

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agrobiologiques

(LPVRAB)

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master

Option : Biotechnologie microbienne

Thème

Identification des microorganismes dans les urines chez des patientes souffrant d'infection urinaire par MALDI-TOF MS

Présenté par :

AISSANI Anissa

BELABID Imane

Devant le jury composé de :

Mme BENSAID F.

MAA, U. Blida 1

Présidente

Mme NEBBAK A.

Maitre de recherche B. CRAPC

Promotrice

Mme AMMAD F.

MCA, U. Blida 1

Co- promotrice

Mme BENKORTEBY H. MAA, U. Blida 1

Examinatrice

Année universitaire 2019 /2020

Remerciements

Au terme de ce travail du mémoire de master, nous tenons à exprimer nos profondes gratitude, avant tout à ALLAH le tout puissant et notre créateur, qui nous aide et nous donne la force à accomplir ce travail.

Nos profondes reconnaissances s'adressent particulièrement à notre promotrice Madame NEBBAK .A (maitre de recherche B. CRAPC) pour son soutien, son encouragement, la confiance qu'elle nous a témoigné en acceptant de diriger ce travail et pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter nos réflexions.

Nous remercions notre co-promotrice Madame AMMAD. F, (maître de conférences classe A à USDB) pour son aide, ses orientations, sa patience, sa disponibilité, et ses précieux conseils lors de la réalisation de ce mémoire.

Nos vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par Mme BENSALD F. (maitre assistante classe A à USDB), qui nous a fait l'honneur de présider notre jury. A Mme BENKORTÉBYH. (maitre assistante classe A à USDB), d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent également à :

Monsieur BOUHENNA Mustapha, le chef d'équipe Biomolécules et effets thérapeutiques de la division santé, et tous les chercheurs du centre de recherche en analyses physico- chimique CRAPC de Bou-Ismaïl, qui facilitent l'accès et l'acquisition des données nécessaires à la réalisation de ce travail.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué à ce travail par leurs remarques, leurs suggestions et leurs soutiens.

Dédicaces

Je dédie ce travail,

À mes très chers Parents

Mr BELABID Ali et Mme YOUNCI Nacira

À qui je dois tout, et pour qui aucune dédicace ne saurait exprimer mon profond amour, ma gratitude, ni mon infinie reconnaissance.

Merci pour l'ampleur des sacrifices et des souffrances que vous avez endurées pour mon éducation et pour mon bien être. Vous n'avez jamais cessé de lutter.

Vos prières et votre présence à mes côtés ont été pour moi d'un grand soutien moral tout au long de ma vie.

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Puisse le tout puissant vous donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.

À mon fiancé Oualid pour son soutien, ses encouragements et ses conseils ;

À toute la grande famille, à mes oncles, mes tantes, mes cousines et mes cousins

Merci d'être toujours à mes côtés, par votre présence, par votre amour dévoué et votre tendresse, je prie dieu le tout puissant pour qu'il vous donne bonheur et prospérité

À mes amies intimes : Marawa, Fatima, Célia, Meriem.

À mon binôme : AISSANI Anissa



Imane

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu le tout puissant est enfin achevé notre travail.

Je dédie ce modeste travail,

Aux deux êtres les plus chers au monde, mes parents :

Mr AISSANI Djamel et Mme KARROUBI ARRAIBI Sakina

Respectueux et magnifiques parents qui m'ont soutenu tout au long de ma vie, vous m'avez comblé avec votre tendresse et affection tout au long de mon parcours. Vous n'avez cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, vous étiez toujours présents à mes côtés pour me consoler quand il fallait. Vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite, je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir, Dieu vous accorde la santé la réussite, le bonheur du monde ; vraiment aucune dédicace ne saurait exprimer mon attachement, mon amour et mon affection, que dieu les garde pour moi.

À mes chers frères : Azzedine et Ibrahim

Qui m'ont donné le courage et le soutien tout le long de mes années d'études, et merci pour tous les moments heureux que nous avons passé ensemble, que dieu vous protègent.

À mon grand-père maternel : Mr KARROUBI ARRAIBI Abd'El Rahmene

Qui m'a donné les conseils ; le courage et le soutien tout le long de mes années d'études, que dieu vous accorde la santé.

À mon oncle paternel : Dr AISSANI Rachid

Toujours de bon conseil, toujours une solution. Merci pour ton soutien.

À toute la grande famille : ma grand- mère paternelle, mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.

À mes amies : Imane, Fatima, Maroua, Abir, Faisa et Soumia

Je dédie ce travail à vous.

À mon binôme et chère amie : BELABID Imane

Source d'amitié, merci pour tous ces bons moments passés avec toi.

À toutes les personnes qui m'ont encouragé ou aidé tout au long de mes études.

Et à tous ceux qui aiment Anissa.



Anissa

Tables des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Summary

ملخص

Introduction..... 1

CHAPITRE I. Généralités

I. Les infections urinaires.....	4
I.1. Epidémiologie	4
I .1.1. Définition.....	4
I .1.1.1. Infection urinaire compliquée.....	4
I .1.1.2. Infection urinaire simple.....	4
I .1.2. Les différents types d'infection urinaires.....	5
I.1.2.1. Cystite	5
I.1.2.2. Pyélonéphrite.....	5
I.1.2.3. Prostatie	5
I.1.2.4. Urétrite infectieuse	5
I .1.3. Facteurs favorisant l'apparition des infections urinaires.....	6
I .1.4. Les symptômes de l'infection urinaire	6
I.2. Physiopathologie	7
I.2.1. Les voies de contamination	7

I.2.1.1. La voie hématogène	7
I.2.1.2. La voie ascendante	7
I.2.1.3. La voie lymphatique.....	7
I.2.2. Les germes responsables des infections urinaires.....	7
I.2.2.1. Bactériennes	7
I.2.2.1.1. Les bacilles à GRAM négatifs.....	7
I.2.2.1.2. Les bacilles à GRAM positifs.....	8
I.2.2.2. Fongiques.....	9
I.3.1. Les méthodes de diagnostic des infections urinaires.....	9
I.3.1. Diagnostic chimique (la bandelette urinaire).....	9
I.3.2. Examen cyto bactériologique des urines	10
I.3.3. Antibio gramme	12
I.4. Aspects thérapeutiques.....	12
I.4.1. Traitement.	13
I.4.2. Prévention de l'infection urinaire	14
 II. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF	
I .1. Définition	15
I .2. Principe de fonctionnement du MALDI TOF MS	15
I .2.1. La matrice	16
I .2.2. Désorption-ionisation « MALDI ».....	17
I .2.3. La spectrométrie à temps de vol « TOF ».....	18
I .2.4. Le spectre	18
I .3. Les banques de données	19
I .3.1. Les types de banques de données.....	19

I .3.2. Les bases de données	20
I .4. Identification par MALDI-TOF MS dans un laboratoire de routine de microbiologie médicale	
I .4.1. Analyse de culture bactérienne sur gélose.....	21
I .4.2. Analyse de microorganismes après extraction.....	22
I .5. Applications de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	22
I .5.1. En microbiologie clinique.....	22
I .5.1.1. Détection de la résistance à un antibiotique	23
I .5.1.2. Etudes épidémiologiques.....	23
I .5.1.3. Détection de marqueurs de virulence.....	23
I .5.2. Autre applications de la spectrométrie de masse de type MALDI- TOF	23
I 6. Les avantages et les inconvénients de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	24

CHAPITRE II : Matériel et Méthodes

Conclusion	33
Références bibliographiques	36
Annexe	42

Liste des figures

Figure 1 : Forme topographique de 4 types d'infections urinaires.....	5
Figure 2 : Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	16
Figure 3 : Principe d'ionisation par la technique MALDI.....	18
Figure 4 : Technique Temps de vol (TOF).....	18
Figure 5 : Spectre MALDI-TOF.....	19
Figure 6 : L'identification des colonies microbiennes par MALDI TOF MS.....	22
Figure 7 : Méthodologie à suivre pour la manipulation des échantillons : de la collecte à l'analyse des résultats.....	29

Liste des tableaux

Tableau 1 : les différents types de la matrice.....17

Tableau 2 : les avantages et les inconvénients de la spectrométrie de masse de type MALDI _
TOF MS.....25

Liste des abréviations

AAF : Aérobie anaérobie facultatif.

ARN_r : ARN ribosomale.

BGN : Bactérie GRAM négatif.

BU : Bandelette urinaire.

CHCA : Acide -cyano-4-hydroxy-cinnamique.

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DHB : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque.

ECBU : Examen cyto bactériologique des urines.

E .coli : *Escherichia coli*.

EMB : Gélose lactosée à l'éosine et au bleu de méthylène.

IU : Infection urinaire.

IVU : Infection des voies urinaires.

KDa : Kilo Dalton.

LDC : Lysine décarboxylase.

MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation.

MS : Spectrométrie de masse.

(M / z) : Masse par charge.

(Nm): Nanomètre.

PMF: Peptide mass fingerprinting.

PVL : Leucocidine de Panton et Valentine (toxine produite par *S. aureus*).

UFC : Unités formant colonies.

UTI : Infection du tractus urinaire.

UTIC : Infection du tractus urinaire communautaire.

UTIN : Infection du tractus urinaire nosocomiale.

SA : Acide sinapinique.

SEP : Système disponible sur le marché mondial (Biotyper et vitex MS plus) .

TOF : Temps de vol.

