UNIVERSITE MOHAMMED V SUISSI

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2011 *THESE N°: 27*

IDENTIFICATION BACTÉRIOLOGIQUE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE TYPE MALDI-TOF (MATRIX-ASSISTED LASER DÉSORPTION/ IONISATION TIME- OF- FLIGHT

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE RABAT
BIBLIOTHEQUE "B"
N° d'Enregistrement : 2081
Cote :
Date d'Arrivée : 8/3/11

THESE

Présentée et soutenue publiquement le : .....

PAR

Mlle. ASMAA BENHILAL

Née le 05 janvier 1983 à Casablanca

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : *Identification – Bactériologie– Spectrométrie de masse- MALDI-TOF*

JURY

Mr. M. ZOUHDI — **PRESIDENT**
Professeur de Microbiologie

Mr. Y. SEKHSOKH — **RAPPORTEUR**
Professeur agrégé de Microbiologie

Mme. S. TELLAL
Professeur agrégé de Biochimie

Mr. A. MASRAR
Professeur agrégé d'Hématologie

JUGES

بسم الله الرحمان الرحيم

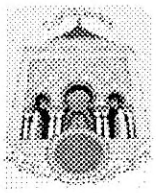
أولم ير الإنسان أنا خلقناه من نطفة

فإذا هو خصيم مبين و ضرب لنا مثلا و

نسي خلقه قال من يحي العظام و هي رميم

قل يحييها الذي أنشأها أول مرة و هو

بكل خلق عليم



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 - 1969 : **Docteur Abdelmalek FARAJ**
1969 - 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH

1974 - 1981 : Professeur Bachir LAZRAK

1981 - 1989 : Professeur Taieb CHKILI

1989 - 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI

1997 - 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Najia HAJJAJ

Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines

Professeur Mohammed JIDDANE

Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération

Professeur Ali BENOMAR

Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie

Professeur Yahia CHERRAH

Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1.	Pr. CHKILI Taieb	Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2.	Pr. HASSAR Mohamed	Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3.	Pr. EL KHAMLICHI Abdeslam	Neurochirurgie
4.	Pr. MESBAHI Redouane	Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5.	Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid	Cardiologie
6.	Pr. EL MANOUAR Mohamed	Traumatologie-Orthopédie
7.	Pr. HAMANI Ahmed*	Cardiologie
8.	Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih	Chirurgie Cardio-Vasculaire
9.	Pr. SBIHI Ahmed	Anesthésie -Réanimation
10.	Pr. TAOBANE Hamid*	Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

11.	Pr. ABROUQ Ali*	Oto-Rhino-Laryngologie
12.	Pr. BENOMAR M'hammed	Chirurgie-Cardio-Vasculaire
13.	Pr. BENSOUDA Mohamed	Anatomie
14.	Pr. BENOSMAN Abdellatif	Chirurgie Thoracique
15.	Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma	Physiologie

Novembre 1983

16.	Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*	Pneumo-phtisiologie
17.	Pr. BALAFREJ Amina	Pédiatrie
18.	Pr. BELLAKHDAR Fouad	Neurochirurgie
19.	Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia	Rhumatologie
20.	Pr. SRAIRI Jamal-Eddine	Cardiologie

Décembre 1984

21.	Pr. BOUCETTA Mohamed*	Neurochirurgie
22.	Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil	Radiothérapie
23.	Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne
24.	Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation

25.	Pr. NAJI M'Barek *	Immuno-Hématologie
26.	Pr. SETTAF Abdellatif	Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

27.	Pr. BENJELLOUN Halima	Cardiologie
28.	Pr. BENSAID Younes	Pathologie Chirurgicale
29.	Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa	Neurologie
30.	Pr. IHRAI Hssain *	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
31.	Pr. IRAQI Ghali	Pneumo-phtisiologie
32.	Pr. KZADRI Mohamed	Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

33.	Pr. AJANA Ali	Radiologie
34.	Pr. AMMAR Fanid	Pathologie Chirurgicale
35.	Pr. CHAHED OUAZZANI Houria ép.TAOBANE	Gastro-Entérologie
36.	Pr. EL FASSY FIHRI Mohamed Taoufiq	Pneumo-phtisiologie
37.	Pr. EL HAITEM Naïma	Cardiologie
38.	Pr. EL MANSOURI Abdellah*	Chimie-Toxicologie Expertise
39.	Pr. EL YAACOUBI Moradh	Traumatologie Orthopédie
40.	Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah	Gastro-Entérologie
41.	Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
42.	Pr. OHAYON Victor*	Médecine Interne
43.	Pr. YAHYAOUI Mohamed	Neurologie

Décembre 1988

44.	Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
45.	Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie
46.	Pr. FAIK Mohamed	Urologie
47.	Pr. HERMAS Mohamed	Traumatologie Orthopédie
48.	Pr. TOLOUNE Farida*	Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

49.	Pr. ADNAOUI Mohamed	Médecine Interne
50.	Pr. AOUNI Mohamed	Médecine Interne
51.	Pr. BENAMEUR Mohamed*	Radiologie
52.	Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali	Cardiologie
53.	Pr. CHAD Bouziane	Pathologie Chirurgicale
54.	Pr. CHKOFF Rachid	Pathologie Chirurgicale
55.	Pr. FARCHADO Fouzia ép.BENABDELLAH	Pédiatrique
56.	Pr. HACHIM Mohammed*	Médecine-Interne
57.	Pr. HACHIMI Mohamed	Urologie
58.	Pr. KHARBACH Aïcha	Gynécologie -Obstétrique
59.	Pr. MANSOURI Fatima	Anatomie-Pathologique
60.		

61.	Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda	Neurologie
62.	Pr. SEDRATI Omar*	Dermatologie
63.	Pr. TAZI Saoud Anas	Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

64.	Pr. AL HAMANY Zaîtounia	Anatomie-Pathologique
65.	Pr. ATMANI Mohamed*	Anesthésie Réanimation
66.	Pr. AZZOUZI Abderrahim	Anesthésie Réanimation
67.	Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM	Néphrologie
68.	Pr. BELKOUCHI Abdelkader	Chirurgie Générale
69.	Pr. BENABDELLAH Chahrazad	Hématologie
70.	Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif	Chirurgie Générale
71.	Pr. BENSOUDA Yahia	Pharmacie galénique
72.	Pr. BERRAHO Amina	Ophtalmologie
73.	Pr. BEZZAD Rachid	Gynécologie Obstétrique
74.	Pr. CHABRAOUI Layachi	Biochimie et Chimie
75.	Pr. CHANA El Houssaine*	Ophtalmologie
76.	Pr. CHERRAH Yahia	Pharmacologie
77.	Pr. CHOKAIRI Omar	Histologie Embryologie
78.	Pr. FAJRI Ahmed*	Psychiatrie
79.	Pr. JANATI Idrissi Mohamed*	Chirurgie Générale
80.	Pr. KHATTAB Mohamed	Pédiatrie
81.	Pr. NEJMI Maati	Anesthésie-Réanimation
82.	Pr. OUAALINE Mohammed*	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
83.	Pr. SOULAYMANI Rachida ép.BENCHEIKH	Pharmacologie
84.	Pr. TAOUFIK Jamal	Chimie thérapeutique

85.	Décembre 1992	
86.	Pr. AHALLAT Mohamed	Chirurgie Générale
87.	Pr. BENOUDA Amina	Microbiologie
88.	Pr. BENSOUDA Adil	Anesthésie Réanimation
89.	Pr. BOUJIDA Mohamed Najib	Radiologie
90.	Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza	Gastro-Entérologie
91.	Pr. CHRAIBI Chafiq	Gynécologie Obstétrique
92.	Pr. DAOUDI Rajae	Ophtalmologie
93.	Pr. DEHAYNI Mohamed*	Gynécologie Obstétrique
94.	Pr. EL HADDOURY Mohamed	Anesthésie Réanimation
95.	Pr. EL OUAHABI Abdessamad	Neurochirurgie
96.	Pr. FELLAT Rokaya	Cardiologie
97.	Pr. GHAFIR Driss*	Médecine Interne
98.	Pr. JIDDANE Mohamed	Anatomie
99.	Pr. OUAZZANI TAIBI Med Charaf Eddine	Gynécologie Obstétrique
100.	Pr. TAGHY Ahmed	Chirurgie Générale
101.	Pr. ZOUHDI Mimoun	Microbiologie

Mars 1994

102.	Pr. AGNAOU Lahcen	Ophtalmologie
103.	Pr. AL BAROUDI Saad	Chirurgie Générale
104.	Pr. BENCHERIFA Fatiha	Ophtalmologie
105.	Pr. BENJAAFAR Noureddine	Radiothérapie
106.	Pr. BENJELLOUN Samir	Chirurgie Générale
107.	Pr. BEN RAIS Nozha	Biophysique
108.	Pr. CAOUI Malika	Biophysique
109.	Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
110.	Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT	Gynécologie Obstétrique
111.	Pr. EL AOUAD Rajae	Immunologie
112.	Pr. EL BARDOUNI Ahmed	Traumato-Orthopédie
113.	Pr. EL HASSANI My Rachid	Radiologie
114.	Pr. EL IDRISSI LAMGHARI Abdennaceur	Médecine Interne
115.	Pr. EL KIRAT Abdelmajid*	Chirurgie Cardio- Vasculaire
116.	Pr. ERROUGANI Abdelkader	Chirurgie Générale
117.	Pr. ESSAKALI Malika	Immunologie
118.	Pr. ETTAYEBI Fouad	Chirurgie Pédiatrique
119.	Pr. HADRI Larbi*	Médecine Interne
120.	Pr. HASSAM Badredine	Dermatologie
121.	Pr. IFRINE Lahssan	Chirurgie Générale
122.	Pr. JELTHI Ahmed	Anatomie Pathologique
123.	Pr. MAHFOUD Mustapha	Traumatologie - Orthopédie
124.	Pr. MOUDENE Ahmed*	Traumatologie- Orthopédie
125.	Pr. OULBACHA Said	Chirurgie Générale
126.	Pr. RHRAB Brahim	Gynécologie -Obstétrique
127.	Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR	Dermatologie
128.	Pr. SLAOUI Anas	Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

129.	Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
130.	Pr. ABDELHAK M'barek	Chirurgie - Pédiatrique
131.	Pr. BELAIDI Halima	Neurologie
132.	Pr. BRAHMI Rida Slimane	Gynécologie Obstétrique
133.	Pr. BENTAHILA Abdelali	Pédiatrie
134.	Pr. BENYAHIA Mohammed Ali	Gynécologie - Obstétrique
135.	Pr. BERRADA Mohamed Saleh	Traumatologie - Orthopédie
136.	Pr. CHAMI Ilham	Radiologie
137.	Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae	Ophtalmologie
138.	Pr. EL ABBADI Najia	Neurochirurgie
139.	Pr. HANINE Ahmed*	Radiologie
140.	Pr. JALIL Abdelouahed	Chirurgie Générale
141.	Pr. LAKHDAR Amina	Gynécologie Obstétrique

142.	Pr. MOUANE Nezha	Pédiatrie

Mars 1995

143.	Pr. ABOUQUAL Redouane	Réanimation Médicale
144.	Pr. AMRAOUI Mohamed	Chirurgie Générale
145.	Pr. BAIDADA Abdelaziz	Gynécologie Obstétrique
146.	Pr. BARGACH Samir	Gynécologie Obstétrique
147.	Pr. BEDDOUCHE Amoqrane*	Urologie
148.	Pr. BENAZZOUZ Mustapha	Gastro-Entérologie
149.	Pr. CHAARI Jilali*	Médecine Interne
150.	Pr. DIMOU M'barek*	Anesthésie Réanimation
151.	Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*	Anesthésie Réanimation
152.	Pr. EL MESNAOUI Abbes	Chirurgie Générale
153.	Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila	Oto-Rhino-Laryngologie
154.	Pr. FERHATI Driss	Gynécologie Obstétrique
155.	Pr. HASSOUNI Fadil	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
156.	Pr. HDA Abdelhamid*	Cardiologie
157.	Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed	Urologie
158.	Pr. IBRAHIMY Wafaa	Ophtalmologie
159.	Pr. MANSOURI Aziz	Radiothérapie
160.	Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia	Ophtalmologie
161.	Pr. RZIN Abdelkader*	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
162.	Pr. SEFIANI Abdelaziz	Génétique
163.	Pr. ZEGGWAGH Amine Ali	Réanimation Médicale

Décembre 1996

164.	Pr. AMIL Touriya*	Radiologie
165.	Pr. BELKACEM Rachid	Chirurgie Pédiatrie
166.	Pr. BELMAHI Amin	Chirurgie réparatrice et plastique
167.	Pr. BOULANOUAR Abdelkrim	Ophtalmologie
168.	Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan	Chirurgie Générale
169.	Pr. EL MELLOUKI Ouafae*	Parasitologie
170.	Pr. GAOUZI Ahmed	Pédiatrie
171.	Pr. MAHFOUDI M'barek*	Radiologie
172.	Pr. MOHAMMADINE EL Hamid	Chirurgie Générale
173.	Pr. MOHAMMADI Mohamed	Médecine Interne
174.	Pr. MOULINE Soumaya	Pneumo-phtisiologie
175.	Pr. OUADGHIRI Mohamed	Traumatologie-Orthopédie
176.	Pr. OUZEDDOUN Naima	Néphrologie
177.	Pr. ZBIR EL Mehdi*	Cardiologie

Novembre 1997

178.	Pr. ALAMI Mohamed Hassan	Gynécologie-Obstétrique
179.	Pr. BEN AMAR Abdesselem	Chirurgie Générale
180.	Pr. BEN SLIMANE Lounis	Urologie
181.	Pr. BIROUK Nazha	Neurologie
182.	Pr. BOULAICH Mohamed	O.R.L.

183.	Pr. CHAOUIR Souad*	Radiologie
184.	Pr. DERRAZ Said	Neurochirurgie
185.	Pr. ERREIMI Naima	Pédiatrie
186.	Pr. FELLAT Nadia	Cardiologie
187.	Pr. GUEDDARI Fatima Zohra	Radiologie
188.	Pr. HAIMEUR Charki*	Anesthésie Réanimation
189.	Pr. KANOUNI NAWAL	Physiologie
190.	Pr. KOUTANI Abdellatif	Urologie
191.	Pr. LAHLOU Mohamed Khalid	Chirurgie Générale
192.	Pr. MAHRAOUI CHAFIQ	Pédiatrie
193.	Pr. NAZI M'barek*	Cardiologie
194.	Pr. OUAHABI Hamid*	Neurologie
195.	Pr. SAFI Lahcen*	Anesthésie Réanimation
196.	Pr. TAOUFIQ Jallal	Psychiatrie
197.	Pr. YOUSFI MALKI Mounia	Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

198.	Pr. AFIFI RAJAA	Gastro-Entérologie
199.	Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*	Pneumo-phtisiologie
200.	Pr. ALOUANE Mohammed*	Oto-Rhino-Laryngologie
201.	Pr. BENOMAR ALI	Neurologie
202.	Pr. BOUGTAB Abdesslam	Chirurgie Générale
203.	Pr. ER RIHANI Hassan	Oncologie Médicale
204.	Pr. EZZAITOUNI Fatima	Néphrologie
205.	Pr. KABBAJ Najat	Radiologie
206.	Pr. LAZRAK Khalid (M)	Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

207.	Pr. BENKIRANE Majid*	Hématologie
208.	Pr. KHATOURI ALI*	Cardiologie
209.	Pr. LABRAIMI Ahmed*	Anatomie Pathologique

Janvier 2000

210.	Pr. ABID Ahmed*	Pneumophtisiologie
211.	Pr. AIT OUMAR Hassan	Pédiatrie
212.	Pr. BENCHERIF My Zahid	Ophtalmologie
213.	Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd	Pédiatrie
214.	Pr. BOURKADI Jamal-Eddine	Pneumo-phtisiologie
215.	Pr. CHAOUI Zineb	Ophtalmologie
216.	Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer	Chirurgie Générale
217.	Pr. ECHARRAB El Mahjoub	Chirurgie Générale
218.	Pr. EL FTOUH Mustapha	Pneumo-phtisiologie

219.	Pr. EL MOSTARCHID Brahim*	Neurochirurgie
220.	Pr. EL OTMANYAzzedine	Chirurgie Générale
221.	Pr. GHANNAM Rachid	Cardiologie
222.	Pr. HAMMANI Lahcen	Radiologie
223.	Pr. ISMAILI Mohamed Hatim	Anesthésie-Réanimation
224.	Pr. ISMAILI Hassane*	Traumatologie Orthopédie
225.	Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss	Gastro-Entérologie
226.	Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*	Anesthésie-Réanimation
227.	Pr. TACHINANTE Rajae	Anesthésie-Réanimation
228.	Pr. TAZI MEZALEK Zoubida	Médecine Interne

Novembre 2000

229.	Pr. AIDI Saadia	Neurologie
230.	Pr. AIT OURHROUI Mohamed	Dermatologie
231.	Pr. AJANA Fatima Zohra	Gastro-Entérologie
232.	Pr. BENAMR Said	Chirurgie Générale
233.	Pr. BENCHEKROUN Nabiha	Ophtalmologie
234.	Pr. CHERTI Mohammed	Cardiologie
235.	Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma	Anesthésie-Réanimation
236.	Pr. EL HASSANI Amine	Pédiatrie
237.	Pr. EL IDGHIRI Hassan	Oto-Rhino-Laryngologie
238.	Pr. EL KHADER Khalid	Urologie
239.	Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*	Rhumatologie
240.	Pr. GHARBI Mohamed El Hassan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
241.	Pr. HSSAIDA Rachid*	Anesthésie-Réanimation
242.	Pr. LACHKAR Azzouz	Urologie
243.	Pr. LAHLOU Abdou	Traumatologie Orthopédie
244.	Pr. MAFTAH Mohamed*	Neurochirurgie
245.	Pr. MAHASSINI Najat	Anatomie Pathologique
246.	Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae	Pédiatrie
247.	Pr. NASSIH Mohamed*	Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
248.	Pr. ROUIMI Abdelhadi	Neurologie

Décembre 2001

249.	Pr. ABABOU Adil	Anesthésie-Réanimation
250.	Pr. AOUAD Aicha	Cardiologie
251.	Pr. BALKHI Hicham*	Anesthésie-Réanimation
252.	Pr. BELMEKKI Mohammed	Ophtalmologie
253.	Pr. BENABDELJLIL Maria	Neurologie
254.	Pr. BENAMAR Loubna	Néphrologie
255.	Pr. BENAMOR Jouda	Pneumo-phtisiologie
256.	Pr. BENELBARHDADI Imane	Gastro-Entérologie
257.	Pr. BENNANI Rajae	Cardiologie
258.	Pr. BENOUACHANE Thami	Pédiatrie
259.	Pr. BENYOUSSEF Khalil	Dermatologie

260.	Pr. BERRADA Rachid	Gynécologie Obstétrique
261.	Pr. BEZZA Ahmed*	Rhumatologie
262.	Pr. BOUCHIKHI IDRISSI Med Larbi	Anatomie
263.	Pr. BOUHOUCH Rachida	Cardiologie
264.	Pr. BOUMDIN El Hassane*	Radiologie
265.	Pr. CHAT Latifa	Radiologie
266.	Pr. CHELLAOUI Mounia	Radiologie
267.	Pr. DAALI Mustapha*	Chirurgie Générale
268.	Pr. DRISSI Sidi Mourad*	Radiologie
269.	Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira	Gynécologie Obstétrique
270.	Pr. EL HIJRI Ahmed	Anesthésie-Réanimation
271.	Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid	Neuro-Chirurgie
272.	Pr. EL MADHI Tarik	Chirurgie-Pédiatrique
273.	Pr. EL MOUSSAIF Hamid	Ophtalmologie
274.	Pr. EL OUNANI Mohamed	Chirurgie Générale
275.	Pr. EL QUESSAR Abdeljlil	Radiologie
276.	Pr. ETTAIR Said	Pédiatrie
277.	Pr. GAZZAZ Miloudi*	Neuro-Chirurgie
278.	Pr. GOURINDA Hassan	Chirurgie-Pédiatrique
279.	Pr. HRORA Abdelmalek	Chirurgie Générale
280.	Pr. KABBAJ Saad	Anesthésie-Réanimation
281.	Pr. KABIRI EL Hassane*	Chirurgie Thoracique
282.	Pr. LAMRANI Moulay Omar	Traumatologie Orthopédie
283.	Pr. LEKEHAL Brahim	Chirurgie Vasculaire Périphérique
284.	Pr. MAHASSIN Fattouma*	Médecine Interne
285.	Pr. MEDARHRI Jalil	Chirurgie Générale
286.	Pr. MIKDAME Mohammed*	Hématologie Clinique
287.	Pr. MOHSINE Raouf	Chirurgie Générale
288.	Pr. NABIL Samira	Gynécologie Obstétrique
289.	Pr. NOUINI Yassine	Urologie
290.	Pr. OUALIM Zouhir*	Néphrologie
291.	Pr. SABBAH Farid	Chirurgie Générale
292.	Pr. SEFIANI Yasser	Chirurgie Vasculaire Périphérique
293.	Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia	Pédiatrie
294.	Pr. TAZI MOUKHA Karim	Urologie

Décembre 2002

295.	Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*	Anatomie Pathologique
296.	Pr. AMEUR Ahmed *	Urologie
297.	Pr. AMRI Rachida	Cardiologie
298.	Pr. AOURARH Aziz*	Gastro-Entérologie
299.	Pr. BAMOU Youssef *	Biochimie-Chimie
300.	Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
301.	Pr. BENBOUAZZA Karima	Rhumatologie
302.	Pr. BENZEKRI Laila	Dermatologie
303.	Pr. BENZZOUBEIR Nadia*	Gastro-Entérologie
304.	Pr. BERNOUSSI Zakiya	Anatomie Pathologique

305.	Pr. BICHRA Mohamed Zakariya	Psychiatrie
306.	Pr. CHOHO Abdelkrim *	Chirurgie Générale
307.	Pr. CHKIRATE Bouchra	Pédiatrie
308.	Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair	Chirurgie Pédiatrique
309.	Pr. EL ALJ Haj Ahmed	Urologie
310.	Pr. EL BARNOUSSI Leila	Gynécologie Obstétrique
311.	Pr. EL HAOURI Mohamed *	Dermatologie
312.	Pr. EL MANSARI Omar*	Chirurgie Générale
313.	Pr. ES-SADEL Abdelhamid	Chirurgie Générale
314.	Pr. FILALI ADIB Abdelhai	Gynécologie Obstétrique
315.	Pr. HADDOUR Leila	Cardiologie
316.	Pr. HAJJI Zakia	Ophtalmologie
317.	Pr. IKEN Ali	Urologie
318.	Pr. ISMAEL Farid	Traumatologie Orthopédie
319.	Pr. JAAFAR Abdeloihab*	Traumatologie Orthopédie
320.	Pr. KRIOULE Yamina	Pédiatrie
321.	Pr. LAGHMARI Mina	Ophtalmologie
322.	Pr. MABROUK Hfid*	Traumatologie Orthopédie
323.	Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*	Gynécologie Obstétrique
324.	Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*	Cardiologie
325.	Pr. MOUSTAINE My Rachid	Traumatologie Orthopédie
326.	Pr. NAITLHO Abdelhamid*	Médecine Interne
327.	Pr. OUJILAL Abdelilah	Oto-Rhino-Laryngologie
328.	Pr. RACHID Khalid *	Traumatologie Orthopédie
329.	Pr. RAISS Mohamed	Chirurgie Générale
330.	Pr. RGUIBI IDRISSI Sidi Mustapha*	Pneumophtisiologie
331.	Pr. RHOU Hakima	Néphrologie
332.	Pr. SIAH Samir *	Anesthésie Réanimation
333.	Pr. THIMOU Amal	Pédiatrie
334.	Pr. ZENTAR Aziz*	Chirurgie Générale
335.	Pr. ZRARA Ibtisam*	Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

336.	Pr. ABDELLAH El Hassan	Ophtalmologie
337.	Pr. AMRANI Mariam	Anatomie Pathologique
338.	Pr. BENBOUZID Mohammed Anas	Oto-Rhino-Laryngologie
339.	Pr. BENKIRANE Ahmed*	Gastro-Entérologie
340.	Pr. BENRAMDANE Larbi*	Chimie Analytique
341.	Pr. BOUGHALEM Mohamed*	Anesthésie Réanimation
342.	Pr. BOULAADAS Malik	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
343.	Pr. BOURAZZA Ahmed*	Neurologie
344.	Pr. CHAGAR Belkacem*	Traumatologie Orthopédie
345.	Pr. CHERRADI Nadia	Anatomie Pathologique

346.	Pr. EL FENNI Jamal*	Radiologie
347.	Pr. EL HANCHI ZAKI	Gynécologie Obstétrique
348.	Pr. EL KHORASSANI Mohamed	Pédiatrie
349.	Pr. EL YOUNASSI Badreddine*	Cardiologie
350.	Pr. HACHI Hafid	Chirurgie Générale
351.	Pr. JABOUIRIK Fatima	Pédiatrie
352.	Pr. KARMANE Abdelouahed	Ophtalmologie
353.	Pr. KHABOUZE Samira	Gynécologie Obstétrique
354.	Pr. KHARMAZ Mohamed	Traumatologie Orthopédie
355.	Pr. LEZREK Mohammed*	Urologie
356.	Pr. MOUGHIL Said	Chirurgie Cardio-Vasculaire
357.	Pr. NAOUMI Asmae*	Ophtalmologie
358.	Pr. SAADI Nozha	Gynécologie Obstétrique
359.	Pr. SASSENOU ISMAIL*	Gastro-Entérologie
360.	Pr. TARIB Abdelilah*	Pharmacie Clinique
361.	Pr. TIJAMI Fouad	Chirurgie Générale
362.	Pr. ZARZUR Jamila	Cardiologie

Janvier 2005

363.	Pr. ABBASSI Abdellah	Chirurgie Réparatrice et Plastique
364.	Pr. AL KANDRY Sif Eddine*	Chirurgie Générale
365.	Pr. ALAOUI Ahmed Essaid	Microbiologie
366.	Pr. ALLALI Fadoua	Rhumatologie
367.	Pr. AMAR Yamama	Néphrologie
368.	Pr. AMAZOUZI Abdellah	Ophtalmologie
369.	Pr. AZIZ Noureddine*	Radiologie
370.	Pr. BAHIRI Rachid	Rhumatologie
371.	Pr. BARKAT Amina	Pédiatrie
372.	Pr. BENHALIMA Hanane	Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
373.	Pr. BENHARBIT Mohamed	Ophtalmologie
374.	Pr. BENYASS Aatif	Cardiologie
375.	Pr. BERNOUSSI Abdelghani	Ophtalmologie
376.	Pr. BOUKLATA Salwa	Radiologie
377.	Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed	Ophtalmologie
378.	Pr. DOUDOUH Abderrahim*	Biophysique
379.	Pr. EL HAMZAOUI Sakina	Microbiologie
380.	Pr. HAJJI Leila	Cardiologie
381.	Pr. HESSISSEN Leila	Pédiatrie
382.	Pr. JIDAL Mohamed*	Radiologie
383.	Pr. KARIM Abdelouahed	Ophtalmologie
384.	Pr. KENDOUSSI Mohamed*	Cardiologie
385.	Pr. LAAROUSSI Mohamed	Chirurgie Cardio-vasculaire
386.	Pr. LYAGOUBI Mohammed	Parasitologie
387.	Pr. NIAMANE Radouane*	Rhumatologie
388.	Pr. RAGALA Abdelhak	Gynécologie Obstétrique
389.	Pr. SBIHI Souad	Histo-Embryologie Cytogénétique
390.	Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam	Ophtalmologie

