à l'endotoxine O et d'infection intestinales: l'existence des diarrhées à *E. coli* est connue depuis 1940. Ces diarrhées sont dues à des souches de sérotypes particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies [19].

## Chapitre 2 :Méthodes d'identification

L'identification bactérienne est de plus en plus facilitée au laboratoire par l'utilisation de nombreuses galeries d'identification dont :

- ✓ Les galeries classiques avec un nombre de caractères limités. Mais elles nécessitent souvent le recours à d'autres tests biochimiques complémentaires.
- ✓ Les galeries API sont très performantes mais leur coût est élevé.
- ❖ Une nouvelle méthode basée sur la spectrométrie de masse peut être utile au laboratoire de bactériologie pour l'identification rapide des différents pathogènes.

### 1. Tests biochimiques discriminant les entérobactéries

#### 1.1.Mise en évidence du type respiratoire

La détermination du type respiratoire (ou type énergétique) d'une bactérie consiste en la détermination du rapport qu'a cette bactérie avec l'oxygène.

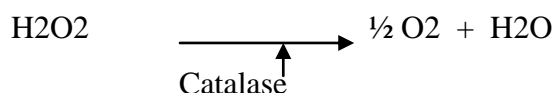
Les bactéries ont des besoins respiratoires spécifiques, elles sont soit [44, 45] :

- a-** Des bactéries aérobies strictes : Bactéries ayant besoin d'oxygène pour leur respiration.
- b-** Des bactéries anaérobies strictes : La présence de l'oxygène est toxique pour ces bactéries.
- c-** Des bactéries aéro-anaérobies facultatives : La présence de l'oxygène est facultative, elles peuvent se développer en présence ou en absence d'oxygène.
- d-** Des bactéries micro-aérophiles : Bactéries se développent sous une faible pression d'oxygène.
- e-** Des bactéries anaérobies aéro-tolérantes : Bactéries se développent en absence d'oxygène mais elles tolèrent la présence de ce dernier dans le milieu.

La mise en évidence expérimentale de ces cinq types respiratoires peut être réalisée sur la gélose viande-foie (gélose VF).

#### 1.2. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formé comme sous produit de processus métaboliques. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon :



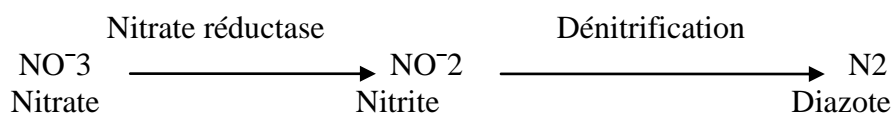
### 1.3.Recherche de l'oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi quinonique rose violacé. L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau H<sub>2</sub>O ou en eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les bactéries qui possèdent l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N,N,N,N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine qui est un composant du réactif de la recherche de la cytochromeoxydase en bactériologie, ce qui donne des produits violacés.

### 1.4.Recherche de la nitrate-réductase

La nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites dont leur mise en évidence est réalisée en utilisant le réactif de Griess. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification selon :



Le réactif de Griess, prend une teinte rouge-orangé en présence d'ions nitrites , ce qui indique que la bactérie possède une nitrate-réductase qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites et c'est le cas pour les entérobactéries.

L'absence de coloration rouge ne signifie pas obligatoirement que la bactérie testée ne possède pas de nitrates-réductase, car elle peut posséder une nitrate-réductase très active qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade diazote N<sub>2</sub> et une bactérie possédant une telle enzyme consomme tout les nitrates du milieu.

Dans ce cas le test est complété par l'épreuve de Zo-Bell en ajoutant la poudre de zinc qui est un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites.

L'apparition d'une teinte rouge indique la formation d'ions nitrites par l'action du zinc, donc ça signifie la présence des ions nitrates dans le milieu, donc la bactérie ne possède pas de nitrate-réductase.

A l'inverse, l'absence de coloration rouge indique qu'il n'y a plus d'ions nitrates dans le milieu pour réagir avec le zinc, donc la bactérie possède une nitrate-réductase très active qui a consommé tout les ions nitrates.

### 1.5. Les tests biochimiques du catabolisme des glucides

#### 1.5.1. Etude de la voie d'attaque des glucides

Les bactéries utilisent les glucides suivant deux voies métaboliques :

- Une voie oxydative : en présence d'oxygène.
- Une voie fermentative : en absence d'oxygène, ou en faible tension d'oxygène.

Pour déterminer la voie d'attaque des glucides (glucose en particulier) par les bactéries à Gram négatif, (cas des entérobactéries) on utilise le milieu de Hugh et Leifson ou le milieu MEVAG. (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides).

Ce milieu est additionné le plus souvent de glucose pour la détermination de la voie d'attaque de cet ose par les entérobactéries. Mais il peut aussi être préparé avec d'autres glucides (lactose, saccharose...) pour étudier leur métabolisme par ces bactéries. Ce milieu contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol qui permet d'apprécier le type de dégradation du glucide (glucose) qui libère des acides et éventuellement des gaz. Il vire au jaune en milieu acide, sinon il conserve la couleur verte du milieu ou il vire au bleu en cas d'alcalinisation. Donc à la fin de l'incubation, on observe le changement de couleur du milieu pour déterminer le type oxydatif ou fermentatif.

#### 1.5.2. Milieux glucidiques pour bactéries fermentatives

Des milieux de culture contenant un ou plusieurs glucides permettent d'étudier l'utilisation des sucres par les bactéries fermentatives (entérobactéries).

##### a- Bouillon au rouge de phénol

Ce milieu qui est additionné d'un glucide, et qui contient la cloche de Durham est utilisé pour réaliser des tests de fermentation des glucides afin de permettre l'identification biochimique de bactéries. Après la préparation et la répartition du milieu en tubes, une solution stérile du glucide à étudier avec une concentration de 5 à 10 g/l est additionnée dans

le milieu, sachant que de nombreux glucides peuvent être testés pour l'identification biochimique.

b-Milieu de Kligler- Hajna

Le milieu de Kligler- Hajna est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques, il est utilisé principalement pour l'identification des entérobactéries. C'est un milieu coulé en pente et en culot. Il renferme du lactose, du glucose, du thiosulfate et des ions ferreux. L'indicateur de pH est le rouge de phénol. C'est un milieu au niveau duquel on recherche en 24h : L'utilisation du glucose et du lactose, la production de l'H<sub>2</sub>S, la production de gaz provenant de la fermentation du glucose, et la B-galactosidase pour les bactéries lactose (-) donc test ONPG.

-Utilisation des glucides :

- Le culot

Pour qu'une bactérie puisse utiliser le lactose, elle doit avoir deux enzymes : Une B-galactoside perméase et une B-galactosidase.

Les bactéries fermentent le glucose avec production d'acides et au bout de 24h, tout le glucose sera fermenté, ce qui fait virer l'indicateur de pH au jaune.

Dans le cas d'où la bactérie ne peut pas fermenter le glucose, la production d'acides n'aura pas lieu et le culot reste rouge.

- La pente

Les bactéries utilisent le glucose comme source de carbone et d'énergie, Et elles produisent des acides qui font virer l'indicateur de pH du rouge au jaune.

- La production de gaz:

La présence de gaz se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air.