Résumé

Les infections urinaires sont un véritable problème de santé publique en raison du réservoir de bactéries multi-résistantes qu'elles représentent.

L'intérêt de notre recherche est permettre une détection rapide d'agents pathogènes impliqués dans l'infection urinaire.

Au cours de notre étude, les échantillons devaient être collectés au niveau d'un cabinet de gynécologie- obstétrique recevant des patientes de différentes régions de Tipaza et ses environs allant de Blida jusqu'à Cherchel, pour analyser la présence de ces germes par des méthodes conventionnelle (identification basée sur les caractéristiques biochimiques) et technologie d'identification bactérienne obtenus par la spectromètre MALDI-TOF MS .

L'identification rapide des agents pathogène responsable des infections urinaire à un impact significatif car elle permet d'éviter des complications potentiellement mortelles et de réduire la thérapie antimicrobienne.

Mots-clés: MALDI-TOF MS, spectromètre, infection urinaire, bactéries multi-résistantes.

Summary

Identification of microorganisms in the urine of patients with urinary tract infection with MALDI-TOF MS.

Urinary tract infections are a real public health problem because of the reservoir of multi-resistant bacteria they represent.

The interest of our research is to allow rapid detection of pathogens involved in urinary tract infection.

During our study, the samples had to be collected at a gynecology-obstetrics office receiving patients from different regions of Tipaza and its surroundings ranging from Blida to Cherchel, to analyze the presence of these germs by methods conventional and bacterial identification technology obtained by the MALDI-TOF MS spectrometer.

The rapid identification of pathogens responsible for urinary tract infections has a significant impact as it avoids life-threatening complications and reduces antimicrobial therapy.

Key-words: MALDI-TOF MS, spectrometer, urinary tract infection, multi-resistant bacteria.

تحديد الكائنات الحية الدقيقة في بول المرضى الذين يعانون من عدوى المسالك البولية مع

MALDI_ TOF MS.

تعد التهابات المسالك البولية مشكلة صحية عامة حقيقية بسبب خزان البكتيريا المتعددة المقاومة التي تمثله

يهدف البحث بالسماح بالكشف السريع عن مسببات الأمراض المتورطة في عدوى المسالك البولية

خلال دراستنا، كان لا بد من جمع العينات في مكتب أمراض النساء والتوليد لاستقبال المرضى من مناطق مختلفة من تيبازة ومحيطها من البلدة إلى شرشال، لتحليل وجود هذه الجراثيم بالطرق. تقنية تحديد الهوية التقليدية والبكتيرية التي تم الحصول عليها بواسطة مطياف MALDI-TOF MS.

إن التعرف السريع على مسببات الأمراض المسؤولة عن التهابات المسالك البولية له تأثير كبير لأنه يتجنب المضاعفات التي تهدد الحياة ويقلل من العلاج بمضادات الميكروبات

الكلمات المفتاحية

مطياف ، عدوى المسالك البولية ، بكتيريا متعددة المقاوم MALDI-TOF MS

Introduction

L'infection urinaire est l'une des infections bactériennes la plus fréquente en médecine générale, après les infections respiratoires, et la plus souvent rencontrée aussi bien en milieu communautaire qu'en milieu hospitalier (Cunha, 2017). L'infection urinaire est plus commune chez la femme, on estime qu'environ 50% des femmes souffriront d'au moins un épisode symptomatique au cours de leur vie. Les germes les plus souvent responsables des infections urinaires sont environ 90% des cas, des bactéries entériques, en particulier *Escherichia coli*, qui produisent 70% de ces infections. Les autres agents pathogènes des voies urinaires sont *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp, *Enterococcus* spp, et *Staphylococcus saprophyticus* (Bertrand et al, 2012).

Le diagnostic conventionnel des infections urinaires dans les fluides corporels est effectué sur la base d'un profilage biochimique et métabolique qui nécessite 24 à 48 h pour l'identification des espèces bactériennes responsables. Dans l'intervalle, les patients reçoivent des antibiotiques empiriques, qui sont parfois inappropriés. Les laboratoires de microbiologie clinique ont besoin de méthodes rapides, fiables et rentables pour identifier les agents pathogènes potentiels dans les échantillons cliniques afin que le traitement antimicrobien approprié puisse être initié tôt (Singhal, 2015).

Cependant, au cours des dernières années, la technique MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry), qui est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une est devenue un outil potentiel pour l'identification et le diagnostic microbiens. Au cours du processus de MALDI-TOF MS, les microbes sont identifiés à l'aide de cellules intactes ou d'extraits cellulaires (Pinault et al, 2019). D'autres applications de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sont en cours de développement, telles que la mise en évidence de toxines bactériennes ou de mécanismes de résistance aux antibiotiques, et dans le domaine environnemental pour comprendre la diversité de la communauté microbienne et pour identifier les espèces marines, elle est utilisée aussi dans le domaine alimentaire pour évaluer la qualité, la sécurité et l'authentification des laboratoires de microbiologie alimentaire (Descy et al, 2010).

Le présent travail est une étude menée au sein du centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques (CRAPC) à Bou-Ismaïl. L'objectif de notre travail consiste à faire une identification des pathogènes responsables des infections des voies urinaires par des méthodes de diagnostic conventionnelles (dépistage automatisé, cultures sur plaques et identification basée sur les caractéristiques biochimiques), versus une identification par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres, le premier est une recherche bibliographique sur les infections urinaires et leurs caractéristiques, ainsi que les méthodes de diagnostic dont le MALDI-TOF MS, le second chapitre est dédié au matériel utilisé et aux méthodes employées, le troisième chapitre est consacré à la discussion, enfin une conclusion générale.

Chapitre I

Généralités

I. Les infections urinaires

I.1. Epidémiologie

I .1.1. Définition

L'infection urinaire est définie comme étant une colonisation microbienne (bactériurie significative) de l'arbre urinaire, qui peut survenir dans n'importe quelle région des voies urinaires, y compris les uretères, la vessie, les reins ou l'urètre ; les infections de la vessie (cystite) et les infections de l'urètre (urétrite) sont les plus fréquentes (Schmiemann, 2013).

Elle peut être d'origine communautaire (UTIC), ce type d'infection est très fréquent en pratique courante car les voies urinaires constituent le deuxième site d'infection bactérienne après l'appareil respiratoire. Comme elle peut être d'origine nosocomiale (UTIN) si elle n'est pas présente lors de l'hospitalisation, et émergée après plus de 48 h de l'hospitalisation (Bertrand *et al*, 2012).

I .1.1.1. Infection urinaire compliquée

Elle survient chez des patients présentant au moins un facteur de risque de complication, parmi les suivants :

- Anomalie organique ou fonctionnelle de l'arbre urinaire (lithiase, tumeur, reflux...).
- Certaines pathologies comme le diabète, l'insuffisance rénale, l'immunodépression.
- Grossesse, sexe masculin.
- Infections récidivantes (≥ 4 épisodes/an) (Bertrand *al*, 2012).

Les IU dites compliquées comprennent :

La cystite compliquée.

La pyélonéphrite compliquée (Ellatifi, 2011).

I .1.1.2. Infection urinaire simple

Les infections urinaires simples surviennent chez des personnes en bonne santé avec des voies urinaires normales. Ce type d'UTI survient le plus souvent chez les femmes. La cystite est un autre nom pour une infection des voies urinaires (Cunha, 2017).

Les IU dites simples comprennent :

- La cystite aiguë simple.
- La pyélonéphrite simple (Ellatifi, 2011).

I .1.2. Les différents types d'infections urinaires

Il existe quatre types d'infections urinaires :

I .1.2.1. Cystite: C'est une infection localisée à la vessie, le plus souvent d'origine bactérienne, bénigne, l'infection se fait toujours par voie ascendante. Souvent elle est due à une infection par *Escherichia coli* présente dans l'intestin. Plus rarement, peut être due au champignon *Candida albicans* (candidose) (Mohammedi, 2013).

I .1.2.2. Pyélonéphrite: La pyélonéphrite est une infection bactérienne des voies urinaires hautes et du parenchyme rénal, touchant donc le bassinet (pyélite) et le parenchyme rénal (néphrite), compliquant ou s'associant à une infection des voies urinaires basses (Drai et *al*, 2012).

I .1.2.3. Prostatite: La prostatite peut être aiguë ou chronique selon la durée des symptômes, et représente la plus courante UTI récurrente chez les hommes de tout âge, avec une fréquence particulière chez les jeunes adultes. Il présente généralement une douleur, une fréquence, une urgence et une dysurie périnéale ou scrotale (Bouarroudj et Boutebza, 2015) .

I .1.2.4. L'urétrite infectieuse: Si l'infection touche uniquement l'urètre, Il s'agit souvent d'infection sexuellement transmissible courante chez les hommes et les femmes. Les germes en cause sont la *chlamydia* et le *gonocoque* (Bouarroudj et Boutebza, 2015).

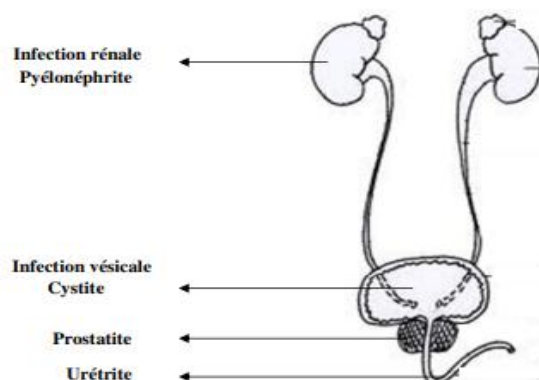


Figure 1. Forme topographique de 4 types d'infections urinaires (Bouarroudj et Boutebza, 2015).