391. Pr. ZERAIDI Najia — Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen* — Rhumatologie
424. Pr. AFIFI Yasser — Dermatologie
425. Pr. AKJOUJ Said* — Radiologie
426. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra — Dermatologie
427 Pr. BELMEKKI Abdelkader* — Hématologie
428. Pr. BENCHEIKH Razika — O.R.L
429 Pr. BIYI Abdelhamid* — Biophysique
430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine — Chirurgie - Pédiatrique
431. Pr. BOULAHYA Abdellatif* — Chirurgie Cardio - Vasculaire
432. Pr. CHEIKHAOUI Younes — Chirurgie Cardio - Vasculaire
433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas — Gynécologie Obstétrique
434. Pr. DOGHMI Nawal — Cardiologie
435. Pr. ESSAMRI Wafaa — Gastro-entérologie
436. Pr. FELLAT Ibtissam — Cardiologie
437. Pr. FAROUDY Mamoun — Anesthésie Réanimation
438. Pr. GHADOUANE Mohammed* — Urologie
439. Pr. HARMOUCHE Hicham — Médecine Interne
440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed* — Anesthésie Réanimation
441 Pr. IDRISS LAHLOU Amine — Microbiologie
442. Pr. JROUNDI Laila — Radiologie
443. Pr. KARMOUNI Tariq — Urologie

444. Pr. KILI Amina	Pédiatrie
445. Pr. KISRA Hassan	Psychiatrie
446. Pr. KISRA Mounir	Chirurgie – Pédiatrique
447. Pr. KHARCHAFI Aziz*	Médecine Interne
448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*	Pharmacie Galénique
449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*	Parasitologie
450. Pr. MANSOURI Hamid*	Radiothérapie
451. Pr. NAZIH Naoual	O.R.L
452. Pr. OUANASS Abderrazzak	Psychiatrie
453. Pr. SAFI Soumaya*	Endocrinologie
454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra	Psychiatrie
455. Pr. SEFIANI Sana	Anatomie Pathologique
456. Pr. SOUALHI Mouna	Pneumo – Phtisiologie
457. Pr. TELLAL Saida*	Biochimie
458. Pr. ZAHRAOUI Rachida	Pneumo – Phtisiologie

<u>Octobre 2007</u>

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila	Anatomie pathologique
459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid	Anesthésie réanimation
460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid	Anesthésier réanimation
461. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *	Anesthésie réanimation
462. Pr. BAITE Abdelouahed *	Anesthésie réanimation
463. Pr. TOUATI Zakia	Cardiologie
464. Pr. OUZZIF Ez zohra *	Biochimie
465. Pr. BALOUCH Lhousaine *	Biochimie

466. Pr. SELKANE Chakir *	Chirurgie cardio vasculaire
467. Pr. EL BEKKALI Youssef *	Chirurgie cardio vasculaire
468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *	Chirurgie cardio vasculaire
469. Pr. EL ABSI Mohamed	Chirurgie générale
470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *	Chirurgie générale
471. Pr. ACHOUR Abdessamad *	Chirurgie générale
472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq *	Chirurgie générale
473. Pr. GHARIB Noureddine	Chirurgie plastique
474. Pr. TABERKANET Mustafa *	Chirurgie vasculaire périphérique
475. Pr. ISMAILI Nadia	Dermatologie
476. Pr. MASRAR Azlarab	Hématologie biologique
477. Pr. RABHI Monsef *	Médecine interne
478. Pr. MRABET Mustapha *	Médecine préventive santé publique et hygiène
479. Pr. SEKHSOKH Yessine *	Microbiologie
480. Pr. SEFFAR Myriame	Microbiologie
481. Pr. LOUZI Lhoussain *	Microbiologie
482. Pr. MRANI Saad *	Virologie
483. Pr. GANA Rachid	Neuro chirurgie
484. Pr. ICHOU Mohamed *	Oncologie médicale
485. Pr. TACHFOUTI Samira	Ophtalmologie
486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine	Ophtalmologie
487. Pr. MELLAL Zakaria	Ophtalmologie
488. Pr. AMMAR Haddou *	ORL
489. Pr. AOUFI Sarra	Parasitologie
490. Pr. TLIGUI Houssain	Parasitologie

491. Pr. MOUTAJ Redouane *	Parasitologie
492. Pr. ACHACHI Leila	Pneumo phtisiologie
493. Pr. MARC Karima	Pneumo phtisiologie
494. Pr. BENZIANE Hamid *	Pharmacie clinique
495. Pr. CHERKAOUI Naoual *	Pharmacie galénique
496. Pr. EL OMARI Fatima	Psychiatrie
497. Pr. MAHI Mohamed *	Radiologie
498. Pr. RADOUANE Bouchaib *	Radiologie
499. Pr. KEBDANI Tayeb	Radiothérapie
500. Pr. SIFAT Hassan *	Radiothérapie
501. Pr. HADADI Khalid *	Radiothérapie
502. Pr. ABIDI Khalid	Réanimation médicale
503. Pr. MADANI Naoufel	Réanimation médicale
504. Pr. TANANE Mansour *	Traumatologie orthopédie
505. Pr. AMHAJJI Larbi *	Traumatologie orthopédie

Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes	Anatomie
Pr. AZENDOUR Hicham *	Anesthésie Réanimation
Pr. BELYAMANI Lahcen *	Anesthésie Réanimation
Pr. BOUHSAIN Sanae *	Biochimie
Pr. OUKERRAJ Latifa	Cardiologie
Pr. LAMSAOURI Jamal *	Chimie Thérapeutique
Pr. MARMADE Lahcen	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AMAHZOUNE Brahim *	Chirurgie Cardio-vasculaire

Pr. AIT ALI Abdelmounaim *	Chirurgie Générale
Pr. BOUNAIM Ahmed *	Chirurgie Générale
Pr. EL MALKI Hadj Omar	Chirurgie Générale
Pr. MSSROURI Rahal	Chirurgie Générale
Pr. CHTATA Hassan Toufik *	Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pr. BOUI Mohammed *	Dermatologie
Pr. KABBAJ Nawal	Gastro-entérologie
Pr. FATHI Khalid	Gynécologie obstétrique
Pr. MESSAOUDI Nezha *	Hématologie biologique
Pr. CHAKOUR Mohammed *	Hématologie biologique
Pr. DOGHMI Kamal *	Hématologie clinique
Pr. ABOUZAHIR Ali *	Médecine interne
Pr. ENNIBI Khalid *	Médecine interne
Pr. EL OUENNASS Mostapha	Microbiologie
Pr. ZOUHAIR Said*	Microbiologie
Pr. L'kassimi Hachemi*	Microbiologie
Pr. AKHADDAR Ali *	Neuro-chirurgie
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia	Neurologie
Pr. AGADR Aomar *	Pédiatrie
Pr. KARBOUBI Lamya	Pédiatrie
Pr. MESKINI Toufik	Pédiatrie
Pr. KABIRI Meryem	Pédiatrie
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *	Pneumo-phtisiologie
Pr. BASSOU Driss *	Radiologie
Pr. ALLALI Nazik	Radiologie

Pr. NASSAR Ittimade	Radiologie
Pr. HASSIKOU Hasna *	Rhumatologie
Pr. AMINE Bouchra	Rhumatologie
Pr. BOUSSOUGA Mostapha *	Traumatologie orthopédique
Pr. KADI Said *	Traumatologie orthopédique

Octobre 2010

Pr. AMEZIANE Taoufiq*	Médecine interne
Pr. ERRABIH Ikram	Gastro entérologie
Pr. CHERRADI Ghizlan	Cardiologie
Pr. MOSADIK Ahlam	Anesthésie Réanimation
Pr. ALILOU Mustapha	Anesthésie réanimation
Pr. KANOUNI Lamya	Radiothérapie
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*	Radiologie
Pr. DARBI Abdellatif*	Radiologie
Pr. EL HAFIDI Naima	Pédiatrie
Pr. MALIH Mohamed*	Pédiatrie
Pr. BOUSSIF Mohamed*	Médecine aérotique
Pr. EL MAZOUZ Samir	Chirurgie plastique et réparatrice
Pr. DENDANE Mohammed Anouar	Chirurgie pédiatrique
Pr. EL SAYEGH Hachem	Urologie
Pr. MOUJAHID Mountassir*	Chirurgie générale
Pr. RAISSOUNI Zakaria*	Traumatologie orthopédie
Pr. BOUAITY Brahim*	ORL
Pr. LEZREK Mounir	Ophtalmologie

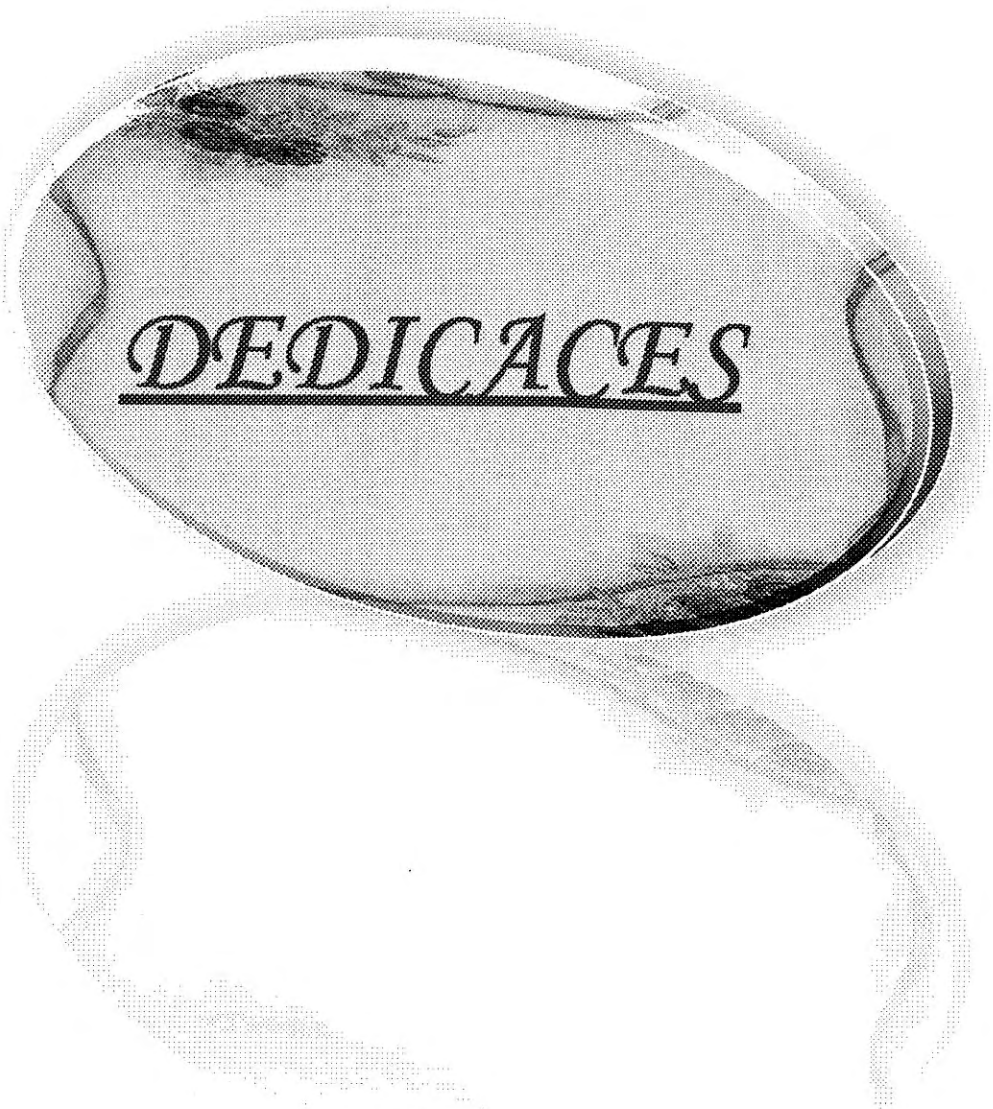
Pr. NAZIH Mouna*	Hématologie
Pr. LAMALMI Najat	Anatomie pathologique
Pr. ZOUAIDIA Fouad	Anatomie pathologique
Pr. BELAGUID Abdelaziz	Physiologie
Pr. DAMI Abdellah*	Biochimie chimie
Pr. CHADLI Mariama*	Microbiologie

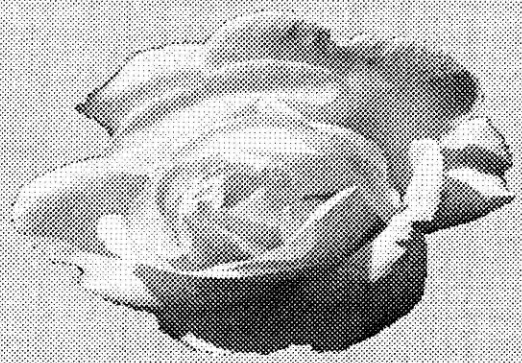
ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

1.	Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
2.	Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie
3.	Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
4.	Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
5.	Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
6.	Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
7.	Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
8.	Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
9.	Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia	Biochimie
10.	Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
11.	Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
12.	Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
13.	Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootechnie
14.	Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
15.	Pr. HMAMOUCHI Mohamed	Chimie Organique
16.	Pr. IBRAHIMI Azeddine	
17.	Pr. KABBAJ Ouafae	Biochimie
18.	Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
19.	Pr. REDHA Ahlam	Biochimie
20.	Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSI Med	Chimie Organique
21.	Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
22.	Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
23.	Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

** Enseignants Militaires*


DEDICACES



Toutes les lettres ne sauraient trouver

les mots qu'il faut...

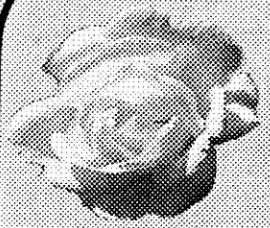
Tous les mots ne sauraient exprimer la

gratitude,

l'amour, le respect et la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que

Je dédie cette thèse à ...



A Allah

Tout puissant

Qui m'a inspiré

Qui m'a guidé dans le bon chemin

Je vous dois ce que je suis devenue

Louanges et remerciements

Pour votre clémence et miséricorde

A mes très chers parents que j'adore CENTLAA

MOHAMED ET BOUBEATRADJA

Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur, l'ampleur de l'Amour, l'Attachement que j'éprouve pour vous . mon respect et ma considération pour les sacrifices que vous consentis pour mon éducation, mon instruction et mon bien être.

Vos prières et vos encouragements, ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours.

Je suis fière et contente de réaliser une partie de ce que vous avez tant espéré et attendu de moi.

Ce travail représente le si peu avec lequel je pourrai vous remercier. Seul dieu tout puissant pourra vous récompenser.

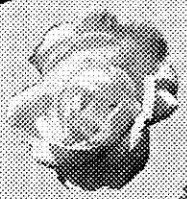
Merveilleuse maman, j'espère que j'ai été à la hauteur de vos espérances. Que Dieu tu garde et tu accorde longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler.

A mes très chers frères MUSTAPHA

et ABDELAZIZ

Pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que vous portez à ma vie, pour votre soutien, votre compréhension et vos encouragements.

Que Dieu le tout-puissant, vous accorde longue vie, prospérité et bonheur.



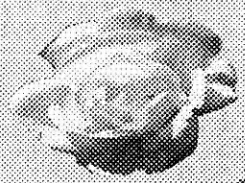
A mes très chères sœurs AMINA,

MALIKA, FATIMA, DOUA

Les mots ne sauraient exprimer l'entendue de l'affection que j'ai pour vous

Je suis très honorée d'avoir des sœurs comme vous, vous m'avez épaulé aux moments les plus durs, je vous dédie ce travail avec l'expression de mon amour et ma gratitude.

Que dieu vous bénisse et vous offre un avenir prospère.



A ma belle famille

Essentiellement mon oncle BENRAL

AHMED, mes tantes AICHA et

MELODA

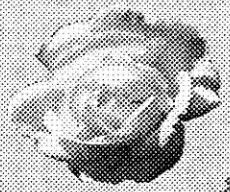
Pour vos encouragements et vos soutiens

Je vous aime énormément

J'espère Que ce travail soit le témoin de

toute mon affection, ma gratitude, mon estime

et mon attachement.

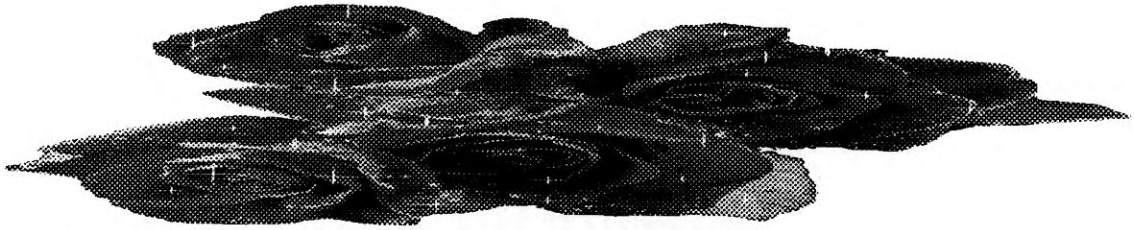


A tous mes meilleures amies

En souvenir des moments agréables passés ensemble, veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma tendre affection et mes sentiments les plus respectueux avec mes vœux de succès, de bonheur et de bonne santé

.

REMERCIEMENTS



À NOTRE MAITRE PRÉSIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur M. ZOUHDI

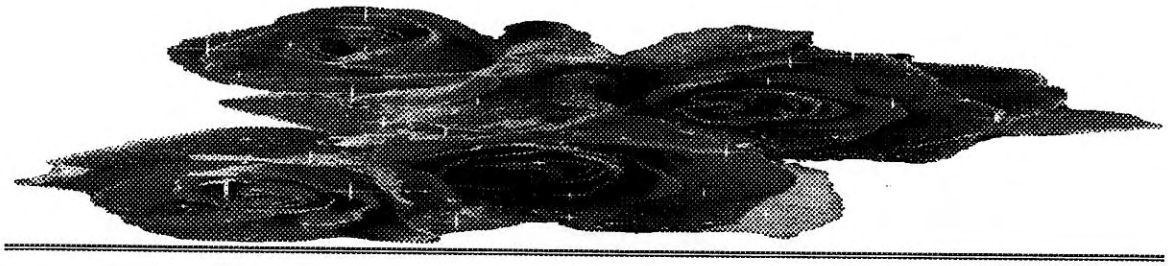
Professeur de Microbiologie

Permettez-nous de vous exprimer nos sincères remerciements. C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de cette thèse avec plaisir et sans conditions.

Nous gardons un vif souvenir de la simplicité et l'amabilité de votre abord.

Vos qualités humaines et professionnelles seront pour nous un exemple à suivre dans l'exercice de notre métier.

Veuillez trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude



A NOTRE MAITRE ET RAPPORTEUR DE THESE

Monsieur le professeur Y. SEKHSOKH

Professeur de Microbiologie

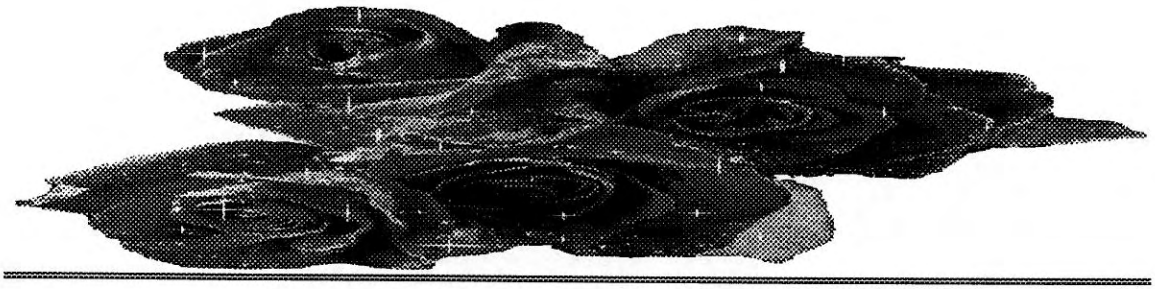
Nous vous remercions vivement de nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail.

Vous nous avez aidé jusqu'au dernier moment avec un grand savoir et des orientations éclairantes accompagnées d'une grande gentillesse.

Sans votre Clairvoyance, vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être préparé et dirigé dans des conditions favorables.

Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.

Qu'ALLAH vous protège et vous accorde santé, bonheur et prospérité à vous et à vos enfants



A NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE

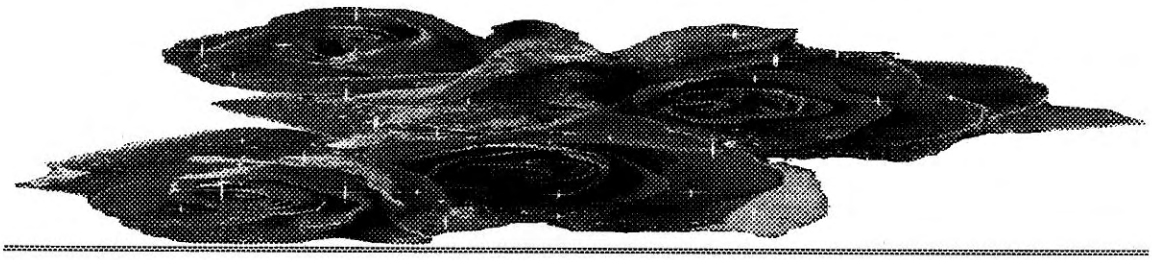
MADAM le professeur S.TELLAL

Professeur de biochimie

Nous sommes particulièrement reconnaissants pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de jurer notre travail.

Notre gratitude est grande pour l'intérêt que vous avez montré à l'encontre de notre travail

Veuillez trouver dans cet ouvrage le témoignage de notre profonde reconnaissance et respect.



A NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE

Monsieur le Professeur A. MASRAR

Professeur d'hématologie.

C'est pour nous un grand honneur que vous acceptiez de siéger parmi notre honorable jury.

Votre modestie, votre sérieux et votre compétence professionnelle seront pour nous un exemple dans l'exercice de notre profession.

Permettez nous de vous présenter dans ce travail, le témoignage de notre grand aspect

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique.

ARN : acide ribonucléique.

ACN : acitonitrile.

AF : acide formique.

BCP : pourpre de bromocrésol.

BM : biologie moléculaire.

CHCA : acide alphacyano-4-hydroxycinnamique.

CHU : centre hospitalière universitaire.

CNR : centre nationale de référence.

dTTP : désoxythymidine triphosphate.

dUTP : désoxyuridine triphosphate.

E.coli: Escherichia coli

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

IC: identification conventionnelle

KDa : kilodalton.

MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption ionization time of flight.

PCR: polymerase chain reaction.

PVL: leucocidine de Panton et Valentine.

SDS : sodium dodecyl sulphate

TFA : acide trifluoroacetique.

Liste des figures

Figures	*Titre*
Figure 1	Photo d'un SM MALDI-TOF Biflex
Figure 2	Principe de la SM type MALDI-TOF
Figure 3	Structure d'un SM
Figure 4	Etapes d'ionisation moléculaire
Figure 5	Analyseur à temps de vol
Figure 6	Structures des matrices les plus usuelles
Figure 7	Préparation de l'échantillon inclus dans un gel
Figure 8	Procédure d'élimination des sels
Figure 9	Dessalage par Zip Tip
Figure 10	Aspect du dépôt en présence de composés incompatibles
Figure 11	Etapes de dépôt en couche mince
Figure 12	Etapes de dépôt en goutte séchée
Figure 13	Etape de dépôt type sandwich
Figure 14	Résultats d'analyse des souches bactériennes

Figure 15	Schéma général de l'identification en SM dans l'organisation du laboratoire
Figure 16	Schéma présentatif des résultats d'analyse
Figure 17	Etapes de synthèse du pore
Figure18	Exemple d'un spectre MALDI-TOF pour la toxine PVL
Figure 19	Spectre de masse de *Listeria.innocua* après (a) stérilisation en boillon pour 5 min, (b) stérilisation avec l'éthanol 70%, (c) absence de stérilisation
Figure 20	Spectres d'E. coli en utilisant (a) l'acide formique dans l'acide cinapic, (b) acide TFA 1% dans l'acide cinapic, (c) TFA 1% dans CHCA
Figure 21	Effet de la concentration d'acide formique sur le nombre de sommets de spectre.
Figure 22	de l'intensité spectrale avec la concentration du TFA
Figure 23	Effet de différents types de dissolvant sur la qualité de spectres
Figure 24	Effet de la concentration bactérienne sur le spectre

Liste des tableaux

tableaux	*Titre*
Tableau I	Matrices usuelles et échantillon
Tableau II	les points à respecter pour minimiser la contamination.
Tableau III	Les classes des détergents
Tableau IV	La compatibilité des détergents
Tableau V	Tableau comparatif d'identification bactérienne.
Tableau VI	Identifications bactériennes par Vitek 2 et Microflex
Tableau VII	Répartition des groupes bactériens identifiés par SM plus que Vitek 2
Tableau VIII	Répartition des groupes bactériens fréquemment identifiés par Vitek 2 que par Microflex.
Tableau IX	Identification concordante entre SM et l'identification conventionnelle en fonction des souches testées.
Tableau X	Identification détaillée (SM/IC/BM) des 14 souches présentant une identification discordante.
Tableau XI	Répartition des 10 000 souches analysées en SM par groupes ou familles de microorganismes

Tableau XII	Répartition des 10 000 souches analysées en SM par groupes ou familles de microorganismes
Tableau XIII	Identification des microorganismes anaérobies
Tableau XIV	Comparaison des résultats d'identification par spectrométrie de masse et méthode conventionnelle
Tableau XV	Identification des souches de légionella au niveau de l'espèce
Tableau XVI	Effet de différentes solutions de stérilisation sur le spectre de MALDI-TOF

Table des matières

I- Introduction

II- Historique.

III- Principe de fonctionnement de spectrométrie de masse type MALDI-TOF.

Généralité.

A- Préparation de l'échantillon.

1- Choix de la matrice.

a- Caractéristique de la matrice.

b- Structure des matrices les plus usuelles.

2- Types d'échantillons.

a- Préparation de l'échantillon sous forme solide.

b- Préparation de l'échantillon sous forme liquide.

c- Préparation de l'échantillon inclus dans un gel.

3- Nature des solutions accompagnants l'échantillon.

a- Différents types de détergents.

b- Elimination des sels.

c- Aspect du dépôt en présence de composés incompatible

B-Préparation de dépôt.

1- Dépôt en couche mince.

2- Dépôt en goutte sèche.

3- Dépôt de type sandwich

IV- Problématique d'identification bactériologique et Positionnement de MALDI-TOF dans cette problématique.

1- Problématique d'identification microbiologique.

2- Positionnement de MALDI-TOF dans la problématique.

V- Utilisation de spectrométrie de masse en microbiologie médicale.

1- Identification de microorganisme.

2- Génotypage.

