



HAL
open science

Applications de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF à la bactériologie et à la distinction de variants génétiques

Louardi Moussaoui

► **To cite this version:**

Louardi Moussaoui. Applications de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF à la bactériologie et à la distinction de variants génétiques. Microbiologie et Parasitologie. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ124 . tel-00872251

HAL Id: tel-00872251

<https://theses.hal.science/tel-00872251v1>

Submitted on 11 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

EA4438 physiopathologie et médecine translationnelle
Groupe « Physiopathologie et remédiations des interactions
Hôtes-*Staphylococcus aureus* »

THÈSE présentée par :

Louardi MOUSSAOUI

Soutenue le : **05 septembre 2012**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Sciences médicales- Recherche clinique et innovation
technologique**

**Applications de la spectrométrie de masse type
MALDI-TOF à la bactériologie et à la distinction
de variants génétiques**

THÈSE dirigée par :

MrPREVOST Gilles
Mr RIEGEL Philippe

Docteur, université de Strasbourg
Docteur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

MrMEGRAUDFrancis
MrGREUB Gilbert

Professeur, Institut de bactériologie de Bordeaux
Professeur, Institut de microbiologie de Lausanne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

MrJAULHAC Benoit
MrLOZNIEWSKI Alain
MrANDRE Philippe
Mr HEBERT Yann

Professeur, Institut de bactériologie de Strasbourg
Docteur, Institut de bactériologie de Nancy
Docteur, EA3429 Fac de pharmacie de Strasbourg
Docteur, Bruker Daltonics

Remerciements

Aux Membres du Jury

Un grand Merci

De m'avoir fait l'honneur de juger ce travail

A mes parents (Khelifa & Aïcha)

Toute ma reconnaissance, mon affection, mon respect et surtout pour m'avoir soutenue depuis le premier jour, dans les instants difficiles comme dans les moments de joie

A Florence ...

A ma sœur Algiya et tous mes frères (Sliman, Fouzi, Nassim, Hamza, AbdelGhani et Ryad

Mes nièces : Ahlem et Ikram

Mes neveux Houssam et Aymen

A Gilles,

*Ma reconnaissance d'abord, mais surtout mon profond respect
Je te remercie pour m'avoir accueilli au sein de ton laboratoire,
Pour ton soutien moral et matériel tout au long de ces années et durant
les moments difficiles auxquels j'ai été confronté
Pour ton amitié et ton encouragement précieux,
Gilles: restes toi-même, & Thank You. Again*

A François Delaland,

*Pour m'avoir formé et assisté à la spectrométrie de masse
Pour tout le temps que tu m'as consacré malgré ton emploi du temps
chargé*

A Daniel

*Ta personne, Ta gentillesse, Ton savoir faire, etc. ta patience pour
supporter mes innombrable questions
Pour moi t'es une vraie encyclopédie*

A Philippe

*Ta sympathie, ton être, et pour toutes les collections de souches
Pour ta collaboration pour le bon déroulement de notre projet*

A Jean Michel Scheftel

*Ta gentillesse, Ta sympathie, et Ta disponibilité
Pour ta collaboration aussi pour le bon déroulement de notre projet*

A Raymonde

Merci surtout pour tes éclats de rire inoubliables

A Benoit, Khaldoun, Mira, Lamine BM, Sophie, et tous les stagiaires

*Un grand merci d'avoir supporté mes sauts d'humeur
Je souhaite également à vous tous une bonne continuation et tout le
bonheur du monde*

A mes amis, Karim, Redouane, Bilal, Céline, Anais, Slim, Imane, etc.

*Et à toutes les techniciennes du laboratoire de bactériologie de
Strasbourg*

Un Grand merci mais surtout un profond amour

*Aux membres du groupe MicroBio CLUB (Facebooker's) Hicham, Amine,
Salah, Selma, Khalida et Batoune*

Ne vous inquiétez pas je vous ai pas oublié ;)



Langage correct de la recherche scientifique... (Sorry it's in english)

It has long been known = I didn't look up the original reference.

A definite trend is evident = These data are practically meaningless.

While it has not been possible to provide definite answers to the question = An unsuccessful experiment, but I still hope to get it published.

Three of the samples were chosen for detailed study = The other results didn't make any sense.

Typical results are shown = This is the prettiest graph.

These results will be in a subsequent report = I might get around to this sometimes, if pushed/funded.

In my experience = once.

In case after case = Twice.

In a series of cases = Thrice.

It is believed that = I think.

It is generally believed that = A couple of others think so, too.

Correct within an order of magnitude = Wrong.

According to statistical analyses = Rumour has it.

A statistically-oriented projection of the significance of these findings = A wild guess.

A careful analysis of obtainable data = Three pages of notes were obliterated when I knocked over a glass of beer.

It is clear that much additional work will be required before a complete understanding of this phenomenon occurs = I don't understand it.

After additional study by my colleagues = They don't understand it either.

Thanks are due to Joe Bloggs for assistance with the experience and the Cindy Adams for Valuable discussions = Mr. Bloggs did the work and Ms. Adams explained to me what it meant.

A highly significant area for exploratory study = A totally useless topic selected by my committee.

It is hoped that this study will stimulate further investigation in this field = I quit.

ABREVIATIONS

ACN	Acétonitrile
ADN et ARN	Acides désoxyribonucléique et ribonucléique
BET	Bromure d'éthidium
BHI	Bacto Heart Infusion Broth
BLSE	β -lactamine à spectre étendu
CoNS	Souches de <i>Staphylococcus</i> à Coagulase Négative
Da	Dalton
DO	Densité optique
ECP	Electrophorèses en Champ Pulsé
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
EGTA	Ethylène glycol-bis (β -amino ethyl éther) N, N, N, N' tétraacétate
ESI	Ionisation par Electrospray
GS	Gélose au sang
kb	Kilobase
MH	Mueller-Hinton
m/z	Masse/charge
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
M	Masse Moléculaire
MRSA	<i>S. aureus</i> résistante à la méthicilline
MSP	Main Spectra Projection
MSSA	<i>S. aureus</i> sensible à la méthicilline
NB	Nutrient Broth
ppm	Partie par million
p/v	Poids pour volume
pb	Paire de bases
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phénylméthyl Sulfonyl Fluorure
rpm	Révolution par minute
SM	Spectrométrie de Masse
TFA	Acide tri-fluoro acétique (CF_3COOH)
TOF	Temps de vol (Time of Flight)
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TY	Tryptone Yeast
UV	Ultraviolet

v/v	Volume pour volume
α-HCCA	acide α –cyano-4-hydroxy-cinnamique
Hz	Hertz
nm	Nanomètre
MLST	Multi Locus Sequencing Typing
CCI	CompositeCorrelation Index

