

L'identification des micro-organismes par spectrométrie de masse type MALDI-TOF

I. Généralités

Inventée par Joseph Thomson en 1912, cette technique physique d'analyse, permet de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique.

Avec les avancées technique et scientifique, la spectrométrie de masse est maintenant l'alliée des laboratoires hospitaliers de bactériologie et permet une identification rapide et fiable de nombreuses bactéries, mais également certains champignons ou parasites.

II. Principe de la technique

II.1.Principe général

La spectrométrie de masse consiste en la **séparation en phase gazeuse d'ions**, en fonction de leur rapport « masse / charge » (m / z).

Les différentes étapes consisteront donc en une ionisation du matériel à analyser (**colonie bactérienne, de levure, de moisissure...**), suivie d'une séparation des ions obtenus. Une analyse fine de cette séparation pourra aboutir à l'identification recherchée.

La méthode spectrométrique utilisée en microbiologie est celle dite « **MALDI-TOF** », pour « **Matrix Assisted Lazer Desorption / Ionization – Time of Flight** », autrement dit :

Desorption/Ionisation Laser assistée par Matrice – Temps de Vol

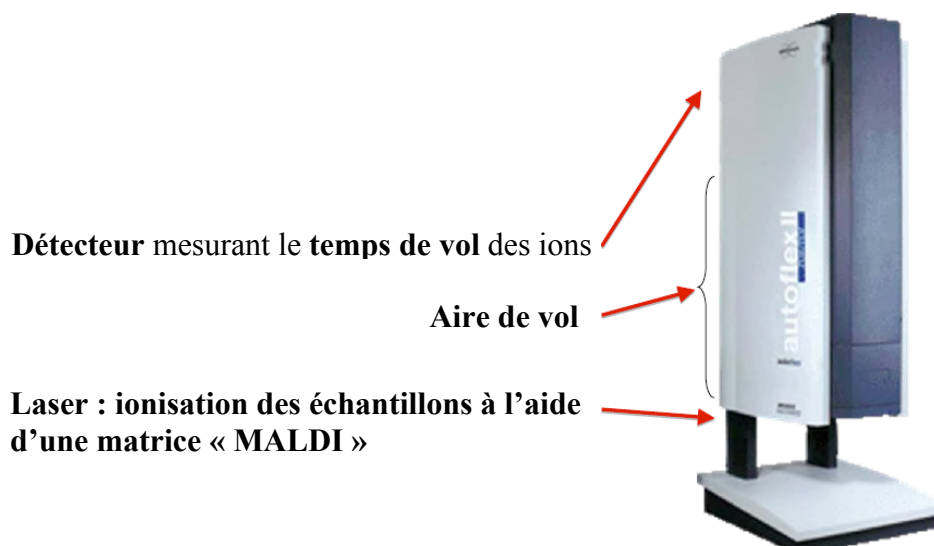
II.2. La technique MALDI-TOF

Un rayonnement laser est utilisé pour ioniser les échantillons à analyser. Les ions qui en résultent sont envoyés dans une colonne à vide. Leur **temps de vol** à l'intérieur de cette colonne (dépendant de la racine carrée du rapport « masse de l'ion / sa charge ») et, par conséquent, leur **séparation différentielle**, constitue un **spectre qui est spécifique de l'échantillon analysé**.

Le spectre obtenu est alors comparé à une base de données, et l'identification est alors possible.