3- Autres utilisations.

VI- Etude comparative d'identification bactériologique entre MALDI-TOF et l'identification conventionnelle prise en charge par deux écoles de recherche scientifiques.

1- But.

2- Matériels et méthodes.

3- Résultats des études au CHU de Lille.

4- Résultats des études au laboratoire hospitalier de Lyon.

VII- Validation de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF par comparaison avec la biologie moléculaire et les tests classiques: expérience effectuée par le laboratoire de microbiologie du centre hospitalier de Mulhouse.

1- Matériels et méthodes.
2- Résultats.
3- Discussion.

VIII- Exemples d'identification.

1- Identification d'isolats de *Streptococcus agalactiae* par SM type MALDI-TOF.
2- Identification des staphylocoques par SM et comparaison aux identifications du centre national de référence.
3- Identification rapide d'une toxine staphylococcique : la Leucocidine de Panton et Valentine (PVL).
4- Identification d'espèce de legionelle.

IX- Facteurs expérimentaux qui affectent la qualité et la reproductibilité de MALDI- TOF.

Généralité.

1- Méthodes.
2- Résultats et discussion.
a- Croissance et stérilisation bactérienne.
b- Effet des additifs.
- Concentration d'acide dans la matrice.
- Composition du dissolvant dans la matrice.
- Surfactant dans la matrice.
c- Concentration bactérienne.
d- Condition instrumentale.

X- Conclusion

I- Introduction :

La spectrométrie de masse (SM) est un outil spectroscopique analytique s'occupant de la séparation des espèces moléculaires et atomique d'après leurs masses, cette technique peut être utilisée dans l'analyse de beaucoup de types d'échantillons élémentaire aux grandes protéines et polymères[1].

Il existe aujourd'hui deux types de SM : L'analyse des molécules prises individuellement appelée SM moléculaire qui correspond à la SM classique et l'analyse des complexes non-covalent ou SM supramoléculaire apparue beaucoup plus récemment et qui est encore dans une phase de développement [2].

Au début des années 1990 la SM moléculaire a marqué un tournant dans l'histoire de la SM avec le développement de technique d'ionisation dites « douce » telle que le MALDI-TOF « Matrix, Assisted, Laser, Désorption /Ionisation Time- Of- Flight » qui a ouvert la voie à l'analyse des molécules de grande taille en biologie (protéines, ADN, ARN. Etc.) avec une sensibilité femtomolaire [2].

Auparavant il était difficile de mesurer la masse moléculaire de plus de 5 KDa, la technique d'ionisation MALDI-TOF a permis de mesurer avec précision des masse moléculaires de plus de 500 KDa [2], de plus c'est une technique récente d'identification des microorganismes en plein essor[3], permet d'accéder à un niveau important de différenciation bactérienne[4]. Cette identification repose sur l'analyse de leur contenu protéique et la séparation selon le rapport masse/charge (m/z) [5].

Des études ont été prises en charge, par différentes écoles de recherche scientifique, ont donné les résultats suivants : 95% - 97,4% d'identifications correctes sont comparables voire meilleures à ceux de systèmes automatisés utilisant des méthodes conventionnelles (75 ,2% - 92,6%) [6].

Nous somme donc persuadés que la SM type MALDI-TOF est un outil puissant, sensible et récent caractérisé par :

- la simplicité : pas de test préalable (coloration de gram ...).
- la rapidité : résultat en quelque minute seulement.
- l'universalité : permet l'analyse de tous les types de bactéries :

  Cliniques, vétérinaires, environnementaux et des levures
- la fiabilité : analyse moléculaire et identification des sous espèces.
- l'économie : coût du test s'élevant à quelques centimes [7].

Figure 1 : photo d'un SM MALDI-TOF biflex III

II- Historique :

Depuis longtemps, il a été reconnu que l'étude des maladies infectieuses n'a pas pu continuer sans une circonscription claire des microbes, c'est pour cette raison des efforts considérables ont été consacrés pour améliorer continuellement les méthodes utilisées dans la caractérisation microbienne.

Traditionnellement la classification et l'identification bactérienne ont été basé sur les caractères morphologique et physiologique, par conséquent toutes les éditions du manuel de bergey ont endossé ces propriétés (Obsen et Shal, 2003)[8]. Cependant l'arrivée d'analyse taxonomique en 1970 inclue l'analyse du peptidoglycane en 1990, l'analyse des lipides telle que les quinones respiratoire, lipide polaire et l'acide gras de long chaine (LCFA) en 1982, et l'analyse SDS- polypeptide en 1980 tous cela a fait beaucoup étendre la gamme des caractères phénotypiques de la cellule bactérienne , donc dans les prochaines 20 années il y aura une révision majeure dans le système de la classification [8]. En outre l'arrivée de l'analyse de l'acide nucléique a ouvert la voie aux approches modernes qui commencent initialement par la détermination des molécules de guanine et cytosine puis de l' ADNs, ADN, ARN (Deley ,1970) finalement ARNr et ADNr 16S (Stackebrandt, 1988)[8].

Néanmoins la confiance seule en l'ADNr 16S peut se tromper puisque beaucoup des espèces ne peuvent pas être classées par comparaison avec une seule séquence de, gène par exemple le genre Bacillus ne peut pas être identifié par ADNr 16S [8], néanmoins cette dernière représente la seule base de donnée disponible pour la classification bactérienne.

Au début, La spectrométrie de masse a été utilisée pour l'analyse chimique, pourtant le développement d'ionisation douce amène

l'appariation des techniques plus performantes pour l'analyse des composants d'un organisme vivant (Cotter, 1992) :

- Désorption du plasma (DP).
- Bombardement rapide de l'atome (FAB).
- Désorption laser (LD).
- Ionisation de l'electrospray (ESI).

Ainsi la découverte de MALDI représente une apogée de ces études car elle permet l'analyse des molécules biologique sans limitation de masse (Karas et Hillenkampe, 1988)[8].

Elément d'histoire de la spectrométrie de masse [9].

- En1910, le britannique Joseph John Thomson conçoit la technique de SM et met en évidence l'existence d'isotopes stables.
- En 1918, Arthur Jeffrey Dempster, construit un SM à secteur magnétique.
- En 1942, commercialisation du premier appareil.
- En1949, Herzog et Viehbok élaborent la SM à ionisation secondaire connu sous le nom de SIMS (secondary ion mass spectrometry).
- En1959, Roland Gohlke, réalise le premier couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse CG-SM
- En 1981, mise en place d'une technique d'ionisation par bombardement d'atome rapide connu sous le nom de FAB.
- En1985, Hillenkamp découvre le MALDI (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation) qui permet d'effectuer le séquençage de peptides
- En 1988, Fenn, découvre la méthode d'ionisation électrospray qui permet les mesures de peptide des hautes masse moléculaires.

III - Principe de fonctionnement :

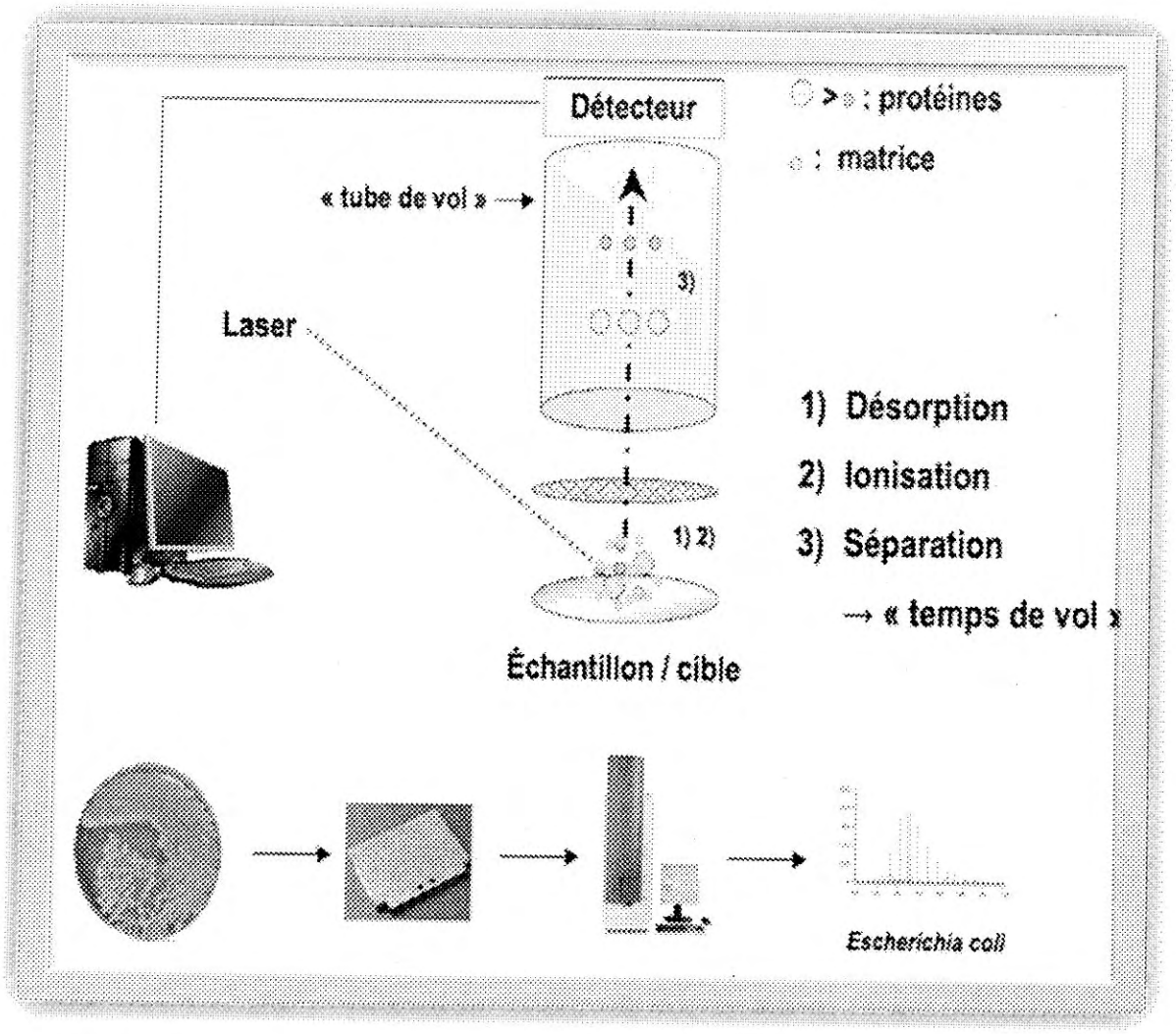


figure 2 : principe de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF[6].

La spectrometrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt, par mesure de leur masse et de caractériser leur structure chimique[10], elle se compose principalement de trois parties :

- **La chambre d'ionisation** produisant des ions en phase gaseuse [6].
- **L'analyseur** séparant les ions selon le rapport masse sur charge (m/z).
- **Le détecteur.**

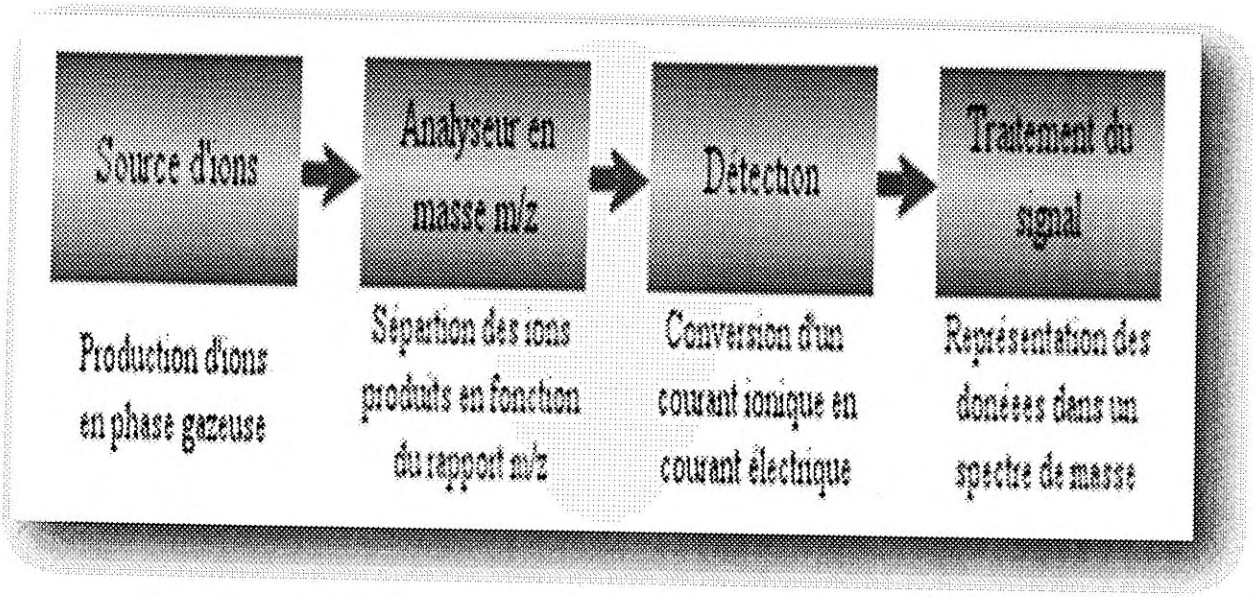


Figure 3 : Structure d'une spectrométrie de masse [10].

❖ **L'ionisatin des molécules** est l' étape la plus importante pour l'identification des molécules. Le produit à identifier est inclus dans une matrice (3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid) ; alpha –cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) et immobilisé sous forme de cristaux (étape de co-cristallisation) sur un support inert (plaque d'acier). Le complexe produit-matrice est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice, (ce n'est pas nécessaire d'ajuster la longueur d'onde correspond à la fréquence de l'absorption de chaque analyte, car c'est la matrice qui absorbe la pulsation laser[11]), l'impulsion laser provoque localement un échauffement du dépôt et de la microexplosion ce qui entraine des collisions et le transfert de charge de la matrice à l'échantillon, les ions générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ éléctrique qui les dirige vers l'analyseur [6].

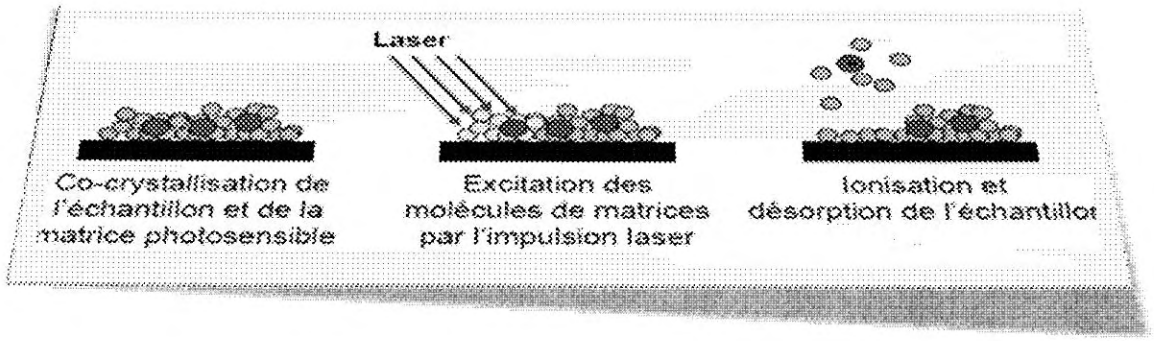


Figure 4 : Etapes d'ionisation moléculaire [12]

❖ **L'ionisatin des molécules** est l' étape la plus importante pour l'identification des molécules. Le produit à identifier est inclus dans une matrice (3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid) ; alpha –cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) et immobilisé sous forme de cristaux (étape de co-cristallisation) sur un support inert (plaque d'acier). Le complexe produit-matrice est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice, (ce n'est pas nécessaire d'ajuster la longueur d'onde correspond à la fréquence de l'absorption de chaque analyte, car c'est la matrice qui absorbe la pulsation laser[11]), l'impulsion laser provoque localement un échauffement du dépôt et de la microexplosion ce qui entraine des collisions et le transfert de charge de la matrice à l'échantillon, les ions générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ éléctrique qui les dirige vers l'analyseur [6].

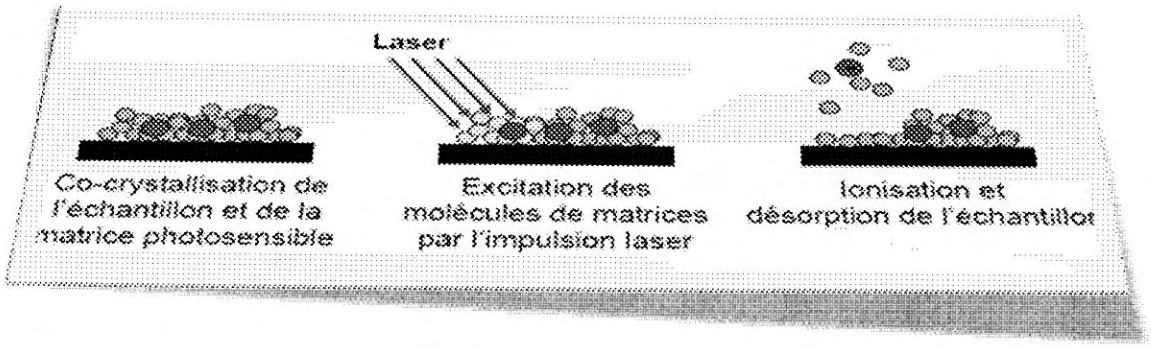


Figure 4 : Etapes d'ionisation moléculaire [12]

❖ **L'analyseur** permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol libre (TOF : Time-Of-Flight) selon le rapport m/z . les molécules les plus petites sont les premiéres à arriver au détecteur, les molécules qui ont le même rapport m/z sont séparées grâce à un miroir électrostatique.[6]

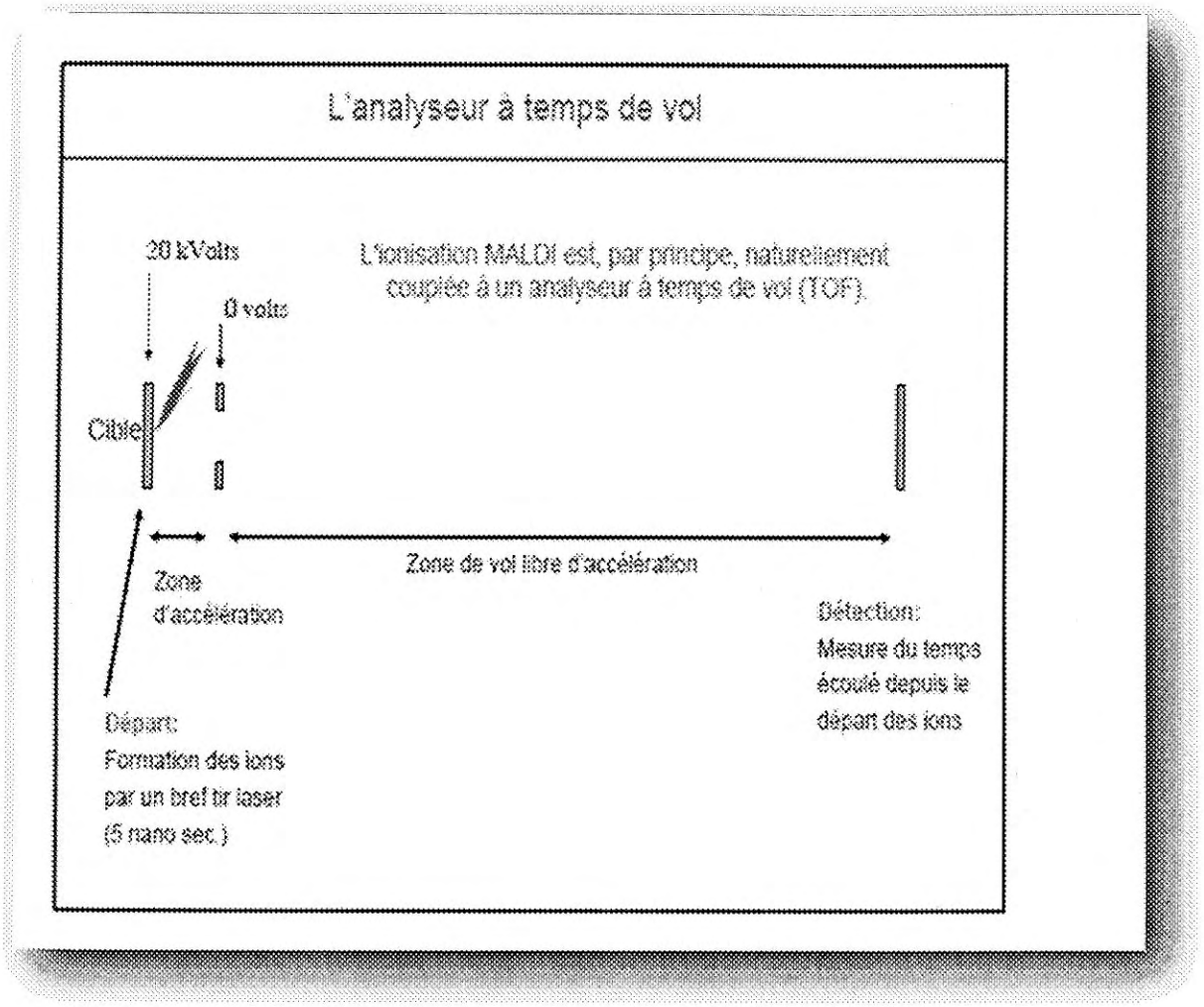


Figure 5 : Analyseur à temps de vol[13]

❖ **Le détecteur** transforme les ions reçus en courant électrique qui est amplifié , numérisé et enregistré[14].

A- ***Préparation de l'échantillon*** [12] :

L'analyse MALDI-TOF est une technique relativement tolérante vis-à-vis des composés qui accompagnent généralement l'échantillon à analyser. Cependant certains échantillons ne pourront être analysés qu'après un traitement préalable le rendant compatible pour l'analyse MALDI-TOF.

La personne qui va préparer l'échantillon doit poser un certain nombre de questions qui orienteront son choix pour la préparation :

- type de molécule à analyser (choix de la matrice)
- type d'échantillon (gel, liquide, poudre)
- nature des solvants accompagnant l'échantillon
- pH
- présence de sels
- présence de détergents

1- Choix de la matrice :

La matrice est un point important dans l'analyse, son choix peut conditionner la réussite ou l'échec de l'analyse, l'utilisation de nouvelles matrices permet l'évolution de la technique [15], et elle minimise le dépôt de l'échantillon et augmente l'efficacité de transfert d'énergie du laser à l'analyte, donc elle améliore la sensibilité.

a- Caractéristiques de la matrice :

- Petit composé organique, photosensible (cycle aromatique).
- Faible volatilité.
- Compatible avec le solvant de l'analyte (soluble).
- Bonne absorbance à la longueur d'onde du laser (337 nm).

- Capable de transférer une ou plusieurs charges à l'analyte (acide).

b- Structure des matrices les plus usuelles :

Trois matrices permettent de réaliser une grande partie des analyses surtout dans le domaine protéomique.

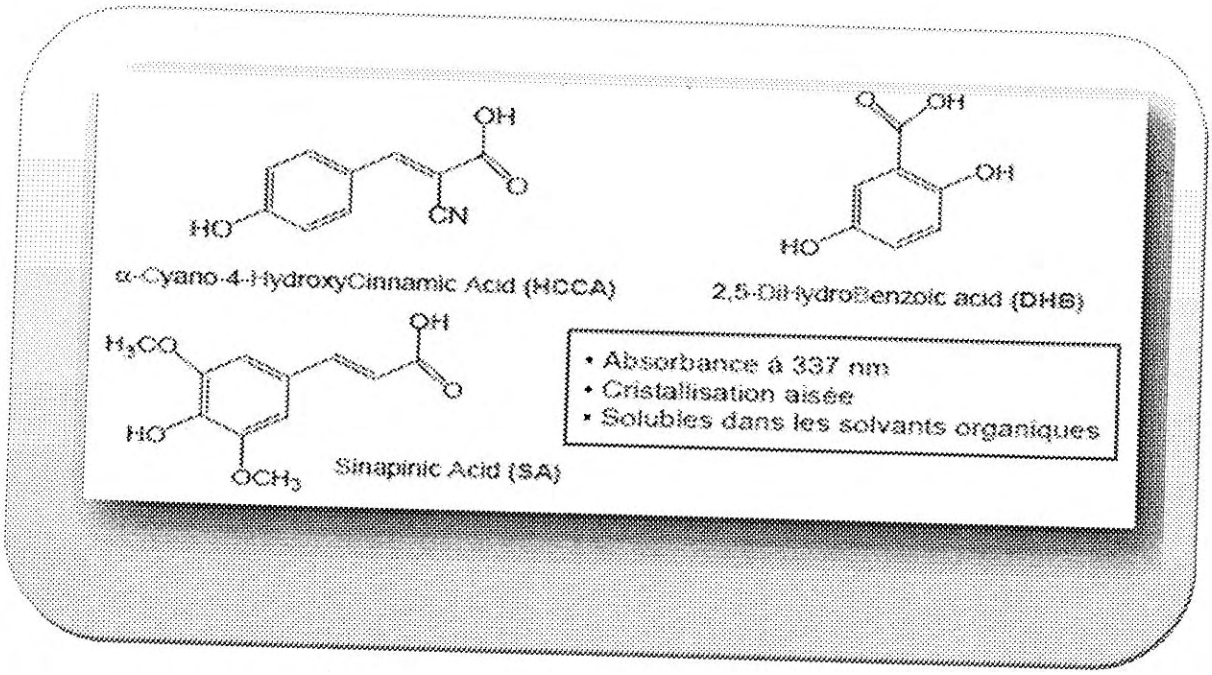


Figure 6 : Structures des matrices les plus usuelles

Tableau I : Matrices usuelles et échantillon

Matrice	Type d'échantillon
α-cyano (HCCA)	Peptides / Protéines / Glycoprotéines
Acide Dihydroxybenzoïque (DHB)	Peptides / Peptides Glycosylés, Phosphorylés Polymères polaires / Glycannes
Acide sinapinique (SA)	Protéines / Glycoprotéines / Polymères polaires
HCCA + DHB	Peptides (Ref)

2- Type d'échantillon :

L'échantillon peut se présenter sous trois formes :

- Solide (poudre, cristal)
- Liquide (solution)
- Gel (électrophorèse)
- La forme sous laquelle se présente l'échantillon va orienter son mode de préparation pour l'analyse MALDI-TOF.

NB : L'échantillon sous forme liquide nécessite un traitement qui peut être plus difficile.

a- Préparation de l'échantillon sous forme solide :

Un échantillon sous forme solide peut sembler plus facile à travailler car généralement, il n'y a plus de matériel, de ce fait le risque de contamination est limité.

La préparation de ce type d'échantillon peut se limiter à trouver le solvant adéquat, ainsi il peut contenir des détergents qui seront nécessaire d'éliminer avant l'analyse.