- La production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S):

Elle a lieu à partir de l'ion thiosulfate provenant du thiosulfate de sodium et qui est réduit en H<sub>2</sub>S .Le sulfure d'hydrogène réagit avec les ions du citrate de fer ammoniacal pour former un précipité de sulfure de fer noir. Ainsi: Une bactérie H<sub>2</sub>S<sup>+</sup> présente un précipité noir , par contre une bactérie H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> : pas de précipité noir.

- Test ONPG: OrthoNitroPhényl – B-D – Galactopyranoside

Le test ONPG ou test de l'ONPG – Hydrolase est un test complémentaire celui-ci Permet, lorsque la bactérie est Lactose (-) de trouver s'il y a présence d'une B-galactosidase que l'on reconnaît grâce à la coloration en jaune du milieu. Pour que la bactérie hydrolyse le lactose, IL faut qu'elle ait deux enzymes:

- La B-galactoside perméase membranaire qui permet la pénétration du lactose dans la Cellule.

- La B-galactosidase qui est une Hydrolase capable d'hydrolyser la liaison osidique en donnant le galactose et le glucose.

L'orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside (ONPG) est un hétéroside dont l'aglycone est l'orthonitrophénol et l'ose est le galactose. C'est un analogue structural du lactose, L'hydrolyse de l'ONPG par une B-galactosidase libère du galactose et de l'orthonitrophénol.

Les bactéries Lactose (+) possèdent la B-galactosidase donc elles sont toujours ONPG +, Par contre les bactéries Lactose (-) peuvent être :

- ONPG (-) : elles ne possèdent pas d'ONPG-hydrolase (B-galactosidase).

- ONPG (+) : elles possèdent soit une B-galactosidase, mais pas de B-galactosidase perméase et elles ne peuvent pas dégrader le Lactose soit une ONPG-hydrolase autre qu'une B – galactosidase.

c- Milieu TSI (Triple Sugar Iron)

Ce milieu de culture, proposé par Hajna (1945), est principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des entérobactéries. C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du : glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) et de gaz. Le rouge de phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif. Le noircissement du culot indique la présence de H<sub>2</sub>S.

### 1.5.3. Milieu mannitol-mobilité

Ce milieu permet de rechercher simultanément la mobilité , et l'utilisation du mannitol.

❖ Le test mannitol

Le mannitol est un dérivé de réduction du mannose. La réduction des oses simples peut se faire sur les fonctions aldéhyde ou cétone : on obtient alors des polyalcools que l'on

désigne avec le suffixe –itol. Ce polyalcool peut être fermenté par la bactérie avec libération de produits acides qui font virer l'indicateur de pH du rouge en milieu basique au jaune en milieu acide. Donc : bactérie mannitol (+).

### ❖ Le test de mobilité bactérienne

Si la bactérie est immobile, on observe des colonies au lieu de l'ensemencement, par contre si la bactérie est mobile on observe une répartition des colonies dans le milieu.

#### 1.5.4.Le milieu RM-VP (bouillon Clark et Lubs)

Ce milieu permet de rechercher les voies fermentaires des entérobactéries et de différencier la fermentation des acides mixtes et la fermentation butanediolique chez les entérobactéries.

- Test du rouge de méthyle (test RM):

C'est une réaction utilisée pour mettre en évidence la voie fermentative des acides mixtes lors de l'identification des entérobactéries. La fermentation du glucose par les entérobactéries produit de l'acide pyruvique, puis des acides organiques. Ces acides font virer le RM au rouge et dans le cas contraire, il vire au jaune.

- Réaction de Voges-Proskauer (test VP):

C'est une réaction utilisée pour mettre en évidence la voie fermentaire du butane – 2, 3 –diol lors de l'identification biochimique des entérobactéries, cette réaction permet de mettre en évidence l'acétoïne ou (3 – hydroxybutanone), parce que Le butane – 2, 3 – diol ne peut pas être mis en évidence facilement.

#### 1.5.5. L'utilisation du Citrate de Sodium

Certaines entérobactéries sont capables d'assimiler le citrate de Sodium comme seule source de Carbone et d'énergie et la recherche de cette propriété se fait avec le milieu de Simmons au Citrate de Sodium. Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone ; le citrate. Les bactéries possédant l'enzyme citratase sont capables de se développer sur ce milieu. La bactérie qui utilise le citrate, elle alcalinise le milieu, ce qui fait virer le bleu de bromothymol du vert au bleu en milieu basique.

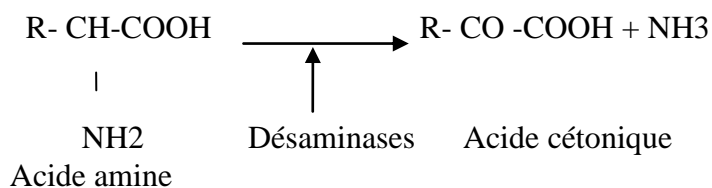


### 1.6. Les tests biochimiques du catabolisme des protéines

Les entérobactéries peuvent assimiler et dégrader les acides aminés selon deux voies métaboliques : La désamination et la décarboxylation.

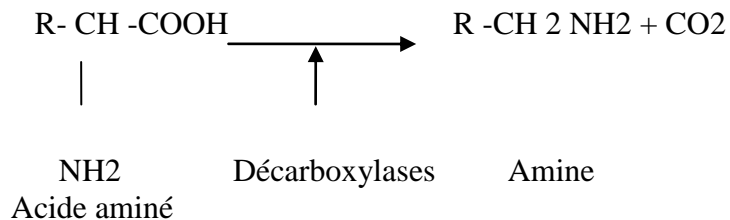
#### 1.6.1. La désamination

Elle est réalisée par des désaminases bactériennes, c'est le départ du groupement aminé. Les désaminases, enzymes induites, agissent sur les acides aminés en entraînant la formation des acides cétoniques correspondants selon la réaction suivante:



#### 1.6.2.La décarboxylation

Elle est réalisée par des décarboxylases bactériennes, enzymes induites qui libèrent le groupement carboxyle et forme l'amine correspondante selon la réaction suivante :



La recherche des décarboxylases de l'ornithine, de la lysine, et de l'arginine forment trois tests biochimiques utiles dans le diagnostic différencié des entérobactéries. Ces trois tests peuvent être réalisés sur les bouillons « LDC- ODC- ADH » qui sont appelés les milieux de Moëller et qui permettent de montrer la présence des décarboxylases et dihydrolase bactériennes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa réalcalinisation. Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide, donc jaune.

- L'ornithine décarboxylase (ODC) est une enzyme qui libère le groupement carboxyle de l'acide aminé ornithine et donne production de la putriscine qui alcalinise le milieu.
- La lysine décarboxylase (LDC) est une enzyme qui libère le groupement carboxyle de l'acide aminé lysine et donne production de la cadavérine qui alcalinise le milieu.

- L'arginine dihydrolase (ADH) est une enzyme qui dégrade l'arginine en libérant de l'ammoniac et des amines qui alcalinisent le milieu.

Il existe des acides aminés qui peuvent être décomposés selon des réactions métaboliques particulières, comme le cas du tryptophane.