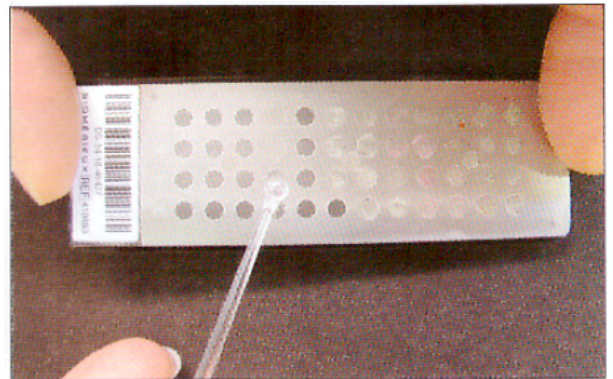
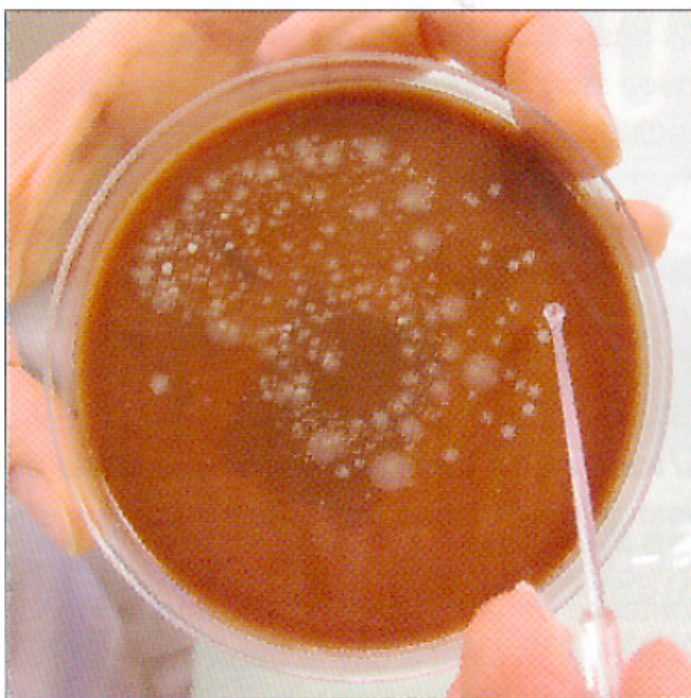
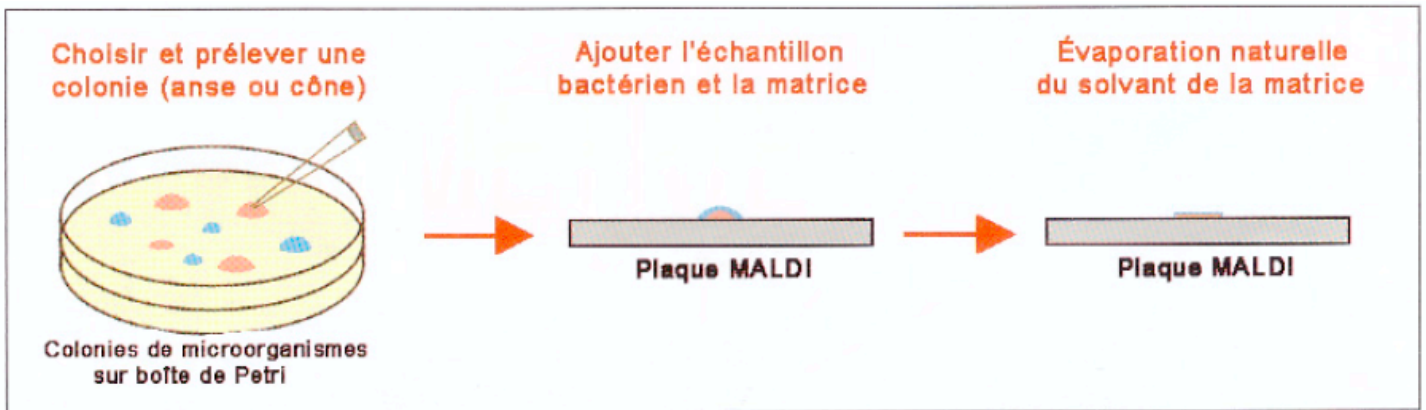
II.2.1. Le matériel

Un spectromètre de masse type MALDI se constitue de la manière suivante



II.2.2. Mode opératoire (voir vidéo)

La plupart des analyses actuelles, nécessitent, pour une identification par « MALDI-TOF-MS », **l'obtention d'une culture à partir du produit pathologique**. Les colonies d'intérêt sont déposées sur un puits de la **plaque cible**.



Chaque plaque contient, selon le fabricant, plus ou moins de puits. Les dépôts sont effectués en duplicate, et un minimum de 48 identifications différentes par plaque cible est possible.