I .1.3. Les facteurs de risque

Les facteurs généraux

- Sexe : L'IU est plus fréquente chez la femme que chez l'homme. En effet, la proximité entre le tube digestif et l'appareil génito-urinaire chez la femme rend le risque relativement plus élevé.
- Âge : Les patients de plus de 65 ans sont plus exposés au risque d'IU. La vieillesse est ainsi un des facteurs favorisant de l'apparition d'une bactériurie.
- Urètre court (femme).
- Dénutrition, alcoolisme, hospitalisation prolongée, diabète, la femme enceinte.
- Les patients ayant une cardiopathie, une insuffisance rénale ou, une hypertension artérielle (Alalli, 2020).

Les facteurs médicamenteux

- ✚ Les antibiotiques, immunosuppresseurs (L'administration d'immunosuppresseurs ou d'antibiothérapie à large spectre, qui déséquilibrent les flores commensales de barrière des patients et participent à la sélection des bactéries multi- résistantes, favorisent la survenue des infections).
- ✚ Corticothérapie au long cours.

Les facteurs extrinsèques

Les IU surviennent dans la majorité des cas chez les patients sondés ou après cathétérisme des voies urinaires (cystoscopie, chirurgie urologique...ect). Ces infections sont essentiellement liées à la durée du cathétérisme, à la technique de pose, au type de système de drainage utilisé et sa mauvaise gestion.

I .1.5. Les symptômes de l'infection urinaire

Les symptômes et les signes d'une infection des voies urinaires apparaissent chez l'infecté que ce soit homme ou femme, enfant ou âgé :

- Des douleurs ou des brûlures en urinant.
- Un sentiment persistant d'avoir besoin d'uriner.
- Une fréquence anormalement élevée de mictions durant le jour (parfois le besoin d'uriner survient aussi la nuit).

- De douleur dans le bas-ventre ou le bassin.
- Urine laiteuse, trouble, rougeâtre ou de couleur foncée avec odeur nauséabonde.
- Pas de fièvre s'il s'agit d'une simple cystite (Catherine, 2014).

I.2. Physiopathologie

I.2.1. Les voies de contamination

I.2.1.1. La voie descendante (hématogène)

C'est une infection par voie sanguine (septicémie) et l'infection par voie rétrograde lors de cathétérisme de l'urètre et lors de reflux vésicaux- urétral en présence de l'infection des voies urinaires basses. Les germes de la voie hématogène sont donc le plus souvent spécifiques tel que *Staphylocoque aureus*, *Candida*, *Mycobacterium tuberculosis* (Karhate, 2011).

I.2.1.2. La voie ascendante

La pénétration des germes se fait le plus souvent par voie ascendante canalaire. L'urètre, bien que colonisée par une flore multiple, est le premier obstacle à l'inoculation des bactéries intra-vésicale. Les germes le plus souvent saprophytes vont donc remonter jusque dans la vessie puis dans le haut appareil urinaire du fait de la baisse des défenses de l'hôte et de la présence de facteurs favorisants. On distingue les infections urinaires spontanées à partir de la flore périnéale et les infections iatrogènes liées à la pose de sonde urinaire ou à un examen endovésicale (Alan, 2015).

I.2.1.3. La voie lymphatique

Elle est rare, La voie lymphatique consiste à la migration des bactéries par voie lymphatique du colon jusqu'aux voies excrétrices urinaires où elles provoqueraient une bactériurie initiale pour se transformer secondairement en infection secondaire véritable (Coulibaly, 2010).

I.2.2. Les germes responsables des infections urinaires

I.2.2.1. Bactériennes

I.2.2.1.1. Les bacilles à GRAM négatif

a. *Escherichia coli* : ce sont des anaérobies facultatifs possédant un nitrate réductase, et non halophile, immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche, capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. Elle est considérée comme un hôte normal, c'est-à-dire commensal, de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud

(Diallo, 2013 ; Baliere, 2016). *E. coli* représente à lui seul l'agent responsable de la très grande majorité des cas d'IU spontanées (Souailah et Mousaoui, 2017).

b. *Proteus mirabilis*: genre bactérien comprenant des bacilles à GRAM négatif appartenant à la famille des *Entérobactéries*, est bien connue pour sa capacité à essaimer de manière robuste à travers les surfaces dans un motif en œil de taureau frappant et dans les laboratoires cliniques et les cours d'études microbiologiques comme étant l'espèce qui pullule à travers les surfaces d'agar, cet organisme est le plus souvent un pathogène des voies urinaires, en particulier chez les patients subissant un cathétérisme à long terme (Jessica et al, 2016).

c. *Pseudomonas spp* : genre bactérien de bacilles à GRAM négatif comportant un nombre important d'espèces, pour la plupart présentes à l'état naturel sur toute la surface du globe, dans le sol, les eaux et les plantes. Bactérie nosocomiale possédant un pouvoir pathogène étendu, elle est responsable de nombreuses infections : pneumonies, gastro-entérites infantiles et infections urinaires (cystites, pyélonéphrites). L'espèce la plus fréquemment responsable d'infections humaines est *Pseudomonas aeruginosa* (Wainsten, 2012).

d. *Klebsiella spp* : genre bactérien comprenant des bacilles à GRAM négatif. Il est présent dans la flore fécale de l'homme, commensale sur la peau, les muqueuses et les voies respiratoires. C'est une bactérie immobile, elle donne après une incubation de 24h à 37°C des colonies de 03 à 04 mm de diamètre, bombées et muqueuses, constitue un germe multi résistant à partir duquel se développent des épidémies d'infections (infections urinaires, pulmonaires, ou septicémies) acquises en milieux hospitaliers (Wainsten, 2012).

1.2.2.2. Les bacilles GRAM positifs

a. *Staphylococcus saprophyticus*: une des principales causes d'infections urinaires (IU) non compliquées chez la femme jeune sexuellement active. Il a également été rapporté chez l'homme de tout âge et dans des infections plus sévères, comme des pyélonéphrites aiguës, des prostatites, des péritonites ou des endocardites. C'est une Cocci à GRAM positif non encapsulée, ayant un aspect en grappe au microscope optique (Le Bouter, 2011).

b. *Streptocoque spp* : parmi les streptocoques, les espèces commensales appartiennent à la flore normale des muqueuses de l'homme, ce sont les streptocoques du groupe D et sont les plus retrouvés dans les infections urinaires. Ce sont des Cocci immobiles anaérobies facultatifs généralement non capsulés, disposés en très courtes chainettes et légèrement ovoïdes. Les Streptocoques se cultivent sur gélose ordinaire, leur température optimale est de 37°C, mais ils se cultivent bien en 45°C (Wainsten, 2012).

I.2.2.2. fongiques

Les infections urinaires fongiques, sont surtout rencontrées en milieu hospitalier, et sont rarement présentes chez un individu sain, alors qu'elles sont retrouvées plus fréquemment en unité de soins intensifs et réanimation chez des patients qui présentent des facteurs favorisants (diabète, cathéter urinaire à demeure, antibiothérapie).

La famille la plus importante de champignons est le *Candida*. Le *Candida albicans* est le plus fréquemment, on a d'autres comme le *Candida glabrata*, le *Candida tropicalis* et le *Candida krusei* peuvent également être associés aux infections urinaires fongiques.

Ce sont des infections régulièrement asymptomatiques. Leur prise en charge est essentiellement préventive en limitant aux recommandations la pose d'une sonde urinaire et la mise en place d'une antibiothérapie (Dariane et al, 2015).

I.3. Les méthodes diagnostique des infections urinaires

Les infections urinaires représentent un véritable problème de santé, il faut les détecter avant qu'elles arrivent au stade grave. Il existe trois étapes essentielles pour diagnostiquer les IU (Denis et al, 2011).

I 3.1. Diagnostique chimique (Bandelettes urinaires BU)

La pratique des bandelettes urinaires permet d'orienter le diagnostic d'infection (Ouakhzan, 2011). Ces bandelettes permettent de détecter simultanément et rapidement la présence de leucocytes et de bactéries sur des urines fraîchement émises (Denis et al ,2011). Les bandelettes réactives utilisent des méthodes biochimiques pour déceler la présence des deux stigmates essentiels de l'infection : la leucocyturie et la bactériurie.

La présence de leucocytes se traduit par l'excrétion d'une enzyme, le leucocyte estérase. Ce leucocyte estérase réagit avec la bandelette lorsque la leucocyturie est supérieure à $10^4/\text{mm}^3$ ($10^4/\text{ml}$).

La mise en évidence des bactéries utilise la présence des nitrates. Seules les bactéries possédant un nitrate réductase sont capables d'élaborer des nitrites dans les urines (Ait Miloud, 2011). Il s'agit des *Entérobactéries*, responsables de la majorité des infections urinaires. Lorsqu'il est positif, le temps de détection est inférieur à une minute. Le seuil de détection est de 10^5 UFC/ml. Il doit être effectué sur les urines matinales, ayant séjournées 3 ou 4 heures dans la vessie (Rharrit, 2016).