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	4
RESUME DE THESE	11
1. INTRODUCTION.....	11
2. ENJEU DE LA THESE.....	12
3. LA SPECTROMETRIE DE MASSE TYPE MALDI-TOF	13
3.1. La spectrométrie de masse peut s'appliquer à l'identification bactérienne !	14
3.2. La spectrométrie de masse sur les protéines bactériennes et l'épidémiologie....	15
4. CONCLUSION	17
PREAMBULE	18
I. INTRODUCTION	23
1. Généralités	23
1.1. La bactérie.....	23
1.2. La bactériologie	24
2. Bactériologie médicale	28
2.1. Culture et isolement des bactéries.....	30
2.2. La classification des bactéries.....	32
2.3. L'identification bactérienne.....	33
3. Méthodes d'identification phénotypiques dites conventionnelles	35
3.1. Identification des principales bactéries en bactériologie clinique	35
3.2. Les systèmes d'identification manuelle.....	42
3.3. Antibiogrammes.....	43
3.4. Méthodes conventionnelles automatisées	44
4. Identification moléculaire d'une bactérie	46
4.1. Typage moléculaire des bactéries	47
4.2. Détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques	49
5. Méthodes conventionnelles : Avantages et limites	50
6. Méthodes d'identification protéomique	51
6.1. L'ère protéomique et l'identification bactérienne.....	51
6.2. La spectrométrie de masse	53
6.3. Quelques applications de la spectrométrie de masse	61
II. OBJECTIFS DE LA THESE.....	65
III. MATERIELS & METHODES	68
1. Souches bactériennes.....	68
2. Production de masse et stockage des isolats	68
3. Milieux de culture	68
4. Solutions et tampons usuels	69
5. Identification et Antibiogramme (<i>S. aureus</i>).....	70
6. Recherche de la résistance à la méthicilline.....	70
7. Identification des souches par le système VITEK 2 (bioMérieux)	71
8. Détermination du sérotypage et toxines de cholera	71
9. Test d'antibiogramme (<i>Vibrio sp</i>).....	71
10. Protocole recherche des SE (A à I) et TSST chez des <i>S. aureus</i> par xMAP	72

11. Spectrométrie de masse MALDI-TOF	74
11.1. Identification directe des Hémocultures par MALDI-TOF	74
11.2. Procédure de profilage des Microorganismes par MALDI-TOF	75
11.3. Traitement des données avec le logiciel MALDIBiotyper1.1 TM (Bruker).....	77
11.4. Reproductibilité et répétabilité	78
12. Electrophorèse en champ pulsé (ECP)	79
12.1. Principe.....	79
12.2. Préparation d'ADN bactérien intact en vue en électrophorèse en champs pulsé	79
12.3. Hydrolyse de l'ADN	80
12.4. Electrophorèse en champs pulsé pour les <i>S. aureus</i> (Migration)	80
12.5. PFGE pour les souches de <i>Vibrio sp</i>	81
12.6. Lecture (pour les <i>S. aureus</i> et les <i>Vibrio sp</i>)	81
12.7. Critères d'interprétation (pour les <i>S. aureus</i>)	82
12.8. Critères d'interprétation (Pour les <i>Vibrio sp</i>):	82
13. MLST ou (Multilocus Sequence Typing)	82
13.1. Principe.....	82
13.2. MLST (méthode).....	82
14. Méthodes d'analyse des résultats	84
14.1. Analyses Statistiques.....	84
14.2. Analyses phylogénétiques	88
14.3. Méthodes phénétiques	89
14.4. Identification des Spectres par le Logiciel MALDIBiotyper TM	89
IV. RESULTATS	94
1. Validation de la méthode	94
1.1. Répétabilité	95
1.2. Effets de la congélation.....	95
1.3. Effets des conditions de cultures.....	96
1.4. Reproductibilité pour une identification au niveau de l'espèce	97
1.5. Reproductibilité pour faire du typage bactérien.....	97
1.6. Reproductibilité inter-laboratoire.....	103
1.7. ARTICLE (1) : Identification Bactérienne	103
2. Application à la routine hospitalière	113
2.1. Capacités de MALDIBiotyper TM 1.1 pour l'identification et la classification	114
bactérienne	114
2.2. Application de la spectrométrie de masse en routine hospitalière.....	117
2.3. L'identification directe à partir des échantillons	124
2.4. ARTICLE (2) : Identification Bactérienne	125
3. Typage bactérien	141
3.1. Épidémiologie moléculaire	142
3.2. La spectrométrie de masse sur les protéines bactériennes et l'épidémiologie : rêve ou	143
réalité	143
3.3. Discrimination des sous espèces du genre <i>Corynebacterium</i>	144
3.4. Possibilités offertes par MALDIBiotyper TM 1.1 dans le typage des bactéries	149
3.5. ARTICLE (3) : Les <i>Vbriio sp</i>« comparaison entre l'électrophorèse en champs pulsé et	152
la MALDI-TOF ».	152
3.6. ARTICLE (4) : Discrimination des <i>E. coli</i>&<i>Shigella sp</i>	169
3.7. ARTICLE (5) : Typage des <i>S. aureus</i>	195
V. DISCUSSION	224
1. Discussion globale des travaux	224
2. Conclusion Bibliographique	242

1.	Identification des micro-organismes par MALDI-TOF/MS (WorkFlow).....	242
2.	Quelques lacunes	244
3.	Applications futures	248
4.	La spectrométrie de masse en bactériologie, et si nous parlons économie?!.....	248
5.	Ouverture de la technique aux pays en voie de développement	249
	3. Réflexion et conclusion	250
	ANNEXES	253
	BIBLIOGRAPHIE	261