### 1.7 .Milieu urée-indole

Ce milieu de culture permet en 24 h de réaliser trois tests biochimiques qui permettent l'identification de germes, particulièrement les entérobactéries. Ces trois tests sont : Le test uréase, le test TDA, et le test indole.

#### 1.7.1. Recherche de l'uréase

Les entérobactéries peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent décomposer l'urée en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique.

#### 1.7.2. Recherche de l'indole

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase en formant de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. Après addition du réactif de Kovacs, Le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, et forme un composé coloré en rouge. L'indole peut être mis en évidence en utilisant le milieu urée-indole ou L'eau peptonée exempte d'indole ; c'est un bouillon qui ne contient pas d'indole, mais il contient du tryptophane pour que certaines entérobactéries puissent le dégrader en indole.

#### 1.7.3.Test TDA

Par contre certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à l'enzyme tryptophane désaminase (Test TDA) et cette dernière conduit à la désamination de cet acide aminé en produisant l'ammoniac et l'acide indole – 3 pyruvique. Ce dernier est révélé par l'apparition d'une couleur brune en présence de perchlorure de fer .

## 2. Système API

Créée en 1970 par le docteur Bussière, le pharmacien Cinquabre, Paul & Pierre Montagnon et Henri Labruyère, la société API® a par la suite été rachetée par la société Biomérieux. Elles utilisent le même principe que les techniques biochimiques conventionnelles d'identification des bactéries. Elles se présentent sous forme de cupules prête à l'emploi contenant le substrat lyophilisé nécessaire aux différents tests biochimiques. Version miniaturisée et standardisée, elles ont l'avantage de standardiser les caractères biochimiques recherchés pour améliorer la reproductibilité inter laboratoire en éliminant le choix subjectif des tests « importants » pour la caractérisation.

Une galerie API est un ensemble de petits tubes prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés. Il ya différents types de galeries API dont API 20 E est utilisé spécialement pour l'identification des *Enterobacteriaceae*.

### 2.1. Galerie API 20 E

#### 2.1.1. Objet du test

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système [21] .

#### 2.1.2. Principe

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification [21] .

### 3.La spectrométrie de masse MALDI-TOF

#### 3.1. Introduction

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge . Les applications de la spectrométrie de masse sont nombreuses et touchent divers domaines: en biotechnologies pour l'analyse des peptides ou oligonucléotides, en pharmacologie pour le dosage de médicaments, dans le domaine de l'environnement pour l'analyse de l'eau, en clinique pour la recherche de drogues [22], etc. Il existe plusieurs types de spectromètres de masse pouvant séparer des molécules plus ou moins grandes et leurs méthodes ont toutes en commun les étapes suivantes [23] :

- 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

Depuis longtemps utilisée en microbiologie clinique, la Spectrométrie de Masse de type MALDI-TOF (MatrixAssisted Laser Désorption Ionisation-Time Of Flight) arrive en force en microbiologie pour répondre à des besoins d'identification fiable et rapide (Figure 05). Cette méthode permet l'identification d'un germe au genre et à l'espèce en moins de quinze minutes à partir d'une colonie fraîche . Le MALDI-TOF MS 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. Elle est maintenant en plein essor dans les laboratoires d'analyse de microbiologie comme système d'identification. Actuellement, au niveau mondial, environ 1000 installations existent dans le secteur clinique et pharmaceutique et une centaine dans le secteur alimentaire.

La technologie MALDI-TOF MS en microbiologie peut identifier les microorganismes jusqu'au niveau de l'espèce. Le principe se base sur l'ionisation des protéines bactériennes par un rayon laser et la création de pics caractéristiques (spectre). A partir d'une base de données de spectres, le logiciel associé recherche la correspondance à l'espèce de la bactérie



Figure 05:Système d'identification Spectrométrie de Masse de type MALDI-TOFmicroflex

selon un indice de fiabilité entre les deux spectres. Le MALDI-TOF MS ne donne toute fois pas d'information sur le sérotype ni sur la pathogénicité de l'espèce .

Typiquement, un spectromètre de masse est composé de 3 éléments :

- ❖ une source d'ions (MALDI).
- ❖ une séparation des molécules (TOF).
- ❖ et la détection [27] .

### 3.2. 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*) . 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. La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides .

L'échantillon est mélangé à la matrice et 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 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 mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront 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 (Figure 06) [24].

### 3.3. 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) . 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.

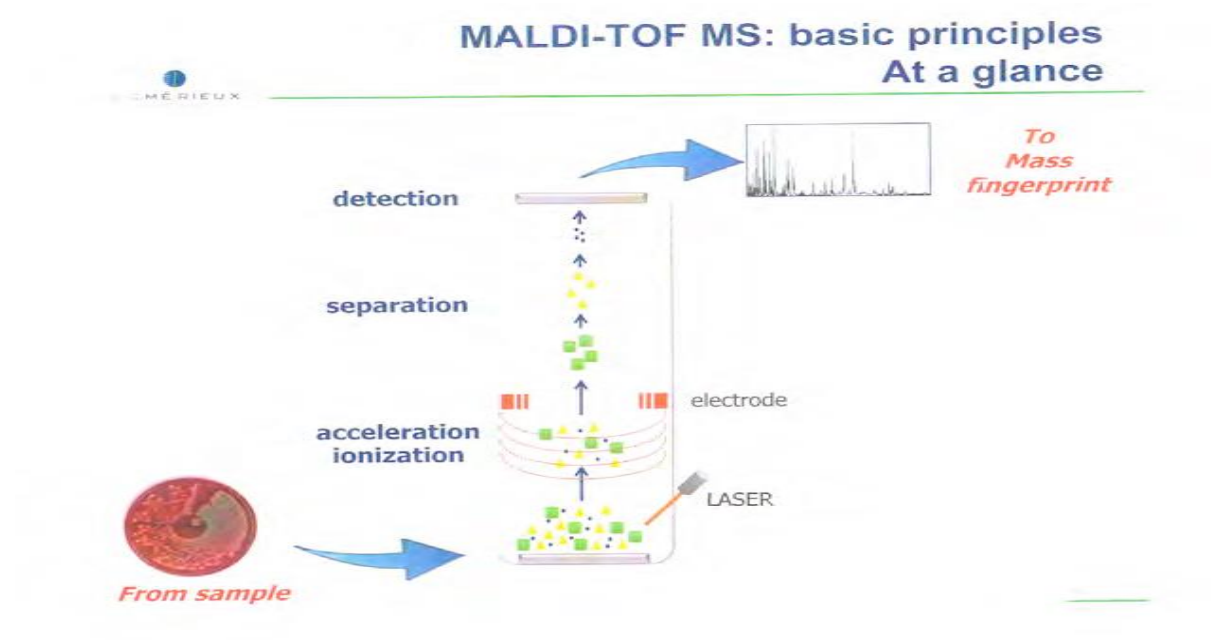


Figure 06: Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF

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 et les substances hydrophiles auront une affinité pour l'eau.

Après avoir mélangé la matrice à l'échantillon, le spot est séché à l'air. Le solvant va ainsi s'évaporer et il ne restera plus que la matrice cristallisée et l'analyte à l'intérieur [25].