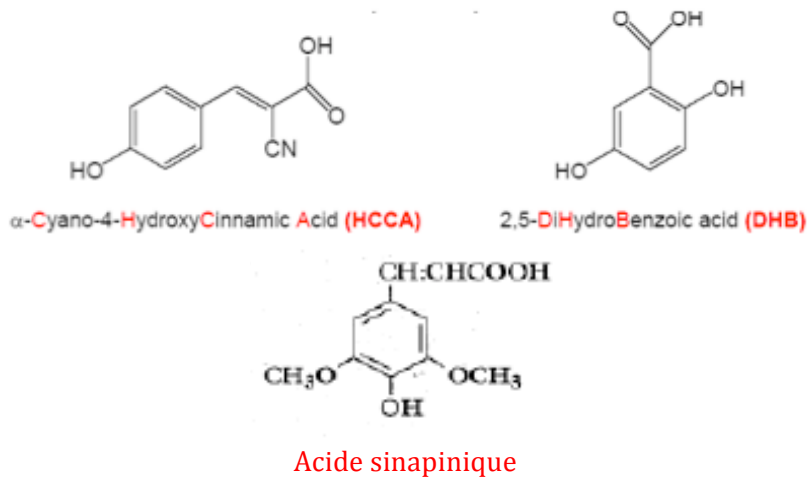
Les colonies, sont ensuite recouvertes par quelques microlitres d'un **mélange de solution lytique et de matrice**.

La préparation des échantillons ne présente aucune difficulté technique, mais doit être rigoureuse pour une identification correcte. Un puits de la plaque MALDI est consacré au dépôt d'une souche de référence (*E. coli* ATCC 8739), en guise de témoin positif. Un témoin négatif peut être réalisé par un simple dépôt de matrice.

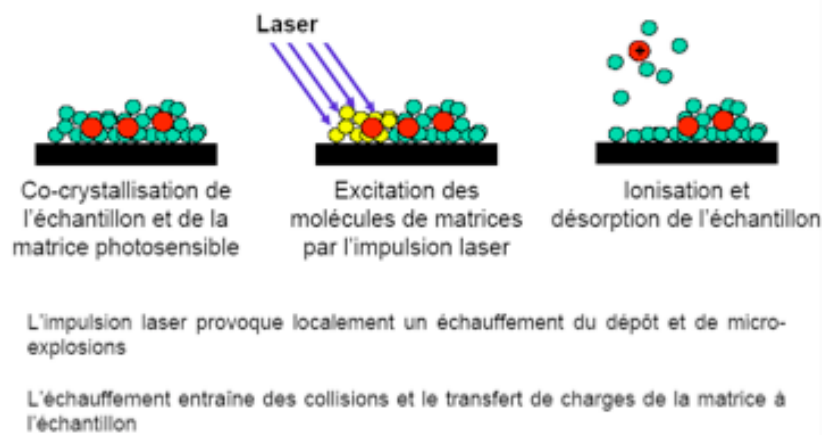
II.2.3. Composition de l'échantillon et nature et rôle de la matrice.

Comme vu ci-dessus, l'échantillon déposé est constitué de fragments de colonies microbiennes. Elles-mêmes sont constituées des éléments macromoléculaires constitutifs des micro-organismes, à savoir glucides, lipides, et bien sûr, **protéines**.

3 types de matrice sont couramment utilisés pour l'identification de micro-organismes par « MALDI-TOF-MS ».



La matrice va **co-cristalliser avec les éléments moléculaires de l'échantillon**. Son caractère acide, confère à la matrice, la capacité de céder des protons à l'échantillon avec lequel elle a co-cristallisé.



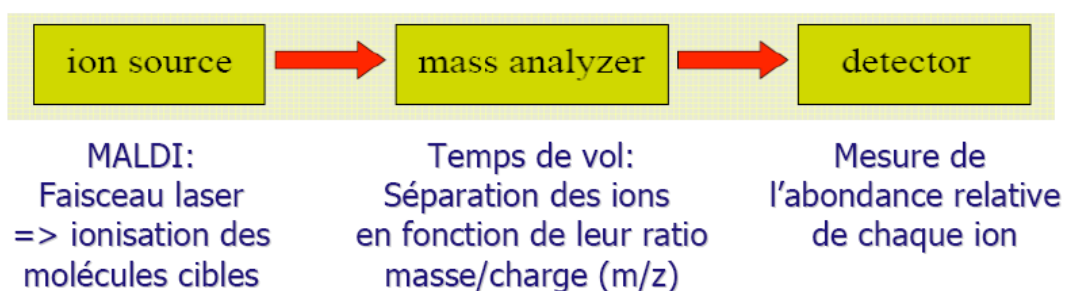
Les protéines sont facilement ionisables sous l'effet du rayonnement laser. Or, 80% de l'équipement protéique total d'une bactérie correspond à ses **PROTEINES RIBOSOMIALES**. Leur composition, au vu de leur importance fonctionnelle, est bien conservée au sein d'une espèce ou d'un genre donné. Les conditions de cultures n'affectent pas leur composition. Toutes les protéines bactériennes sont donc potentiellement ionisables, mais de par leur quantité très importante, ce sont donc les ribosomiales qui seront détectées par l'appareil.