LISTE DES FIGURES

Figure 1	: Une cellule bactérienne.....	23
Figure 2	: Louis Pasteur (1822-1895): Dans cette représentation Pasteur observe dans un bocal une moelle épinière de lapin enragé, suspendue en train de se dessécher au-dessus de cristaux de potasse. C'est le processus qui a permis d'obtenir le vaccin contre la rage.	24
Figure 3	: Louis Pasteur (1822-1895) par le photographe NADAR	26
Figure 4	: Robert Koch (1843-1910).....	27
Figure 5	: Isolement de bactéries sur une gélose Mueller-Hinton, après un examen microscopique et une coloration de Gram.....	30
Figure 6	: Arbre phylogénétique montrant la diversité des bactéries, comparées aux autres organismes. Les eucaryotes sont colorés en rouges, les archaea en vert et les bactéries en bleu.	32
Figure 7	: Schéma de la démarche de l'analyse bactériologique	34
Figure 8	: Les tests d'orientation pour l'identification des bacilles et Cocci à Gram positif....	40
Figure 9	: Les tests d'orientation pour l'identification des bacilles à Gram négatif	41
Figure 10	: Les tests d'orientation pour l'identification des Cocci à Gram négatif	41
Figure 11	: Historique schématique du séquençage d'acide nucléique	49
Figure 12	: Workflow (Schéma général) de l'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS	52
Figure 13	: Schéma général d'un spectromètre de masse type MALDI-TOF. Dans le spectromètre de masse à temps de vol, le miroir électrostatique présente le double avantage d'augmenter la longueur du trajet et de compenser les effets de la dispersion d'énergie cinétique	56
Figure 14	: Schéma général de la technique d'ionisation douce ESI (Electrospray Ionization).57	
Figure 15	: Schéma général d'un spectre de masse. Dans le spectromètre de masse à temps de vol.....	60
Figure 16	: Calcul de la résolution spectrale dans le spectromètre de masse à temps de vol .	60
Figure 17	: Les différentes étapes de l'extraction protéique pour une éventuelle identification par MALDI-TOF/MS à partir des échantillons d'hémoculture.	75
Figure 18	: Les différentes étapes de l'extraction protéique pour une éventuelle identification par MALDI-TOF/MS	76
Figure 19	: Les valeurs CCI d'un jeu de spectres affichées en matrice.....	87
Figure 20	: Représentation de la distribution des différents spectres de masse en 2D et 3D par Biotyper1.1 TM	88
Figure 21	: Les résultats Graphique d'identification. La partie supérieure montre le spectre contenant des pics inconnus, les pics similaires au sein de la fenêtre intérieure (verte), au sein de la fenêtre extérieure (jaune) et les pics non similaires (rouge). La partie inférieure montre le spectre de référence dédié.	91

Figure 22 : Description graphique de la fonction de correction d'intensité. Sur l'axe des X la valeur-I-corrélation sont donnés et déterminées à partir de la corrélation entre l'intensité réelle d'un spectre inconnue et le spectre de référence. Sur l'axe des Y la valeur effective de I-corrélation qui est corrigée par le paramètre rajusté.	91
Figure 23 : Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF/MS dans les mêmes conditions (20 fois 50 tirs) de la souche commerciale <i>E.coli</i> BL21 déposée en tripliqué permettant l'étude de la répétabilité de l'analyse.	98
Figure 24 : Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF/MS, des extraits frais de la souche 1315, <i>S. aureus</i> , cultivé sur gélose au sang à 37°C avec repiquage quotidien permettant l'étude de la reproductibilité de la manipulation à différents temps.	99
Figure 25 : Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF/MS de la souche <i>S. intermedius</i> B169 conservée à 4 °C pendant 4 semaines. A : après 24H de conservation ; B : après une semaine ; C : après deux semaines ; D : après trois semaines ; E : après 4 semaines	99
Figure 26 : Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF/MS de la souche <i>S. intermedius</i> B169 conservée à -20 °C pendant 4 semaines. A : après 24H de conservation ; B : après une semaine ; C : après deux semaines ; D : après trois semaines ; E : après 4 semaines.	100
Figure 27 : Profils multiples de la souche <i>S. aureus</i> 12684 cultivée dans les différents milieux de cultures. Les différents profils sont pré-traités par Biotyper1.1. 1 : Bacto Heart Infusion (BHI), 2 : Gélose au sang (GS), 3 : Müller Hinton (MH), 4 : Nutrient Broth (N2), 5 : Tryptone Yeast (TY), réalisé par le Biotyper™ 1.1.	100
Figure 28 : Profils multiples d'une souche de <i>S. aureus</i> (12684) cultivée dans le milieu gélose au sang et incubée pendant : 24 h, 48h et 72h à 37°C et sans repiquage quotidien. Les spectres de masse ont déjà été traités par Biotyper™1.1.	101
Figure 29 : Dendrogramme démonstratif de huit souches différentes provenant de trois genres différents réalisé par le logiciel Biotyper™1.1 de Bruker.	114
Figure 30 : 2D plot pour la classification des 68 souches de bacilles Gram négatif. (BioTyper™1.1 de Bruker Daltonics).....	115
Figure 31 : Différents profils de différentes espèces de <i>Corynebacterium</i>	145
Figure 32 : Dendrogramme de classification de 146 souches du genre <i>Corynebacterium</i> , réalisé par le Biotyper™ 1.1 avec 33 branches	146
Figure 33 : Dendrogramme de classification de 146 souches du genre <i>Corynebacterium</i> , réalisé par le Biotyper™ 1.1 avec 40 branches	146
Figure 34 : Dendrogramme de classification à 60 branches de 146 souches bactériennes du genre <i>Corynebacterium</i> établi par le Biotyper™1.1 de Bruker Daltonics.....	147
Figure 35 : Arbre phylogénétique de 61 espèces appartenant au genre <i>Corynebacterium</i> , par la comparaison des séquences de l'ADNr 16S.	148
Figure 36 : Dendrogramme de toutes les souches du genre <i>Corynebacterium</i> réalisé par le Biotyper™ 1.1 et une banque de données provisoire réalisée par le laboratoire.	149
Figure 37 : a : Une distribution à deux dimensions de spectres de différentes souches appartenant à la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> : <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter youngae</i> , <i>Citrobacter braakii</i> , <i>Citrobacter farmeri</i> et <i>Escherichia coli</i> . b : « 3D scatter plot scores » des 3 principaux composants pour 6 espèces individuelles du genre <i>Pseudomonas</i> , soit <i>P. oleovorans</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> DSM291, <i>P. mendocina</i> , <i>P. putida</i> souche B401, <i>P. veronii</i>	150
Figure 38 : Dendrogramme de classification des 31 souches d' <i>E. coli</i> BLSE productrices d'une Cefotaximase, réalisé par le Biotyper™1.1. Les souches, ont été cultivées sur gélose au sang pendant 24h à 37°C puis stocké à -20°C pendant 2 semaines avant de passer à l'analyse par MALDI-TOF/MS.	151
Figure 39 : Classification de quelques souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées de deux services de médecine hospitalière provenant d'hémocultures positives.	151