Les composants de la matrice doivent avoir plusieurs caractéristiques :

- ils doivent pouvoir se mélanger avec les solvants organiques et l'eau .
- ils doivent 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.
- ils doivent être assez petits afin d'avoir une bonne volatilité et se vaporiser sous l'action du rayon laser .
- ils doivent être acides afin de transmettre des protons à l'analyte et ainsi l'ioniser .
- ils doivent pouvoir absorber fortement et rapidement les rayons ultra-violetts du laser [26] .

### 3.4. Désorption-ionisation

Un laser UV (337 nm de longueur d'onde) d'azote (N<sub>2</sub>) est pulsé 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 (Figure 07) [26].

### 3.5. 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. Les ions passent ensuite à travers un champ électrique de force connue accélérant leur progression .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 (Figure 08 ) [26] .

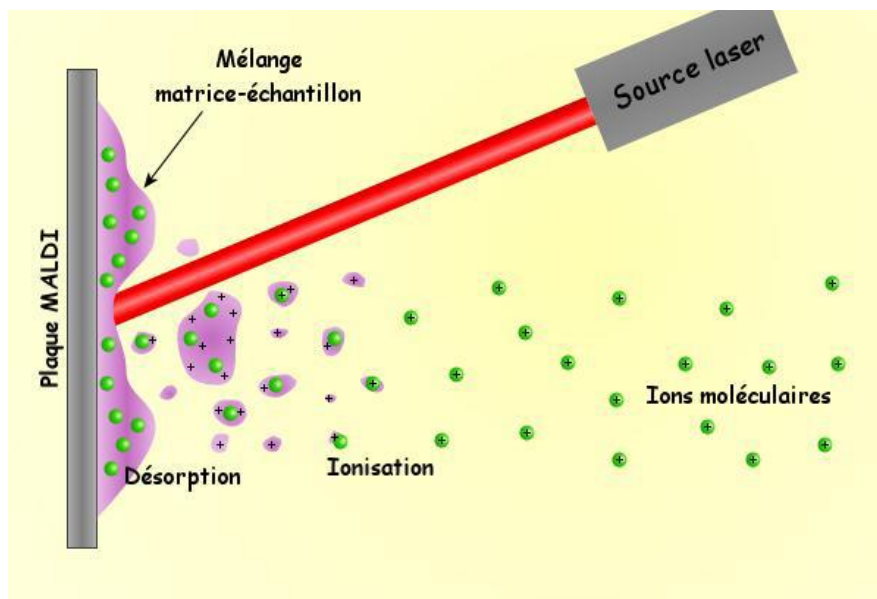


Figure 07:Principe d'ionisation par la technique MALDI.  
L'analyte (en vert) est cristallisé dans la matrice (en violet)

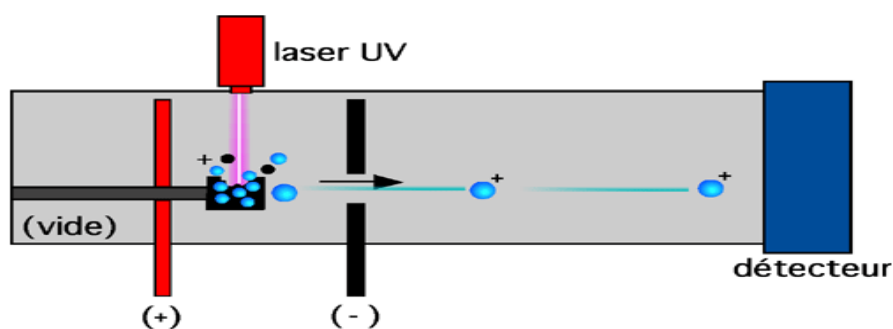


Figure 08:Technique Time of flight (TOF)

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



### 3.6. Le spectre

Les données enregistrées sont calculées afin de transposer les résultats dans 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 09) [26] .

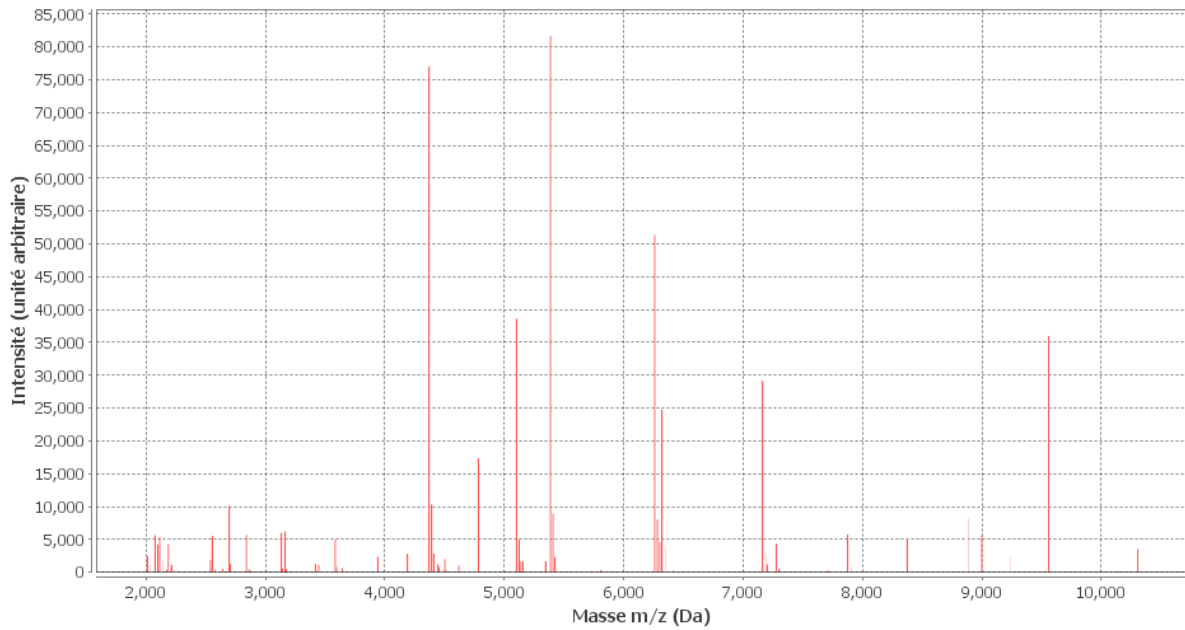


Figure 09:Spectre MALDI-TOF

**MATERIEL  
ET  
METHODES**

## 1. Matériel

### 1.1. Les souches étudiées

Cette étude a porté sur des souches pré-identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie , unité bactériologie générale du centre hospitalo-universitaire Benbadis Constantine (CHU). nous avons étudié 200 souches d'entérobactéries dans lesquels nous avons réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques et biochimiques.

## 2. Méthodologie

### 2.1 Analyse bacteriologique

#### 2.1.1 .Coloration de GRAM

C'est la coloration de base en bactériologie , elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'un des caractères essentiels de la classification des bactéries.

Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration:

- La différence de la composition chimique de la paroi bactérienne.
- La différence de perméabilité de la paroi bactérienne.

#### ❖ Technique de coloration de Gram

Pour réaliser la coloration de Gram des 200 souches, nous avons fait:

#### 1-La préparation du frottis

Ils ont prélevé à l'aide d'une anse de platine une colonie de chaque souche et la mettre sur la goutte d'eau distillée en surface de chaque lame pour faire les frottis des 200 souches. puis la fixation du frottis à la flamme d'un bec Bunsen.