I.3.2. Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

L'ECBU va permettre de détecter et de dénombrer (diagnostic qualitatif et quantitatif) les éléments figurés de l'urine (polynucléaires, hématies, cellules épithéliales) et les microorganismes (Ellatifi, 2011). Pour obtenir de bons résultats, il est important de respecter les conditions de recueil, de conservation et de transport (Ait Miloud, 2011).

a-Examen macroscopique

L'examen macroscopique de l'urine homogénéisée permet d'apprécier (Haouar, 2010) :

- L'aspect peut être limpide, trouble.
- La couleur peut être jaune pâle, ambrée, hématurique ou colorée par les médicaments.
- La présence de sédiments et leur abondance donnant un aspect floconneux, cristallin, blanchâtre (phosphate), rouge brique (acide urique) ou rose (Traig, 2017).

b- Examen microscopique

• A l'état frais

- Examen quantitatif à partir de l'urine totale (non centrifugée) : Une goutte d'urine est placée dans une cellule de Malassez. On effectue un comptage des leucocytes et des globules rouges /mm³.

- Examen qualitatif à partir du culot (après centrifugation urinaire) : on dépose une goutte de l'échantillon centrifugé entre lame et lamelle, et on l'observe au microscope optique à l'objectif (x40).

Ceci permet d'étudier la morphologie, la mobilité, ainsi que l'abondance des germes. On peut aussi trouver des cellules épithéliales, cristaux, levures et parasites...ect.

Après coloration : Les résultats sont obtenus en quelques minutes après coloration de GRAM. Cette coloration permet d'étudier la morphologie des germes et le GRAM différentiel (Ait Miloud, 2011).

• Résultats

Leucocyturie :

La présence d'un germe avec une leucocyturie est la preuve d'une IU. Elle est considérée comme le témoin d'une atteinte inflammatoire des tissus de l'arbre urinaire (Ait Miloud, 2011).

Ce nombre est rapporté par millilitre. En cas d'infection urinaire, un processus inflammatoire se traduit par la présence de plus de 10⁴ leucocytes/ ml, parfois en amas, fréquemment associée à une

hématurie supérieure à 10^4 hématies/ml dans environ 30 % des cas. La présence de cylindres doit être signalée (Rharrit, 2016).

Bactériurie :

La présence de bactéries à l'examen direct réalisé après coloration de GRAM, sur une urine homogénéisée non centrifugée et examinée au fort grossissement en immersion, correspond à une bactériurie $\geq 10^5$ unités formant colonies (UFC) par millilitre (ml) (Haouar, 2010).

Elle est hautement recommandée car elle présente plusieurs intérêts (Ouakhzan, 2011) :

- L'orientation du diagnostic en facilitant le choix des milieux de culture et des conditions de culture spécifiques (Ait Miloud, 2011).
- La présence de micro-organisme au fort grossissement en immersion est bien corrélée avec présence d'une bactériurie $>10^5$ UFC/ml, elle présente une sensibilité et une spécificité de 90% pour un micro-organisme par champ (Ouakhzan, 2011).

Autres éléments cellulaires :

L'examen microscopique de l'état frais permet de mettre en évidence la présence de :

- **Cylindres** : ils peuvent être hyalins. Les cylindres pathologiques contiennent des hématies et/ou des leucocytes (cylindres hématiques et/ou leucocytaires). Leur présence permet d'identifier le rein comme la source de l'hématurie et/ou de la leucocyturie.
- **Cristaux médicamenteux** : d'oxalate de calcium, d'acide urique, phospho-ammoniac-magnésien. Ces derniers signent la présence d'une lithiase secondaire à une infection liée à une bactérie productrice d'uréase, notamment : *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium urealyticum*.
- **Levures** : *Trichomonas* .
- **œufs de parasites**: *Schistosoma haematobium*. (Denis et al, 2011).

-Bactérie

-Spermatozoïdes

c- Culture :

La culture des urines permet d'isoler les germes, d'identifier l'espèce bactérienne, de la quantifier et d'effectuer un antibiogramme adéquat (Rharrit, 2016).

Les milieux de culture diffèrent selon la nature du prélèvement et les résultats de l'examen direct. Ils peuvent être : ordinaires, enrichis ou sélectifs. Les méthodes de culture les plus employées comme l'étalement avec une anse calibrée ou la méthode de la lame immergée détectent des bactériuries ou *candiduries* à partir d'un seuil d'environ 10^2 UFC/ml d'urine (Ait Miloud, 2011).

La très grande majorité des bactéries responsables d'infections urinaires ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur géloses ordinaires (Rharrit, 2016).

De façon systématique ou en fonction des résultats de l'examen direct (aspect plurimicrobien), seront ajoutés des milieux sélectifs :

- Milieux Chapman pour les *Staphylocoques*.
- Gélose lactosée à l'éosine et au bleu de méthylène (EMB).
- Gélose Drigalski ou de Mac Conkey qui permettent la croissance des bacilles GRAM négatif mais inhibent celle des cocci GRAM positif.
- Gélose au sang additionnée d'acide nalidixique et de colistine qui favorise la croissance des cocci GRAM positifs aux dépens de celle des bacilles à GRAM négatif (Himi, 2016).

d- Identification :

Elle est basée sur l'observation de la morphologie des colonies, complétée d'une coloration de GRAM, de la recherche de l'oxydase pour les bacilles GRAM négatif et de la recherche de la catalase pour les cocci GRAM positifs.

L'ensemencement des galeries classiques (Klinger, Mannitol-mobilité, Citrate de Simmons, indole-urée et autres) ou des galeries de type API : (API 20 E, API 20 NE, API Staph, API Strep ...) permet la recherche des caractères biochimiques, notamment :

- L'utilisation du glucose, du lactose, du mannitol et de l'indole.
- La production d' H_2S et de gaz.
- La présence de LDC (lysine décarboxylase), de nitrate réductase et de l'uréase,
- L'utilisation du citrate comme seule source de carbone.
- La mobilité (Rharrit, 2016).

I.3.3. Antibiogramme :

C'est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis à vis d'un ou plusieurs antibiotiques (Ait Miloud, 2011).

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est triple, épidémiologique, il permet de conforter l'identification et de prédire la sensibilité d'une bactérie à un ou plusieurs antibiotiques dans une vision essentiellement thérapeutique et cela en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis des antibiotiques (Haouar, 2010).

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques à tester et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut par exemple placer plusieurs disques en papier imbibés d'antibiotiques sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Pétri (Ait Miloud, 2011).

Les résultats obtenus déclarent que la bactérie sensible, intermédiaire ou résistante, les antibiotiques les plus utilisés sont les bêta lactamine, les aminosides, les céphalosporines, les macrolides et les quinolones (Denis et *al*, 2011).

I.4. Aspects thérapeutiques

I.4.1. Traitement

Le traitement de l'infection urinaire a pour objectif principal de stériliser le plus rapidement les voies urinaires et le parenchyme rénal afin d'éviter la constitution de lésions cicatricielles (Himi, 2016).

1- Antibiothérapies :

Une antibiothérapie est une technique thérapeutique qui utilise un ou plusieurs médicaments anti-infectieux, médicaments appartenant à la classe des antibiotiques et dont l'activité s'exerce contre les germes, plus précisément les bactéries à l'origine de l'infection.

Le choix et les modalités d'administration de l'antibiotique se font en fonction du type d'infection, de sa localisation, de sa gravité, du germe probablement responsable et doivent être adaptés à l'antibiogramme quand il est disponible (Ouakhzan, 2011).

Il existe deux types d'antibiothérapie : l'antibioprophylaxie et l'antibiothérapie curative:

L'antibioprophylaxie :

L'antibioprophylaxie a un double sens. Il peut s'agir d'antibioprophylaxie chirurgicale classique mais aussi l'administration d'antibiotiques au long cours dans le but de prévenir une IUN liée à une sonde vésicale. Son rôle principal est d'éviter ou de prévenir les infectios génito-urinaires fébriles,

comme les pyélonéphrites, prostatites, épидидymites, l'urosepsie et de tenter aussi d'éradiquer les bactériuries, même asymptomatiques chez les patients devant être opérés en urologie (Alalli ,2020).

L'antibiothérapie curative :

L'antibiothérapie curative est réalisée lorsque l'antibioprophylaxie s'avère insuffisante, dans ce cas l'acte chirurgical est nécessaire (Lobel et Soussy, 2007).

2- Phagothérapie :

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages (parfois simplement appelés phages) dans le but de traiter et de guérir des infections bactériennes. La phagothérapie est donc un traitement spécifique de maladies bactériennes par des phages (Errafyg, 2016). L'utilisation thérapeutique des bactériophages présente des avantages et des limites. Compte tenu de la rapidité de leur multiplication et du nombre de clones issus de chaque cycle lytique, il est logique d'attendre de la phagothérapie une bactéricide intense et rapide. Celle-ci est plus rapide que celle obtenue par les antibiotiques. Elle sera d'autant plus importante que les populations bactériennes sont élevées, à la différence des antibiotiques. (Ravat et al ,2015).

I.4.2 Prévention de l'infection urinaire :

Les principales mesures du changement de comportement sont les suivantes :

- ❖ il faut boire beaucoup d'eau pour diluer et éliminer les bactéries qui atteignent la vessie avec une abondance et uriner fréquemment.
- ❖ Nettoyage anal post-défécation chez la femme, toujours en antéro-postérieur, avec l'intention de ne pas fournir de flore fécale dans la zone péri urétrale (Allali, 2020)
- ❖ Avoir une bonne hygiène intime quotidienne avec un savon adapté.
- ❖ S'essuyer avec le papier hygiénique en allant d'avant vers l'arrière.
- ❖ Les conseils vestimentaires (sous-vêtements en coton, pantalon peu serré) sont utiles (Ouakhzan, 2011).
- ❖ Le jus de canneberge est une option intéressante en prévention des rechutes puisqu'il empêcherait les bactéries d'adhérer aux parois des voies urinaires (Flatz et al, 2013).

II. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

II .1. Définition

La spectrométrie de masse est une technique analytique dans laquelle les composés chimiques sont ionisés en molécules chargées et le rapport de leur masse à la charge (m / z) est mesuré, le premier spectromètre de masse a été conçu par Francis William Aston en 1919 (Gravet, 2013).

Parmi les types de la spectrométrie de masse on a le MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = Time-Of-Flight). Découverte au début des années 1980, cette méthode utilise la spectrométrie de masse pour identifier les micro-organismes, en quelques minutes, par l'obtention d'un spectre caractéristique, aussi nommé « empreinte spectrale », d'une espèce donnée (Carbannelle et Nassif, 2015 ; Singhal et al ,2015).

II .2. Principe de fonctionnement du MALDI-TOF MS

Le principe général de la spectrométrie de masse repose sur la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Ceci donne lieu à la caractérisation sous forme d'un « spectre » des masses moléculaires des différents composés présents dans un échantillon (Carbannelle, 2012).

La technologie de type MALDI-TOF requiert au préalable une étape de cristallisation, sur support inerte, de l'échantillon dans une matrice. Le complexe ainsi formé est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. L'irradiation du mélange cristallin conduit à la désorption d'ions caractéristiques de l'échantillon (MALDI). Les molécules ionisées sont alors accélérées dans un champ électrique et dirigées vers un analyseur séparant les ions selon leur temps de vol (TOF). Ainsi, en fonction de leur rapport m/z , les ions atteignent plus ou moins rapidement le détecteur où ils sont alors transformés en un signal électrique qui sera amplifié puis analysé et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre (Degand, 2012 ; Jang, 2018).

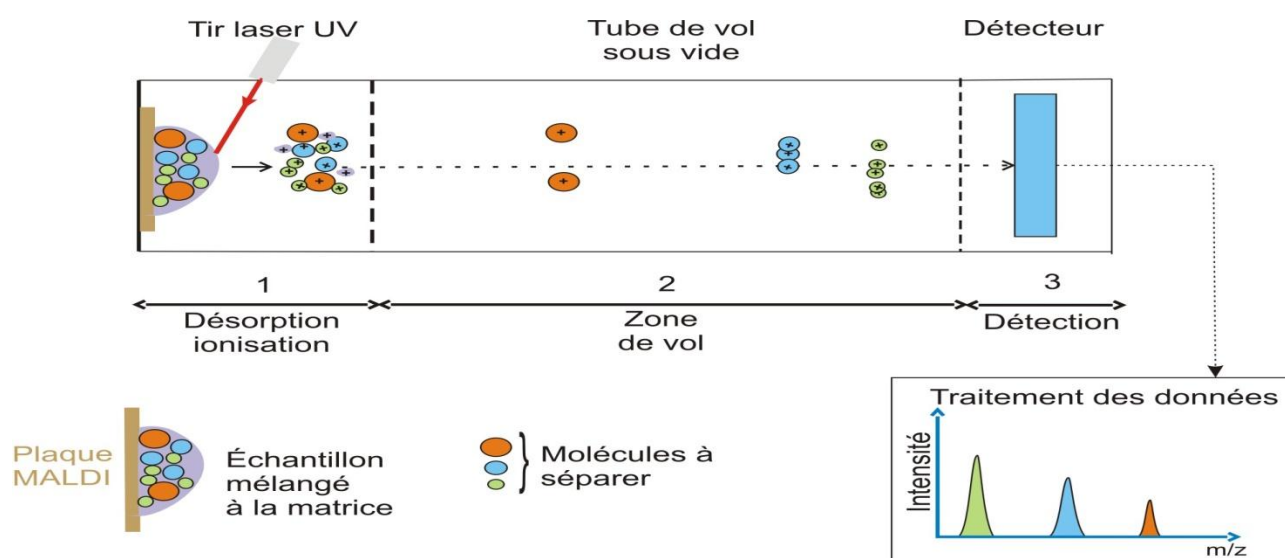


Figure 2. Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (sur http://biotechnologie.acmontpellier.fr/IMG/jpg/doc_eleve_identification_bacterienne_malдитof.jpg consulté le 16 mars 2020).

II .2.1. La matrice

La nature de la matrice influe sur la qualité des spectres (nombre de pics et intensités relatives). Le rôle principal de la matrice étant de transmettre l'énergie d'un laser à l'échantillon à analyser, elle doit être efficace à la longueur d'onde du laser, avoir un bon rendement d'ionisation et être suffisamment inerte pour ne pas interférer dans le spectre de l'échantillon analysé (Carbonnelle, 2014). Elles permettent un éclatement des microorganismes et la libération des protéines qui migrent réalisant une véritable chromatographie (Jang, 2018).

Les matrices utilisées sont à base d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (acide gentisique, DHB), d'acide trans-3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique, SA) et d'acide -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) (Tableau n°1) (Carbonnelle, 2014).

Tableau n°1 : Les matrices les plus utilisées pour les échantillons biologiques, y compris les protéines et les peptides (Carbonnelle ,2014).

Les matrices	Les fonctions
Acide -cyano-4-hydroxy-cinnamique (-CHCA)	<ul style="list-style-type: none"> - Cristallisation régulière - Spectre de qualité en peu de tirs - Spectres de 80-150 signaux - Peu de signaux dont m/z > 10kDa.
Acide 2,5 dihydroxybenzoïque (acide gentisique, DHB)	<ul style="list-style-type: none"> - Cristallisation irrégulière - Nombreux tirs de laser pour un spectre de qualité - Spectres de 100-200 signaux - Beaucoup de signaux dont m/z > 10kDa.
Acide trans-3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique, SA)	C'est une matrice d'utilisation plus récente, elle permet l'analyse de protéines de masse moléculaire plus élevée que le CHCA et le DHB.

2.2. Désorption – Ionisation (MALDI)

L'ionisation douce est l'étape clef de l'identification bactérienne puisqu'elle permet l'analyse de macromolécules telles que les protéines, dont les tailles peuvent aller jusqu'à 100 kilo Dalton (kDa). Cependant, l'étude de macromolécules dont le poids moléculaire excède 20–30 kDa demande une préparation fastidieuse. La méthode MALDI consiste à mélanger une solution organique saturée de cristaux, appelée matrice, avec un échantillon déposé sur un support (plaque de métal ou plaque jetable). En microbiologie, cet échantillon est le plus souvent une colonie bactérienne ou fongique, déposée sur la plaque, les deux composés co-cristallisent sous l'effet de l'évaporation. L'échantillon se présente alors sous la forme d'un dépôt solide pris dans la matrice. La plaque est insérée dans le spectromètre de masse et le mélange matrice-échantillon cristallisé est irradié brièvement par un faisceau laser (en général un laser à azote de longueur d'onde 337 nm dans les instruments MALDI-TOF commercialisés pour le diagnostic bactérien). Pour obtenir un spectre correct, des centaines de tirs laser sont impulsés sur la cible pour maximiser le processus d'ionisation (Suarez et al, 2015).

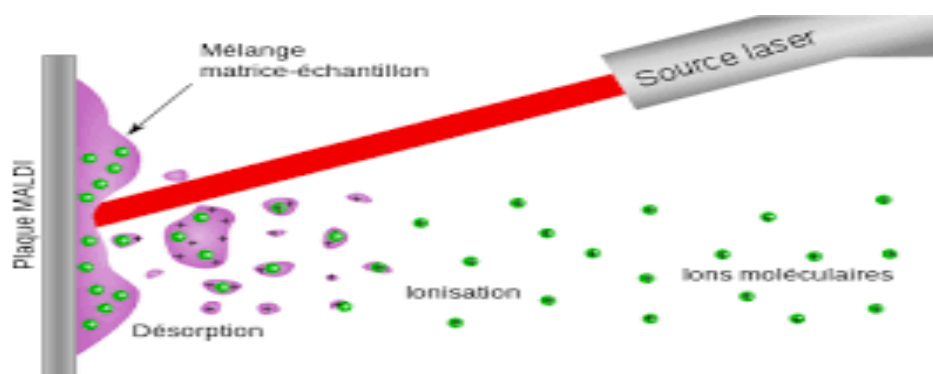


Figure 3. Principe d'ionisation par la technique MALDI (Cristina, 2012).

2.3. La spectrométrie à temps de vol (TOF)

La spectrométrie à temps de vol est une technique séparant les substances ionisées en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. La séparation se fait entre une anode et une cathode dirigeant ainsi les molécules ionisées vers l'électrode portant la charge inverse des ions à analyser. Les ions passent ensuite à travers un champ électrique de force connue accélérant leur progression. (Leblanc, 2011; Tonella et Petrini, 2011).

Après leur passage dans le champ électrique, les ions entrent dans un tube non soumis à un champ électrique et sont séparés selon leur masse-charge. Les ions prennent des vitesses différentes car les grosses molécules se déplacent plus lentement que les petites. Ensuite, le détecteur envoie les informations enregistrées à l'analyseur qui va traiter les données et les présenter sous forme de spectre (Marie et al., 2013).