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Chronologie des avancés de la bactériologie avant le vingtième siècle	29
Tableau 2: Caractères utilisés en systématique bactérienne	41
Tableau 3 : Sequences des primers utilisés en PCR (MLST)	83
Tableau 4: Effets des conditions de culture (Température, durée d'incubation et milieux de cultures) sur l'identification bactérienne par MALDIBiotyper™ (2 Tableaux).....	102
Tableau 5: Identification de 17 espèces du genre <i>Corynebacterium</i> par le logiciel Biotyper™1.1 et une base de données spécifique aux Corynébactéries, selon 2 propositions: prise en considération des 10, ou 100 pics les plus intenses. Les valeurs d'identification en termes de pourcentage de certitude sont données pour les premiers et le second choix.	116
Tableau 6: Résultat d'identification (tout score confondus) par Microflex LT & MALDIBiotyper™2.0 de 531 échantillons sur une période de 1 mois dans le laboratoire de bactériologie de Strasbourg (2008).	119
Tableau 7: Résultat d'identification (score > 2: 86,8% des souches) par Microflex LT & MALDIBiotyper™2.0 de 531 échantillons sur une période de 1 mois dans le laboratoire de bactériologie de Strasbourg (2008).	119
Tableau 8: Résultat d'identification (Discordance: score >2 (11/424 souches) par Microflex LT & MALDIBiotyper™2.0 de 531 échantillons sur une période de 1 mois dans le laboratoire de bactériologie de Strasbourg (2008).	120
Tableau 9: Résultats d'identification obtenus par la technique du Smear (tout scores confondus).....	122
Tableau 10: Résultats d'identification obtenus par la technique du Smear (scores > 2).....	122
Tableau 11: Déviations des scores de fiabilité d'identification pour 41 espèces bactériennes par les techniques d'extraction protéique et de dépôt direct comparées par le système MALDI-TOF/MS Biotyper™2.0	123
Tableau 12: Les différents systèmes MALDI-TOF/MS commercialisés utilisés dans l'identification bactérienne	234
Tableau 13: List of discriminating peaks traced in different species of <i>Shigella</i> sp & <i>E. coli</i> (presence of peaks (+))	236
Tableau 14: Lacunes trouvées dans l'identification de routine par MALDI-TOF MS selon Greub <i>et al.</i> 2010.....	240

RESUME DE THESE

1. INTRODUCTION

Les techniques d'identification et de typage de microorganismes mises à la disposition des microbiologistes ne cessent de progresser. Généralement, les méthodes d'identification utilisées en routine dans les laboratoires de microbiologie sont des méthodes dites conventionnelles et reposent essentiellement sur des tests phénotypiques et/ou biochimiques. Le pouvoir discriminant des méthodes conventionnelles reste assez limité et présente un délai d'identification d'environ 1 à 3 jours. Ce délai peut retarder le diagnostic et la prescription d'une antibiothérapie adaptée. De plus, ces méthodes donnent seulement une identification au niveau du genre et/ou de l'espèce et ne sont souvent pas applicables pour une identification au niveau de la sous-espèce (typage), ce qui peut être important lors de la suspicion ou de risque de situation épidémique dans le domaine médical. Au cours des dix dernières années, des méthodes génotypiques ont été proposées en utilisant des techniques de biologie moléculaire. Leur pouvoir de discrimination est généralement élevé par rapport aux techniques phénotypiques et elles constituent les méthodes actuelles de typage permettant une approche plus fine lors d'enquêtes épidémiologiques. Cependant, ces méthodes génotypiques ont également leurs limites, à savoir la complexité des protocoles, le savoir-faire nécessaire pour maîtriser ces systèmes, le coût des réactifs, l'utilisation de sondes ou de séquences nucléotidiques spécifiques pour chaque espèce, et enfin le délai important nécessaire pour l'identification. Il faut noter également qu'il n'existe pas de méthode moléculaire générale pour tous les microorganismes et pour la majorité de ces techniques moléculaires, leur valeur comme outils épidémiologiques n'a été que partiellement établie[1]. Ces difficultés ont conduit au développement de méthodes alternatives, le plus souvent des méthodes de chimie analytique. Parmi les applications récentes de technologies émergentes figure la spectrométrie de masse[2]. Cette technique permet de définir des masses différentes à une précision moléculaire. Elle peut théoriquement s'appliquer à la définition des microorganismes grâce à sa sensibilité en termes de quantité de produits. Après l'exploration des acides gras et des polyholosides de bactéries, ce sont les protéines abondantes qui font l'objet des plus grandes attentions pour ce type d'applications[3]. Nous nous concentrons dans cette thèse sur les capacités et l'applicabilité d'un système d'identification des bactéries via leurs protéines et la spectrométrie de masse couplée à un algorithme, BiotyperTM, comme un outil susceptible de typer les bactéries.

2. ENJEU DE LA THESE

L'urgence hospitalière exige une performance élevée dans le diagnostic en termes de spécificité et de rapidité, ainsi qu'une rationalisation des coûts hospitaliers. Dans ce contexte général, l'objectif de mon travail fut de valider et d'optimiser l'approche en analyse protéomique de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification et la classification d'un ensemble de bactéries pathogènes ou opportunistes chez l'homme, en enrichissant une banque de données et en testant la robustesse de la méthode, afin d'obtenir une méthode rapide fixe et fiable d'acquisition de résultats.

Pour atteindre cet objectif, nous avons tout d'abord choisi d'étudier l'identification par spectrométrie de masse par le biais d'un algorithme réalisé peu de temps avant le début de cette thèse. Pour cela, nous avons optimisé les différentes étapes de l'analyse spectrométrique pour passer à l'identification et à la classification bactérienne. Toutes les souches testées ont été isolées en bactériologie clinique et celles introduites dans la banque ont été identifiées par leurs séquences d'ADN 16S comme référence d'identification. La possibilité d'identifier les bactéries dès la positivité des hémocultures a un intérêt dans la prise en charge clinique du patient, et dans le choix de l'antibiogramme qui, alors, pourrait être interprété le lendemain de cette positivité. En effet, par les méthodes dites classiques après la positivité des hémocultures (mono ou polymicrobiennes), plusieurs jours sont nécessaires pour l'identification bactérienne. Une identification par MALDI-TOF pourrait nécessiter moins de temps. Pour ce faire, nous avons optimisé un nouveau protocole d'extraction protéique à partir d'échantillons dans des tubes munis d'un gel séparateur. Nous avons aussi étudié les capacités du logiciel Biotyper™ comme outil de typage et comme application à l'épidémiologie des Staphylocoques et des *Vibrio cholerae* en se basant sur la reproductibilité et la sensibilité des résultats acquis pour la discrimination et surtout la proximité des souches (sous-typage). Afin d'évaluer le potentiel du Biotyper™, des profils d'électrophorèse en champ pulsé et de génotypage en locci multiples ont été comparés pour un collectif de souches sélectionnées. Cependant, l'identification des espèces comme les *Shigella spp* par cette technique n'a pas encore été résolue et l'un des buts de la thèse fut de développer une approche fixe d'acquisition et d'interprétation des spectres de masse pour que la spectrométrie de masse puisse distinguer les deux genres *Shigella* et *Escherichia* et puisse même identifier les différentes espèces appartenant au genre *Shigella*.