#### 2- La coloration au violet de Gentiane

La lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée.

#### 3-Mordançage au lugol

Etaler le lugol et laisser agir 20 secondes , Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

#### 4- Décoloration à l'alcool

Verser goutte à goutte l'alcool sur les lames inclinées obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

#### 5-Contre coloration avec de la Fuchsine

Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes.

#### 2.1.2. préparation de la suspension bactérienne

La suspension bactérienne de chacune des 200 souches a été préparée dans un bouillon nutritif avec des colonies prélevées à partir d'un milieu solide (gélose nutritive).

La conservation des souches a été réalisée en tubes sur gélose nutritive inclinée.

#### 2.1.3. Les tests biochimiques

L'identification des souches a porté sur une série de tests biochimiques, Les tests biochimiques ayant servi à l'identification sont :

- 1- Gaz en glucose, production d'H<sub>2</sub>S, métabolisme du lactose et du saccharose. (Milieu TSD).
- 2- Mannitol-mobilité.
- 3- Test VP (Voges-Proskauer) : fermentation butanediolique et production d'acétoïne.
- 4- Test RM (Rouge de Méthyle) : fermentation des acides mixtes.
- 5- Utilisation du citrate en tant que seule source de carbone (cycle de Krebs).
- 6- Production de l'uréase : métabolisme protéique.
- 7- Production d'indole (métabolisme du Tryptophane).
- 8- Production de l'oxydase (physiologie respiratoire).
- 9- Production de catalase (physiologie respiratoire).

### 1. Milieu TSI

La pente du milieu TSI est ensemencée par stries et le culot par piqûre centrale, puis incubation à 37C° pendant 18 heures.

### 2. Milieu Mannitol-mobilité

L'ensemencement du milieu s'est fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une anse de platine (fil droit sans boucle). Incubation à 37C° durant 18 heures.

### 3. Test RM-VP

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé le milieu Clarck et Lubs et nous l'avons ensemencé à l'aide d'une anse de platine avec la souche bactérienne à analyser. Après avoir incubé à 37C° pendant 18 heures nous avons partagé le milieu en deux tubes pour pratiquer les deux tests :

- Réaction de Voges-Proskauer en ajoutant quelques gouttes du réactif VP1 et le même volume du réactif VP2. La lecture s'effectue après quelques minutes.
- Test du rouge de méthyle en additionnant 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. La lecture est immédiate.

### 4. Utilisation du citrate

La pente du milieu est ensemencée avec une strie sur toute la surface. Incubation à 37°C, pendant 18 heures.

### 5. Production de l'uréase

La mise en évidence de l'uréase s'est faite en utilisant le milieu urée-indole. Ce dernier est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne après l'avoir préparée dans de l'eau physiologique. Ensuite une incubation de 18 heures à 37C°.

### 6. Test de l'indole

Le test est réalisé en introduisant dans de l'eau peptonée exempte d'indole quelques gouttes de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur suite à une incubation de 18 heures à l'étuve, l'addition du réactif de Kovacs montre la production de l'indole qui se traduit par un anneau rouge en surface du milieu.

## 7. Recherche de l'oxydase

Ce test est important pour le diagnostic des bacilles à gram négatif . Ce test est réalisé à l'aide de disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactif :N-diméthyl paraphénylène diamine, sur lequel ils ont déposé une colonie. La lecture du résultat était immédiate et sans incubation:

- la présence d'oxydase se manifeste par une coloration violette.
- test négatif pas de coloration .

## 8. Production de la catalase

Une colonie est prélevée à partir de la boîte de Pétri et déposée sur une lame. Une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 volumes) est déversée sur cette colonie.

## 2.2. Etude moléculaire

En laboratoire étranger (en France) , Les 200 souches qui correspondent à l'espèce *Eschérichia coli* ont subis une identification moléculaire grâce à une nouvelle méthode basée sur la spectrométrie de masse.

### 2.2.1. Spectromètre MALDI-TOF ( Microflex)

C'est une technique basée sur le profil protéique des bactéries qui permet en quelques minutes et avec une haute précision leurs identifications [28] .

- Cette technique se réalise en 4 étapes :

#### 1-Nettoyage de la cible (plaque métallique)

- Rincer la cible sous l'eau chaude du robinet en frottant avec du papier de précision afin de ne pas la rayer .
- Rincer avec de l'éthanol à 70% en frottant avec du papier de précision .
- Répéter les deux premières étapes .
- Placer la cible dans un petit réservoir en inox ou céramique et la recouvrir d'éthanol 70% .
- Laisser agir pendant 15 minutes puis éliminer l'éthanol dans la poubelle appropriée .
- Déposer sur la cible 500 µl de TFA 80 %, frotter avec du papier de précision .
- Rincer la cible avec de l'eau HPLC et laisser sécher 15 minutes .

## 2-Préparation de la matrice

La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident.

- Dans un tube à Eppendorf, mettre 2g de HCCA
- Ajouter 500 µl d'acétonitrile
- Ajouter 250 µl de TFA à 10%
- Ajouter 250 µl d'eau HPLC
- Soniquer 10 min (la solution doit être trouble)
- Centrifuger 5 min à 13000 rpm
- Transférer le surnageant dans un tube propre, la matrice est prête à être utilisée.

## 3-Dépôt des échantillons

- Compléter le plan de la cible MALDI utilisée en indiquant la référence des échantillons déposés.
- Déposer les échantillons dans la zone appropriée en prélevant les isolats à identifier à partir d'une colonie bactérienne de 24 heures de façon la plus homogène possible et de façon à obtenir une fine couche sur la cible (support métalliques en acier inoxydable avec 96 puits à l'aide d'une pointe de cône. Pour chaque isolat, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreur.
- Déposer 1.5µl de matrice sur chaque spot.
- Laisser sécher pendant 5 min sous la hotte pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

## 4-Insertion de la cible et lancement du spectromètre de masse

- Introduire la plaque (la cible) dans le Microflex.
- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control.
- Lancer le spectromètre de masse : Microflex [28] .

RESULTATS  
ET  
DISCUSSION



## 1. Résultats

### 1.1. Aspect microscopique

#### ❖ Coloration de GRAM

L'observation microscopique, Après la coloration de Gram montre la présence des bacilles à Gram négatif colorées en rose.



Figure 10 : Observation microscopique après coloration de Gram.

### 1.2. Tests biochimiques

Grâce aux tests biochimiques, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries analysées.

Les résultats obtenus qui concernent les 200 souches étudiées grâce aux tests biochimiques sont:

#### 1.2.1. Milieu TSI

C'est un milieu coulé en pente et en culot, au niveau duquel nous avons recherché 4 caractères :

- la fermentation du lactose sur la pente qui se traduit par virage au jaune.
- la fermentation du saccharose également qui se matérialise par virage au jaune.
- la présence de gaz qui se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air.
- la production de H<sub>2</sub>S qui se traduit par une coloration noire.

Toutes les souches ont fermenté le lactose ainsi que le saccharose, elles produisent du gaz mais pas du sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S.



Figure 11: Aspect du milieu TSI

### 1.2.2. Milieu Mannitol mobilité

C'est une gélose molle conditionnée en tubes et qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des germes.