Sous l'effet du laser, le co-cristallisé « **protéines ribosomiales - matrice** » est détruit et des fragments protéiques ionisés sont **désorbés et sublimés**.

Dans le cadre de l'identification de micro-organismes, les protocoles ont été optimisés de manière à ce que **les ions issus de la désorption ne portent qu'une seule charge positive**.

II.2.4. Déroulement de l'analyse dans l'appareil

La figure ci-dessous montre schématiquement les 3 grandes parties de l'analyse, depuis l'**ionisation de l'échantillon, jusqu'à la détection des ions issus du processus**.



CE QU'IL FAUT COMPRENDRE DE CHACUNE DES TROIS ETAPES : (s'aider de l'animation « MALDI » et des figures suivantes)

II.2.4.1 Phase d'accélération

Les ions issus de la destruction du co-cristallisé « matrice-échantillon », subissent une **accélération dans la zone du même nom**, sous l'effet d'un champ électrique de 20-25 kV. Cette zone ne mesure que quelques centimètres. Les ions arrivent tous en même temps à la fin de cette zone, **à l'entrée du tube de vol**.

II.2.4.2 Migration dans le tube de vol

À l'entrée du tube de vol, **l'influence du champ électrique s'arrête**. Les ions sont « lâchés » dans un **vide poussé** (10^{-7} mbar = 10^{-5} Pa = 10 μ Pa). Ce vide est nécessaire afin que la trajectoire des ions, et donc, leur temps de vol, ne soit pas faussée par des collisions avec les molécules de l'air.

Les protocoles « MALDI » d'ionisation par le transfert de charge venant de la matrice ont été optimisés de manière à ce que les ions protéiques, **ne portent qu'une seule charge positive**. Un peu à la manière des protéines séparées en **électrophorèse SDS-PAGE, dont le seul critère de séparation est finalement la taille** de la protéine elle-même, les ions portant tous une seule charge positive, **ne sont séparés que sur le critère de leur masse**, selon la formule suivante :

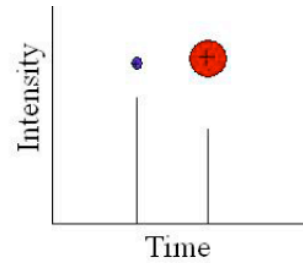
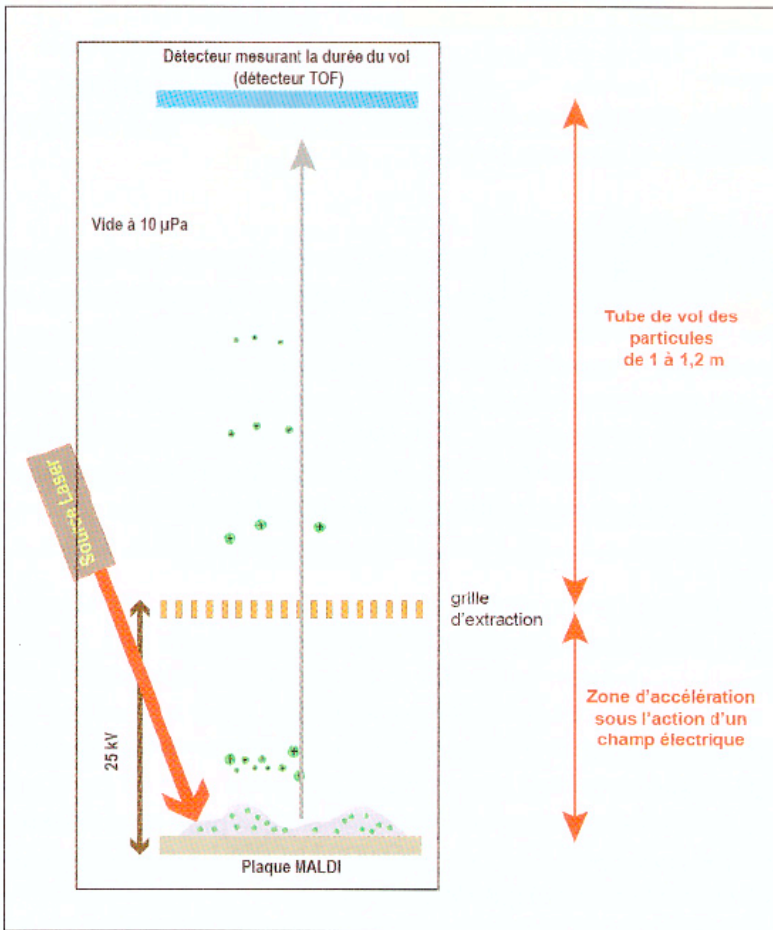
$$t = d \cdot \sqrt{\frac{m}{2 \cdot z \cdot eV}}$$