D'un point de vue méthodologique, cette thèse s'appuie sur une démarche qualitative et privilégie l'usage de protocoles et d'algorithmes informatiques spécialisés, puis propose en valorisation de nouveaux utilitaires pour la résolution des problèmes suscités.

3. LA SPECTROMETRIE DE MASSE TYPE MALDI-TOF

La spectrométrie de masse utilisée dans cette thèse est celle de type Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time –Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS). Elle est basée sur l'ionisation des échantillons. Un échantillon couvert d'une matrice ionisante est bombardé par un laser (337 nm, 20 Hz). En étant désorbées de la plaque inerte, les particules ionisables sont accélérées dans un champ électrique (19 kV) en leur imprimant un temps de vol dans un tube où un vide poussé (10^{-10} Bar) est maintenu. La molécule désorbée est projetée vers un détecteur. Son temps de vol est proportionnel à sa masse (m) et sa charge (z). Par définition, la MALDI-TOF est une spectrométrie de masse à ionisation douce, ce qui signifie que la charge des molécules produites est toujours de 1. Différentes matrices ionisantes sont disponibles, elles ont des spécificités différentes en fonction de la gamme de masses à séparer, et de l'hydrophobicité des produits... Alors que le dépôt est réalisé sur un disque de 3 mm de diamètre, l'obtention d'un spectre moyen et représentatif s'effectue après avoir réalisé un nombre prédéfini de tirs laser d'une puissance et d'une fréquence dépendant de l'expérience et de la machine utilisée sur la surface qu'occupe l'analyte. Ces spectres, acquis selon les paramètres fixés par l'utilisateur seront conservés si le ratio signal sur bruit est satisfaisant. Ainsi, un spectre représentant une souche est en fait la somme du nombre prédéfini au préalable dans l'acquisition des spectres accumulés et moyennés dans la gamme de masse souhaitée (2 000-20 000 Da). Sauf spécifiés, tous les résultats présentés dans cette thèse ont été acquis sur BiFlexIII™ (Bruker Daltonics). Les fichiers des spectres sont lisibles par le logiciel associé à l'équipement (ici FlexAnalysis™), ainsi que l'algorithme de recherche (par exemple BioTyper1.1 et 2.0™) qui permettent de comparer le spectre obtenu à ceux d'une banque de données, et ouvrent également une perspective de typage de souches d'une même espèce[4].

3.1. La spectrométrie de masse peut s'appliquer à l'identification bactérienne !

3.1.1. Précautions préliminaires et reproductibilité

Nous avons évalué l'éventuelle influence de certains milieux de culture sur la qualité de l'identification bactérienne. Ces milieux de culture (complets ou sélectifs) dont l'utilisation en routine est importante phénotypiquement, et quels que soient leur nature, n'ont pas fait varier les scores de fiabilité d'identification des bactéries (>2.0) au niveau de l'espèce. Le temps de culture cependant doit être minimal et permettre une analyse sur des colonies suffisamment développées sans que les cultures soient vieillissantes ou les géloses desséchées. Par ailleurs, nous avons participé à une étude internationale multicentrique avec 7 autres laboratoires internationaux pour réaliser l'identification de 60 bactéries non fermentantes avec des spectromètres différents (Biflex, Ultraflex, Microflex) et la reproductibilité inter-laboratoire était de 98.5%. Seuls six échantillons parmi 480 n'ont pas été identifiés. Ceci était dû à des confusions de souches (4 échantillons) ou à leur contamination (1 échantillon) et/ou à un signal insuffisant (1 échantillon)[5].

3.1.2. Application de la spectrométrie de masse en routine hospitalière

Nous avons eu l'opportunité aussi de tester la qualité de l'identification par la spectrométrie de masse en parallèle de la routine bactériologique pour divers secteurs de prélèvements (plus de 4000 échantillons testés en trois ans). La qualité de l'identification fut alors supérieure à 90%. Il est également utile de préciser lors d'une étude d'évaluation réalisée séparément que dans 6 cas (1,1%) où 531 échantillons ont été traités, la spectrométrie de masse a fourni une identification de genre et d'espèce lorsque l'identification classique ne fournissait que le genre. Cependant, il reste à souligner la difficulté à différencier des bactéries comme *Streptococcus mitis/oralis* des *S. pneumoniae*, or ce dernier est un germe qui suscite beaucoup d'attention par rapport sa pathogénéicité.

3.1.3. Identification bactérienne à partir des hémocultures positives par MALDI-TOF/MS-Biotyper™ 2.0

Toujours au titre des applications de la spectrométrie de masse ; nous avons abordé l'intérêt de l'identification bactérienne des hémocultures positives. L'identification des bactéries dès la positivité des hémocultures a un intérêt dans la prise en charge clinique du patient, et parfois dans la lecture de l'antibiogramme dès le lendemain de cette positivité. Nous avons optimisé un nouveau protocole d'extraction protéique et les résultats obtenus par spectrométrie le jour de positivité de l'hémoculture montrent une performance de l'identification de 97,52% au niveau du genre et de 95.86% au niveau de l'espèce[6] .

3.1.4. L'identification d'*Escherichia coli* et *Shigella spp*

Cette investigation de recherche nous a permis d'établir une base de données sur la base d'un concept de sélection de pics communs et de biomarqueurs spécifiques à l'espèce. Par ailleurs, la suppression de tous les pics non informatifs ou non reproductibles issus des souches cultivées sur un milieu sélectif, nous a permis de démontrer les performances de la spectrométrie de masse dans la distinction des *Shigella spp* et les *E. coli* lactose négatif. Trente deux souches ont servi pour la construction de la banque dont 15 appartenant au genre *Escherichia* et 17 au genre *Shigella*. La totalité des souches testées (48) ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce avec un bon score. Le concept et son insertion au logiciel Biotyper sont examinés dans une démarche de valorisation en partenariat avec la société Bruker ([manuscrit retenu](#)).

3.2. La spectrométrie de masse sur les protéines bactériennes et l'épidémiologie

Après la possibilité de l'identification des espèces majeures par spectrométrie de masse, nous avons développé dans cette partie de notre travail l'identification intra-spécifique ou le typage des isolats (identification de souches au sein de la même espèce). Cette étape qui se situe au-delà de l'identification de l'espèce, requiert la recherche d'éléments spectraux discriminants faiblement visibles dans les spectres. Ce travail consiste à évaluer l'intérêt de la spectrométrie de masse comme méthode de typage et les applications porteront sur deux agents pathogènes pour l'homme : *S. aureus*, *Vibrio cholerae* et *Shigella* pour lesquels nous possédons des collections de souches que nous avons bien caractérisées à l'échelle phénotypique.