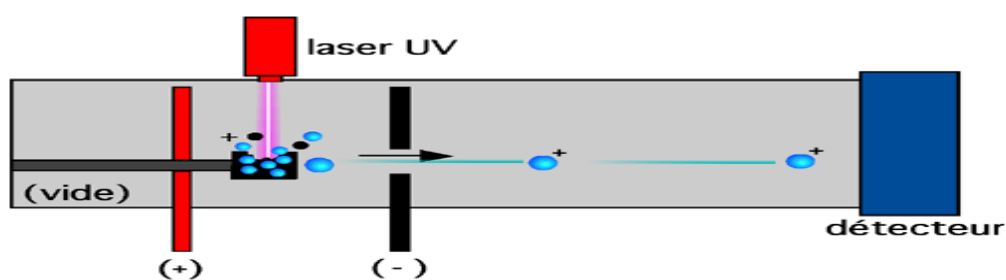


Figure 4 : Technique Temps de vol (TOF) (Cristina, 2012).

2.4. Le spectre

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

pics enregistrés et recherche dans la base de données l'identification du germe correspondant (Cristina, 2012).

Certains composants du spectre sont spécifiques à un genre, d'autres à une espèce voire une sous-espèce. Selon la qualité et la pureté de l'échantillon et le nombre de spectres de référence dans la base de données, l'identification de la bactérie se fait en quelques secondes à quelques minutes (Marie et al, 2013).

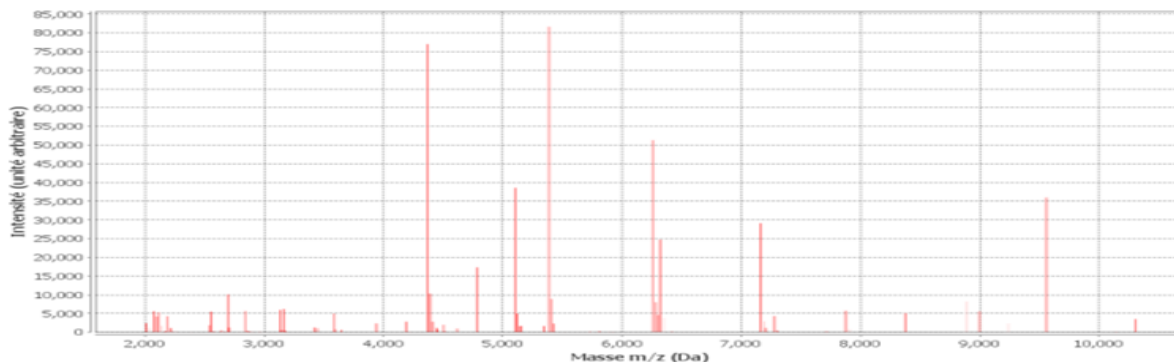


Figure 5. Spectre MALDI-TOF (Cristina, 2012).

II .3. Les banques de données

II .3.1. Les types de banques de données

L'identification des micro-organismes par cette technique repose sur la constatation que l'empreinte spectrale est différente d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre.

La réalisation des banques de données doit prendre en compte les variations de spectres afin de développer une stratégie fiable permettant une identification précise. Deux stratégies principales existent (Etienne, 2011) :

1. La première consiste à créer une banque de données dans laquelle, pour une espèce donnée, l'essentiel des pics de plusieurs souches est conservé. Dans ce cas c'est la grande similitude entre le spectre de la bactérie à identifier et celui d'une souche dans la base de données qui permettra d'identifier l'espèce à tester.
2. La seconde stratégie a pour objectif de sélectionner et de ne retenir que les pics spécifiques d'espèce, pics constants ayant une intensité relative élevée. Le spectre de la souche à tester est alors comparé aux pics spécifiques retenus dans la banque de données. Dans cette approche, le nombre de pics est plus restreint.

II .3.2. Les bases de données

Andromas

Le logiciel Andromas comprend trois bases de données distinctes : une base de bactéries, une base de levures et *Aspergillus* spp, et une base pour les mycobactéries.

Ce système utilise plusieurs profils spectraux spécifiques d'espèce pour chaque organisme, afin d'accroître la robustesse de l'identification. Cette banque de données est constituée d'un nombre restreint de pics pour chaque espèce bactérienne :

- ✚ L'identification de la souche testée correspond à l'espèce de la souche de référence qui a obtenu le meilleur match et qui possède au moins 70 % de similitude.
- ✚ Plus la différence est grande entre la première identification et la seconde, meilleure est la discrimination entre espèces.
- ✚ Une différence d'au moins 10 % entre ces deux premières propositions est requise pour obtenir une bonne identification.

L'identification est rendue sous la forme de trois réponses possibles : « bonne identification », « identification à confirmer », « pas d'identification ». Les deux derniers items sont basés sur un seuil en dessous duquel l'analyse doit être refaite (Gravet, 2013).

Biotyper

Le système proposé par Bruker daltonics (appareil Microflex1, logiciel Biotyper1) est également composé d'un système complet pour l'identification des bactéries, mycobactéries, champignons, et échantillons d'hémocultures positives.

Les données des spectres sont analysées en prenant en compte la position, la fréquence des pics et leur intensité. Ils sont ensuite comparés à une base de données issue de répétitions spectrales des souches de référence. Un score de correspondance basé sur les masses identifiées et leur corrélation d'intensité est généré et utilisé pour le classement des résultats :

- ✚ Un score entre 2,33 et 3 est considéré comme une très probable identification d'espèce.
- ✚ Un score entre 2 et 2,32 comme une bonne identification de genre et une probable identification d'espèce.

✚ Un score entre 1,7 et 1,999 comme une probable identification de genre, requérant d'autres tests.

✚ Les scores inférieurs à 1,699 ne permettent pas d'identification et l'échantillon doit donc être repassé ou soumis à d'autres tests (Suarez, 2015).

Vitek-MS

VITEK-MS (bio Mérieux) comporte une base de données d'environ 645 espèces bactériennes d'intérêt médical (base VITEK-MS), mais également une base de données annexe, Saramis (AnagnosTek) comportant des espèces agroalimentaires et environnementales. Dans la base VITEK-MS, pour chaque espèce, une dizaine de souches de référence non liées épidémiologiquement constituent la base de données. Pour chaque souche, plusieurs spectres sont obtenus avec différents milieux de culture. Pour l'identification, l'algorithme suivant est utilisé : les spectres inconnus sont comparés aux spectres de référence par découpage du spectre en tranches (1000 à 1500).

Dans chaque tranche, la présence ou l'absence de pics caractéristiques d'espèces sont recherchées et un score d'homologie global, donné en pourcentage est calculé :

✚ Un score d'identification supérieur à 60 % est considéré comme fiable.

✚ Si un score supérieur à 60 % est obtenu pour deux espèces de référence de la base de données, l'identification est rendue comme « faible discrimination » et impose des tests supplémentaires.

✚ Si aucun score supérieur à 60 % n'est obtenu, aucune identification n'est rendue (Degand, 2012).

II .4. Identification par MALDI-TOF MS dans un laboratoire de routine de microbiologie médicale

Les types d'échantillons pouvant être analysés par un système MALDI-TOF MS peuvent être classés en 2 catégories : les cultures bactériennes sur gélose, qui se déposent directement sur la cible, et les cultures de levures, de champignons filamenteux, de mycobactéries, les hémocultures positives et les prélèvements urinaires, qui nécessitent une extraction préalable.

II .4.1. Analyse de culture bactérienne sur gélose

La colonie bactérienne est directement déposée sous forme d'un fin frottis à la surface d'une plaque métallique, la cible, puis recouverte par une matrice appropriée. Jusqu'à 96 souches par série peuvent être étudiées pour le système Bruker et 384 pour le système Shimadzu. La cible est ensuite introduit dans le système MALDI-TOF et, en moins de 2 minutes, le premier spectre de masse est produit et analysé. Par comparaison avec la base de données, le logiciel informatique propose l'identification la plus probable (Descy *et al*, 2010).

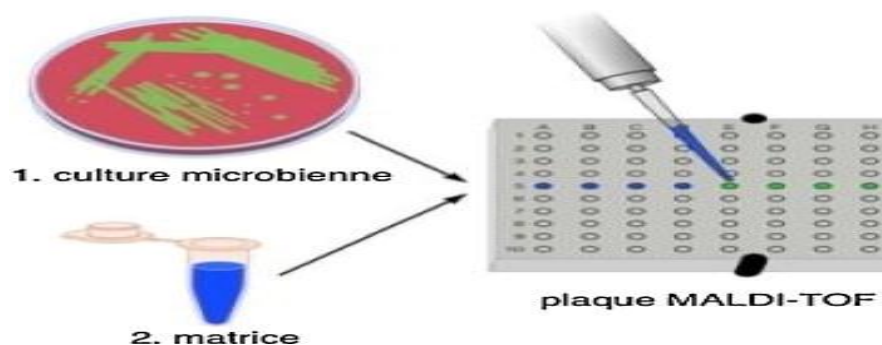


Figure 6 : L'identification des colonies microbiennes par MALDI TOF MS (Suarez *et al* , 2015).

II .4.2. Analyse de microorganismes après extraction

Pour l'identification de certains microorganismes (levures, champignons filamenteux, mycobactéries), une extraction préalable des protéines est recommandée afin de produire un spectre de masse exploitable. Il en est de même pour les échantillons primaires tels que les hémocultures positives et les urines. Cette étape d'extraction allonge le temps de manipulation de 10 à 15 minutes par extrait, par rapport à la technique de dépôt direct (Descy *et al*, 2010).