avec t = temps de vol
d = distance au détecteur (constante)
m = masse de l'ion
z = charge de l'ion (1 dans notre cas)
eV = champ électrique (constant)

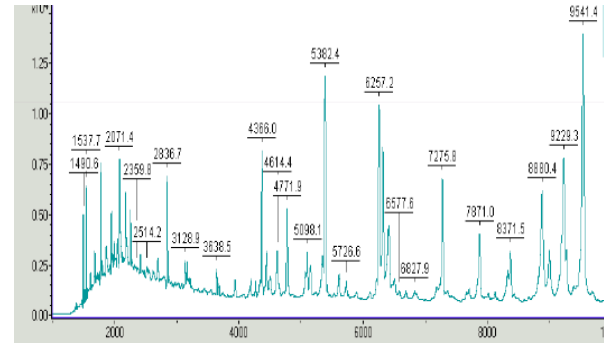
Le dénominateur sous la racine carrée étant constant, on voit clairement que **plus m est faible, plus le temps de vol dans le tube sera court**. Les ions protéiques de faible masse atteignent donc le détecteur en premier, comme le montrent la figure ci-dessous (aire de vol, partie du spectromètre dans laquelle on mesure le **temps de vol**).

II.2.4.3 Détection et élaboration des spectres

Les ions protéiques **de rapport m/z les plus petits, parviennent donc au détecteur en premier**. Pour chaque groupe d'ions de même rapport m/z, un signal est enregistré au niveau du détecteur, sous la forme d'une fonction **temps/intensité**. Ce signal est traité informatiquement avant d'être retranscrit. Chaque type de microorganisme, de par sa composition en protéine ribosomiale, donne, à l'issue du processus, un **spectre (ensemble de signaux, sous forme de pics) qui lui est spécifique (figures ci-après)**.



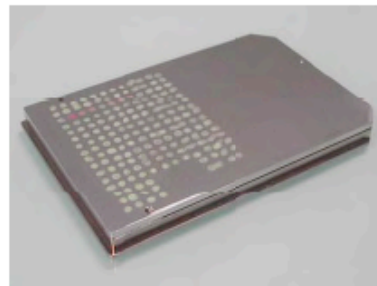
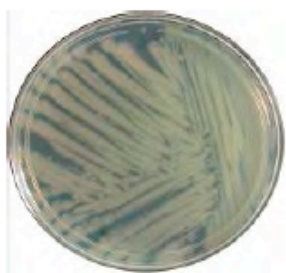
Retranscription du signal reçu au niveau du détecteur



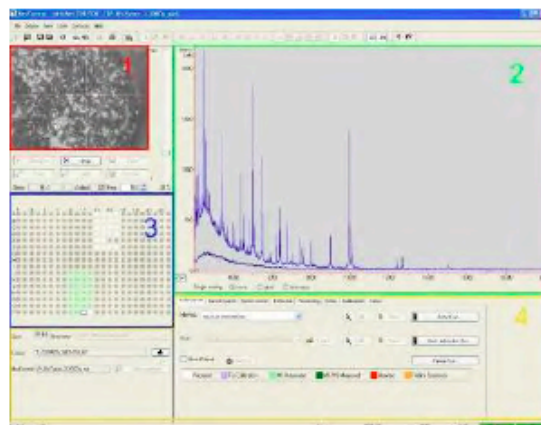
Obtention du spectre définitif du microorganisme à identifier. Spectre à comparer à ceux existants dans la base de données informatique du spectromètre.