Toutes les souches ont fermenté le mannitol qui se manifeste par un virage du milieu au jaune (Mannitol +).

L'observation d'une culture dans tout les tubes signifie que les bactéries ont diffusé à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble dans tous les milieu (Mobilité+).

Alors que Les bactéries immobiles ont uniquement poussé le long de la strie d'ensemencement .

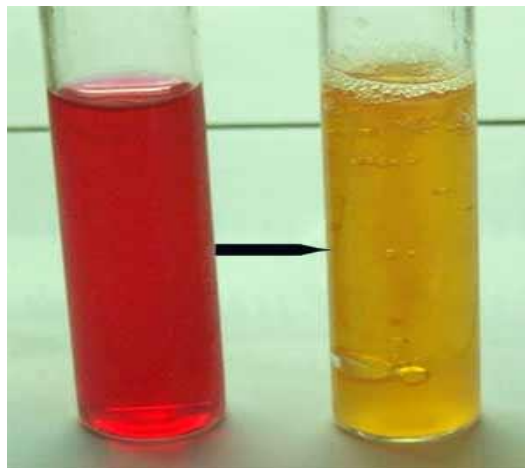


Figure 12: l'aspect milieu mannitol -mobilité

### 1.2.3. Test RM -VP

Le test VP (Voges-Proskauer) s'est fait sur le milieu Clark et Lubs et met en évidence la production d'acétoïne. Si le milieu reste incolore donc le test VP est négatif, par contre Si le milieu donne une couleur rose à rouge donc le test VP est positif.

Toutes les souches étaient VP négatif car après ajouts des réactifs VP1 et VP2 il n'y a pas eu de réaction.



Figure 13: Aspect du test VP positif

Concernant le test RM, toutes les souches étaient RM positif car le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle.



a : Aspect du test RM négatif



b : Aspect du test RM positif

Figure 14: Test RM

### 1.2.4. Utilisation du citrate

Toutes les souches n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone, elles sont Citrate négative (le milieu reste vert).

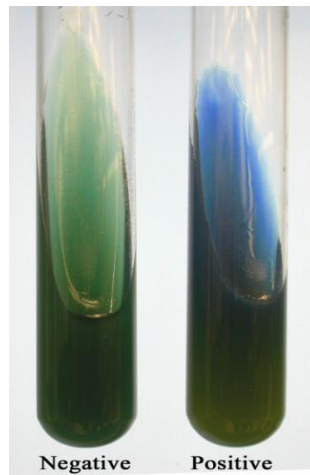
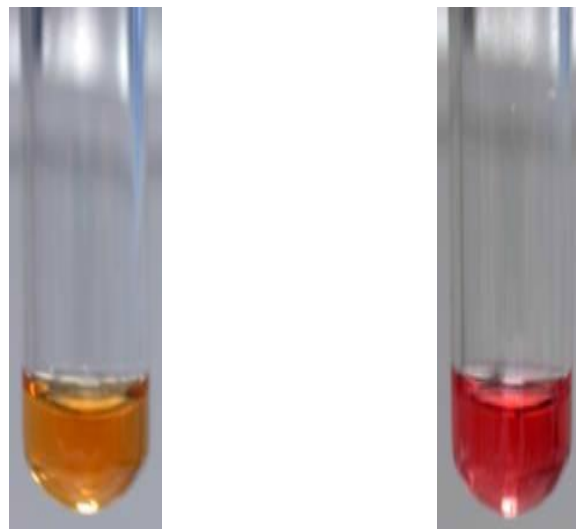


Figure15: Aspect du milieu citrate de Simmons

#### 1.2.5. Production d'uréase

La production d'uréase se matérialise par un changement de la coloration au rouge, du fait de l'alcalinisation du milieu.

les résultats obtenu toutes les souches étaient uréase négative, car Les milieu restes inchangé test négatif.



a : Aspect du test négatif

b : Aspect du test positif

Figure 16: Test uréase

### 1.2.6 Production d'indole

La présence d'indole se manifeste par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs.

Toutes les souches ont dégradé le tryptophane en indole, donc elles sont indole positives.



a : Aspect du test négatif



b : Aspect du test positif

Figure 17: Test d'indole

### 1.2.7. Recherche de la catalase

Toutes les souches que nous avons analysées sont des catalases positives, dont la présence se manifeste par la production de bulles de gaz.

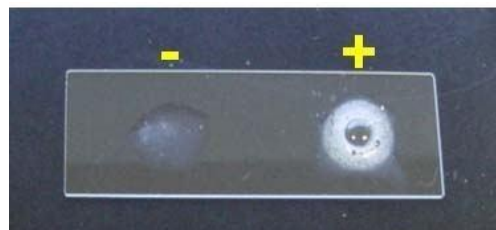


Figure 18: Test de la catalase

### 1.2.8. Recherche de l'oxydase

La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après. Les résultats obtenus étaient les suivants:

Toutes les souches étaient dépourvues d'oxydase et il n'y pas eu de coloration, donc elles sont oxydase négative.

❖ Ces résultats sont en accord avec le même profil biochimique d' *Escherichia coli*.

Donc les 200 souches correspondent à l'espèce *Escherichia coli*.

## 1.2. MALDI TOF

Les résultats obtenus à partir de cette études montrent qu'ils ont trouvé que les 200 souches sont réparti en deux :

160 souches correspondent à l'espèce *E. coli* et 40 souches correspondent aux espèces suivantes:

- ✓ *Serratia marcescens*
- ✓ *Proteus mirabilis*
- ✓ *Klebsiella pneumoniae*
- ✓ *Enterobacter cloacae*

## 2. Discussion

Les 200 souches à Gram négatif isolées à partir des prélèvements au niveau du laboratoire de bactériologie , unité bactériologie générale du centre hospitalo-universitaire Benbadis Constantine (CHU). ont été identifiées sur la base de leurs caractères biochimiques, et moléculaires.

### 2.1. Les résultats des tests biochimiques

L'identification présomptive des bactéries a été effectuée en comparant leurs résultats avec ceux relevés sur des références de systématiques bactériennes [29] .

#### 2.1.1. Milieu TSI

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

Au cours de cette étude, ils ont trouvé que toutes les souches fermentent le lactose, le saccharose, le glucose avec production de gaz, et sans production de l'H<sub>2</sub>S.

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification qui fait virer le rouge de phénol au jaune, alors que la production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique. L'apparition de bulles ou bien la fragmentation de la gélose est due à la production de gaz (hydrogène, CO<sub>2</sub>) résultant des fermentations sucrées [30].

#### 2.1.2. Utilisation du mannitol

La fermentation du mannitol se traduit par une acidification du milieu qui sera mise en évidence par le virage de l'indicateur coloré du pH (le rouge de phénol).

Durant cette étude, ils ont bien observé que toutes les souches utilisent le mannitol comme source de carbone et d'énergie [31].

#### 2.1.3. La mobilité

D'après cette étude, ils ont obtenu des résultats positifs concernant le test de mobilité avec toutes les souches [32].

#### 2.1.4. Test RM-VP

Toutes les souches fermentent le glucose en produisant de nombreux acides organiques plus ou moins forts par la voie des fermentations acides mixtes donc RM<sup>+</sup> et VP<sup>-</sup> [33].