L'application de l'identification bactérienne par MALDI-TOF au diagnostic direct sur urines positives est possible. Cette approche consiste à analyser un prélèvement d'urine dont l'examen direct est positif après coloration de GRAM. L'inoculum nécessaire pour cette analyse est d'au moins 10^5 UFC/ml. Plusieurs protocoles sont disponibles, faisant appel à différentes étapes. Les premières étapes sont en général une centrifugation pour éliminer le culot globulaire, puis une phase centrifugation du surnageant pour recueillir les bactéries, suivi d'étapes de lavage du culot bactérien à l'eau distillée stérile. Des essais d'extraction protéique préalable sont possibles mais ne semblent pas améliorer les performances d'identification (Degand, 2012).

II .5. Applications de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

II .5.1. En microbiologie clinique :

II .5.1.1. Détection de la résistance à un antibiotique :

Même si l'identification rapide des bactéries par la technique MALDI-TOF permet d'améliorer l'antibiothérapie probabiliste, la détermination de la sensibilité aux antibiotiques est l'analyse pour laquelle le délai de rendu du résultat conditionne la bonne prise en charge antibiotique du patient. (Surese, 2015).

MALDI-TOF MS s'est avéré générer des (PMF): empreinte de masse des peptides, capables de discriminer les lignées de souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline, dans des conditions expérimentales rigoureuses, il s'est également révélé utile pour le sous-typage de souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (Singhal et al, 2015).

De même, la (SEP) : système disponible sur le marché mondial (Biotyper et vitex MS plus), MALDI-TOF s'est avérée très utile pour identifier les entérocoques résistants à la vancomycine.

II .5.1.2. Etudes épidémiologiques

C'est pour comparer les profils protéiques de différentes souches bactériennes et ainsi déjà tirer quelques conclusions quant à leur éventuelle homologie. Il est imaginable par exemple, de comparer des *Acinetobacter baumannii* multi-résistants isolés dans différentes unités hospitalières, si leurs spectres présentent exactement les mêmes pics, de suspecter leur appartenance au même clone épidémique. Par ailleurs, à partir des scores de similarité des spectres, un dendrogramme peut être établi permettant de relier les espèces rapprochées au sein d'un genre bactérien déterminé, ou de visualiser parmi une même espèce les souches les plus comparables (Descy et al, 2010).

Récemment, certains auteurs ont montré que la technique de type MALDITOF MS permettait également l'identification de sous-espèces bactériennes. Par exemple, il est possible d'identifier les sérotypes de *Listeria monocytogenes*, de *Salmonella enterica* et les biotypes de *Yersinia enterocolitica* (Stephan, 2011).

II .5.1.3. Détection de marqueurs de virulence

La recherche et la détection de souches pathogènes produisant des facteurs de virulence particuliers associés à des protéines spécifiques, telles des toxines par exemple, pourraient également aider le clinicien dans la gestion des infections.

Ils ont trouvé un pic, marqueur de la présence de la leucocidine de Panton et Valentine (toxine PVL), qui différencie les souches de *S. aureus* productrices de PVL de celles qui n'en produisent pas. Cette approche semble prometteuse mais, comme pour la détection de résistance aux antibiotiques, elle nécessite des développements pour permettre son application clinique (Descy et al, 2010).

II .5.2. Autre applications de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

Environnementales

Les tests basés sur des caractéristiques biochimiques ne parviennent généralement pas à identifier les microbes isolés d'échantillons environnementaux, car la diversité des microbes dans ces habitats est énorme. Diverses études ont montré que le MALDI-TOF MS peut être utilisée comme un outil efficace pour identifier et caractériser des isolats provenant d'écosystèmes spécifiques (Singhal et *al*, 2015).

En outre, un système d'identification microbienne basé sur MALDI MS a également été utilisé pour identifier les espèces bactériennes marines, et sa capacité à faire ainsi a été comparé à celui du séquençage du gène d'ARNr 16S conventionnel (Jang, 2018).

L'utilisation de MALDI-TOF MS pour la surveillance bactérienne de routine dans une usine de traitement d'eau potable a potentiel de cette technique pour une utilisation dans la gestion des risques et surveillance des processus de traitement de l'eau et du système de distribution (Jang, 2018).

Alimentaires

MALDI-TOF MS été appliqué avec succès en microbiologie alimentaire à des fins diverses comme l'identification et la classification des bactéries lactiques dans les aliments fermentés, la détection des bactéries impliquées dans la détérioration du lait et du porc, et identification des bactéries isolées du lait des vaches laitières (Barreiro et *al*, 2010 ; Singhal et *al*, 2015).

Les systèmes d'identification microbienne basés sur MALDI- TOF MS peuvent également être utilisés pour évaluer la qualité, la sécurité et l'authentification des laboratoires de microbiologie alimentaire (Siciliano et *al*, 2016).

II 6. Les avantages et les inconvénients de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

La technologie MALDI TOF MS présente l'avantage d'être rapide, faible cout de fonctionnement. Cependant coute d'instrument initial est très élevé et les base données doivent être améliorées.

Tableau n°2 : Les avantages et les inconvénients de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Dingle et Susan, 2013 ; Bourassa et Butler-Wu, 2015).

Les avantages :	Les inconvénients :
<ul style="list-style-type: none"> •Rapidité de l'identification en quelque minute •Simplicité de l'analyse •Petit volume d'échantillon nécessaire •Coûts opérationnels bas •Préparation de l'échantillon universelle pour bactéries, levures et moisissures •Fiable et reproductible 	<ul style="list-style-type: none"> •Nécessite une base de données des spectres •Encore peu développé en pathologie végétale •Coût élevé de l'instrument initial •Cultures fraîches pour analyses •La base de données doit être suffisamment grande pour discriminer correctement certaines bactéries très proches, comme <i>E. coli</i> et <i>Shigella</i> spp

Chapitre II

Matériel

et

Méthodes

A cause des circonstances sanitaires particulières que l'Algérie et le reste du monde ont traversé ces derniers mois ; Situation engendrée par la pandémie du COVID-19 ; Nous n'avons malheureusement pas pu effectuer la partie expérimentale qui était prévue.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de notre travail consistait à faire une identification des pathogènes des voies urinaires par des méthodes conventionnelles de diagnostic (identification basée sur les caractéristiques biochimiques), versus une identification par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Les infections urinaires représentent un problème de santé, particulièrement important en raison de leur fréquence et de leur morbidité. L'identification par des méthodes fiables et plus rapides sont de plus en plus convoitées et ceci pour une charge rapide des patients par une antibiothérapie adéquate.

D'après les résultats obtenus par d'autres travaux, on conclut que l'identification bactérienne par le spectromètre MALDI- TOF présente l'avantage d'être rapide, fiable et reproductible, dont le temps d'analyse raccourci permet une sélection plus précoce et plus précise des antibiotiques pour le traitement des patients, en plus elle est bien adaptée à l'analyse à haut débit avec un faible cout de fonctionnement.

Références bibliographiques

A

- Ait Miloud K, (2011) - *l'infection urinaire: expérience du laboratoire de microbiologie de l'hôpital des spécialités de rabat*, Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie, Faculté de médecine et de pharmacie, université Mohammed V Rabat, P82.
- Alan E, (2015) - *Les infections urinaires communautaires bactériennes : évaluation des connaissances de l'équipe officinale et des conseils apportés aux patients*, Thèse de Doctorat en Pharmacie, université de Lorraine, Paris, France, P 11-12.
- Allali M, (2020) - *infection urinaire et pathogènes émergents*, Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine, Faculté de médecine et de pharmacie Rabat, Université Mohammed V Rabat, P19.

B

- Baliere C, (2016) - *Les Escherichia coli potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des stec et des epec*, Thèse pour obtenir le titre de docteur de l'université de Bretagne occidentale, Ecole doctorale des sciences de la mer, université de Bretagne occidentale, P178.
- Bertrand Fougère, Jacques Gaillat, Patrice François, Emmanuelle Cambau, Bénédicte Corroyer, Benoit de Wazières, Gaetan Gavazzi, Marc Paccalin, (2012)- *Adequacy to the recommendations in urinary tract infections: à multicenter transversal survey in hospitalized patients aged over 75 years*. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil*, V10, P 1.
- Bouarroudj Y et Boutebza F, (2015) - *Les infections urinaires*, université de Constantine (1), Constantine, P39.

C

- Carbonnelle É et Nassif X, (2011)- *Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale, médecine/sciences*. V 27, P 882-888.
- Carbonnelle É, (2012) - *Implantation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie: quels changements pour les cliniciens?*, *Réanimation*. V 21, P 351-361.
- Catherine S, (2014) - *Infection urinaire : symptômes et traitements de l'infection urinaire*.
- Coulibaly D, (2010) - *Infection urinaire et grossesse dans le centre de santé de référence de la commune II (CSREFCII)*, Thèse de Doctorat en médecine, Faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie, université de Bamako, P45.

- Cristina Cariello, (2011-2012) -*La spectrométrie de masse maldi-tof et le diagnostic microbiologique*, Travail de diplôme, Sion : Laboratoire de microbiologie.
- Cunha J.P, (2017). *Urinary Tract Infection (UTI) Symptoms, Treatment & Causes* [en ligne]. Emedicine Health. Disponible sur« https://www.emedicinehealth.com/urinary_tract_infection_uti/article_em.htm#urinary_tract_infection_uti_facts » .Consulté le 25 avril 2018.