Ces techniques sont les mêmes que celles utilisées pour les échantillons liquides.

b- <u>Préparation de l'échantillon sous forme liquide :</u>

Les échantillons en milieu liquide sont souvent les plus problématiques car ils peuvent contenir des sels ou des détergents permettant d'éviter l'agrégation ou la précipitation de l'échantillon. Cependant, les sels et les détergents sont susceptibles d'altérer la qualité de l'analyse MALDI-TOF.

c- <u>Préparation de l'échantillon inclus dans un gel</u> :

L'un des principales causes d'échec de l'analyse protéomique est la présence de protéines contaminants en quantité supérieure à celle de la protéine à identifier.

⟶Il faut respecter impérativement certains points afin de minimiser les contaminations lors de la préparation d'échantillons [16].

Tableau II : les points à respecter pour minimiser la contamination.

Ce qu'il ne faut pas faire	Ce qu'il faut faire
➢ Travailler dans un lieu de passage. ➢ Travailler sans blouse. ➢ Porter un vêtement en laine. ➢ Travailler sur un paillasse non dédié. ➢ Se gratter.	➢ Vérifier la compatibilité des protocoles. ➢ Utiliser des matériels dédiés. ➢ Travailler sous hotte ➢ Laver tout les matériels

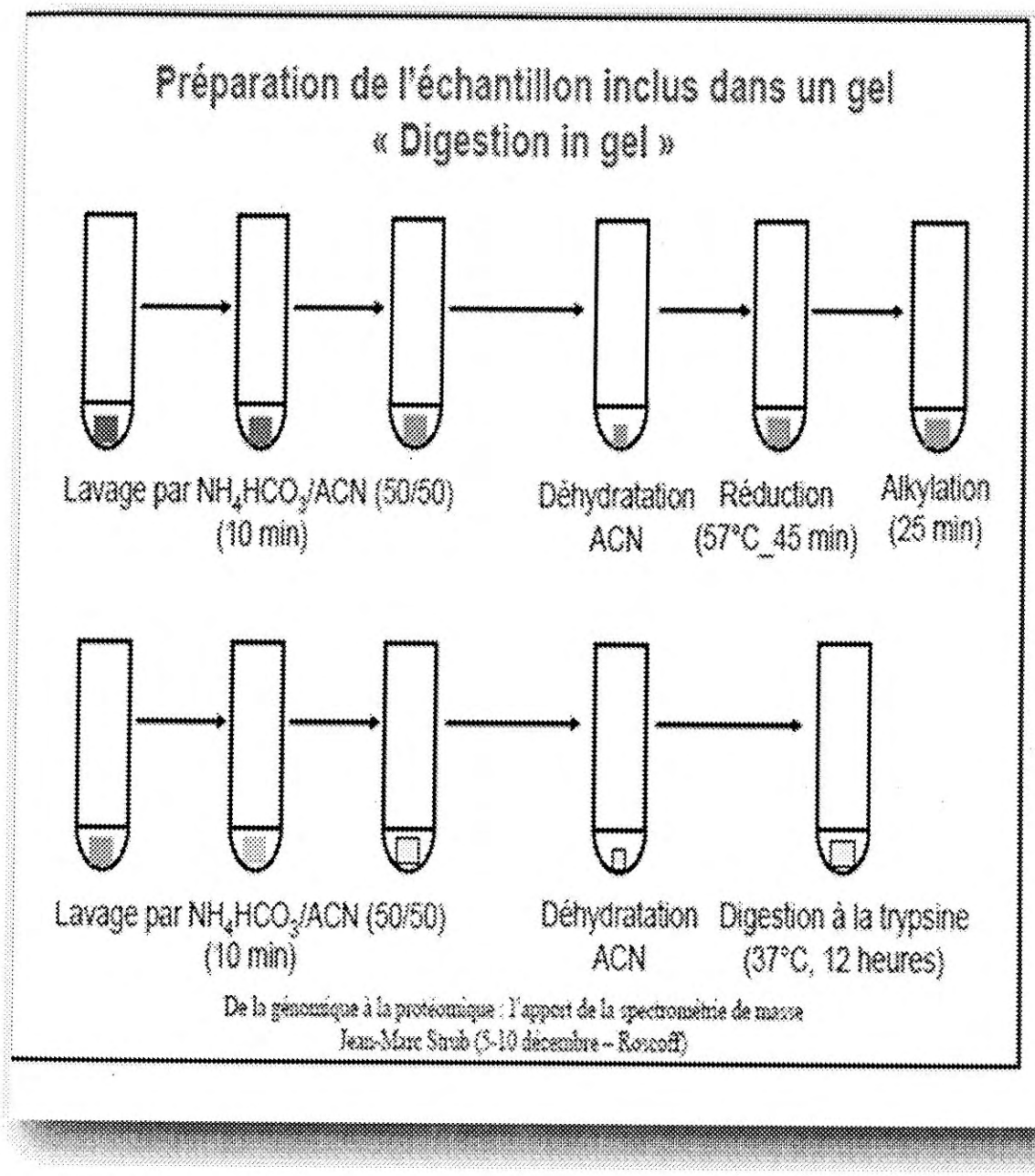


Figure 7 : Préparation de l'échantillon inclus dans un gel[12].

3- Nature des solutions accompagnant l'échantillon :

a- Différents types de détergents :

Tableau III : Les classes des détergents

Les détergents rangés dans 4 classes

Classe	Effet sur le spectre MALDI
1	Pas d'effet, peut améliorer le spectre
2	Effets limités
3	Dégradation de la qualité du spectre et de l'intensité du signal
4	Suppression du signal

Tableau IV : La compatibilité des détergents

Détergents	Classe	Remarques
n-octyl-glucoside	1	compatible
n-dodécyl-glucoside	1	
Octanoyl-N-méthylglucamide	1	
Décanoyl-n-methylglucamide	1	
n-dodécyl-β-D-maltoside	2	
Triton X-100	3	à éviter
Triton X-114	3	
PEG 2000	3	
CHAPS	4	incompatible
CHAPSO	4	
SDS	4	

➢ **Remarques sur les détergents de classe 3 et 4 :**

- Les détergents de classes 3 et 4 sont très difficiles à éliminer.
- Ces détergents sont généralement non volatils et entrainent une mauvaise cristallisation en dépôt goutte séchée.
- Le SDS utilisé pour « solubiliser » des protéines forme alors une enveloppe autour de la protéine et inhibe totalement le signal en MALDI-TOF
- L'élimination du SDS peut se faire par extraction liquide- liquide, gel filtration par colonne d'affinité ou dialyse
- Une précipitation à l'acétone est totalement inefficace vis-à-vis de l'enveloppe de SDS autour de la protéine, le SDS étant insoluble dans l'acétone

b- L'élimination des sels :

- **Elimination des sels par lavage direct du dépôt :**

  Il est possible de dessaler un échantillon sur cible par un lavage direct à l'aide de 1µl d'eau acidifiée par 1% de HCOOH.

  Ce type de lavage, sur un dépôt en goutte séchée ou en sandwich, permet un dessalage rapide de l'échantillon sans quasiment aucune perte.

  Les sels sont solubilisés par l'eau, les peptides restent cristallisés avec la matrice.

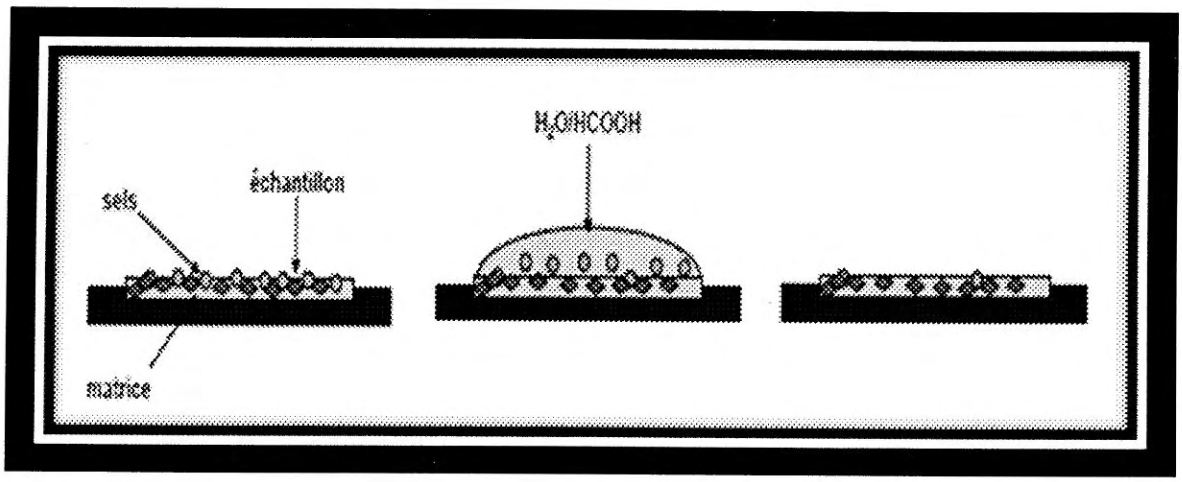


Figure 8 : Procédure d'élimination des sels

- **Dessalage de l'échantillon par Zip Tip :**

  Le dessalage d'un échantillon peut se faire par chromatographie de phase inverse sur un volume de 2 à 3 µl en 5 minutes.

  Le ZipTip est une micro colonne de 0,2 à 0,5 µl de phase

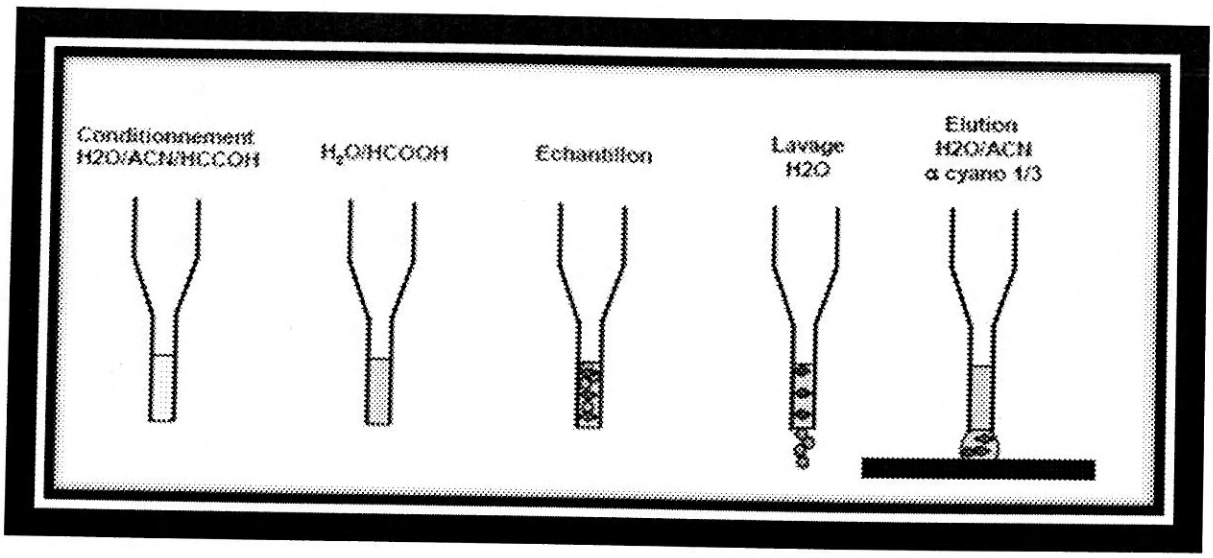


Figure 9 : Dessalage par Zip Tip.

c- Aspect du dépôt en présence de composés incompatibles

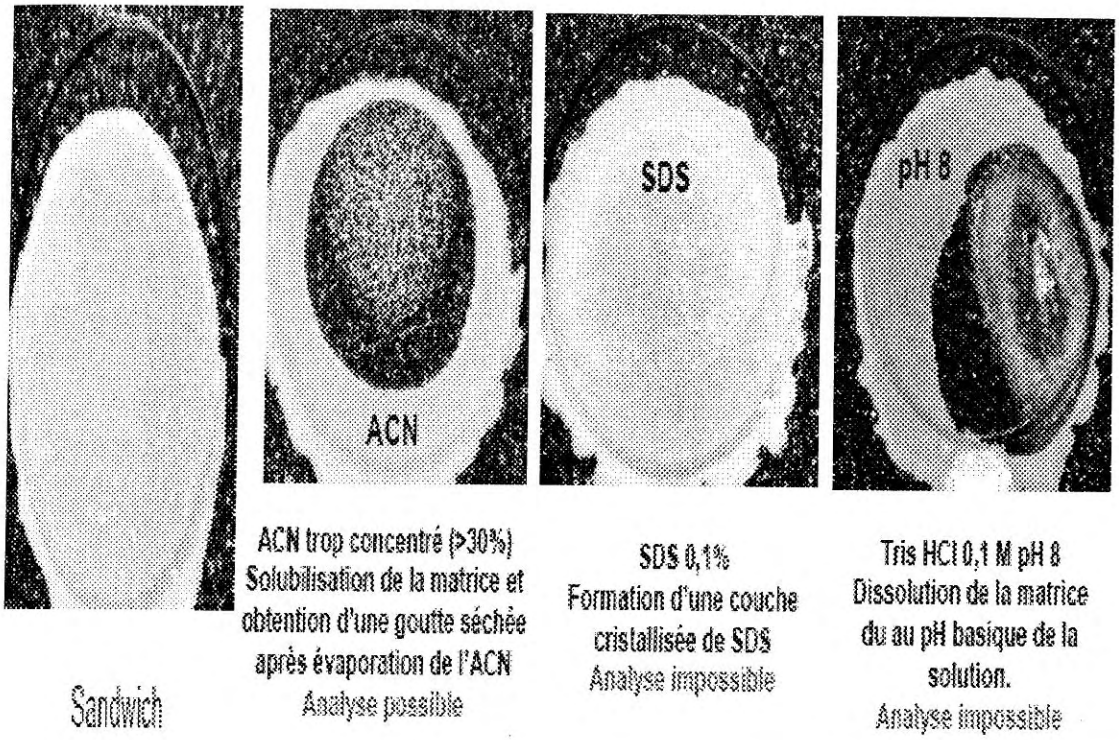


Figure 10 : Aspect du dépôt en présence de composés incompatibles

B- Préparation de dépôts :[12]

La qualité de l'analyse dépend en grande partie de la qualité du dépôt couple échantillon matrice.

Trois types de dépôts peuvent être utilisés dans l'analyse.

- Couche mince.
- Goutte séchée.
- Sandwich.

Le dépôt le plus fréquemment utilisé est celui dit en goutte séchée.

Dans des occasions rares où le dépôt en goutte séchée n'a pas produit un bon signal sauf si l'échantillon avait été réfrigéré pour quelques semaines, dans ce cas, une couche supplémentaire de matrice aide à rehausser la qualité du signal.

1- Dépôt en couche mince :

Ce type de dépôt très homogène et rapide à réaliser

1- Déposer 0,5 µl d'une solution d'éthanol ou d'acétone saturé en matrice, et laisser sécher. (soniquer et centrifuger la solution avant la première utilisation)
2- Déposer 0,5 µl d'une solution d'échantillon contenant de TFA 0.1% sur la couche précédemment formée. La solution d'échantillon ne doit pas contenir trop de solvant organique fort, qui risque de redissoudre les microcristaux de la sous couche : ne pas dépasser une proportion de 30% en acitonitrile. Ajoutez éventuellement une gouttelette de 0,5 µl de TFA 0 ,1% avant d'ajouter l'analyte si ce dernier contient déjà une forte concentration de solvant organique.
3- Si l'échantillon ne pouvait être acidifié, rajouter 0,5 µl d'une solution d'eau contenant de TFA 0.1%.
4- Laisser sécher le spot afin d'optimiser les conditions de cristallisation, le séchage peut s'effectuer à l'air libre et à température ambiante s'il s'agit d'un composé de forte masse moléculaire (protéine, gros peptide), sous vide ou en séchant au sèche-cheveux s'il s'agit d'un mélange de petits peptides. De manière générale un séchage trop rapide peut provoquer une discrimination à l'encontre des composés de haut poids moléculaire (peptides de (m/z) > 3000 notamment).
5- Rinçage éventuel par 1 µl de TFA 0 ,1%, contenant 10 mM de citrate d'ammonium.

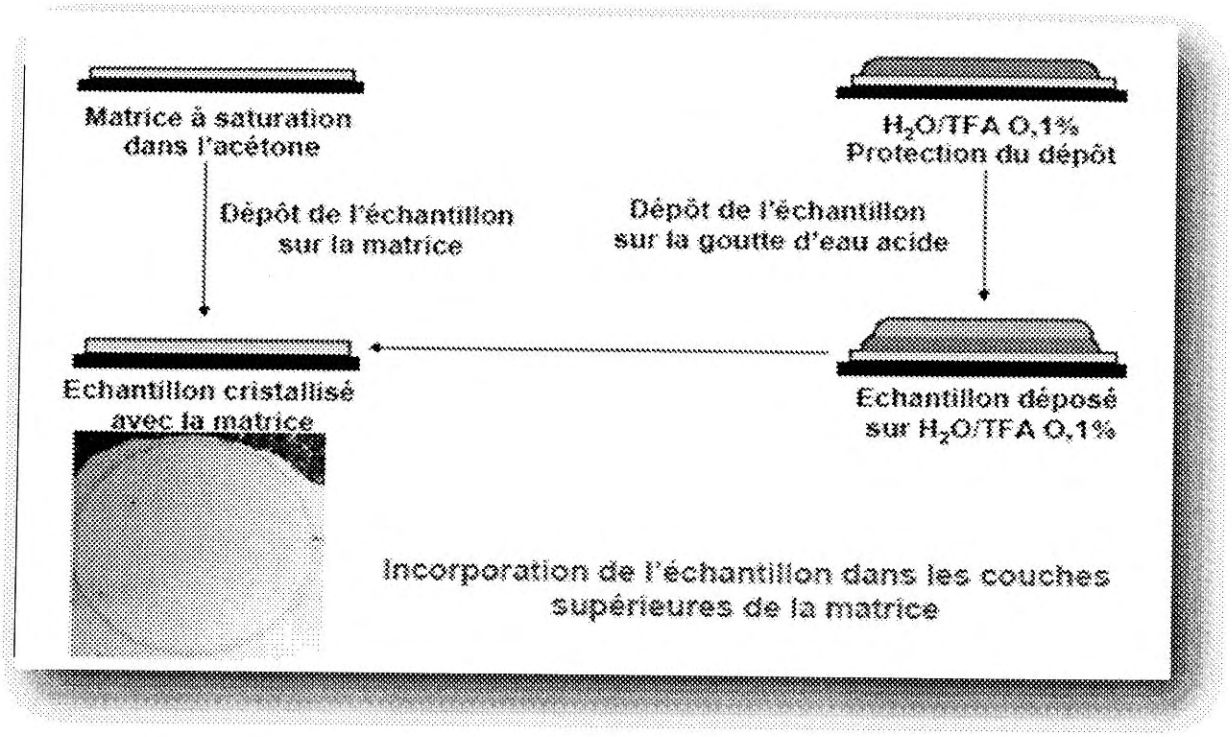


Figure 11 : Etapes de dépôt en couche mince

2- Dépôt en goutte sèchée :

1- Préparer une solution H2O/CH3CN/TFA saturée en matrice. Le pourcentage de TFA est de l'ordre de 0 ,1. Le pourcentage d'acétonitrile est habituellement de 30 % pour les protéines et peptides. Dans le but d'obtenir un dépôt plus homogène, on pourra utiliser une solution H2O/CH3CN/TFA (50 ; 50 ; 1) saturée en matrice. Il est également recommander d'augmenter la qualité d'acétonitrile utilisée dans le cadre de l'analyse de protéines hydrophobes.

2- Soniquer et centrifuger la solution de matrice. Prélever du surnageant de cette solution et le diluer 3 fois dans la solution de H2O/CH3CN/TFA si la matrice est de l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique et le pourcentage d'acitonitrile utilisé est de 50% (solution recommandée pour l'analyse de

peptides). Utiliser cette solution pour les dépôts. Dans tous les autres cas utiliser directement le surnageant de la solution da la matrice.

3- Mélanger 0,5 µl de solution d'échantillon avec 0,5 µl de solution de matrice ; le mélange peut s'effectuer dans un eppendorf ou directement sur la plaque.

4- Sécher dans les mêmes conditions que pour le dépôt en couche mince.

5- Rinçage éventuel avec trois fois par 1 µl de TFA 0,1% contenant 10mM de citrate d'ammonium.

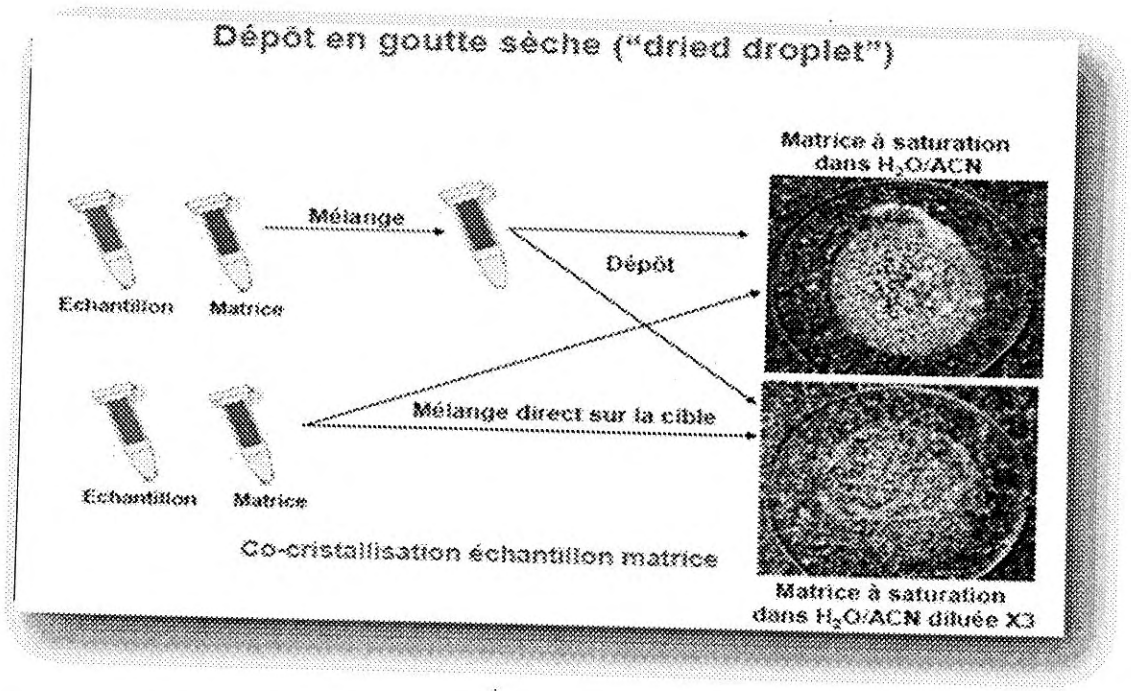


Figure 12 : Etapes de dépôt en goutte sèche.

3- Dépôt de type sandwich :

1- Les deux premières étapes sont identiques à celles du dépôt en couches minces

2- Recouvrir la goutte d'échantillon avec 0,5 µl d'une solution H2O/CH3CN/TFA (70 ; 30 ; 0,1) (V ; V ; V) saturée en matrice. Ajouter éventuellement une gouttelette de 0,5 µl de TFA 0,1% en guise de protection si l'analyse contient déjà une forte concentration de solvant organique.
3- Sécher sous vide ou à l'aire libre.

Rincer 2 à 3 fois avec 1 à 1,5 d'une solution TFA 0,1% contenant 10 mM de citrate d'ammonium (froide).

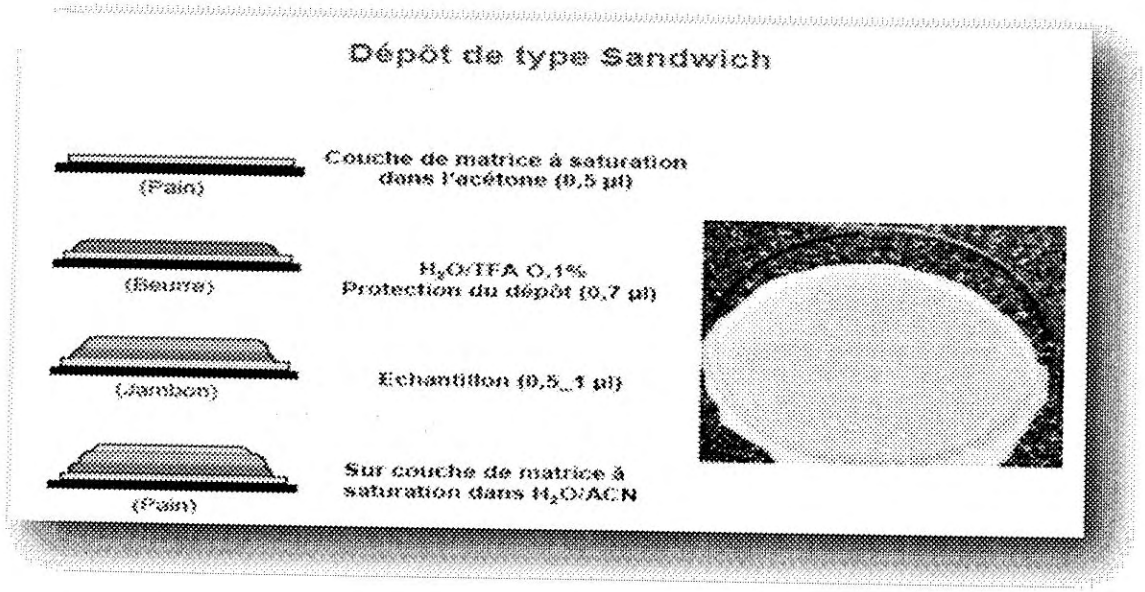


Figure13 : Etapes de dépôt type sandwich.

IV- Problématique d'identification microbiologique et positionnement de la SM type MALDI-TOF dans cette problématique :

1- Problématique d'identification microbiologique

La SM et les différentes approches qui y sont liées montrent leurs nombreuses possibilités d'application dans les domaines de la recherche en protéomique et de la biologie médicale

Les disciplines les plus importants relatifs à la microbiologie, réside essentiellement dans la nécessité d'identification des microorganismes responsables d'infection et dans la détermination de l'antibiogramme.

Ces deux activités restent difficiles à lier parfaitement sur une approche diagnostique globalisée du fait des nombreuses particularités de croissance des microorganismes ne permettant pas de les traiter dans un ensemble unique. Il est donc possible d'identifier de nombreux microorganismes, en utilisant des tests biochimiques, des milieux chromogéniques, voire des approches de séquençage d'ADN, plus onéreuses encore, pour caractériser le plus large éventail des pathogènes. Cependant la pression hospitalière demande une performance élevée dans le diagnostic en termes de spécialité et de rapidité, ainsi qu'une rationalisation des coûts hospitaliers[17].

Actuellement, l'identification des microorganismes est dominée par l'identification phénotypique, aspect et morphologie des colonies,

coloration de gram, caractéristiques de croissance, pigmentation,..., ainsi que sur les caractères biochimiques, présence ou absence d'enzyme, utilisation ou non de sucre par fermentation ou oxydation[18]. Ces techniques de recherche ont été miniaturisées grâce aux galeries d'identification de type Api, leur lecture automatisée. L'identification en biologie moléculaire (séquençage de l'ARN 16S, séquençage de gènes rbo, sodA...) permet l'identification des souches atypiques ou mal identifiées par les techniques usuelles [19].