#### 2.1.5. Utilisation du citrate

Le milieu de citrate de Simmons est un milieu synthétique où la seule source de carbone est le citrate. Seules les bactéries autotrophes sont capables de croître en présence de citrate comme seule source de carbone et d'alcaliniser le milieu, notons que le citrate est le premier composé du cycle de Krebs s'il est utilisé, il y a croissance et le milieu s'alcalinise et cela se traduit par le virage de couleur du vert en bleu. Dans l'étude qui a été faite la couleur du milieu reste vert avec toutes les souches donc n'utilisent pas le citrate (citrate<sup>-</sup>) [34].

#### 2.1.6. Production de l'uréase

En présence de l'enzyme de l'uréase, l'urée est transformée en carbonate d'ammonium et il en résulte une alcalinisation du milieu (dans le cas uréase positive). Ces ions ammonium vont alcaliniser le milieu et entraîner le virage de l'indicateur du pH (le rouge

de phénol) du jaune au rouge en milieu basique. Toutes les souches ont donné une réaction négative avec le test de l'uréase. Cela s'explique par l'absence de l'enzyme de l'uréase [36].

#### 2.1.7. Production d'indole

Toutes les souches ont donné une réaction positive avec le test indole.

L'indole est obtenu de la dégradation du tryptophane, grâce à une enzyme bactérienne «la tryptophanase ». Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. L'indole est apolaire, donc soluble dans les solvants organiques et réagit fortement en milieu acide avec le para diméthylamino - benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs [35].

#### 2.1.8. Production de la catalase

Après avoir effectué le test catalase, toutes les souches d'entérobactéries qu'ils ont étudiées présenter un caractère catalase (+) [37].

#### 2.1.9. Production d'oxydase

Le but du test d'oxydase est la recherche d'un système Cytochrome C des bactéries (oxydase positive). Ce test est un bon contrôle pour les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, car elles sont toutes oxydases négatives [32].

### 2.2.MALDI TOF

Le MALDI-TOF identifie les micro-organismes en utilisant le logiciel Biotyper . La spectrométrie de masse permet de mesurer une unique empreinte moléculaire d'un micro-organisme, plus précisément, le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se trouvent chez tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en faisant correspondre le modèle respectif à une base de données étendue, ouverte, pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce [38].



**CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES**

## Conclusion et Perspectives

L'identification des bactéries consiste à reconnaître une bactérie inconnue en définissant son appartenance à une espèce. Il repose sur un ensemble de tests biochimiques pour une identification classique qui exigent généralement un engagement de temps allant de quelques heures à plusieurs jours et la spectrométrie de masse MALDI TOF en raison d'identification moléculaire [42].

L'étude de la morphologie bactérienne est le premier acte effectué par un laboratoire de diagnostic pour identifier une bactérie. L'observation de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire du diagnostic. Les analyses manuelles sont longues, et des méthodes semi-automatiques nécessitent de grandes quantités de matériel biologique.

Dans cette étude, ils ont essayé de confirmer les résultats des souches étudiées par système d'identification classiques avec l'identification moléculaires MALDI-TOF et l'évaluation de la capacité spectrométrie de masse MALDI-TOF dans l'identification bactériennes.

Ce travail permet d'identifier des différentes espèces bactériennes :

- Le système d'identification classique présente une seule espèce bactérienne *Escherichia coli*
- La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet d'identifier l'espèce *Escherichia coli* et des autres espèces bactériennes:

*Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* , *Enterobacter cloacae*.

Enfin, au point de vue perspective, La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique donnant des résultats fiables et dans un délai plus court (en quelques minutes) que les méthodes habituelles (galeries biochimiques) et peu coûteuse. Maintenant les nombreux avantages qui résultent de l'utilisation de cette technologie. En utilisant seulement une petite partie d'une colonie et une goutte de solution de matrice, MALDI-TOF MS peut identifier avec précision les bactéries. Tous les isolats bactériens ont été correctement identifiés au niveau de l'espèce par cette technique spectrométrique, MALDI-TOF a permis de mettre en évidence la présence de communautés bactériennes diversifiées (obtention d'espèces bactériennes différentes). Cette étude montre que la spectrométrie de masse MALDI-TOF a une grande utilité dans l'identification bactériennes et va révolutionner leur pratique et va bientôt remplacer la plupart des méthodes d'identification traditionnelles [43].

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Avril.JL., Dabernat H., Denis F., *et al.* (2000). Bactériologie clinique. *Edition Ellipses*. 601 p.
- [2] Murray Pr., Baron EJ., Pfaller MA., *et al.* (1999). Manuel of clinical Microbiology. In. American Society for Microbiology. *7th edition Washington*. P 442-458.
- [3] Ewing Wh., Edwards Pr. (1960). The principal divisions and groups of enterobacteriaceae and their differentiation, *Intern Bull Bacterial Nomencl Taxon*. **10**:1-12.
- [4] Edwards P.R., Ewing W.H. (1977). Identification of the *Enterobacteriaceae* *Ed Burgess, Minneapolis, 3rd ed.*
- [5] Avril. J., Monteil. H., Dobernat.H., Denis.F. (2000). Bactériologie clinique. *Edition Ellipse: 171, 172, 175, 208, 294, 295.*
- [6] Perriere G. (1992). Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation certains aspects de l'expression des gènes chez *E. coli* UCBL. *Thèse Université de Lyon I, France*. p 14, 77.
- [7] Bakhoun I. (2004). Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. Thèse de doctorat en pharmacologie de l'université de Dakar. P 8.
- [8] Pilet C., Bourdon JL., Toma B., *et al.* (1979). Les enterobactéries : Bactériologie médicale et vétérinaire: Systématique bactérienne. Doins Paris. P 109-187.
- [9] Joly B., Reynaud A. (2003). Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. Edition Lavoisier. Paris. P 356.
- [10] Djelouat S. (2009). Les entérobactéries : L'essentiel. [En ligne]. <http://knol.google.com/k/salim-djelouat/mes-knols/> . (Consulté le 23 Avril 2016).
- [11] Le Minor L., Nicolle P., Buttiaux R., Chabbert Y., *et al.* (1954). <<Studies on Escherichia coli isolated in infantile gastroenteritis>> . *Ann Inst Pasteur*. **86**: 204-226.
- [12] Le Minor L., Buttiaux R., Gaudier B., Le Minor S., et NICOLLE P . (1956). <<Epidemiologic research on gastroenteritis due to Escherichia coli in a Hospital in Northern France >>. Dans *Arch Mal Appar Dig Mal Nutr*. **45**:225-247.