La genèse des spectres de masse des protéines bactériennes dans des conditions bien établies est remarquablement reproductible. BioTyper™ effectue l'identification sur l'ensemble des pics compris entre 3000 et 15000 Da en intégrant tous les pics dont les aires varient de 1 à 1,000. La construction de dendrogrammes est basée sur les scores de similarité. De plus,

une analyse à variation multiple basée sur l'analyse des composants principaux est possible. Ce logiciel offre une variété d'algorithmes et de visualisations de classification (clustering). Ainsi, en s'intéressant à un groupe de 31 souches d'*Escherichia coli* - Cefotaximase + qui n'avaient pas été différenciées par d'autres méthodes, nous avons pu distinguer deux groupes de souches distants de plus de 30% sur l'échelle arbitraire appliquée et de nouvelles dichotomies apparaissent dans ces sous-groupes.

Un autre exemple est donné par 20 souches de *Vibrio cholerae* non O1 issues de stations de traitement des eaux usées de trois sites (avec la collaboration de R. Eddabra et de Mme le Professeur R. Mimouni, Agadir, Maroc). Lors de leur analyse en électrophorèse en champ pulsé, ces 20 souches se distinguent en 10 profils n'ayant pas de réelles relations clonales constituant trois groupes distincts (1, 11, et 8 souches). Lorsque ces souches sont analysées en spectrométrie de masse, 4 groupes significatifs se dégagent et les souches les plus proches le sont dans un score de similarité de 975/1000[7].

Une autre illustration est issue de l'enquête sur *Staphylococcus aureus* isolé des patients atteints de pyomyosites et ostéomyélites porteurs de SARM. En tout, 82 souches ont été analysées par ECP (Electrophorèse en champ pulsé), MLST (Multi Locus Sequence Typing) et MALDI-TOF. L'étude des toxines ainsi que le phénotype de susceptibilité aux antibiotiques ont été réalisés. Vingt profils d'ECP représentaient les cas de pyomyosites et 11 les cas d'ostéomyélites. Ces résultats ne reflétaient aucune concordance par rapport au phénotype de l'antibiogramme ni à la présence ou absence des toxines. De plus, le groupement des souches par MALDI-TOF ne corrélait pas avec le groupement d'ECP. Enfin, pour évaluer les profils MLST et les deux techniques (ECP et MALDI-TOF), nous avons sélectionné un pulsotype qui regroupe 20 souches différentes où le MALDI-TOF les a séparées en quelques groupes (6 groupes). Les résultats MLST montrent le besoin d'établir la notion de clone en spectrométrie de masse pour mieux comprendre la diversité des souches et sur quelle base de typage il est possible de définir cette notion. ([Manuscrit en préparation](#)).

4. CONCLUSION

La spectrométrie de masse offre un très bon potentiel pour l'identification bactérienne de routine, et se diffuse maintenant très vite dans les laboratoires d'analyses, car elle permet d'obtenir une identification rapide et en une seule étape d'investigation, en permettant plusieurs types d'économie : consommables, gestion de commandes, de stocks de déchets, gestion de personnel. Cette technique s'applique aux bactéries, avec un protocole certainement adapté pour les bactéries possédant des acides mycoliques dans leur paroi. Cette approche évolue rapidement tant pour la banque de données que pour les algorithmes qui permettent désormais de caractériser les mélanges de deux bactéries dans les hémocultures comme dans d'autres cultures. Elle apporte un gain réel dans la prise en charge du patient et le choix éclairé des antibiotiques testés pour l'antibiogramme. Cette prise en charge sera encore améliorée par un outil supplémentaire de comparaison des souches pour une veille épidémiologique "en temps réel", sans investissement supplémentaire. La technique peut aussi constituer un outil alternatif de sérotypage.

PREAMBULE

Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique des souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent



What is it? Damn bacteria!!

étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective.

possible thérapie antimicrobienne effective. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective.

Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective.

Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective.

techniques Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective.

d'identification et de typage de microorganismes mises à la disposition des microbiologistes ne cessent d'évoluer et de Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective.

progresser. Il n'existe actuellement pas de méthode unique d'identification qui puisse être appliquée à tous les microorganismes cultivables ou non, et aucune de ces méthodes proposées actuellement, qu'elle soit phénotypique, biochimique ou génomique, ne permet à elle seule d'identifier la souche et d'avoir des informations exactes sur sa position taxonomique. Un domaine de la microbiologie clinique est la dénomination scientifique de souches microbiennes. Cela est fait habituellement avec l'intention de donner un aperçu de l'agent étiologique causant une maladie infectieuse, incluant les associations pathologiques et une possible thérapie antimicrobienne effective.

Généralement, les méthodes d'identification historiques appliquées en routine dans les laboratoires de microbiologie sont des méthodes dites conventionnelles et reposent essentiellement sur des tests phénotypiques et/ou biochimiques. Ces méthodes utilisent un nombre relativement faible de caractères considérés comme importants, tels que certains caractères phénotypiques majeurs (coloration, morphologie, mobilité, présence de spores, croissance en aérobiose/anaérobiose...) et biochimiques (assimilation et fermentation des sucres, équipement enzymatique...). Le pouvoir discriminant des méthodes conventionnelles reste assez limité et présente un délai d'identification d'environ 1 à 3 jours. Ce délai peut retarder le diagnostic et la prescription d'une antibiothérapie adaptée. Ces méthodes sont