Du fait du brassage génétique et de la fréquence des mutations, il n'est cependant pas rare que l'identification soit imparfaite à partir d'une galerie comportant 8,12 à 50 phénotypes biochimiques et, soit les logiciels d'analyse soit le microbiologiste doivent effectuer une interprétation avant de rendre un résultat. Cette interprétation dépend fortement des données colligées dans les banques de données. Par ailleurs, la détermination de l'antibiogramme reste une analyse disjointe de l'identification des microorganismes, et fait aussi appel à des méthodes rigoureuses d'évaluation et à des données régulièrement remises à jour [17].

À ce jour, seuls quelques automates intègrent à la fois une analyse biochimique des souches et leur sensibilité aux antibiotiques par la détection de leur croissance dans des conditions de culture particulières. Ces systèmes requièrent une primo-culture, une préparation des cartes d'identification et une incubation minimale de six heures, alors que la puissance d'analyse est d'environ 100-120 identifications par jour et 80 antibiogrammes par jour sur une période normale de travail. Chacune des approches représente un investissement de 4-5€ par analyse (prix catalogue).

Cependant, ces automates ne répondent pas encore à la variété des espèces devant être identifiées en routine et rendent donc des services dans des secteurs bien précis de l'activité microbiologique d'analyse : en effet il ya des difficultés d'identification automatisée pour les bactéries de croissance

relativement lente, pour certaines aérobies strictes, pour les anaérobies,...les méthodes d'identification de référence comme l'hybridation ADN /ADN ou l'amplification – séquençage de gènes suffisamment constants comme l'ARN 16s, rpoB, rnpB , restent quant à elle confinées le plus souvent à l'anecdote en cas d'impossibilité à rendre un diagnostic fiable, ou pour les microorganismes incultivables ou de croissance difficile, du fait des délais de résultats et de leur coût (>100-150€=$) [17].

2- Positionnement de MALDI-TOF dans la problématique

La SM permet une identification rapide de la majorité de microorganismes rencontrés en pratique courante de routine dans un laboratoire hospitalier de microbiologie [19].

Pour l'identification des bactéries la technique MALDI-TOF s'est appliquée aux composants bactériennes tels que les acides gras, aux polysaccharides, puis aux bactéries entières [20], c'est l'analyse des microorganismes entières qui semble la solution émergente. Elle est retenue sur le principe que les protéines les plus abondantes des microorganismes, les protéines ribosomales et certaines protéines associées aux membranes sont les mieux conservées et offrent une typicité d'espèce.

Elles présentent également des masses moléculaires relativement faibles ou des structures qui vont offrir des points de rupture uniques dus à l'extraction aux solvants nécessaires pour cette préparation de protéines [21,14]. L'application nécessite d'abord un protocole optimisé de culture et de préparation de l'extrait protéique des microorganismes [22]. Outre des bactéries « classique », la méthode a été publiée pour les mycobactéries

[23] et certains hyphomycétes [24], ensuite, la standardisation du spectromètre de masse est très importante, enfin l'exploitation des résultats requière un algorithme de comparaison suffisamment sophistiqué pour que l'analyse soit tout à fait fiabilisée, rapide et spécifique. Il est cependant réconfortant qu'à-propos de la culture, il est possible d'obtenir des profils protéiques très comparables qu'une bactérie comme *Staphylococcus aureus* soit cultivée en milieu liquide ou sur gélose au sang. Pourvu que ses dernières ne soient à un stade trop avancé.

Finalement, dés lors qu'un microorganisme est cultivable, il est possible de le soumettre à la SM. Les protocoles d'extraction sont désormais assez bien définis et nécessitent peu de matériel (une à quelque colonie), avec une exigence d'un bas volume de l'échantillon (inferieur à un microlitre de fluide) [25].

Ils sont suffisamment simples pour imaginer leur automatisation en cas de diffusion de la méthode. Cette préparation représente un coût très faible, quelque dizaine d'euros. Les plaques d'analyse en SM sont réutilisables et permettent le dépôt de 384 échantillons, soit environ 120 identifications qui peuvent être lues, puis exploitées en quelques heures (2-4heures). Ce temps va certainement diminuer encore dans un proche avenir ; deux séries de lectures sont désormais envisageables à court terme. Avec une telle approche, il est nécessaire que les différents laboratoires produisent des résultats comparables avec des spectromètres différents. Les fournisseurs capables de standardiser une large gamme d'appareils sont attentifs à ce point. La qualité des algorithmes et des logiciels associés sera déterminante [17].

A l'heure actuelle, les banques de données se construisent et l'identification par la SM montre une réelle spécificité.

V- Utilisation de spectrométrie de masse en biologie médicale :

La SM est devenue très performante et a été largement appliquée en biologie grâce à des développements instrumentaux remarquables (rapidité de balayage, résolution des analyseurs, acquisition et traitement des données), parmi les applications de la SM on note :

1- Identification des microorganismes :

L'identification des bactéries est réalisée selon deux modes opératoires : dépôt direct de la colonie bactérienne ou dépôt des protéines bactériennes préalablement extraites. Quelle que soit la nature du dépôt, le microorganisme est déposé sous la forme d'un fin frottis à la surface d'une plaque métallique puis recouvert d'une matrice donneuse d'électron qui sera bombardée par un faisceau laser, le choix de la matrice dépend du type de laser utilisé puisque les molécules de la matrice doivent présenter une forte absorption à la longueur d'onde émise par le laser et dépend aussi de la nature des molécules à ioniser. L'intensité du laser est adaptée à chaque type de l'échantillon. Les spectres sont lus dans la gamme de masse 2000-20000 Da [6].

L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance qui considère les positions des pics, le logiciel associé au spectromètre génère automatiquement les listes de pics à partir de tous les spectres typiques qui sont enregistrés dans une banque de données.[6]

La nature du milieu de culture et la durée d'incubation des cultures peuvent influencer sur la qualité du spectre obtenu. Par exemple, les colonies

doivent être récentes pour ne pas avoir une dégradation des protéines ribosomales et des protéines associées aux membranes. Ces protéines de masse moléculaire relativement faible, sont les mieux conservées et offrent une typicité d'espèce.

En pratique, le dépôt direct de la colonie est une méthode performante, précise et rapide. Pour l'identification de certains microorganismes (mycobactéries, levures...) et le typage des souches, l'extraction des protéines est recommandée pour obtenir un spectre de masse utilisable. Cependant, le temps technique est plus long (10 à 15 min par extrait) par comparaison au dépôt direct (moins d'une minute par dépôt) [6].

Les études publiées ont pour objet l'identification des bactéries (entérobactéries, bacilles Gram négatif non fermentant, staphylocoques, corynébactéries, anaérobies) des champignons filamenteux (aspergillus spp) [26,27].

Une banque de spectres est générée par plusieurs mesures d'une espèce ou d'une souche bactérienne connue sous différentes conditions de culture. De ces essais, les informations spécifiques du spectre sont extraites, un profil moyen est obtenu après la mesure de 20 spectres. Le logiciel génère automatiquement les listes des pics à partir de tous les spectres et extrait les pics typiques qui sont présents dans un certain nombre de spectres d'une seule espèce. Les microorganismes inconnus sont identifiés en comparant leurs pics individuels à la banque de données.

Pour certaines bactéries (*Listeria monocytogenes, Salmonella enterica*.....) les techniques d'identification usuelle ne sont pas suffisamment discriminantes. Chez ces bactéries, l'étude de la variation nucléotidique des gènes orthologues révèle une très grande diversité clonale de ces microorganismes. Avec la SM, il est ainsi possible de mieux identifier les clones pathogènes en mettant en évidence la variation nucléotidique et en déterminant la séquence probable à partir d'amplicons [28].

2- Génotypage :

La SM type MALDI-TOF permet de détecter les produits d'amplification génique. L'identification de fragments de 40 à 168 bases est possible à la condition de désaler les amplicons des résidus non amplifiés. Des applications ont été publiées pour certains microorganismes (*Légionella spp, Listeria monocytogenes, Sulfolobus acidocaldarius*, bactéries méthanogène..) dont les amplicons sont de type ARN ou ADN, simple ou double brins. La détection et le génotypage des gènes de résistance aux antibiotiques sont également possibles [29]. Les modifications de séquences nucléotidiques sont déterminées selon les modifications de la masse.

La SM devient une alternative au séquençage standard des gènes 16s ADNr. Cette technique est plus rapide mais ne permet la lecture que des fragments de petite taille. Cet inconvénient peut être contourné en remplaçant le dTTP par le dUTP dans la réaction d'amplification [30]. Les signaux de masses obtenus sont comparés aux séquences publiées de 16s ADNr. Cette technique permet de caractériser aussi bien les bactéries cultivées que non cultivées.

3- Autres utilisations :

Les approches post-génomiques commencent à trouver des applications en microbiologie médicale. Ainsi, l'analyse métabolique met en évidence les métabolites d'intérêt biologique à partir d'analyses statistiques multivariées réalisées sur un très grand nombre de signaux qualitatifs et quantitatifs, de

visualiser les réponses métaboliques des microorganismes face à des phénomènes de toxicité [31]. L'intégration des données issues des analyses du transcriptome, du protéome et du métabolome permet la compréhension du métabolisme cellulaire des microorganismes.

La SM permet la caractérisation fine et la vérification de la pureté de nombreuses protéines recombinantes mises sur le marché par l'industrie avec, par exemple, le cas difficile des anticorps monoclonaux. C'est également la SM appliquée à l'analyse des peptides qui a permis le développement spectaculaire de la proteomique qui repose sur la capacité de la SM [6] à identifier des protéines à partir de quantité femtomolaire isolées sur gels d'électrophorèse mono ou bi-dimentionnelle.

Elle permet d'identifier les modifications post-traditionnelles qui affectent les protéines, ce qui n'est évidement pas possible à partir des séquences génomiques.

De très nombreux programmes de recherche en biologie comportent aujourd'hui un volet proteomique, ceci explique d'ailleurs le nombre beaucoup plus important de SM dans les laboratoires de biologie que dans les laboratoires de chimie. La SM est donc une méthode d'analyse bien établie en biologie pour les molécules de toutes les tailles.

VI- Etude comparative d'identification bactériologique entre MALDI-TOF et l'identification conventionnelle prise en charge par deux laboratoires de microbiologie.

Tableau V : Tableau comparatif d'identification bactérienne.

	CHU de Lille [32]	Hôpitaux de Lyon [33]
1-But	Evaluer l'intérêt de la SM type MALDI-TOF pour l'identification d'espèces bactériennes d'importance médicale, en comparant ses performances à celles du système automatisé d'identification Vitek 2 (biomérieux)	Comparaison de l'identification bactérienne par SM MALDI-TOF à l'identification conventionnelle.

	- 362 souches sont issues de la collection du laboratoire.	- Les études ont été réalisées sur 323 souches.
2- Matériel et méthode	- L'isolement des souches à partir d'un tube de cryoconservation sur un milieu gélosé adapté à l'espèce, à sa température optimale de croissance et pendant 18 à 48 heures.	- L'isolement des souches sur gélose au sang, milieux chromogènes, BCP, pendant une semaine et provenant d'hémoculture (16%), urines(29%), prélèvement pulmonaires (12%), autres (23%).
	- Les études ont été réalisées à la fois en SM (Microflex, Bruker Daltonic) et par Vitek 2, le spectre de masse était analysé grâce au logiciel biotyper 2.0 (Bruker, Daltonics). En cas de discordance entre les identifications MALDI-TOF et Vitek2, l'identification génotypique était prise en compte comme référence.	- L'utilisation de SM AXIMA (shimatzu) couplé au logiciel Saramis, l'intégration à l'informatique du laboratoire se faisant via le logiciel Sirweb. Utilisation des galeries biochimiques (phoenix et biomerieux) en cas de discordance entre SM et l'identification conventionnelle, utilisation de technique moléculaire (PCR/séquençage).
	- Dépôt d'une seule colonie bactérienne sous forme d'un fin frottis d'environs 5 mm^2 à la surface de la plaque métallique et séchage à l'air.	- Dépôt des souches : un puit par souche
	- Ajout d'1 µl de matrice	

(cyanohydroxycinnamique) une seconde étape de séchage à l'air permettait la cristallisation avec l'échantillon bactérien.	- La matrice utilisée : alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic.
- Introduction de la cible dans l'appareille et l'exposition sous vide aux tirs du laser, le temps de vol des espèces ioniques et le spectre de masse était ensuite analysé grâce au logiciel disponible. -en cas de discordance entre les identifications MALDI-TOF et Vitek 2, l'identification génotypique était prise en compte et considérée comme référence.	- Analyse par SM et l'obtention des spectres de masse comparés aux spectres de la base.

4- Résultats des études au CHU de Lille [32] :

- Parmi les 362 isolats analysés, 264 (73%) ont été identifiés de façon concordante par les systèmes Vitek 2 et Microflex .(tableau VI)
- En prenant l'identification génétique 44 (12.5%) des 98 isolats restant avaient été correctement identifiés par SM mais pas par Vitek 2.
- A l'inverse 33 isolats (9.12%) ont été correctement identifiés par Vitek 2 mais pas par Microflex.
- Pour 21 isolats (5.8%) ni l'identification Microflex ni celle de Vitek 2 ne correspond à l'identification génotypique

Le tableau VI confirme la capacité du SM à identifier les staphylocoques, comme cela a été suggéré par des travaux antérieurs [34], en revanche, les résultats obtenus avec les autres groupes bactériens montrent un certain nombre de discordances entre les deux techniques utilisées et dans certains cas, l'incapacité des deux systèmes à identifier les espèces de façon satisfaisante.

Tableau VI : Identifications bactériennes par Vitek 2 et Microflex

Groupes bactériens	Identifications concordantes (%)	
	genre	espèce
Staphylococcus spp (n=25)	100	100
Micrococcus spp, et apparentés *(n=2)*	100	100
Enterococcus spp (n= 23)	100	95.7
Streptococcus spp (n=44)	88.6	65.9
Enterobacteriaceae (n=131)	87.8	83.2
Neisseriaceae (n=12)	91.7	75.0
Pasteurellaceae (n= 27)	92.6	33.3
Autres groupes bactériens (n= 98)	76.5	60.2

- Le tableau VII montre la répartition des groupes bactériens plus fréquemment identifiés par Microflex que par Vitek 2. L'impossibilité d'identifier plusieurs espèces de Pasteurellaceae (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Pasteurellaceae dagmatis*) par Vitek 2 était due à leur absence du thésaurus des espèces reconnues par ce système.
- L'identification des isolats de pasteurellaceae par SM n'a d'ailleurs été obtenue qu'après introduction des spectres des souches type de cette famille dans la base de données du système.
- L'identification par Microflex des Neisseria commensales et d'espèces environnementales de Pseudomonas spp et Acinetobacter spp a été possible en raison de la richesse de la base de données biotyper en spectres de ces espèces.

Tableau VII : Répartition des groupes bactériens identifiés par SM plus que Vitek 2

	Identification correcte par microflex (a)	**Identification correcte par Vitek 2 (a)**
• ***Pseudomonas spp* (autre que *Pseudomonas aeruginosa*).**	**12/14 (b)**	**8/14**
• ***Acinetobacter spp***	**9/11**	**6/11**
• ***Streptocoques* du groupe *« milleri »***	**9/9**	**5/9**
• ***Neisseria sicca /subflava***	**4/5**	**1/5**
• ***Haemophilus spp***	**13/15**	**3/15**

• ***Pasteurella spp***	9/9	3/9

(a) : identique à l'identification génétique.
(b) : nombre total d'isolats étudiés.

- Dans le tableau VIII, la SM ne semble pas être un outil adapté à l'identification des shigelles, bactéries de grande importance médicale, cela est démontré par l'analyse des séquençages des gènes de l'ADNr 16S [30] , néanmoins, l'introduction de nouveaux spectres de sigillé dans la base de données est indispensable avant de pouvoir conclure définitivement en ce sens.
- Trois isolats d'*Enterobacter amnigenus* et un isolat de *Pantoea dispersa* n'ont pu être identifiés comme tels par SM, aucun spectre de base de données biotyper n'étant suffisamment analogue à celui des quatre isolats testés.
- L'identification des isolats d'*Aeromonas caviae, Aeromonas sobria* et *Aeromonas hydrophila* pourtant présentes dans la base biotyper, semble avoir été compromise par les similitudes de leur spectre de masse avec celui de l'espèce récemment identifiée *d'Aeromonas culicicola* [35].
- Les espèces de streptocoques « viridans » n'ont pu être différenciées par SM contrairement à des données rapportées dans un travail antérieur [36], une technique d'extraction à l'acide formique pourrait cependant permettre l'obtention des spectres de meilleure qualité.

Tableau VIII : Répartition des groupes bactériens fréquemment identifiés par Vitek 2 que par Microflex.

	Identification correcte par Microflex (a)	Identification correcte par Vitek 2 (a)
Shigella spp.	**0/6 (b)**	**6/6**
Enterobacter amnigenus /pantoea dispersa	**1/5**	**5/5**
Alcaligenes/achromobacter spp	**3/6**	**6/6**
Aeromonas spp	**0/4**	**4/4**
Streptococcus mitis/oralis	**0/7**	**4/7**

(a) Identique à l'identification génétique,
(c) Nombre total d'isolats étudiés.

5- Résultat des études au laboratoire hospitalier de Lyon [33] :

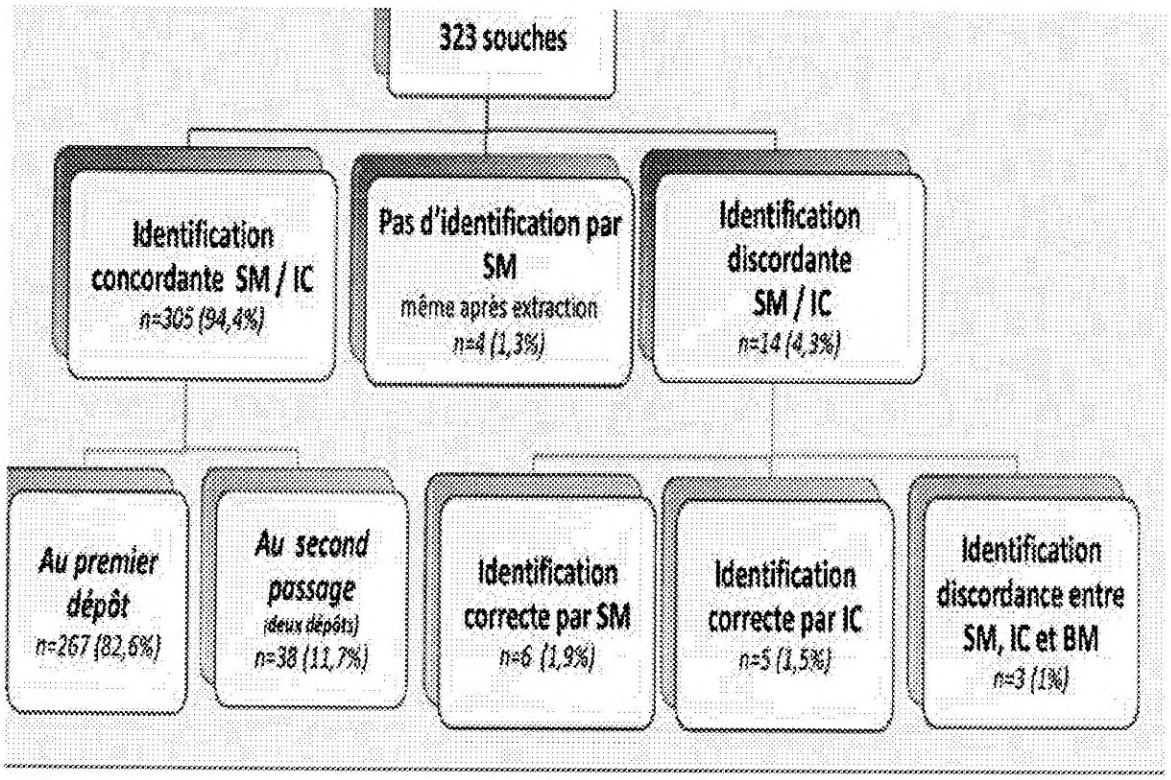


Figure 14 : Résultats d'analyse des souches bactériennes.

Tableau IX : Identification concordante entre SM et l'identification conventionnelle en fonction des souches testées.

Groupe bactérien	Nombre de souches (%)	Concordance SM/IC (Nb de souches, %)
Anaérobies	5 (2)	3 (60)
Burkholderia	4 (1)	4 (100)
Corynebacteries	5 (2)	2 (40)
Entérobacteries	140 (42)	136 (97)
Entérocoques	13 (4)	12 (92)
Haemophilus	6 (2)	6 (100)
Légionelles	3 (1)	3 (100)
Pseudomonas *Acinetobacter* *Stenotrophomonas*	45 (14)	44 (98)
Staphylocoques à coagulase négative (SCN)	38 (12)	37 (97)
Staphylococcus aureus	36 (11)	36 (100)
Streptocoques	13 (4)	12 (92)
Autres	15 (5)	10 (67)

L'identification bactérienne par SM fut concordante avec celle obtenue par l'identification conventionnelle dans 305cas (94.4%).

Tableau X : Identification détaillée (SM/IC/BM) des 14 souches présentant une identification discordante.

	SM	IC (Phoenix (Ph) ou API)	Référence : BM (16s ou *tuf* ou *gyrB*)
1	*Bacteroides thetaoitaomicron*	*Bacteroides fragilis* (API)	*Bacteroides thetaoitaomicron* (16s)
2	*Staphylococcus epidemidis*	*Staphylococcus warneri* (Ph)	*Staphylococcus epidemidis* (tuf)
3	*Citrobacter freundii*	*Escherichia coli* (Ph)	*Citrobacter freundii* (gyrB)
4	*Enterobacter aerogenes*	*Enterobacter cloacae* (Ph)	*Enterobacter aerogenes* (gyrB)
5	*Aggregatibacter aphrophilus*	*Pasteurella spp.* (API)	*Aggregatibacter segnis* (16s)
6	*Acinetobacter ursinii*	*Acinetobacter johnsonni* (Ph)	*Acinetobacter ursinii* (gyrB)
7	*Microbacterium koreense/thalassium*	*Sphingomonas paucimobillis* (API)	*Sphingomonas panipatense* (16s)
8	*Waustersia paucula*	*Comamonas testosteronii* (API)	*Comamonas testosteronii* (16s)
9	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus durans* (Ph)	*Enterococcus durans* (tuf)
10	*Escherichia coli*	*Citrobacter farmeri* (Ph)	*Citrobacter amalonaticus* (gyrB)
11	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Cellulomonas sp.* (API)	*Cellulomonas cellulans* (16s)
12	*Pasteurella canis*	*Pasteurella multocida* (API)	*Actinobacillus equuli* (16s)
13	*Streptococcus pneumoniae*	*Streptococcus oralis* (API)	*Streptococcus infantis* (tuf)
14	*Enterobacter cloacae*	*Enterobacter gergoviae* (Ph)	*Klebsiella oxytoca* (gyrB)

VII- *Validation de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF par comparaison avec la biologie moléculaire et les tests classiques: expérience effectuée par le laboratoire de microbiologie du centre hospitalier de Mulhouse :*

1- Matériels et méthodes [19] :

Les études ont été réalisées sur 10.000 souches bactériennes.

Utilisation de SM Axima (shimatzu) couplé au logiciel Saramis (anagnostec), l'intégration à l'informatique se faisant via le logiciel Sirweb.[37]

Le spectre obtenu est comparé en première intention à des superspectres contenus dans la base, puis aux spectres. Le superspectre est un spectre moyen obtenu après plusieurs passages dans des conditions différentes de culture (temps, milieu, température) d'une quinzaine de souches de référence (souches de collections) et de souches cliniques ou environnementales. L'identification des souches utilisées pour la réalisation de la base est validée par biologie moléculaire (ARN16S. . .).

Utilisation de deux versions de logiciel Saramis Premium. Une première version jusqu'au avril 2010 permettant une identification en superspectres, puis en spectres, l'identification en superspectres était validée pour un pourcentage de concordance supérieur ou égal à 70 % à un ou plusieurs superspectres pour un unique microorganisme. Une identification en spectres a été considérée comme validée techniquement en cas de concordance supérieure à 35 % à plusieurs spectres (10 à 20) d'une même espèce, voire une même sous espèce, le nombre de spectres d'une même espèce étant proportionnel au nombre de spectre présent dans la base. A partir d'avril 2010, nous avons utilisé une nouvelle version du logiciel

Saramis, avec un algorithme modifié pour la recherche en spectres. La concordance doit être supérieure à 45 %. Cette nouvelle version permet une analyse ultrarapide en spectres (dix à 20 secondes) au lieu des quelques minutes exigées par la version antérieure. En octobre 2009 plus de 35000 spectres sont contenus dans la base couvrant 500 genres, 2000 espèces, plus de 2800 superspectres.

Les dépôts se font directement à partir de la colonie sans extraction, cependant une « mini» extraction est nécessaire pour les levures, certaines bactéries à Gram positif, une quantité de colonie est dissociée dans 20 ml d'acide formique à 25 % (v/v) dans un tube de 1,5ml. Cette extraction permet de mieux dissocier les micro- organismes et d'obtenir un spectre plus riche.

L'antibiogramme est réalisé par diffusion en milieu gélosé. L'identification et l'antibiogramme se font le plus souvent à partir d'une seule colonie

Les dépôts et la programmation des plaques se font à chaque poste de travail: hémocultures et liquides, prélèvements divers, urines, prélèvements pulmonaires et prélèvements de selles. Les plaques sont regroupées et passées en deux à quatre fois par jour. La validation se fait à chaque poste de travail.

Pendant un mois, l'ensemble des microorganismes a été identifié en parallèle par les méthodes classiques utilisées jusqu'alors au laboratoire [38]. Après cette validation technique, la spectrométrie de masse a été utilisée seule en première intention. Dés le début de septembre 2009, tous les microorganismes isolés au laboratoire ont été identifiés par spectrométrie de masse à l'exclusion de: *Escherichia coli* isolé´ sur milieu CPS (BioMérieux) dans les prélèvements urinaires, certaines souches de *Staphylococcus aureus* isolées de pus superficiel, une grande partie des souches de *Candida albicans* isolées sur CANDISelect, *Streptococcus*

pneumoniae isolé des prélèvements pulmonaires ou rhinopharyngés identifiés par le test à l'optochine.

Les identifications ont été validées en fonction des données cliniques, de l'antibiogramme et éventuellement la réalisation de tests simples: coloration de Gram, oxydase, études des caractères complémentaires le cas échéant. En cas de discordance avec l'antibiogramme de microorganismes d'identification inhabituelle, des galeries Api ont été réalisées, et des souches ont été envoyées pour séquençage de l'ARN 16S (GenoScreen Lille) principalement.