Fonctionnement interne du spectromètre depuis la désorption-ionisation jusqu'à la détection.

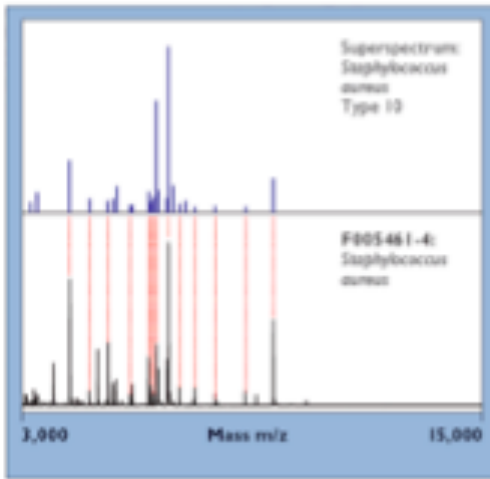
II.2.5. Résumé des étapes analytiques



Comparaison aux collections de spectres



| Gamme de score | Description |
|-----------------|--|
| 2.500 ... 5.000 | Identification à l'espèce hautement probable |
| 1.900 ... 2.299 | Identification au genre sûre, Identification à l'espèce probable |
| 1.700 ... 1.899 | Probable identification au genre |
| 0.000 ... 1.699 | Sans identification fiable |



Un logiciel compare le spectre obtenu avec des spectres pré-enregistrés dans une base de données du fournisseur, et définit les spectres les plus proches avec des scores de similarité.

3 niveaux d'identification sont proposés selon le score :

< 1,7 : absence d'identification

1,7 < score < 2 : identification au genre ou plusieurs espèces possibles → Analyses supplémentaires.

> 2 : identification de l'espèce.

Plus de 90% des souches peuvent être identifiées sans aucun test complémentaire.

III. Avantages / inconvénients

III.1. Avantages

III.1.1. La rapidité du diagnostic

Après l'obtention de la culture de micro-organismes qui prend généralement 18 à 24 heures, le diagnostic devient extrêmement rapide. L'exemple ci-dessous est valable pour une identification bactérienne.