limitées également par la grande diversité des microorganismes et par leur évolution rapide. De plus, elles donnent seulement une identification au niveau du genre et/ou de l'espèce et elles ne sont pas applicables pour une identification au niveau de la sous-espèce (typage), ce qui peut être important lors de la suspicion de situations épidémiques dans le domaine médical. Les tests utilisés peuvent être contaminés durant le processus d'identification ou difficile à lire, donnant un résultat douteux, (ii) Le phénotype d'une espèce donné dans la description des espèces n'est pas une propriété absolue et elle peut montrer une variabilité presque remarquable. Dans beaucoup de cas, seulement quelques souches ont été étudiées pour la description originale d'une espèce et pour cela cette variabilité n'est pas prise en compte dans le schéma d'identification. Les tests utilisés peuvent être contaminés durant le processus d'identification ou difficile à lire, donnant un résultat douteux, (ii) Le phénotype d'une espèce donné dans la description des espèces n'est pas une propriété absolue et elle peut montrer une variabilité presque remarquable. Dans beaucoup de cas, seulement quelques souches ont été étudiées pour la description originale d'une espèce et pour cela cette variabilité n'est pas prise en compte dans le schéma d'identification. Au cours des dix dernières années, des méthodes génotypiques basées sur la détection du polymorphisme de l'acide nucléique (ADN) ont été proposées en utilisant des techniques de biologie moléculaire. Ces techniques moléculaires sont applicables à la plupart des microorganismes. Leur pouvoir de discrimination est généralement élevé par rapport aux techniques phénotypiques et elles constituent les méthodes actuelles de typage permettant une approche plus fine lors d'enquêtes épidémiologiques. Cependant, ces méthodes génotypiques ont également leurs limites, à savoir la complexité des protocoles, le savoir-faire nécessaire pour maîtriser ces systèmes, le coût des réactifs, l'utilisation de sondes ou de séquences nucléotidique spécifiques pour chaque espèce et enfin le délai important nécessaire pour l'identification. Il faut noter également qu'il n'existe pas de méthode moléculaire générale pour tous les microorganismes et pour la majorité de ces techniques moléculaires, leur valeur comme outils épidémiologiques n'a été que partiellement établie. Ces difficultés ont conduit au développement de méthodes alternatives, le plus souvent des méthodes biophysiques. Les techniques spectrométriques se sont particulièrement développées telles que la spectrométrie de masse type MALDI-TOF, ESI-TOF. La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse de la matière en fonction de la masse de ses constituants. Les informations issues de la spectrométrie de masse se présentent sous forme de spectres d'absorption. Cette technique a initialement constitué un outil très puissant dont dispose les chimistes pour identifier et caractériser la structure de nombreux composés organiques et inorganiques. Actuellement, la spectrométrie de masse est appliquée à l'étude des échantillons biologiques à l'échelle moléculaire (lipides, protéines, polysaccharides et ADN...), cellulaire (bactéries, levures et

cellules...) et tissulaire (peau, aorte, cerveau, sein, colon et divers organes...). Dans le domaine de la microbiologie, les applications ont porté essentiellement sur la taxonomie, l'identification, le typage, l'interaction médicament-cible, l'analyse de biofilms et le suivi de la fermentation.

Au sein de l'unité EA 4438 la spectrométrie de masse type MALDI-TOF a été particulièrement appliquée à l'identification et la caractérisation des bactéries et des levures et champignons d'origine clinique.

En raison de la grande diversité des molécules et des macromolécules présentes dans les cellules, le spectre de masse d'une bactérie est assez complexe. L'analyse à l'œil nu d'un grand nombre de spectres devient presque impossible. De plus, les éléments spectraux discriminants les plus efficaces pour l'analyse sont généralement masqués par la diversité et la variabilité moléculaire de la cellule. Ces contraintes rendent nécessaire l'emploi de nouvelles méthodes d'analyse et d'extraction de ces éléments discriminants basées essentiellement sur des calculs statistiques multivariés. Parmi celles-ci, on peut citer l'analyse discriminante, l'analyse hiérarchique en cluster et l'analyse en composantes principales. Plusieurs sociétés ont pris l'initiative de développer des algorithmes dans cette direction pour rendre l'identification plus rapide. Le cas de Bruker Daltonics qui ont développé le logiciel Biotyper qui sert à ajuster les spectres, les aligner, et puis à calculer le taux de similarité des spectres, ce taux qui se traduit par un nombre logarithmique entre 0 et 3. Quand ce taux est entre 1.7 et 3, nous pouvons déduire qu'il s'agit de spectres identiques au sein de la même espèce et quand ce nombre est en dessous de 1.7 les spectres sont différents et il s'agit de deux espèces différentes.



Depuis plus de 8000 ans, les micro-organismes ont fourni à l'homme de la nourriture et de la boisson sans qu'il ait toujours connaissance de leur présence. Mais, ils sont aussi responsables de sa mort par le biais "des maladies infectieuses".

Les découvertes en microbiologie ne furent pas faciles à admettre. En effet l'on a cru pendant longtemps à la génération spontanée : c'est à dire que les êtres vivants pouvaient se développer à partir de la matière inerte. Ainsi Aristote pensait que les invertébrés simples étaient apparus par génération spontanée. Après la mise en évidence des microorganismes, de nombreux travaux débutèrent sur les maladies infectieuses.

Cette introduction illustrera brièvement le début de la bactériologie, les différentes étapes de la bactériologie clinique, et les différents marqueurs d'identification bactérienne. Ces derniers permettront de restituer l'importance d'une nouvelle technologie utilisée pour l'identification bactérienne, rapide et fiable. La protéomique fit son apparition il y a un demi-siècle. Nous en restituerons un bref historique puis, ses applications à l'identification bactérienne apparaîtront comme un objectif de la thèse.

I. INTRODUCTION

1. Généralités

1.1. La bactérie

Les bactéries constituent la forme de vie la plus ancienne, actuellement définissable, de cellule vivante. Des études portant sur des empreintes fossiles et l'analyse génétique des bactéries terrestres actuelles permettent d'estimer que les bactéries existaient déjà en tant que telles il y a plus de trois milliards d'années[8] [9] . Les bactéries font partie des cellules procaryotes avec les cyanobactéries.

Elles se distinguent des cellules eucaryotes, végétales et animales, non seulement par leur petite taille (de l'ordre du micromètre contre environ dix micromètres pour la moyenne des cellules eucaryotes), mais aussi par leur structure

(essentiellement l'absence de membrane nucléaire séparant le chromosome bactérien du cytoplasme) et leur mode de division[10] . Cette distinction entre cellule procaryote et cellule eucaryote serait apparue au cours de l'évolution, à partir d'une cellule ancestrale commune, qui, dans le cas des bactéries, aurait gardé sa petite taille et aurait acquis une paroi, alors que dans le cas des cellules eucaryotes elle aurait augmenté de taille en même temps que des organites particulières se différenciaient à l'intérieur de la cellule (noyau, mitochondries, plastes chez les végétaux, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, etc.[11] [12] . Certaines hypothèses évoquent la possibilité que les mitochondries soient originellement des bactéries ingérées par des cellules eucaryotes (théorie endo-symbiotique) et qui en seraient devenues un élément intégré [13] [14] . Les bactéries se distinguent des virus, qui sont généralement de taille inférieure, essentiellement par l'existence en elles à la fois d'acide ribonucléique et d'acide désoxyribonucléique, alors que les virus n'ont qu'un seul type d'acide nucléique, et par le fait que les virus sont incapables de réplication autonome. Contrairement aux virus qui sont des parasites intracellulaires obligatoires des cellules eucaryotes ou procaryotes (virus de bactéries ou bactériophages), les bactéries peuvent généralement se

"Biologists agree that the ancestor of mitochondria was an alpha-proteobacterium." [13][13]