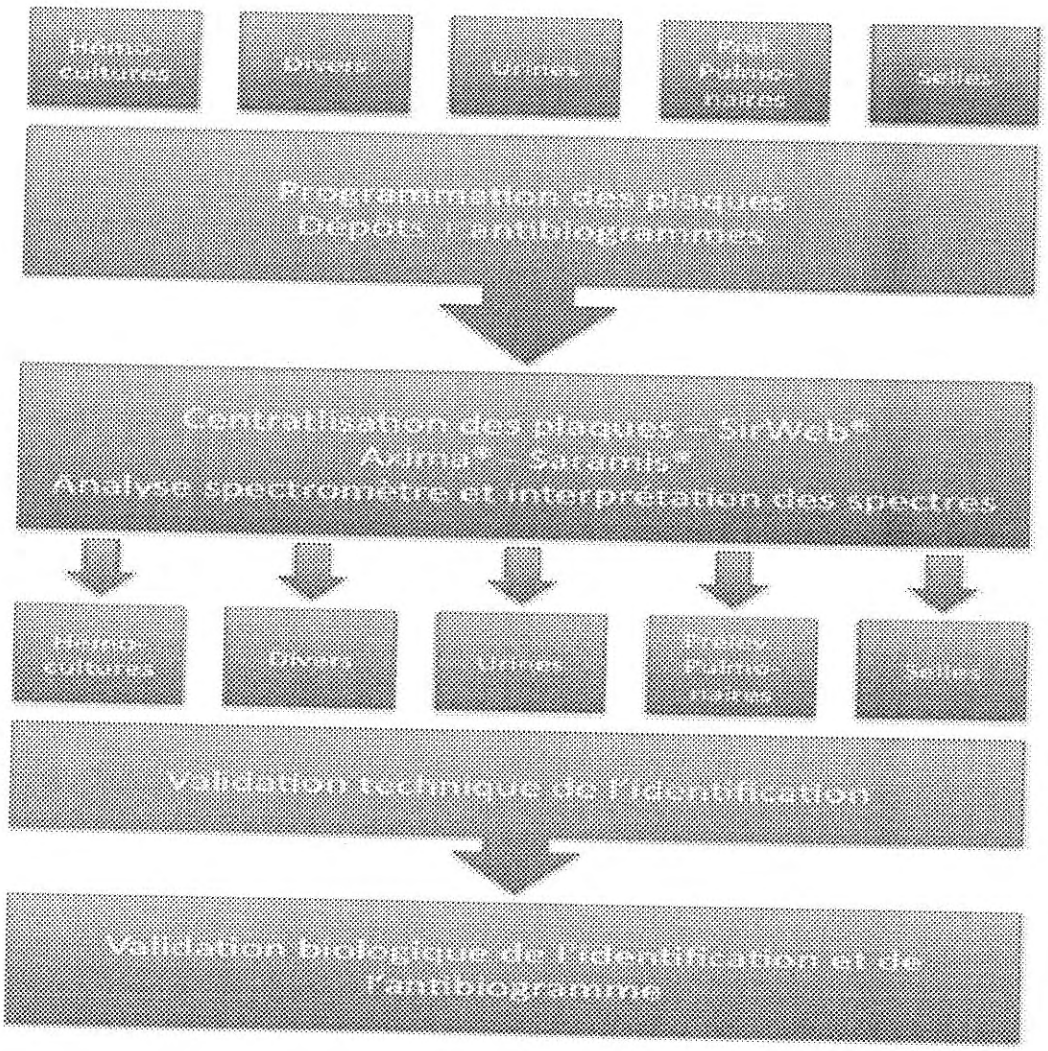


Figure. 15. Schéma général de l'identification en spectrométrie de masse dans l'organisation du laboratoire.[19]

2- Résultats :

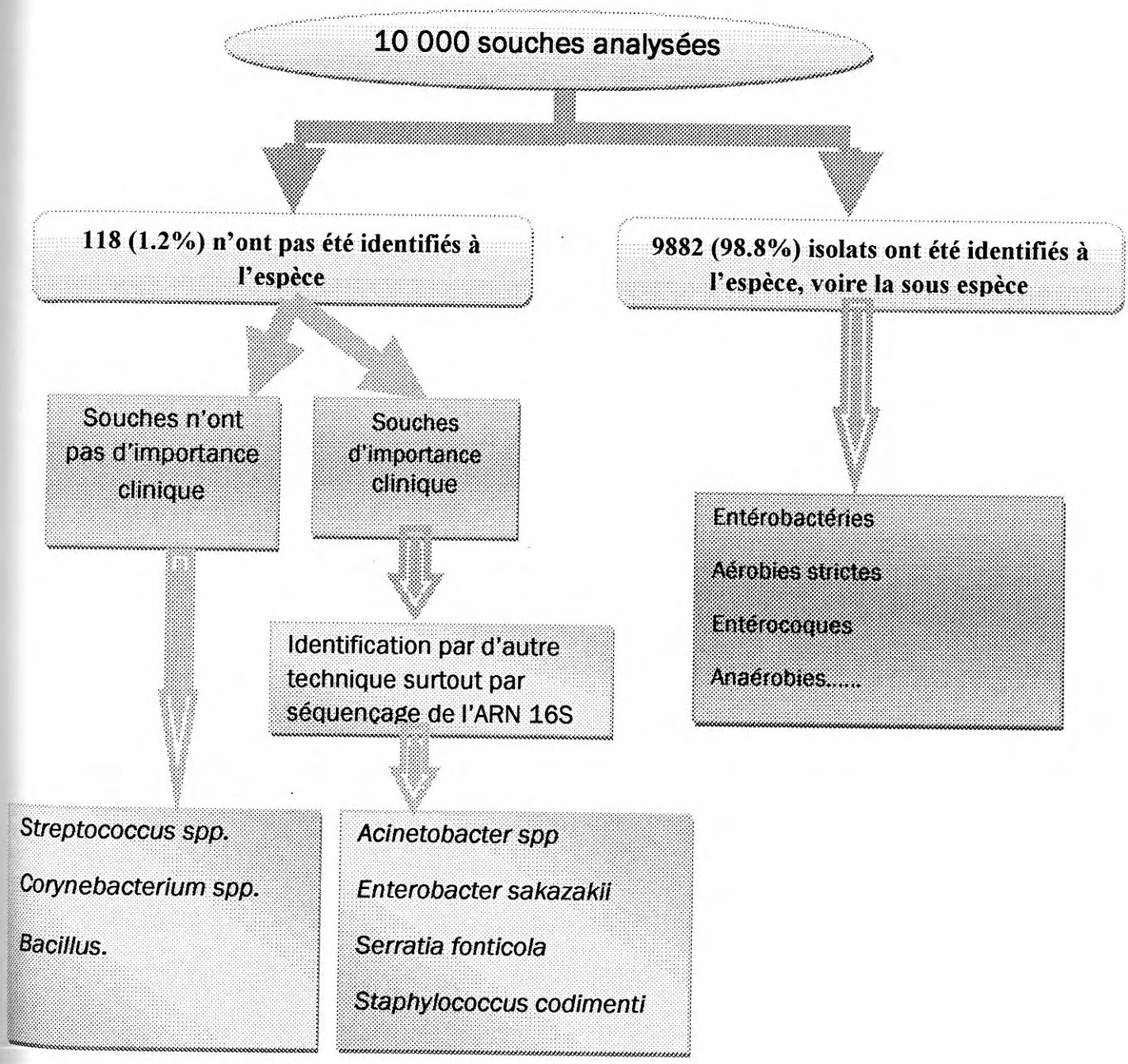


Figure 16 : Schéma présentatif des résultats d'analyse

Le tableau XI présente 10 000 identifications en SM en routine obtenues pendant prés de dix mois de mi- septembre 2009 à juin 2010. Ces identifications n'incluent pas certaines souches non identifiées par SM : la majorité des souches d'*Escherichia coli* isolées de prélèvement d'urine, isolées sur milieu chromogènes, la majorité des souches de *Streptococcus pneumoniae et Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus* identifiées par test d'agglutination, les *Candida albicans* isolés sur milieu chromogène. Ces souches présentent 4645 identifications. Les filamenteux et les mycobactéries n'ont pas été analysées par le SM.

Tableau XI. Répartition des 10 000 souches analysées en SM par groupes ou familles de microorganismes [19].

Familles	**Nombre des souches analysées**	**pourcentage**
Anaérobies	**136**	**1.4**
Entérobactéries	**3871**	**38.7**
Autre bacille gram négatif	**1078**	**10.8**
Staphylocoques	**2393**	**23.9**
Streptocoques	**707**	**7.1**
Entérocoques	**713**	**7.1**
Autre cocci gram négatif	**13**	**0.1**
Bacilles gram positif	**84**	**0.8**

Cocci gram négatif	**14**	**0.1**
Levures	**991**	**9.9**

A- Isolats n'ont pas été identifiés à l'espèce :

Parmi les 10 000 souches analysées, 118 (1.2%) n'ont pas été identifiées à l'espèce, ces souches ont été identifiées par d'autres techniques en fonction de l'importance clinique de leur isolement : en appréciant le site de prélèvement, le nombre d'isolements réalisés pour les hémocultures, après discussion avec le clinicien si nécessaire, ainsi, les souches de *Streptococcus spp, corynebacterium spp, bacillus spp* isolées de façon unique d'hémoculture, de prélèvement superficiel ont été considérés comme des souillures et n'ont pas été identifiés plus précisément.

- Pour le genre *Corynebacterium* seulement 16 souches ont été identifiées à l'espèce (1 *C amycolatum*, 5 *C jeikeium*, 9 *C pseudodiphterium*, 2 *C striatum*), confirmées par galerie Api Coryne, quelques tests simples et le profil de résistance à l'antibiogramme.
- Pour le genre *Streptococcus,* 36 souches parmi 304 souches, des Streptocoque oraux, non pas identifiées à l'espèce, les autres espèces ont été identifiées en superspectre
- Pour les 8 souches de levures et 5 souches des anaérobies qui ont été isolées de prélèvement polymicrobiens, leur identification n'a pas été poursuite.
- 6 souches (trois patients et un contrôle de qualité) avaient une importance clinique, l'identification par d'autre technique a donc été réalisée :

- ❖ Trois souches non identifiées à l'espèce étaient isolées d'hémocultures chez un même patient. Une identification par séquençage de l'ARN 16S a identifié les souches comme Acinetobacter spp.
- ❖ Une souche isolée d'urine, la séquence de l'ARN 16S était similaire à 100% à *Cronobacter turicensis* ce genre est récemment décrit et correspond à une subdivision d'***Enterobacter sakasakii[39].***
- ❖ Une souche de contrôle de qualité nationale était identifiée Serratia liquefaciens (deux spectres avec des scores de concordance inferieur à 30%). Cette identification n'était pas acceptable, une galerie Api20E identifiait la souche comme **Serratia fonticola** à 99%.
- ❖ Une souche de staphylocoque à coagulase négative dont l'isolement était potentiellement significatif, était identifiée par séquençage comme Staphylococcus codimenti.

Tableau XII : Identification des 118 souches non identifiées à l'espèce par SM [19]

Identification	Nombre de souches	commentaires	Identification par une autre technique
Acinetobacter spp	3	Plusieurs hémocultures, pour un même patient	Séquençage ARN 16s
Bacillus spp	8	Prélèvement cutanés	Non

Corynebacterium spp	**38**	**Essentiellement prélèvement cutanés, hémocultures, isolées (souillures)**	**Non**
Lactobacillus spp	**15**	**Souillures**	**Non**
Enterobacter spp	**1**	**Prélèvement urinaire**	**Non**
Serratia spp	**1**	**Contrôle de qualité national**	**Galerie api 20^{E}**
Staphylococcus spp	**3**	**Prélèvement potentiellement significatif**	**Séquençage sodA**
Streptococcus spp	**36**	**Hémocultures isolées (souillures) et prélèvement divers**	**Non**
Anaérobies	**5**	**Prélèvement polymicrobiens**	**Non**
Levures	8	Mélange de plusieurs espèces	Non

B- Isolats identifiés à l'espèce par SM :

Un total de 9882 (98.8%) isolats ont été identifiés à l'espèce, voire la sous espèce. Les entérobactéries sont très majoritairement identifiées en superspectres.

Les espèces Citrobacter freundii et Citrobacter brakii sont parfois identifiées Citrobacter spp nécessitant une identification en spectres pour avoir l'espèce précise. De même, parfois l'identification en spectres d'Enterobacter cloacae s'est faite à Enterobacter spp.

Pour les autres entérobactéries, l'identification a pu ne pas se faire en superspectres en cas de dépôt insuffisant, voire de dépôt trop important, la

comparaison secondairement en spectres donnant l'identification sans confusion possible ou un nouveau dépôt a été nécessaire.

Quelques identifications d'entérobactéries sont à noter :

Une souche de Cedecea netteri a été identifiée en superspectres, l'identification était confirmée par des tests négatifs pour la lysine décarboxylase, absence de fermentation de L-arabinose et L-rhamnose et une réaction positive pour l'arginine dihydrolase. La souche était résistante à la colistine, absence d'hydrolyse de la gélatine et de l'ADN, par ailleurs, la souche fermentait le sacharose, le sorbitol et le xylose [40]. La majorité de ces caractères ont été vérifiés sur galerie Api 20 E mais cette espèce ne fait pas partie de sa base de taxon et donc n'est pas identifié par cette galerie

D'autres espèces ont également été identifiées comme :

- *Leclercia adecarboxylata*
- *Escherichia hermanni*
- *Providencia rettgeri*

Pour les bactéries aérobies strictes ont été identifiés :

- *Achromobacter xylosoxydans*
- *Acinetobacter junii*
- *Acinetobacter ursingii*
- *Arcanobacterium bernardiae*
- *Burkholderia cenocepacia*
- *Pseudomonas putida*
- *Pseudomonas stutzeri*

Pour les entérocoques l'identification en superspectres après dépôts directs :

- *Enterooccus faecalis*
- *Enterooccus faecium*

Pour les autres espèces, une mini extraction par l'acide formique a donné de meilleurs résultats, ont identifié des souches :

- *Enterooccus avium*
- *Enterooccus casseliflavus*
- *Enterooccus cecorum*
- *Enterooccus durans*
- *Enterooccus gallinarum*
- *Enterooccus hirea*

La technique a permis une identification rapide sans équivoques des souches , notamment résistantes à la vancomycine isolées au laboratoire à partir d'isolements cliniques ou sur milieu chromogène sélectif dans le cadre de la recherche d'un portage permettant une mise en place rapide des mesures nécessaires d'isolement.

L'identification des souches rares a été réalisée comme une souche d'E *Enterooccus avium* vanA, le génotype de résistance étant confirmé par biologie moléculaire.

Parmi les bacilles gram négatif autre que les entérobactéries et bactéries aérobies strictes, on a noté, en particulier, une très bonne identification :

- *Campylobacter spp*
- *Haemophilus spp*
- *Haemophilus influenza*
- *Haemophilus parainfuenza*
- *Haemophilus haemolyticus*
- *Eikenella corodens*
- *Aeromonas spp*

- *Capnocytophaga sputigena*
- *Bordetella holmensii*

Tableau XIII : Identification des microorganismes anaérobies :

Répartition des 136 bactéries anaérobies analysées en spectrométrie de masse.

Familles	Nombre de souches analysées	Pourcentage
Bacteroides fragilis	33	24,3
B. thetaiotaomicron	1	0,7
B. vulgatus	3	2,2
Clostridium bifermentens	2	1,5
C. difficile	51	37,5
C. perfringens	13	9,6
C. septicum	1	0,7
C. tertium	1	0,7
Fusobacterium necrophorum	7	5,1
Fusobacterium nucleatum	3	2,2
Peptococcus spp	1	0,7
Peptostreptococcus anaerobius	4	2,9
Peptostreptococcus magnus	2	1,5
Peptostreptococcus spp	4	2,9
Prevotella bivia	2	1,5
Prevotella disiens	2	1,5
Prevotella intermedia	3	2,2
Propionibacterium acnes	3	2,2
Propionibacterium spp	1	0,7

3- Discussion:

Le superspectre est un réel plus. Il permet de s'affranchir de la variabilité entre deux souches d'une même espèce, des conditions de culture notamment.

Elle permet d'identifier rapidement des microorganismes pour lesquelles plusieurs jours étaient nécessaires, par exemple, l'identification du genre *Campylobacter spp* avec un gain de 48 à 72 heures; ou des microorganismes pour lesquelles le recours à des techniques de biologie moléculaire était Nécessaire (*Capnocytophaga spp*). Pour les microorganismes de culture difficile (anaérobies, microorganismes de croissance lente), la faible quantité de microorganisme nécessaire est un

gain énorme. Pour *Clostridium. difficile*, la spectrométrie est une technique d'identification fiable et très rapide, les galeries et autres systèmes d'identification automatique étant peu efficaces. La validation de l'identification directement sur flacons d'hémoculture est prometteuse et sera essentielle pour l'identification des bactéries anaérobie.

En ce qui concerne le genre staphylocoques, la spectrométrie de masse est plus performante que les techniques classiques.

L'identification en spectrométrie de masse était confirmée pour toutes les souches par biologie moléculaire (séquençage du gène sodA et ou séquençage de l'ARN16S).

Streptococcus pneumoniae donne une très bonne identification en spectrométrie de masse. Toutes les souches étaient sensibles à l'optochine, aucune souche de Streptococcus mitis ou S. oralis n'a faussement été identifiée comme S. pneumoniae, il serait intéressant d'étudier des souches de S. pneumoniae résistantes a` l'optochine ainsi qu'un panel important des souches de S. mitis et S. oralis et autres streptocoques oraux parfaitement identifiées.

La base est très bien fournie en superspectres et spectres, et dans cette expérience, le recours à une technique de substitution s'est avéré exceptionnel. Quoiqu'il en soit le déficit de la base Saramis pour le genre Corynebacterium doit être comblé. En effet, seule neuf espèces de corynébactéries sont présentés en superspectres moins que dans la base Bruker [41]. Certaines espèces présentes dans une des bases peuvent être absentes de l'autre, l'évolution des bases à tendance à gommer ces différences.

Pour les entérobactéries, cette identification semble très satisfaisante. L'évolution de la base devra inclure les espèces non encore inclues comme Serratia fonticola, ainsi que les changements de taxonomie récents. Stephan et al [42], viennent de montrer qu'il était possible de

différencier les différentes espèces du genre Cronobacter spp sans difficultés et les intégrer dans la base de données Saramis.

Dans la pratique courante, le nombre d'identification augmente. Le coût est faible mais dés le début de l'utilisation, les identifications ont été limité aux isolats ayant une signification clinique ou ayant un réel intérêt dans l'interprétation bactériologique. Tous les staphylocoques isolés des hémocultures et des cathéters sont identifiés, ce qui permet d'argumenter les souillures ou confirmer la bactériémie si plusieurs isolements d'une même espèce. Pour un examen cytobactériologique d'urine comprenant trois microorganismes, nous ne faisons pas d'identification. Certains auteurs se posent la question de l'intérêt de la coloration de Gram, de l'utilisation de certains tests comme l'oxydase devant la rapidité et l'universalité de la technique [43]. Ces tests simples gardent tout leur intérêt, ils permettent d'éviter d'éventuelles erreurs grossières [44]. Nécessairement, avant le dépôt, il doit savoir s'il s'agit ou non d'un bacille Gram négatif ou d'un cocci pour choisir le type d'antibiogramme

Dans cette experience, il a également gardé les milieux chromogènes utilises pour les prélèvements urinaires, le milieu utilisé pour les levures qui permettent une distinction rapide des différentes colonies. Certains milieux de réisolement ou étape de résolument pour identification ont été abandonnés, l'identification se faisant directement sur le milieu sélectif (recherche de salmonelles, de légionnelles), le réisolement étant effectue´ dans un but de vérification de pureté et de conservation des souches.

VIII- Exemples d'identification :

1- Identification d'isolats de Streptococcus agalactiae par SM type MALDI-TOF : [45]

Streptococcus agalactiae ou Streptocoque du groupe B, bactérie commensale notamment du tube digestif et du vagin, et le premier germe en cause dans les infections néonatales.

Parmi les 10 sérotypes identifiés au sein du groupe, le sérotype III est le plus invasif, responsable de 80% des méningites néonatales.

Une étude a été réalisée afin de déterminer si les variations dans l'expression des protéines liées à la position phylogénétique des souches de S agalactiae affectent l'identification de l'espèce lorsqu'elle est réalisée par spectrométrie de masse type MALDI-TOF.

Cent dix souches de S agalactiae isolées du vagin de femmes enceintes non reliées épidémiologiquement ont été sélectionnées. Ces souches ont été sérotypées (typage capsulaire) et caractérisées par multi-locus séquence typing (MLST) afin de déterminer leur position phylogénétique. Elles ont ensuite été identifiées par la technique MALDI-TOF (extraction protéique, séchage, addition de la matrice chimique, analyse par SM) et les spectres

de masse obtenus ont été réalisés par comparaison à une banque de données grâce au logiciel MALDI-TOF biotyper 1.1.

Les 110 souches de S agalactiae ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce mais avec un résultat considéré comme excellent pour seulement 86 d'entre elles (78%). Ce sont les souches de sérotype III et celles de lignée phylogénétique ST23 qui exprimaient les variations des poids moléculaires des marqueurs de l'espèce les plus importantes

2- Identification des Staphylocoques par SM et comparaison aux identifications du centre national de référence (CNR) [45] :

Les staphylocoques restent un germe pathogène humain important, responsables des infections plus graves, l'identification de ce germe est basé actuellement sur les méthodes phénotypique et génotypique, ainsi une approche alternative apparue aujourd'hui implique l'analyse spectrale massique des protéines de surface par MALDI-TOF.

L'évaluation de l'identification a été réalisée par une équipe lyonnaise à partir d'une collection de souches de référence et d'une collection de souches caractérisées par le centre national de référence isolées en clinique humaine et vétérinaire.

La collection de référence comprenait 44 souches, une souche de S.aureus et 43 souches de Staphylocoque à coagulase négative de 36 espèces différentes. La collection de souches du CNR comprenait 9 souches de S.aureus et 175 souches de Staphylocoque à coagulase négative de 33 espèces différentes.

Toutes les souches ont été identifiées par SM AXIMA (extraction à partir des colonies puis quatre dépôts dans une matrice d'alpha –cyano-4-hydro-cinnamique acide) couplée à la base de données spectrales Saramis et intégrée au sein du logiciel SIRWEB-MALDI-TOF. Les identifications conventionnelles ont été effectuées à l'aide des galeries Api staph de biomérieux.

Les identifications conventionnelles et par SM ont été comparées à l'identification de référence réalisée par le CNR, qui associe les techniques biochimiques et moléculaires.

Parmi les 44 souches de la collection de référence, 6 souches n'appartenant pas à la base de données MALDI-TOF n'ont donné aucune identification, sur les 38 souches restantes 30 (79%) furent parfaitement identifiées à l'espèce par SM. Sur les 184 souches de la collection du CNR, 16 souches furent exclues car n'appartenant pas à la banque de données et 119 furent identifiées parfaitement (tableau XIV).

Tableau XIV. Comparaison des résultats d'identification par spectrométrie de masse et méthode conventionnelle

Nombre de souches identifiées (168)	**Spectrométrie de masse**	**Identification conventionnelle**
Identification correcte	**119 (71%)**	**102 (61%)**
Identification au groupe (hominis/warneri-intermedius)	**17 (10%)**	**31 (18%)**

Identification erronée	**2 (1%)**	**0 (0%)**
Pas d'identification	**30 (18%)**	**35 (21%)**

En conclusion, la SM apparait comme un outil performant pour l'identification des staphylocoques par rapport à l'identification conventionnelle [46]. Par sa rapidité et sa facilité d'utilisation, elle pourrait être utilisée en première intention pour l'identification des staphylocoques, réservant l'identification de référence réalisée par le CNR à un nombre limité de souches non identifiées par SM

3- L'identification rapide d'une toxine staphylococcique : la Leucocidine de Panton et Valentine (PVL) par SM type MALDI-TOF.