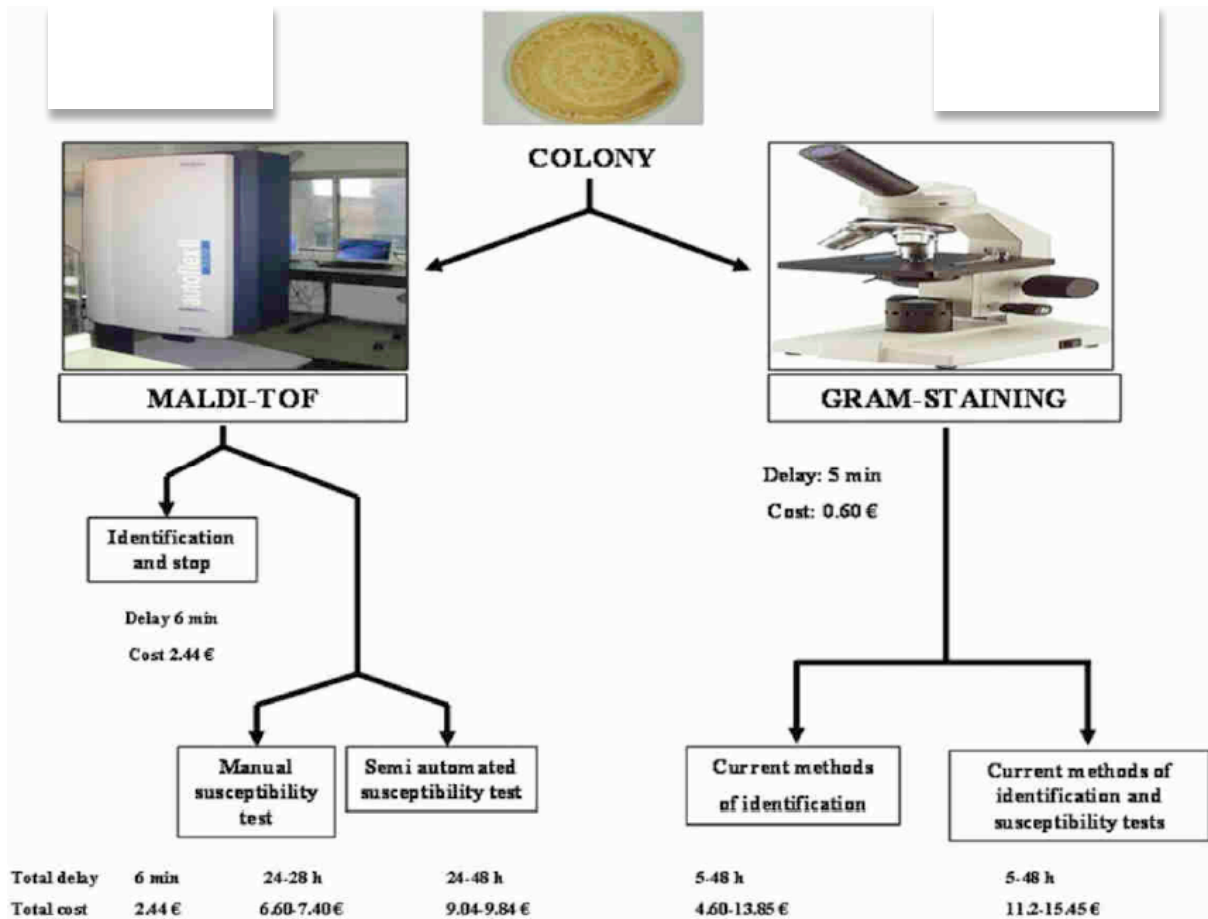
| | |
|---------------------------------------|---------------|
| Préparation de la matrice | 5 min. |
| Préparation de la plaque cible | 15 min |
| Acquisition des spectres | 1 min |
| Comparaison des spectres | 3 min |

L'analyse complète d'une plaque cible (minimum 48 identifications) prend environ **1h**.

NB : *l'analyse des levures et moisissures est également possible et donne des résultats très satisfaisant. Cependant, à cause de la composition particulière de la paroi de ces microorganismes, une étape d'extraction supplémentaire est nécessaire avant l'action de la matrice, ce qui allonge de 5 à 30 minutes le délai d'identification.*

Concernant les mycobactéries (agent de la tuberculose notamment...), le protocole est beaucoup plus contraignant, car il nécessite une étape en zone type P3 pour inactiver les souches, puis une étape d'extraction avec des solvants organiques pour venir à bout de la paroi très « grasse » de ces bactéries.

III.1.2. Le coût



Par rapport au schéma ci-dessus (début de la spectrométrie de masse), les coûts ont encore diminué. Une analyse revient maintenant à **50 centimes d'euros**.

On estime une réduction :

- **D'un facteur 5 à 10 pour les coûts par rapport aux analyses conventionnelles, et d'un facteur 90 par rapport aux analyses de biologie moléculaire.**
- **D'un facteur 55 pour le facteur temps !**

Les coûts de maintenance des appareils sont importants (environ 10% annuels du prix de l'appareil, soit environ 15000 euros), mais sont amortis par la quantité importante d'analyses réalisées en un temps court.

III.1.3. L'accréditation

Les démarches actuelles d'**accréditation** des laboratoires d'analyses de biologie médicale, sont en faveur de techniques telles que la MALDI-TOF MS. En effet, **la technique ne nécessite que très peu de matériel biologique, il n'y a que très peu de gestes techniques à valider**, en comparaison d'une identification classique qui se doit d'accréditer des milieux, des gestes, des galeries, des tests, nécessitant bien plus qu'une colonie.