D

- Dariane C, (2015) - *Infections fongiques et matériel urétéral: quelle prise en charge?* *Progrès en urologie*, V25, P306-311.
- Denis F ; Ploy M C ; Martin C ; Binger E ; Quentin R, (2011) - *Bactériologie médicale ; 2^{ème} Edition*, paris, P178-187.
- Descy. J, Meex C, Melin P, Hayette M P, Huynen P, De Mol P, (2010). *Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute*. *Revue médicale de Liège*, V65, P 29-34.
- Diallo A , (2013) - *Escherichia coli pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire*, Thèse en vue de l'obtention du Doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier, P204.
- Draï. J ; Bessede. T ; Patard J, (2012) -*Prise en charge des pyélonéphrites aiguës*,*Maisson, Paris*, *Progrès en urologie*, V 22, P 871-875.

E

- Errafyq A, (2016)- *rôle de la phagothérapie dans le traitement des infections bactériennes*, thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie, Faculté de médecine et de pharmacie Rabat, Université Mohammed V Rabat, P25.
- Ellatifi O, (2011) - *Place des fluoroquinolones dans le traitement des infections urinaires dans les établissements de santé lorrains*, Thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur en pharmacie, Faculté de pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy 1, P78.

F

- Ferreira Laura , Fernando Sánchez-Juanes , Magdalena González-Ávila , David Cembrero Fuciños , Ana Herrero-Hernández , José Manuel González-Buitrago , Juan Luis Muñoz-

Bellido , (2010) _ *Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry .JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* P 2110–2115 .

- Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al , (2010) - *Real-time identification of bacteria and Candida species in positive blood culture broths by matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol .V 48 , P1542-1548.*
- Flatz A, Clerc O, Peytremann-Bridevaux I, Burnand B, PeytremannBridevaux I, Rège Walther M, (2013)- *La canneberge : un remède «naturel» pour prévenir les infections urinaires.Rev Med Suisse.V 9, P1280.*
- François A ; Brandstätter H ; Bréchet A-C ; HuttnerA, (2013) -*Infections urinaires. HUG. DM CPRU, Service de médecine de premier recours [en ligne]. Disponible au format PDF sur internet : http://www.hug-ge.ch/files/info_soignants/infections_urinaires-arce.pdf [Consulté le 14 Février 2016].*

G

- Gravet A, (2013) -*Spectrométrie de masse et microbiologie,Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, V28, P 297-308.*

H

- Himi R, (2016) - *Infection urinaire chez le diabétique, Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine, Faculté de médecine et de pharmacie, Université Cadi Ayyad Marrakech ,P 89.*
- Haouar I, (2010) - *Les infections urinaires à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat: Fréquence, répartition et antibiorésistance des bactéries isolées dans les urines, Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie, Faculté de médecine et de pharmacie Rabat, Université Mohammed V Rabat, P 7-11.*

I

- Icher B, (2011) - *L'infection Urinaire chez l'enfant évolution des pratiques en médecine générale entre 2004 Et 2009, Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en médecine, Faculté de médecine, Université de Limoges, P 153.*

J

- Jang K S, (2018) - *Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications, journal of microbiology. V 56, P 209-216.*

- Jessica N. Schaffer, Allison N. Norsworthy, (2016), *Proteus mirabilis* fimbriae-and urease-dependent clusters assemble in an extracellular niche to initiate bladder stone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, V 113, n°16, P4494-4499.

K

- Karhate-Andaloussi M, (2011), *L'infection urinaire au cours de la grossesse*, Thèse de Doctorat en médecine, Université SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH, Fès, Maroc, P 34-36.

L

- Leblanc B, (2011), Université de Sherbrooke [Page Web]. Accès : <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/6a.html> (page consultée le 10 aout 2011).
- Le Bouter A, (2011) - *Infections à Staphylococcus saprophyticus*. *Journal des Anti-infectieux*, V 13, P 12-19.
- Lobel B et Soussy C. (2007). *Les infections urinaires* – Paris. P82.

M

- Marie Polet ; Nadine Botteldoorn ;KatelijneDierick , (2013) - *MALDI-TOF MS comme outil d'identification de pathogènes alimentaires*. P 12 -13-14.
- Marklein, G., M. Josten, U. Klanke, E. Müller, R. Horré, T. Maier, T. Wenzel, M. Kostrzewa, G. Bierbaum, A. Hoerauf, and H. G. Sahl ,(2009) - *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates*. *J. Clin. Microbiol.* V 47, P 2912-2917.
- Melania Íñigo, Andreu Coello, Gema Fernández-Rivas, Belén Rivaya, Jessica Hidalgo, María Dolores Quesada, Vicente Ausina , (2016) - *Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples, Combining Urine Screening Methods and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry* .*Journal of Clinical Microbiology*. V 54, n°4 , P988 -993 .
- Mohammedi S, (2013) - *L'infection urinaire chez l'enfant*, Santé-MAG .V 15, P 10-11.

O

- Ouakhzan B, (2011) - *Profil de résistance aux antibiotiques des principales Entérobactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de microbiologie de l'hôpital militaire d'instruction Mohamed V*, Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie ; Faculté de médecine et de pharmacie Rabat, Université Mohammed V , P95.

P

- Pinault L; Chabrière E; Raoult D; Fenolla F, (2019) - *Direct identification of pathogens in urine by use of a specific matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight spectrum database*, *Journal of clinical microbiology*. V 57, P1678-1.

R

- Ravat F ; Jault P ; Gabard J, (2015) - *Bactériophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactérienne*. *Annals of Burns and Fire Disasters*. V 28 , n°1, P 13 _20.
- Rharrit S, (2016) - *Infections et colonisations urinaires masculines en urologie* , Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie , Faculté de médecine et de pharmacie Rabat , Université Mohammed V Rabat , P184.

S

- Schmiemann G, (2012) - *Resistance profiles of urinary tract infections in general practice- an observational study*. *BMC urology*, V 12, n° 1, P 33.
- Seng, P, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain, and D. Raoult ,(2009) _ *Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Clin. Infect. Dis*. V 49 ,P543-551.
- Singhal N , Kumar M , Kanaujia P ,Virdi J ,(2015)- *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. *Frontiers in microbiology*. V 6, P 791.
- Souailah I ; Mousaoui Y, (2017) - *Infection urinaire chez l'enfant* , mémoire de fin d'étude pour l'obtention du Doctorat en médecine générale, Faculté de médecine , Université de Abderrahmane Mira Bejaia , P 102.
- Suarez S N, (2015) - *Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique*, *Pathologie Biologie*. V 63, P 43-52.

T

- Tonella M ; Petrini O ,(2011)- *Application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans le diagnostic microbiologique* [Présentation power point], Bellinzona : Cantonal Institute of Microbiology.
- Traig D ; Touati Y , (2017) - *Étude bactériologique des infections urinaires chez l'enfant et le nourrisson au laboratoire de microbiologie du CHU Tlemcen* , Mémoire de fin d'études

pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie ,Faculté de médecine , Université Abou BekrBelkaïd ,Tlemcen ,P 81.

V

- L. Veron, S. Mailler, V. Girard, B. H. Muller, G. L'Hostis, C. Ducruix, A. Lesenne, A. Richez, H. Rostaing, V. Lanet, S. Ghirardi, A. van Belkum & F. Mallard ,(2015) - *Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS - European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* .V 34, P 1787–1795.

W

- WAINSTEN J-P, (2012)- *La Larousse Médical*. Edition Larousse, Paris Ce-dex 06.Bibliographie.

Sites web consultés :

- 1- [www .doctissimo.fr \ htm \ santé excyclopedie \ Sa – 520-infection-urinaire. Html](http://www.doctissimo.fr/html/santé/excyclopedie/Sa-520-infection-urinaire.html)

Annexes

1-Milieux de culture :

Gélose nutritive

- Extrait de viande de bœuf 01g.
- Extrait de levure 02g.
- Peptone 05g.
- Chlorure de sodium 05g.
- Gélose 15g.
- Ph=7,4.

Gélose Mueller-Henton

- Infusion de viande de bœuf 300ml.
- Peptone de caséine 17,5g.
- Amidon de maïs 1,5g.
- Agar 10g.
- pH=7,4.

Nom : AISSANI, BELABIDE

Prénoms : Anissa, Imane

Thème : Identification des microorganismes dans les urines chez des patientes souffrant d'infection urinaire par MALDI-TOF MS.

Diplôme : Master en Biotechnologie Microbienne

Résumé :

Les infections urinaires sont un véritable problème de santé publique en raison du réservoir de bactéries multi-résistantes qu'elles représentent.

L'intérêt de notre recherche est permettre une détection rapide d'agents pathogènes impliqués dans l'infection urinaire.

Au cours de notre étude, les échantillons devaient être collectés au niveau d'un cabinet de gynécologie- obstétrique recevant des patientes de différentes régions de Tipaza et ses environs allant de Blida jusqu'à Cherchel, pour analyser la présence de ces germes par des méthodes conventionnelle (identification basée sur les caractéristiques biochimiques) et technologie d'identification bactérienne obtenus par la spectromètre MALDI-TOF MS .

L'identification rapide des agents pathogène responsable des infections urinaire à un impact significatif car elle permet d'éviter des complications potentiellement mortelles et de réduire la thérapie antimicrobienne.

Mots-clés: MALDI-TOF MS, spectromètre, infection urinaire, bactéries multi-résistantes.