Les staphylocoques sont des bactéries à Gram positifs producteurs des toxines responsables des infections potentiellement mortelles, du pneumopathie nécrosante [47,48,] par appoptose et lyse cellulaire [49, 50, 51]. L'identification rapide de la toxine et la thérapie adaptée sont essentielles pour limiter la morbidité due aux toxines surtout la PVL, qui est une toxine synergohymenothrope ayant une activité de pore (complexe octamérique formant un tonneau bêta dans la membrane de la cellule cible : leucocyte, monocyte, macrophage [52, 53]. (figure 17)

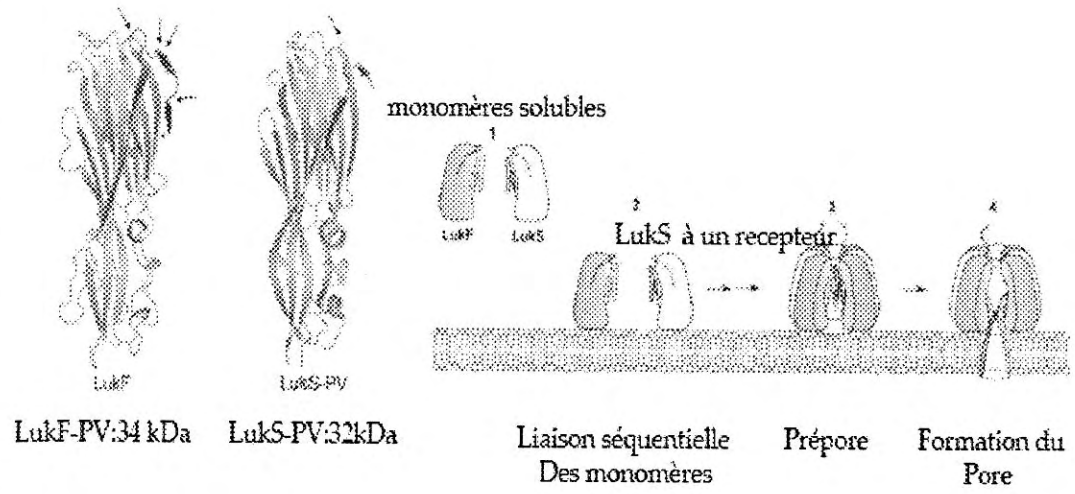


Figure 17 : Etapes de synthèse du pore [52]

Les approches classiques utilisées pour reconnaitre la toxine PVL sont généralement basées sur les propriétés immunologiques, les méthodes utilisées sont : ELISA [54], agglutination du latex [55] et PCR [56]. Ces essais sont des méthodes chères et prenantes, récemment le MALDI-TOf a joué un rôle important dans les laboratoires de microbiologie [34] car il est capable de mettre en évidence les différents phénotypes ainsi que la résistance bactérienne [57.58]

L'étude a été faite sur 81 souches *de Staphylococcus aureus* isolées à l'hôpital militaire universitaire de Constantine en Algérie, entre janvier 2005 et mars 2007. Les isolats ont été prélevés de différents échantillons pathologiques [59]

Les isolats ont été identifiés en premier temps par les méthodes conventionnelles : coloration de Gram, activité du catalase, fermentation du mannitol, capacité de coaguler le plasma du lapin, l'identification a été confirmée en utilisant le Vitek 2, et en deuxième temps par MALDI-TOF (culture bactérienne, dépôt des colonies sur plaque, ajout de la matrice) les profils obtenus ont été étudiés en utilisant le logiciel biotyper

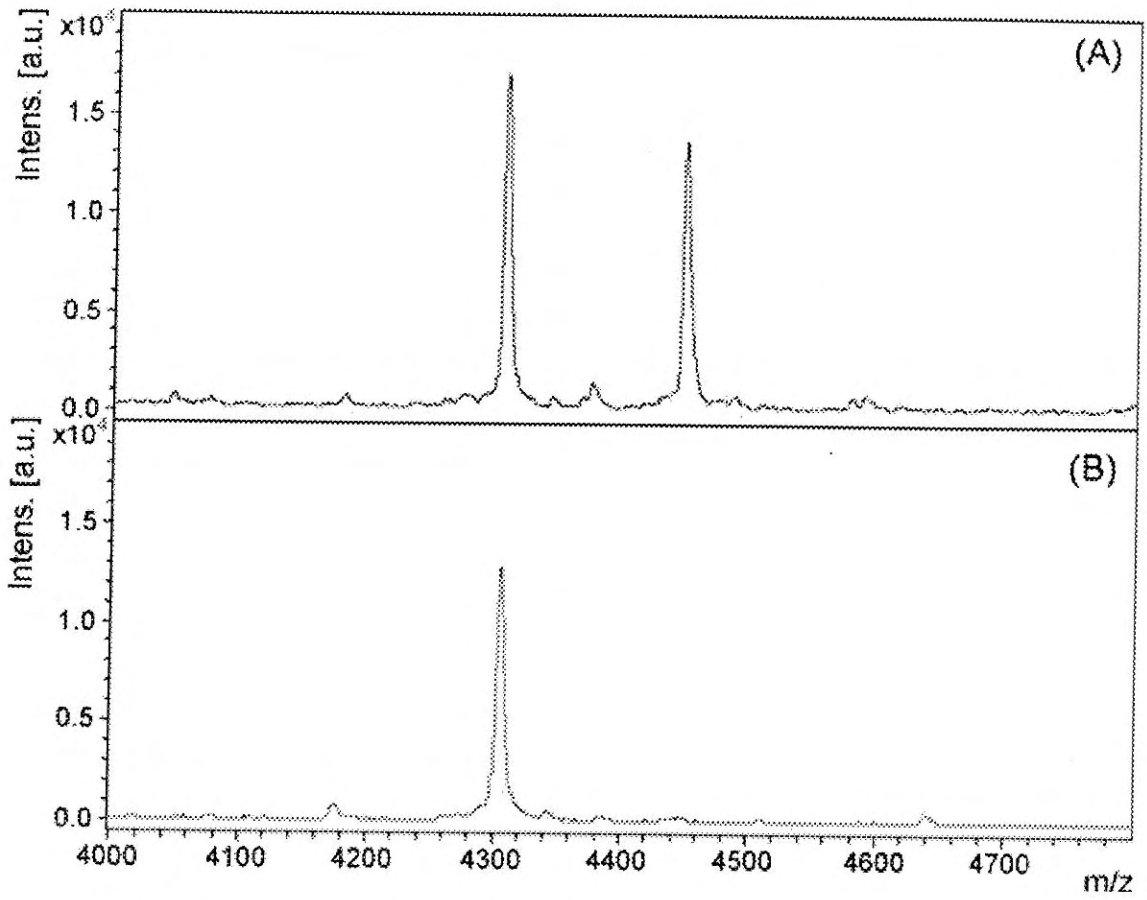


Figure 18 : Exemple de spectre MALDI-TOF pour la toxine PVL [59]

Ces données confirment la capacité de MALDI-TOF à identifier les staphylocoques et la toxine PVL

4- Identification d'espèce de légionelles : [60]

Le genre *Legionella* contient plus de 50 espèces différentes, L'identification de ces bactéries au niveau de l'espèce est réalisée dans des

laboratoires spécialisés soit par des méthodes phénotypiques (immunofluorescence indirecte avec des anticorps spécifiques de chaque espèce), soit par des méthodes moléculaires (séquençage de gènes spécifiques).

Objectif :

Evaluer la faisabilité de l'identification d'espèces des bactéries du genre *Legionella* par MALDI-TOF-MS à l'aide du Spectromètre de masse AXIMA (Shimadzu) couplée à la base de données spectrales SARAMIS (Anagnostec) et intégrée au sein du logiciel SIRWEB-MALDITOF (I2A).

Matériel et Méthodes :

➢ Souches bactériennes et conditions de culture :

• Total des souches testées : 178
Chaque souche et décongelée sur BCYEa (Oxoid, Dardilly, France), et incubée à 35°C à 2,5% de CO_2 pendant 3 à 7 jours, puis est repiquée sur BCYE et incubée 48 heures à 35°C à 2,5% CO_2.

➢ Analyse MALDI-TOF-MS :

• Appareil : AXIMA (Shimadzu Biotec)
• Base de données de spectres : SARAMIS (Anagnostec)
• Interface informatique : SIRWEB-MALDI-TOF (I2A)
• Dépôts : Chaque souche est déposée sur la microplaque permettant l'analyse par spectrométrie de masse.

Résultats :

Parmi les souches présentes dans la base des spectres :
• Identification confirmée : 136 souches (84%)
• Identification probable : 18 souches (11%)
• Pas d'identification : 7 souches (4%)

• Mauvaise identification d'espèce : 1 souche (1%)
Parmi les souches absentes de la base des spectres :
• Mauvaise Identification confirmée : 3 souches (19%)
• Mauvaise Identification probable : 2 souches (13%)
• Pas d'identification : 11 souches (69%)

Conclusion : la SM MALDI-TOF permet une identification des espèces de légionella présentes dans la base de données dans 95% (l'identification confirmée et probable). Complétant la base de données par des spectres des espèces manquantes permettent d'optimiser l'identification d'espèce des légionella par cette méthode. De plus, enrichir la base des superspectres pour chacune des espèces permettant de minimiser le temps d'analyse.

Tableau XV : Identification des souches de légionella au niveau de l'espèce

Espèce	Nb isolats	Identification confirmée : > 30% pour au moins 2/4 des réplicats	Identification probable : > 30% pour 1/4 des réplicats ou < 30% pour plusieurs des réplicats	Pas d'identification	Mauvaise identification
L. birminghamensis (1)	4	3	1	0	0
L. bozemanii (4)	9	9	0	0	0
L. brunensis (2)	1	0	0	1	0
L. dumoffii (4)	4	4	0	0	0
L. erythra (1)	15	13	2	0	0
L. feeleii	6	2	4	0	0
L. gormanii (4)	6	1	2	3	0
L. jordanis	6	5	1	0	0
L. londiniensis (2)	3	0	0	3	0
L. longbeachae	3	1	0	2	0
L. maceachernii (3)	4	3	0	1	0
L. micdadei (3)	9	9	0	0	0
L. oakridgensis	6	5	0	1	0
L. pansiensis	5	5	0	0	0
L. pneumophila	66	62	4	0	0
L. quateresis (2)	1	0	0	1	0
L. quinlivanii (2)	5	0	0	2	3
L. rubrilucens (1)	11	7	4	0	0
L. sainthelensi	4	4	0	0	0
L. spiritensis (2)	2	0	0	2	0
L. Steigerwaltii	2	0	0	2	0
L. taurinensis (1)	3	3	0	0	0
L. tucsonensis (2)	3	0	0	2	1
TOTAL	**178**	**136**	**18**	**20**	**4**
RATIO	**100%**	**76%**	**10%**	**11%**	**2%**

(1) pas dans la base de super spectres
(2) pas dans la base de spectres
(3) genre *Tatlockia*
(4) genre *Fluoribacter*

IX- Facteurs expérimentaux qui affectent la qualité et la reproductibilité de MALDI-TOF

Généralité

Les facteurs les plus importants qui affectent la qualité et la reproductibilité des spectres obtenus par SM sont essentiellement les paramètres instrumentaux et ceux de la préparation de l'échantillon (méthode de stérilisation, type de matrice, concentration des cellules dans la matrice, le type et la concentration d'acide ajouté à la matrice).

MALDI-TOF a été utilisé régulièrement pour l'analyse de protéines purifiées extraites de la bactérie, récemment la technique a introduit une nouvelle méthode pour identifier directement et rapidement les bactéries sans extraction protéique et en présence des autres composants cellulaires, c'est l'analyse de la bactérie entière.

Des expériences ont montré que l'analyse des bactéries entières fournit des spectres reflétant seulement une petite portion de protéome cellulaire, néanmoins il reste une méthode efficace, simple pour bien identifier rapidement les bactéries, de plus l'application d'une procédure complexe peut céder des spectres reproductibles :

- Lavage cellulaire
- Lyophilisation
- Centrifugation
- L'approche de deux couches matrice/échantillon
- Laser Nd :yag au lieu d'azote .

Le **laser Nd-YAG** (acronyme du nom anglais : *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) ou grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme ($Nd:Y_3Al_5O_{12}$) est un cristal utilisé comme milieu amplificateur pour les lasers utilisant des milieux solides Ils constituent un des types les plus communs de laser, et sont utilisés dans de nombreuses applications.

La méthode est démontrée sur la *Listeria innocua* et *Escherichia coli*.

1- Méthodes [61]

Culture bactérienne sur 24h en milieu liquide (50ml de bouillon du soja tryptique) à 35°C a donné les résultats suivants :

E coli se caractérise par une croissance plus rapide, ce qui exige une réinocubation en aérobie

pour Listeria la croissance est plus lente, utilisée directement après culture.

Les bouillons ont été centrifugés à 12000 tr/min pendant 2 min, le surnageant a été enlevé par aspiration, ensuite 1ml d'une solution de stérilisation a été ajoutée, et les suspensions ont été agitées pendant une minute.

La solution de stérilisation peut être soit :- Phénol 5%

- Formaldéhyde 8%
- Ethanol 70%
- Solution du lysozyme

Les suspensions bactériennes ont été transportées au laboratoire de la spectrométrie de masse où elles ont été centrifugées à 4000 tr/min pendant 4 min, les suspensions ont été analysées immédiatement sinon elles ont été conservées à 4°C.

Au temps d'analyse les suspensions ont été agitées et approximativement

2 µl de suspension a été mélangé directement avec la solution de la matrice aux ratios de 1 :1, 1 :3 et 1 :5.

Constituant de la matrice : 10mg CHCA, 10mg de l'acide sinapinic a été dissous dans 1 ml de dissolvant (50/50 éthanol/eau, ou 50/50 acetonitril/ eau, ou 50/50 tétrahydrofuran (THF)/eau) contenir entre 0.1-10% TFA (acide trifluoroacétique) ou AF (acide formique), dans quelques expériences une petite quantité de surfactant a été ajouté à la matrice.

2 µl de mélange de l'échantillon et la matrice a été déposé sur la plaque d'acier qui doit être au préalable nettoyée avec le méthanol et séchée, ensuite. On fait un séchage à l'air libre, dans les expériences où la suspension bactérienne a été filtrée on utilise le filtre de la centrifugeuse, la solution de la matrice a été ajoutée directement sur le filtre après un 200 µl de lavage aqueux, le mélange a été transféré à la plaque, on procède ensuite la méthode de « deux couches » en plaçant une couche mince de la matrice sur la plaque avant le dépôt d'échantillon/matrice.

2- Résultats et discussion [61]

a- Croissance et stérilisation bactérienne :

- **Croissance bactérienne :**

  Les milieux de culture solides où liquides n'affectent pas la qualité spectrale pour E.coli et listeria.

- **Stérilisation bactérienne :**

l'irradiation gamma est un moyen efficace pour stériliser et conserver l'échantillon bactérien, mais il exige des matériels spécialisés généralement non disponibles au champ, donc nous avons concentré sur l'usage des solutions de stérilisation communément disponibles, notre but a été de trouver une solution capable de fournir des échantillons qui pourraient être transportés sans risque et d'entreposer facilement avant l'analyse en donnant une bonne reproductibilité de spectre avec beaucoup de protéines détectées.
On utilise comme bactérie modèle la Listeria et on observe les différences de spectre de masse, compté sur la composition de la solution stérilisante :

- stérilisation par formaldéhyde, phénol ou lysozyme ⟹ Aucune protéine n'a été détectée

Pour augmenter le nombre de protéines détectées il faut enlever le chlorure de sodium, lysozyme, et le phénol par un simple lavage aqueux de l'échantillon par 200 µl à travers un filtre de la centrifugeuse et cela a fait améliorer le spectre de chacune de suspension bactérienne.

- stérilisation par l'éthanol 70% ⟹ Nombreuses protéines observées (figure 19b).

- En absence de stérilisation ⟹ une correspondance entre le spectre obtenu en présence de la solution stérilisante et en absence de stérilisation mais avec une qualité plus pauvre (figure 19c), tableau XVII

Figure 19 : Spectre de masse de *Listeria.innocua* après (a) stérilisation en bouillon pour 5 min, (b) stérilisation avec l'éthanol 70%, (c) absence de stérilisation.

Tableau XVI : Effet de différentes solutions de stérilisation sur le spectre de MALDI-TOF

Solution	Stérilisation	Spectre de MALDI-TOF
Nacl 0.9%	Non	Pauvre
Formaldéhyde 8%	oui	aucun
Phénol 5%	Non	aucun
Lysozyme	Oui	aucun
Ethanol 70%	oui	bon

Conclusion : la suspension bactérienne stérilisée contient plus des ions protéiques que les suspensions non stérilisées.

b- <u>L'effet des additifs :</u>

Type d'acide ajouté dans la matrice :

La matrice utilisée pour l'analyse est CHCA ou l'acide sinapinic dissous dans 50/50 acétonitrile/ eau, le pH de la matrice a été ajustée par l'addition de TFA 2.5% ou FA.

- l'addition de TFA toujours produit un plus grand nombre de sommets intenses que le FA (figure 18a et 18b).

- Les deux composées de la matrice fournissent en présence de TFA 1% des spectres avec un nombre de sommets considérables entre 2 et 12 KDa (18b, 18c). Cependant cette ressemblance n'a pas été observée généralement au dessus d'une masse de 12 KDa, car seulement CHCA qu'était meilleur pour l'identification de protéines entre 12 et 25 KDa que l'acide sinapinic.

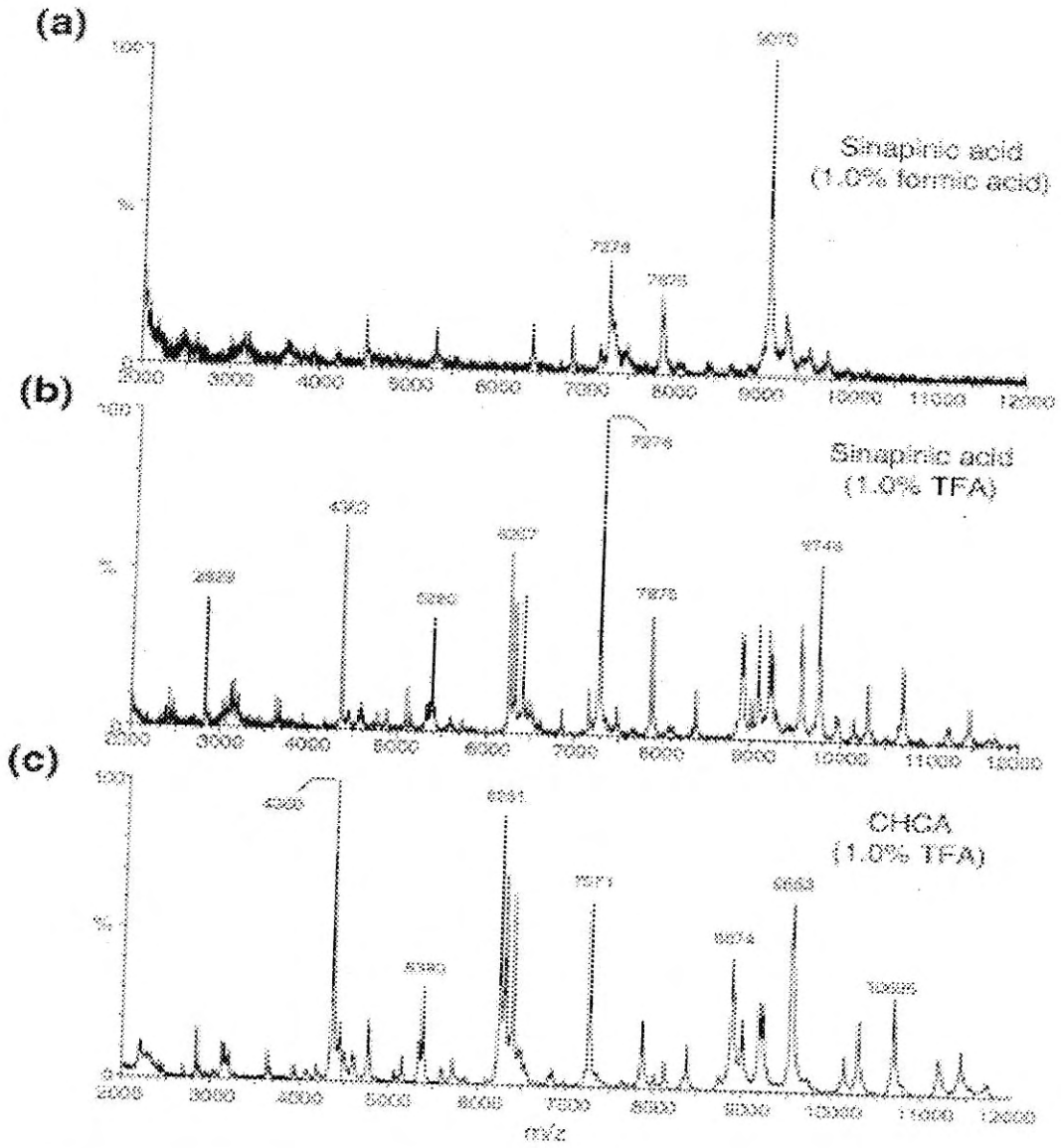


Figure 20 : Spectres d'E. coli en utilisant (a) l'acide formique dans l'acide cinapic, (b) acide TFA 1% dans l'acide cinapic, (c) TFA 1% dans CHCA

Concentration d'acide dans la matrice :

L'acide utilisé pour modifier le pH peut affecter la qualité spectrale et pour mettre en évidence l'effet principal de la concentration enacide on a effectué l'expérience suivante :

E .coli a été traité avec l'éthanol 70% et 50/50 acetonitril/ eau contenant une série de concentration de TFA ou FA (0.1 ; 0.5, 1 ; 2.5 ; 5 ou 10%) ensuite analysé par MALDI-TOF pour voir l'effet de la variation des concentrations d'acide sur les spectres.

La figure 19 montre une augmentation considérable dans le nombre et l'intensité de protéines si la concentration de FA est allée jusqu' a 5 à 10%.

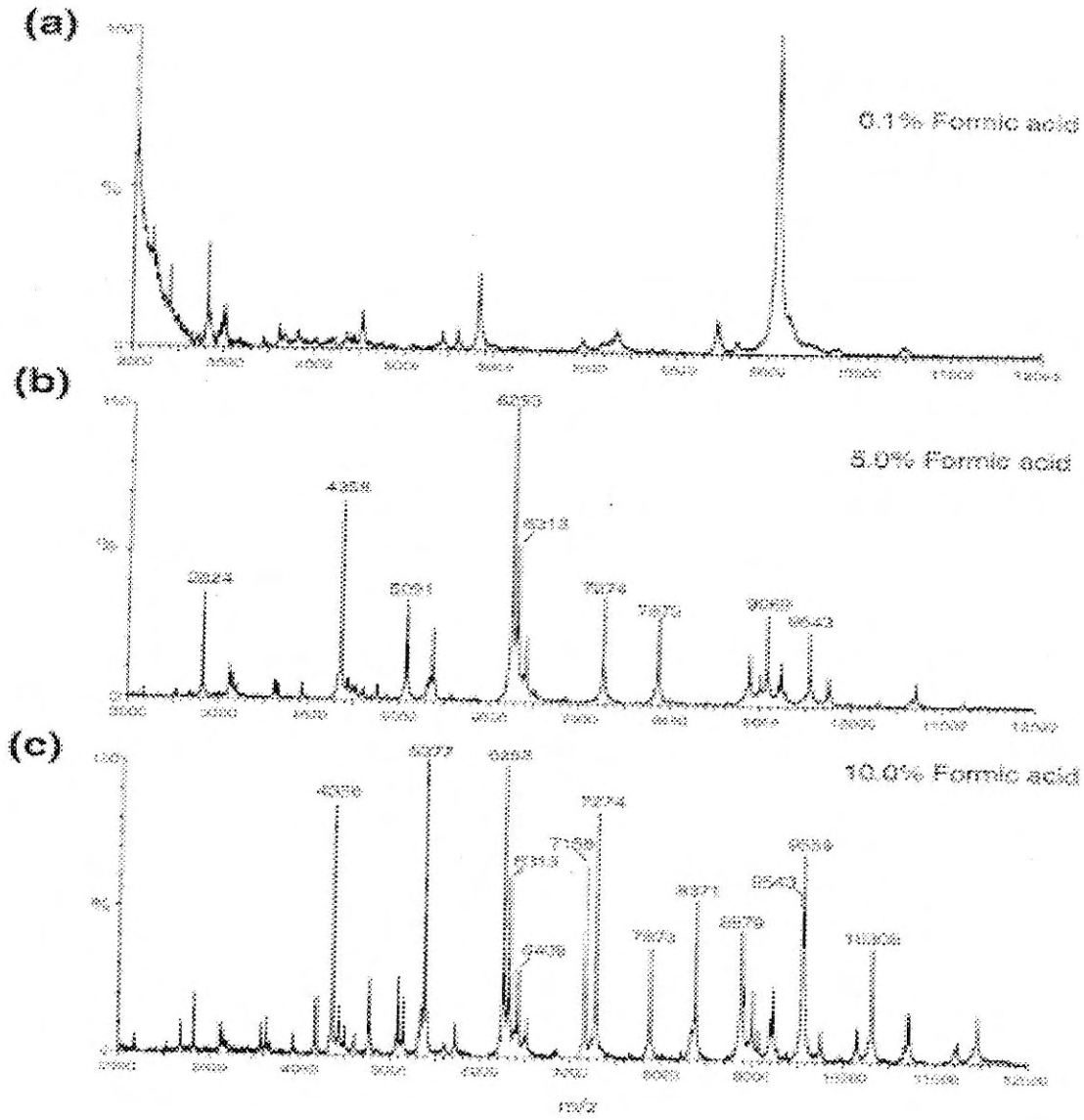


Figure 21 : Effet de la concentration d'acide formique sur le nombre de sommets de spectre.

De plus La modification du pH de la matrice CHCA augmente plus rapidement le nombre et l'intensité du signal spectral avec une concentration croissante d'acide TFA qu'avec l'acide FA, mais l'intensité commence à diminuer aux concentrations plus grandes (3%) de TFA (Figure 22).

- TFA 2.5% constitue la concentration optimale pour une meilleure détection de protéines (3 à 20 KDa) et au dessus de cette concentration le signal de protéines de haut poids moléculaire commence à disparaitre.

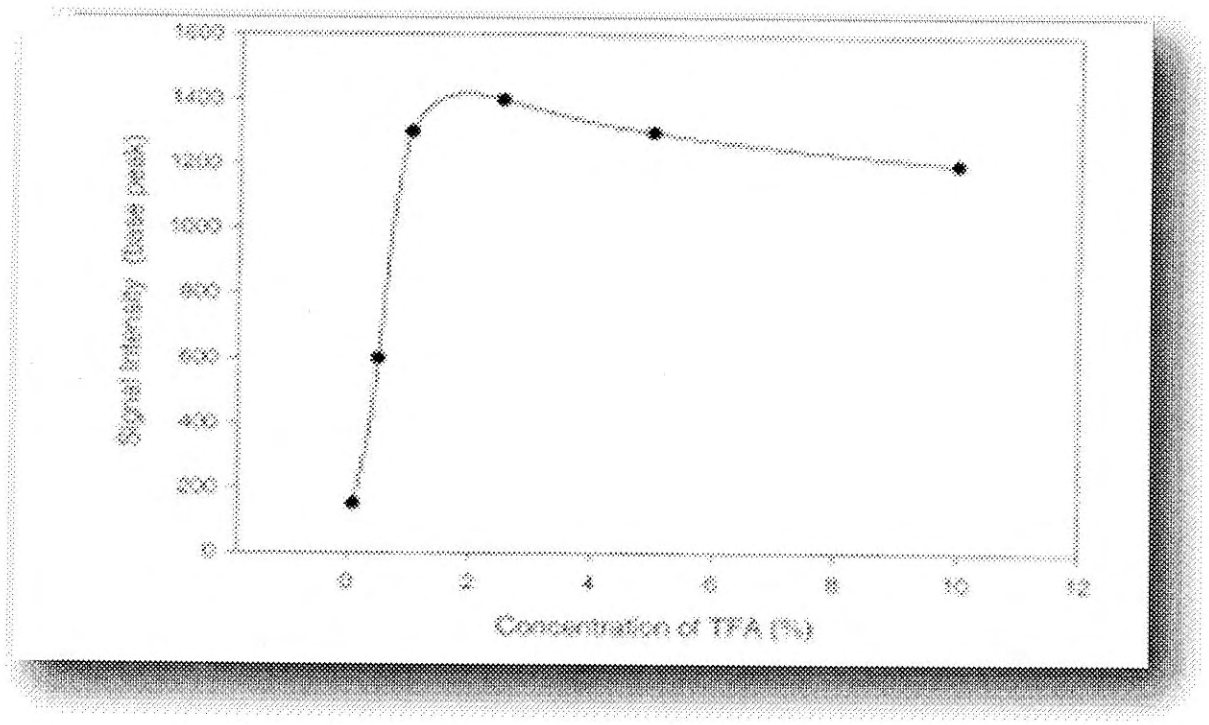


Figure 22 : Variation de l'intensité spectrale avec la concentration du TFA

Composition du dissolvant de la matrice :

L'intérêt est de chercher l'effet des plusieurs mélanges de dissolvants sur la découverte de protéines.

Le dissolvant peut affecter les spectres par l'interaction directe avec les bactéries dans le processus de cristallisation, en effet si la cristallisation est mal faite le processus d'ionisation ne peut pas être effectif.

E. coli et Listeria ont été analysés en utilisant CHCA dissous dans les solutions suivantes : 50/50 méthanol/eau, 50/50 acétone /eau, 50/50 THF/ eau, 50/50 acetonitril/eau chacun avec TFA2.5%.

Le CHCA dissous dans le méthanol ou THF résulte un spectre très semblable, par comparaison avec d'autres mélanges de solvant, ils ont produit un spectre avec un nombre réduit de protéines (figure 23a et b). Le THF apparu être légèrement meilleur pour l'identification de protéines au dessus de 10KDa.

L'utilisation de l'acetone ou l'acetonitril comme dissolvant montre une grande ressemblance (figure 23c et d), de plus le nombre et l'intensité de protéines de bas et haut poids moléculaires étaient meilleurs qu'avec THF ou le méthanol.