- [13] Avril JL.,Dabernat H,Denis F,Monteil H. (1987). La Bacteriologie clinique 2<sup>ème</sup> édition section IV.P:149.
- [14] Chalmers RM.,Aird H.,et Bolton FJ.( 2000).Waterborne Escherichia coli O 157.Journal of Applied Microbiology.88(supplément):124S-132S.
- [15] Flaudrois JI.(2004).Bactério Génér/Croissance bactérienne.Cours de Bactériologie Médicale DCEMIUFR Médecine Lyon Sud-Laboratoire de Biométrie.P:1-3-10.
- [16] James B,Kaper,James P,Nataro ,et Harry L,T.MOBLY.(2004) <<Pathogenic *Escherichia coli*>>.Nat Rev Microbiol .2:123-140.
- [17] Lobril JR. (1998).Réévaluation du modèle de croissance de Monod : effets des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse de l'université de Lyon I France p 42-77.
- [18] Surveillane E.( 1997). Surveillance des infections à E. coli entérohémorragiques (EHEC) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en Europe. DGV de la commission des communautés européennes . 2(12).
- [19] Abhijit A et al. (2013).Study of urinary isolates with reference to extended spectrum beta lactamases detection and antibiogram. Vol 2,Issue 9, p1052.
- [20]Avril JI.,Monteil H.,Dobernat H,Denis F.(2006).Bactériologie clinique.Edition ELLIPSE.P:171-172-175-208-294-295.
- [21] Guy Leyral Jean-Noel Jffin.(2001).Microbiologie Technique.2<sup>e</sup> édition.API 20 E - Système d'identification des enterobacteriaceae et autres bacilles GRAM-NEGATIFS.p 145.
- [22] 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 30 mars 2016).
- [23] 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 30 mars 2016).

- 
- [24] 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.
- [25] 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 5 Avril 2016).
- [26] Leblanc, B. (15 juillet 2011). Université de Sherbrooke [Page Web]. Accès : <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/6a.html> (page consultée le 10 Avril 2016).
- [27] Pavlovic, M., et al . (2013) . “Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria.” *Open.Microbiol.J.* **7**: 135-41
- [28] Seng, P., J. M. Rolain, P. E. Fournier, S. B. La, M. Drancourt, and D. Raoult. 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future.Microbiol.* **5**:1733-1754
- [29] Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., et al. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore. 787 p.
- [30] Hajna A.A. (1945). Triple Sugar Iron Medium for the Identification of the Intestinal groups of Bacteria. *J. Bact.* **49** : 516-517.
- [31] Nkang A.O., Okonko O.I., Fowotade A., Udeze A.O., Ogunnusi T.A., Fajobi E.A., et al. (2009). Antibiotics susceptibility profiles of bacteria from clinical samples in
- [32] Dhayanithi N.B., Ajith Kumar T.T., Kathiresan K. (2010). Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology.* **31** : 409-412.
- [33] Nkang A.O., Okonko O.I., Fowotade A., Udeze A.O., Ogunnusi T.A., Fajobi E.A., et al. (2009). Antibiotics susceptibility profiles of bacteria from clinical samples in Calabar, Nigeria. *J. Bacteriol. Res.* **1** (8) : 89-96.
- [34] Sylla M.B. (2005). Infections invasives à *Escherichia coli* dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré Bamako. Thèse de Doctorat. Université de Bamako. 58 p.

- [35] Soomro A.H., Arain M.A., Khaskheli M., Bhutto B. (2002). Isolation of *Escherichia Coli* from raw milk and milk products in relation to public health sold under market conditions at Tandojam. *Journal of Nutrition*. **1** (3) : 151-152.
- [36] Keri L.B., Amy E.W., John R.W., Sookie S.B. (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*. **93** (2) : 171-181.
- [37] Khan F., Rizvi M., Shukla I., Malik A. (2011). A novel approach for identification of members of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical samples. *Biology and Medicine*. **3** (2) : 313-319.
- [38] Belbel Z . (2013) . Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba . Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba . 38 P.
- [39] Baranton,G., E. Carniel, D . Guiso, I. Postic. (1995). <<Méthodes de typage moléculaire des bactéries.Applications à l'épidémiologie Molecular fingerprinting of bacteria.>> *Epidemiological interest saint Girons Médecine et Maladies Infectieuses* . 25: 1240-1242.
- [40] Claydon,M. A ., S . N. Davey, V . Edwards-Jones, et D. B . Gardon. (1996).<<The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry.>> *Nat. Biotechnol.*14(11):1584-6.
- [41] Demirev, P.A., Y.P. Ho, V.Ryzhov, et C. Fenselau.( 1999). <<Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches.>> *Anal Chem*. 71(14):2732-6.
- [42] Bernard L. (1986) . Systeme expert en identification bactérienne définition et mise en application d'un interface prolog-SGBD.These de Doctorat .Université des sciences et technique de LILLE.
- [43] Kaouther K. (2015) . Application des outils biomoléculaires 16S,MALDI TOF et métagénomique pour la détermination des variation taxonomiques bacteriennes telluriques . Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle LMD . Université des frères Mentouri de Constantine . P:85-86.
- [44] Dellarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France. Lavoisier. 462 p.
- [45] Joffin J.N., Leyrol G. (2006). Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. 363 p.

# **ANNEXE**



**❖ Milieux utilisés**

- L'eau peptonée
- Gélose nutritive
- Bouillon nutritif
- Bouillon nitrate
- Milieux kligler- Hajna (KIA)
- Milieux Mannitol -mobilité
- Milieux Citrate de Simmons
- Milieux Clarks et lubs
- Milieux moeller (ODC,LDC,ADH)
- Eau distillée stérile
- Milieu Urée-indole

**➤ Composition du L'eau peptonée**

peptone exempte d'indole..... 10,0 grammes

chlorure de sodium..... 5,0 grammes

pH = 7,2

**➤ Composition du milieu gélose nutritive**

Infusion coeur-cervelle.....25 g

nitrate de sodium.....10 g

eau distillée.....1 l

pH =7

**➤ Composition du milieu bouillon nutritif**

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone ..... 10,0 g

Extrait de vi ..... 5,0 g

Chlorure de sodium..... 5,0 g

pH =7,2

➤ **Composition du milieu gélose nutritive (g/l)**

extrait de viande.....1

extrait de levure.....2,5

peptone.....5

Chlorure de sodium.....5

Agar.....15

pH =7

➤ **Composition du milieu mannitol mobilité (g/l)**

peptone .....20

Nitrate de K.....1

Mannitol.....2

Rouge de phénol à 1%.....4ml

Agar.....4

pH =8.1

➤ **Composition du milieu de Clarck et Lubs (g/l)**

Peptone.....10

Phosphate dipotassique.....2

Glucose.....5

pH=7

➤ **Composition du milieu KIA (g/l)**

Peptone.....20

Extrait de viande.....3

Glucose.....1

Lactose.....10

Extrait de levure.....3

---

Sulfate ferreux.....	0.3
NaCl.....	5
Hyposulfate de Na.....	0.3
Rouge de phénol.....	25mg
Agar.....	15

pH=7.4

➤ **Composition du milieu urée -indole (g/l) :**

L-tryptophane.....	3
Phosphate monopotassique.....	1
Phosphate bipotassique .....	1
NaCl.....	5
Urée.....	20
Alcool 95 <sup>0</sup> .....	10ml
Rouge de phénol.....	25ml

pH=6.7

➤ **Composition du milieu moeller (g/l) :**

Peptone.....	5
Extrait de viande.....	5
BCP.....	0,1
Rouge de crésol.....	5mg
Pyridoxal.....	5mg
Glucose.....	0,5

➤ **Composition du milieu Citrate de Simmons (g) :**

Citrate de sodium.....	1
Bleu de bromothymol.....	0,08
Chlorure de sodium.....	0,2

Hydrogénophosphate d'ammonium.....1

Dihydrogénophosphate d'ammonium.....1

Agar-agar.....15

pH=6,9