III.1.4. Les perspectives

Cette technique est en évolution très rapide. Avec des techniques d'extraction particulières, elle offre la possibilité d'identifier des levures ou des mycobactéries. Les études en cours permettent des essais d'identification, sans passer l'étape préalable de culture : **identifications directes à partir d'urines, de LCR, d'hémocultures...** Des recherches permettront sans doute d'ici peu d'identifier **des profils de résistance aux ATB, des virus, des toxines...** Depuis peu, l'identification de certains marqueurs tumoraux ouvre de nouvelles perspectives dans la détection précoce de certains cancers.

III.2. Inconvénients... pouvant être contournés

Risque de contamination, mauvaise qualité du dépôt : spectres faussés, identification impossible ou erronée.

Pas d'identification des profils de résistance : nécessité de poursuivre les analyses par des antibiogrammes. **Des protocoles sont cependant actuellement à l'étude pour identifier directement par MALDI-TOF ou techniques dérivées (Tandem MS), les profils de résistances aux antibiotiques.**

Certaines souches peuvent poser des problèmes d'identification, surtout lorsqu'elles appartiennent à des taxons proches (**cas typiques des identifications avec un score entre 1,7 et 2**). En voici quelques exemples :

- **Résultat rendu comme « Salmonella group » : un sérotypage est obligatoire !**
- **Difficulté de discrimination entre Streptococcus pneumoniae et Streptococcus pseudopneumoniae (espèce découverte en 2004) :** présent dans des prélèvements bronchiques essentiellement, *S. pseudopneumoniae* doit ici être différencié du pneumocoque. Ceci peut être fait facilement par la réalisation d'un **test à l'optochine**, contre laquelle *S. pseudopneumoniae* est **résistante si incubée en atmosphère à 5% de CO₂**.
- **Difficulté de discrimination entre Listeria monocytogenes et Listeria ivanovii.** Selon le contexte clinique, la connaissance exacte de l'identité de la bactérie est essentielle. Un simple **CAMP-TEST** permet la discrimination.
- **Difficulté de discrimination entre certaines espèces de Corynébactéries.** Selon le prélèvement (on exclura l'angine diphtérique, donc **importance du contexte clinique**), le rendu « **Corynebacterium spp** », validé par le biologiste sera suffisant. En effet, les corynébactéries possèdent le même profil de résistance aux antibiotiques.
- **Le cas particulier Escherichia coli / Shigella.** L'espèce coli et le genre Shigella sont très proches génétiquement et sont parfois souvent confondus en identification. Le MALDI-TOF ne déroge pas à la règle. Ici, **l'importance des données cliniques et la nature du prélèvement sont essentielles. En effet, on ne trouve pas de Shigella dans les urines !!**
- **Cependant, dans les coprocultures, l'identification d'E. coli nécessite un retour systématique au dossier du patient, où seront vérifiées différentes informations comme l'âge, la présence de sang et pus dans les selles, l'abondance de la bactérie dans le produit pathologique...** La distinction avec *Shigella dysenteriae* doit être faite. Un milieu de **Kligler (!)** permettra de trancher avec le **caractère lactose**.
Le groupage et l'envoi de la souche au centre national de référence sont cependant obligatoires à des fins épidémiologiques.

En cas d'absence d'identification (**scores inférieurs à 1,7**), un 2^{ème} voire un 3^{ème} passage de la cible MALDI permet d'obtenir 45% d'identification. Dans 25% des cas, il est nécessaire **d'effectuer un nouveau dépôt**, éventuellement avec une extraction préalable. Les techniques de séquençage et l'expertise du microbiologiste permettent d'élucider la plupart des non identifications restantes.

Les raisons conduisant à effectuer un nouveau dépôt peuvent être :

- des **caractéristiques intrinsèques des colonies** (trop muqueuses, trop sèches, adhérentes...),
- **une culture âgée** (48 heures),
- **un type de gélose ou une incubation inadaptés**,
- ainsi qu'**une biomasse insuffisante ou au contraire, trop importante**, ce qui est directement lié au geste technique du dépôt sur la cible MALDI.

IV. Conclusion

Il ressort de ces éléments, **que la compréhension de la démarche générale d'identification, associée à la prise en compte de la nature du prélèvement et du contexte clinique, ainsi que la MAITRISE DE CERTAINES TECHNIQUES DE BASE... sont indissociables de l'avancée technologique que constitue le MALDI-TOF MS.**