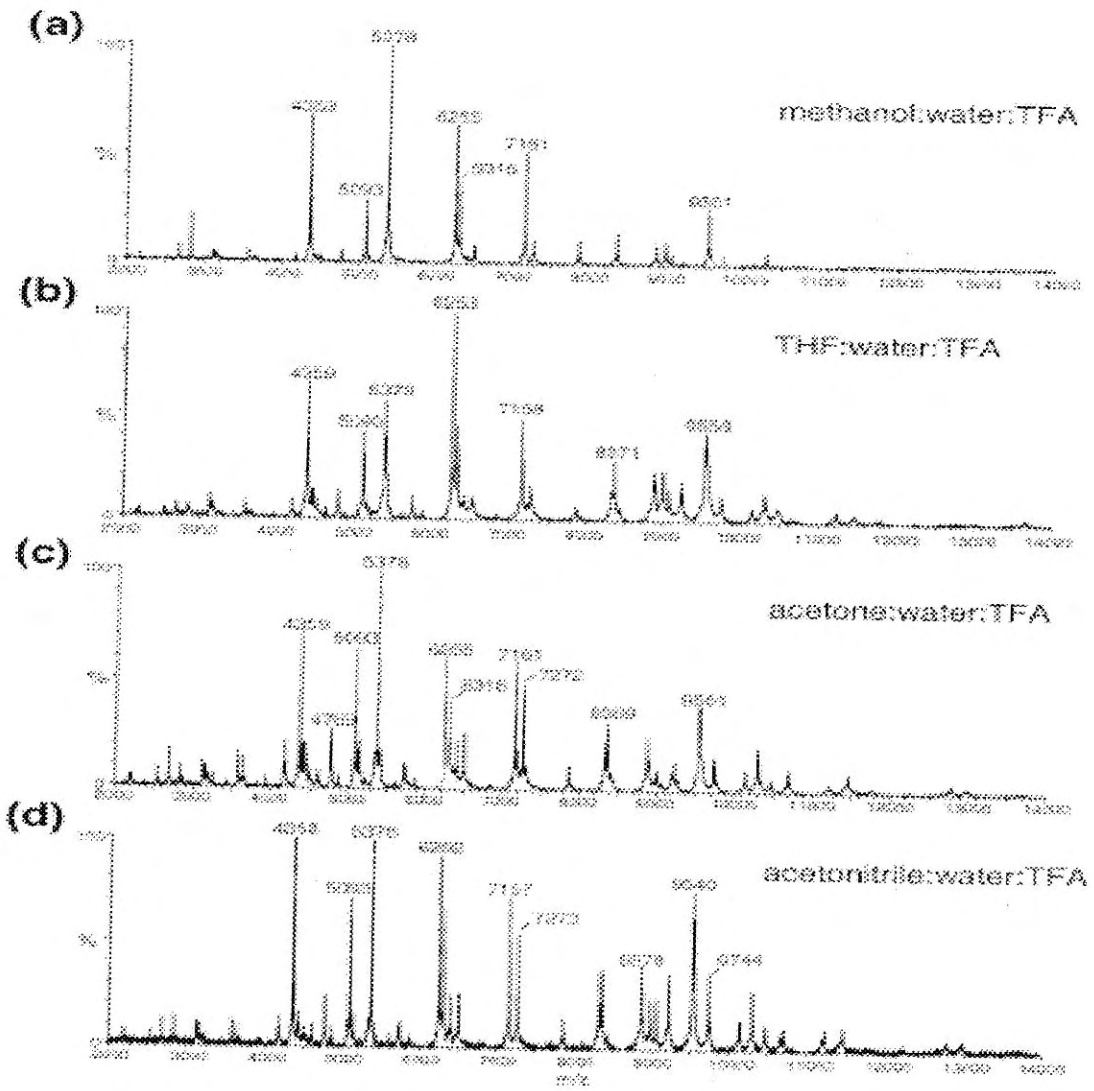


Figure 23 : Effet de différents types de dissolvant sur la qualité de spectres

Surfactant dans la matrice :

Notre but était d'améliorer la méthode de MALDI-TOF pour être efficace d'identifier pas seulement les protéines de 3 à 14 KDa mais aussi les protéines de haut poids moléculaires car les protéines de 20 KDa sont mal détectées et leur intensité de signal est très basse , cela dû à l'insolubilisation de ces protéines dans la matrice, c'est pour cette raison, on a effectué des recherches pour évaluer l'effet de surfactant dans l'amélioration de la solubilisation protéique.

Les surfactants Triton X100 et Tween 20R ont été ajouté à la matrice à des concentrations variable 0.1 ; 0.5 et 1% avant de les mélanger aux suspensions bactériennes. Aucune amélioration considérable n'a été observée pour l'un ou l'autre des surfactants et l'échec d'identification de protéines de haut poids moléculaire a été attribué à la performance instrumentale.

c- Concentration bactérienne :

Une petite variation dans le nombre des cellules sur la cible MALDI-TOF peut attribuer une variabilité considérable, ainsi la mesure prudente et la déposition des cellules sur la cible est un processus fatigant à cause de ces limitations et leur évident effet sur la qualité spectrale. On a cherché une méthode fiable pour déposer un montant approprié de bactéries sur la cible MALDI.

En préparant trois séries de dilution de suspension bactérienne avec la matrice à la concentration de 1 :1 ; 1 :3 et 1 :5 (bactérie : matrice), on a trouvé toujours une combinaison qui résulte un spectre de haute qualité (figure 24)

Les séries de dilution des bactéries avec la matrice est une méthode rapide et reproductible pour obtenir un spectre de haute qualité.

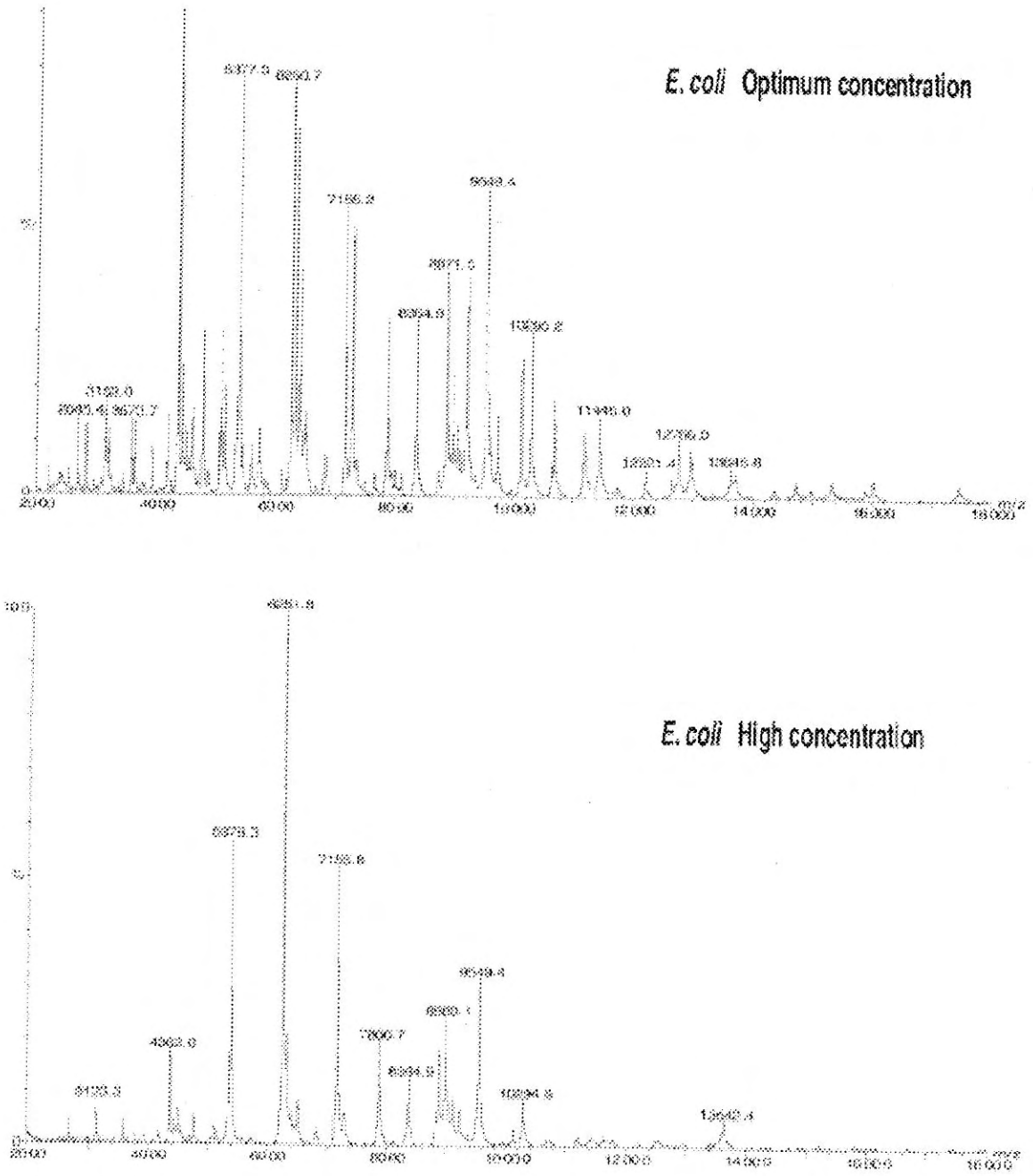


Figure 24 : Effet de la concentration bactérienne sur le spectre

d- **Condition instrumentale :**

Accélération de voltage

Le changement dans le voltage a été examiné pour déterminer le voltage optimum pour l'analyse des suspensions bactériennes.

La Listeria a été analysé à 30, 25, 20, 15 KV, le maximum de voltage de l'instrument utilisé est 30 KV, le spectre de masse à 30 et 25 KV étaient essentiellement les mêmes donnant une bonne résolution et plusieurs sommets intense entre 2 et 12 KDa. A 20 et 15 KDa la résolution n'était pas bonne et les sommets commencent à élargir.

D'après cette expérience, le voltage optimum a été déterminé de 25 KV.

Conclusion :

La spectrométrie de masse type MALDI-TOF représente une avancée technologique majeure dans l'identification rapide de la majorité des espèces bactériennes et fongique ayant une importance clinique, et montre des performances comparables à celles d'un système d'identification phénotypique de référence, la rapidité en plus (moins de deux minutes) et un coût de fonctionnement très faible, seul l'investissement de l'appareil

(150- 200 K€) est susceptible de ralentir l'introduction de cette technique dans les laboratoires de microbiologie.

Cependant cette technique est encore incapable d'identifier tous les isolats d'une souche bactérienne parce que la banque de données n'est pas assez exhaustive, donc le développement de cette base avec des spectres de référence rigoureusement sélectionnés permettra sans doute, dans un avenir proche d'atteindre une plus grande spécificité.

Bibliographie :

1. Spectrométrie de masse. Fs.univ.tlemcen.dz/IMG/pdf/SPECTROMETRIE-DE-masse.pdf

2. **Sarah S, Alain Van D, Valerie VH et all.** La spectrométrie de masse des assemblages non covalents en biologie : aspects fondamentaux et applications à la recherche pharmaceutique. spectra analyse **2005**; 245: 26-35.

3. **Gravet A, Lohmann C, Schimitt F.** Utilisation de la spectrométrie de masse dans un laboratoire hospitalier de microbiologie : l'expérience de mulhousienne. RICAI ; 414. **www.i2a.info /fr/RICAI%202009%20Axima%20Gravet.pdf.**

4. **Chantal B.** Spectrométrie de masse appliquée à l'identification en bactériologie. *Optiobion* **2009**; 422: 1.

5. **Claydon MA, Davey SN, Edward-jones V et all.** The rapid identification of intact microorganism using mass spectrometry. Nat Biotechnol **1996**; 14: 1584-6.

6. **Réné C.** Quelles utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale ? Revue Francophone des laboratoires **2009**; 416: 61-4.

7. AXIMA@SARAMIS SIRWEB MALDI-TOF. www.i2a.info/fr/axima.pdf.

8. **Carrina J, Keys A, Diane J et all**. Compilation of MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterization of bacteria implicated in human infectious diseases. Infection, Genetics and evolution **2004;** 4: 221- 42.

9. **Magniez M**. La spectrométrie de masse. Biotechnologie 2010. biotechnologie.over-blog.com/article-la-spectrometrie-de-masse-51092779.html

10. Spectrométrie de masse. www.physique-quantique.wikibis.com.

11. **Edmond H, Vincent S.** Mass spectrometry, princips and application. Third edition. **2007**:33-9.

12. **Jean M**. Préparation des échantillons pour l'analyse MALDI-TOF. **http://www.sb-roscoff.fr/spmasse/cours_pdf.**

13. Les analyseurs de la spectrométrie de masse pour l'analyse des macromolécules biologique. **http://www.sbroscoff.fr/spmasse/cours_pdf.**

14. **Fenselau C, Demirev PA.** Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. Mass spectrum Rev **2001;** 20:157-71.

15. **Leszyk JD.** Evaluation of the new MALDI matrix 4 chloro-alpha cyanocinamic acid. J biomol tech **2010;** 21: 81-91.

16. Guide pour la préparation des échantillons protéiques.www.innova-proteomics.com

17. **Riegl P, Moussaoui W, Sanglier S et all.** Spectrométrie de masse et identification des microorganismes. Medicine et maladies infectieuses **2007**; 37: 11-3.

18. **Gravet A, Camdessoucens-Miehé, Gessier M et all.** Bilan de l'utilisation en routine de la spectrométrie de masse dans un laboratoire hospitalier de microbiologie. Pathologie biologie **2010** : 1-7.

19. **Wilkins CL, Lay JO**. Identification of microorganisms by mass spectrometry. wiley interscience, Hoboken, New Jersey, Etats- Unis-Canada. ISBN-13978-0471-65442-1

20. **Williams TL, Andrzejewski D, lay JO**. Experimental factors affecting the quality of MALDI-TOF mass spectra obtained from whole bacteria celles. J Am Soc Mass spectrom **2003**; 14: 342-51.

21. **Smole SC, King LA, Leopold PE et all.** Sample preparations of gram- positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight. J Microbiol methods **2002**; 48: 107-15.

22. **Hettick JM, KAshon ML, Slaven JE et all.** Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-

TOF MS and biostatistical analysis. Proteomics **2006**; 6: 6416-25.

23. **Smedsgaard J, Nielson J.** Metabolite profiling of fungi and yeast from phenotype to metabolome by MS ad informatics. J Exp Bot **2005**; 56: 173-286.

24. **Ljiljana PT, Marys S.** Mass spectrometry of proteins and peptides, method and protocols. Second edition **2009**: 367- 80.

25. **Basile F, Beverly MB, Voorhees KJ.** Pathogenic bacteria: their detection and differentiation by rapid lipid profiling and pyrolysis mass spectrometry. Trends anal chem **1998;** 17: 95-109.

26. **Demirevo PA, Ryzhov V, Fenselau C**. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. And chem **1999;** 71: 2732- 8.

27. **Ecker JA, massire C, Hall TA et all.** Identification of Acinetobacter species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. J Clin Microbiol **2006**; 44: 2921-32.

28. **Sturenburg E, Storm N, Sobottka I et all.** Detection and genotyping Of SHV beta–lactamase variants by mass spectrometry after base – specific cleavage of in vitro generated RNA transcripts. J clin Microbiol **2006;** 44: 909-15.

29. **Von Wintzingerod F, Bocker S, Schlotel Burg C et all.** Base – specific fragmentation of amplified 16 S ARNr genes analysed by mass spectrometry: a tool for rapid bacterial identification. Proc Natl Acad Sci USA **2002**; 99: 7039-44.

30. **Madalinski G, Godat E, Alves S et all.** Direct introduction of biological samples into a LTQ-orbitarap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. Anal chem. **2008**; 80: 3291-303

31. **Blondiaux N, Gaillot O, courcol RJ.** Identification bactérienne par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF: évaluation au CHU de Lille. Pathologie biologie **2010** ; 58 : 55-7

32. **Meugnier H, Freydiere AM, Baida N et all.** Identification bactérienne par spectrométrie de masse AXIMA SARAMIS SIRWEB-MALDITOF : application à un laboratoire hospitalier de bactériologie médicale .**www.i2a.info/fr/poster%20MALDI%20routine.pdf**

33. **Carbonelle E, Beretti JL, Cottyn S et all.** Rapid identification by staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol **2007**; 45: 2156-61.

34. **Pidiyar V, Kaznowski A, Narayan NB et all**. Aeromonas culicicola sp Nov from the midgut of cluex quinquefasciatus. Int J Syst Evol Microbio **2002**; 52: 1723-8.

35. **Friedrichs C, Rodoloff AC, chhatwal GS et all.** Rapid identification of Viridans Streptococci by mass spectrometric discrimination . J Clin Microbiol **2007;** 45: 2392-7.

36. **Bizzini A, Durussel C, Bille J et all**. Performance of matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. J Clin Microbiol **2007**; 45: 2156-61.

37. **Iversen C, Mullane N, Macardell B et all.** Cronobacter gen.nov, anew genus to accomodat the biogroups of enterobacter Sakazaki, and proposal of Cronobacter sakazaki gen.nov, comb.nov, cronobacter turicensis sp .nov, cronobacter mytjensii sp nov, cronobacter dublinensis sp nov,cronobacter genonospecies, and of three subspecies, cronobacter dublinensis subsp.nov, cronobacter dublinensis subsp , lausannensis subsp. Nov, and cronobacter dublinensis subsp lactaridi subsp nov. Int J syst E vol Microbial **2008**; 58:1442-7.

38. **Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S et all**. Comparison of two matrix assisted laser desorption ionization time of fight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. J Clin Microbiol **2010**;48:1169-75

39. **Stephan R, Ziegler D, Pfluger V et all.** Rapid genus and species specific identification of cronobacter spp by MALDI-TOF. J Clin Microbiol **2010;** 48:2846- 51.

40. **Seng P, Drancourt M, Gouriet F et all.** Routine identification of bacteria by MALDI-TOF. Clin infect Dis **2009;** 49: 543-51.

41. **Nassif X.** A revolution in the infection of pathogens clinical laboratories. Clin infect Dis **2009;** 49: 552-3.

42. **Chantal B.** Identification bactérienne par spectrométrie de masse, une révolution technologique : réalité d'aujourd'hui ou perspective. Optionbio **2010**: 442; 1-2.

43. **Labandeira-Rey M, couson F, boisset S et all.** *Staphylococcus aureus* Panton- Valentine leukocidine cause necrotizing pneumonia. Science **2007**; 315: 1130-3.

44. Interaction Epithélium respiratoire-Bactéries, Quelques stratégies bactériennes pour contourner les défenses immunes de l'hôte. biologie.univmrs.fr/cours3S2Bact_ries_et_d_fense_immunitaire.ER.pdf

45. **Genestier AL, Michallet MC, Prevost G et all.** *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidine directly targets mitochondria and induces bax-independent apoptosis of human neutrophils. J Clin invest **2005**; 115: 3117-27.

46. **Genestier AL**. *Staphylococcus aureus*: la toxine PVL. J Clin Invest **2005**. biologie.univ-mrs.fr/cours3S2Bact_ries_et_d_fense_immunitairre.ER.pdf

47. **Twatsuki K, Yamasaki O, Morizan S et all.** Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. J Dermatol Sci **2006;** 42: 203-14.

48. **Miles.** La PVL toxine synergohymenotrope ayant une activité de pore dans la cellule eucaryote cible. JBC. 2006. biologie.univ-mrs.fr/cours3S2Bact_ries_et_d_fense_immunitairre.ER.pdf

49. **Hamilton SM, Bryant AE, carroll KC et all.** In vitro production of Panton-Valentine leukocidin among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing divers infection. Clin infect Dis **2007**; 45:1550-8.

50. **Oishi K, Baba T, Nakatomi Y et all.** A latex agglutination assay for specific detection of Panton-Valentin leukocidin. J Microbiol methods **2008**; 75: 411-5.

51. **Francois P, Renzi G, Pittet D et all.** A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome mec element. J Clin Microbiol **2004**; 42: 3309-12.

52. **Du Z, Yang R, Guo Z et all.** Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption /ionization time of flight mass spectrometry. Anal chem **2002**; 74: 5487- 91.

53. **Majcherczyk PA, Mckenna T, Moreillon P et all.** The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicloplanin-susceptible and teicoplanin resistant strains of methicillin –resistant staphylococcus aureus. FEMS Microbiol let **2006;** 255: 233-9.

54. **Bittar F, Ouchenane Z, Smati F. and all.** MALDI-TOF for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidine. International journal of antimicrobial Agents **2009;** 34: 467-70.

55. **Ginevra C, Dauwalder O, Baida N et all**. Evaluation de la spectrométrie de masse AXIMA SARAMIS SIRWEB – MALDI-TOF pour l'identification d'espèce des légionelles par MALDI-TOF-MS. Centre national de référence.www.i2a.info/fr/RICIA%25202009%. 2520MALDI%2520TOF.pdf

Résumé :

La spectrométrie de masse type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight) est une technique récente d'identification des microorganismes en plein essor, la spectrométrie de masse permet d'obtenir un spectre des protéines ribosomales et de membranes en fonction de leur poids après ionisation douce, ce spectre est comparé à une base de données, la qualité de l'identification est fonction de la richesse de la banque de spectres enregistrés.

Du fait de la pression hospitalière qui demande une performance élevée dans le diagnostic en termes de spécialités et de la rapidité puisque la puissance d'analyse est d'environ 100-120 identifications par jour sur une période normale de travail, cela exige la présence des automates qui répondent aux besoins hospitalières.

Selon les études, les résultats d'identifications obtenus avec la spectrométrie de masse (95%- 97.4% d'identifications correctes) sont comparables à ceux des systèmes automatisés utilisant des méthodes conventionnelles (75.2- 92.6%), de plus, la spectrométrie de masse devient une alternative au séquençage standard des gènes 16S ADNr en raison d'un coût d'analyse plus élevé et d'un délai de résultat très long.

Tout cela indique bien l'importance de cette technique dans le domaine microbiologique par leur puissance, leur sensibilité, leur simplicité et leur rapidité d'analyse.

Résumé :

Titre : Identification bactériologique par spectrométrie de masse.

Auteur : Benhilal Asmaa.

Raporteur : SAKHSOUKH Yassin

Mots clés : Bactériologique, Identification, Spectrométrie de masse, MALDI-TOF

La spectrométrie de masse type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Désorption Ionization Time Of Flight) est une technique récente d'identification des microorganismes en plein essor, elle permet d'obtenir un spectre des protéines ribosomales et de membranes en fonction de leur poids après ionisation douce, ce spectre est comparé à une base de données, la qualité de l'identification est fonction de la richesse de la banque de spectres enregistrés.

Du fait de la pression hospitalière qui demande une performance élevée dans le diagnostic en terme de spécialités et de la rapidité puisque la puissance d'analyse est d'environ 100-120 identifications par jour sur une période normale de travail, cela exige la présence des automates qui répondent aux besoins hospitalières.

Selon les études, les résultats d'identifications obtenus avec la spectrométrie de masse (95%- 97.4% d'identifications correctes) sont comparables à ceux des systèmes automatisés utilisant des méthodes conventionnelles (75.2- 92.6%), de plus, la spectrométrie de masse devient une alternative au séquençage standard des gènes 16S ADNr en raison d'un coût d'analyse plus élevé et d'un délai de résultat très long.

Tout cela indique bien l'importance de cette technique dans le domaine microbiologique par leur puissance, leur sensibilité, leur simplicité et leur rapidité d'analyse.

Abstract

Title: Bacteriological identification by spectrometry of mass.

Author: BENHILAL Asmaa.

Reporter : SAKHSOUKH Yassin

Key words: Bacteriological, Identification, Spectrometry of mass, MALDI-TOF.

MALDI-TOF mass spectrometry (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) is a recent technique of identification of the microorganisms in full flight, The SM allows to obtain a spectra of the proteins ribosomal and the membrane function to their mass after soft ionization, this spectra is compared to a database, the quality of identification is function of the wealth bank of spectra recorded.

Because of the hospitable pressure that asks a high performance diagnosis in term of specialty and the speed since the power of analysis is about 100- 120 identifications per day on one normal period of works, it requires the presence of the automatons, that answers the hospitable needs.

According to studies, identification results obtained with mass spectrometry (95% - 97.4% correct identifications) are comparable or better than those obtained with automated systems using conventional methods (75.2% - 92.6%), besides the Mass spectrometry might be an alternative to sequencing of 16S rDNA genes, because the cost of analysis is very expensive and a result delay is very long.

All it indicates, the important of this technique well in the microbiological domain by theirs power, their sensibility, their simplicity, and their speed of analysis

ملخص

العنوان :تحديد الهوية البكتريولوجية بواسطة الطيف الكتلي

الكاتب: بنهلال أسماء

الاستاذ الموجه : سخسوخ ياسين

الكلمات الأساسية : البكتريولوجية، تحديد الهوية ، الطيف الكتلي، مالدي طوف.

الطيف الكتلي من النوع مالدي طوف هي تقنية حديثة للتعرف على الكائنات الحية, تمكن من الحصول على طيف البروتينات الريباسي والأغشية, هذا الطيف يتغير بحسب كتلة مكونات البكتيرية, و ذلك من بعد خضوعها للتأيين الخفيف, تتم مقارنة هدا الطيف مع قاعدة البيانات ، جودة تحديد الهوية البكتريولوجية تختلف بحسب غناء قاعدة البيانات من الأطياف المسجلة.

ونظرا للضغوط الإستشفائية التي تتطلب تقنيات عالية الأداء من حيث سرعة التشخيص و التخصص ذلك لأن قوة التحليل تقدر بحوالي 100 الى 120 تحليلة في اليوم في يوم العمل العادي ، لهذا السبب فإنه يتطلب وجود وحدات التحكم قادرة على تلبية حاجيات المستشفى.

ووفقا للدراسات، فإن النتائج التي تم الحصول عليها في تحديد هوية البكتيريا بواسطة مطياف الكتلة (95 ٪ - 97،4 ٪ التحديد الصحيح) هي مشابهة لتلك التي تم الحصول عليها بواسطة النظم الآلية التي تستخدم الأساليب التقليدية (75,2-92,6 ٪)، بالإضافة إلى ذلك ،فإن تقنية الطيف الكتلي أصبحت بديلا لتقنية التسلسل الجيني نتيجة لارتفاع تكلفة التحليل وأيضا لوقتها الطويل جدا.

كل هذا يدل على أهمية هذه التقنية في مجال الميكروبيولوجية، بقدرتها بحساسيتها، بساطتها وسرعة تحليلها

جامعة محمد الخامس السويسي
كلية الطب والصيدلة بالرباط

سنة: 2011

أطروحة رقم: 27

تحديد الهوية البكتريولوجية بواسطة الطيف الكتلي

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :.....

من طرف

الآنسة: أسماء بنهلال

المزدادة في 5 يناير 1983

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: تحديد الهوية, البكتريولوجية, الطيف الكتلي، مالدي طوف.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

السيد: ميمون الزهدي أستاذ في علوم الجراثيم	رئيس
السيد: ياسين سخسوخ أستاذ مبرز في علم الجراثيم	مشرف
السيدة: سعيدة طلال أستاذة مبرزة في الكيمياء الإحيائية	أعضاء
سيد: عز الدين مسرار أستاذ مبرز في علم الدم البيولوجي	