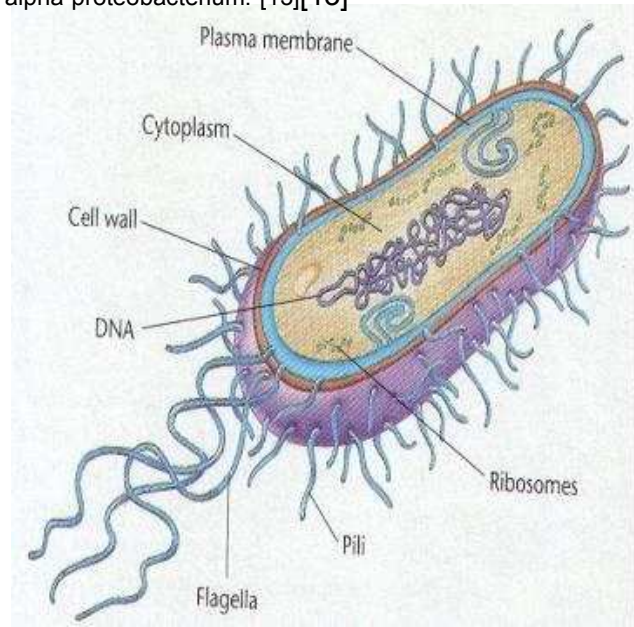


Figure 1 : Une cellule bactérienne

Madigan, M.T. Martinko and J. Parker. 2003. Biology of Microorganisms

répliquer dans des milieux inertes indépendamment de la présence de cellules vivantes[15] [16] [17] . La diversité du monde bactérien est essentiellement due à l'extrême variété des fonctions bactériennes plutôt qu'à d'importantes différences structurelles ou morphologiques. Les bactéries jouent un rôle dominant dans les mécanismes biologiques essentiels de transformation de la matière en énergie. Les connaissances acquises en microbiologie permettent même d'exploiter à l'échelle industrielle les fonctions métaboliques de bactéries spécialisées, pour amplifier des mécanismes naturels tels que la fixation de l'azote, la réduction du gaz carbonique en méthane, la production de certaines vitamines, d'antibiotiques, etc.[18] [19] . Les bactéries responsables d'infections des organismes supérieurs ou d'altération des aliments, qui ont été à la base de la naissance de la bactériologie, ne représentent en fait qu'un des aspects de la fonction écologique des bactéries. Chez l'humain, il a été calculé que 10^{12} bactéries colonisent la peau, 10^{10} bactéries colonisent la bouche et 10^{14} bactéries habitent dans l'intestin, ce qui représentent dix fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines dans le corps humain [17] .

1.2. La bactériologie

La bactériologie a pris naissance dans le sillage de la chimie, à partir du milieu du XIX^e siècle. Elle devait devenir en quelques décennies une science autonome sous l'impulsion de trois savants de génie : Louis Pasteur (1822-1895), qui a créé la bactériologie appliquée en ruinant la thèse de la génération spontanée ; Joseph Lister (1827-1913), qui a imposé l'hygiène médicale et développé la chirurgie en conditions antiseptiques, et Robert Koch (1843-1910), qui a mis au point la technologie des cultures microbiennes en milieu aseptique[20] .



Figure 2 : Louis Pasteur (1822-1895) : Dans cette représentation Pasteur observe dans un bocal une moelle épinière de lapin enragé, suspendue en train de se dessécher au-dessus de cristaux de potasse. C'est le processus qui a permis d'obtenir le vaccin contre la rage.

1.2.1. Avant Pasteur

À la fin du XV^e siècle, apparaissent les premières idées « modernes » sur les maladies infectieuses. Elles concernent surtout la syphilis : Ulsénius, en 1496, en affirme la contagiosité, puis vers 1519, Von Hutten soupçonne, à son origine, de « petits vers ailés » et Paracelse, « de petits germes vivants ». Ces idées, bien que combattues par la majorité des médecins et des savants, amenèrent cependant des mesures de prophylaxie : dès 1500, certaines villes d'Italie avaient institué un contrôle sanitaire des prostituées[21] .

En fait, le premier grand précurseur de la bactériologie fut Jérôme Fracastor, ou Fracastorius, de Vérone. Dans son traité sur les maladies contagieuses, *De contagio et contagiosis morbis* (1546), il affirme l'existence de très petits organismes vivants, invisibles, capables de se reproduire et de se multiplier, qu'il appelle *contagium vivum*, ou *seminaria contagionis*. Il les rend responsables de la syphilis et de la tuberculose : trois siècles avant Pasteur, apparaît ainsi, pour la première fois, la notion de microbes pathogènes[22] .

Fracastor pose également les premières bases de l'épidémiologie, en expliquant la contagion : transmission interhumaine par le contact, et transmission à distance par l'air. Ces conceptions sont véritablement révolutionnaires, et rares en sont leurs défenseurs, comme Montanus, à Pavie, puis à la fin du xvi^e siècle, Ingrassia et Alpino. Les applications pratiques à l'hygiène collective et à la prophylaxie individuelle sont pratiquement inexistantes ; bien sûr, on isolait lépreux et pestiférés, mais sans aucune raison précise de le faire, puisqu'aucune base scientifique n'étayait concrètement ces théories[23] . C'est alors qu'apparaissent les premiers microscopes ; formés d'une seule lentille, ce sont plutôt de fortes loupes ; peu à peu ils se perfectionnent, et aboutissent au dispositif actuellement utilisé qui combine plusieurs lentilles[24] .

La première mention d'une observation microbienne directe remonte à 1659 : Athanase Kircher croit voir de minuscules vers dans le sang des malades atteints de la peste. Il semble cependant douteux que Kircher ait pu observer un bacille pesteux avec le microscope grossier dont il disposait. Puis apparaît le véritable précurseur, le Hollandais Antoine Van Leeuwenhoek. Passionné d'optique, il se consacre bientôt à la fabrication d'appareils de plus en plus perfectionnés. Sous le nom général d'« infusoires », il décrit non seulement des protozoaires, mais aussi des bactéries. C'est ainsi qu'il observe, vers 1680, dans le tartre dentaire « de petits animalcules se mouvant de façon charmante »[22] [23] [24] .

Cinquante ans plus tard, un Italien, Spallanzani, fait faire un nouveau bond en avant à l'étude des microbes. En voulant démontrer qu'ils ne se forment pas spontanément, mais proviennent d'autres microbes préexistants, Spallanzani aboutit à trois découvertes capitales. Tout d'abord, il réussit le premier à cultiver des bactéries dans des flacons contenant du jus de viande, un siècle avant Pasteur. Il réfute la thèse de la génération spontanée : les microbes

n'apparaissent, dans le jus de viande bouilli, que si le flacon est en contact avec l'air ; ce sont les germes de l'air qui contaminent le liquide. Enfin, poussant plus loin l'observation, il parvient à isoler un seul microbe dans une goutte d'eau, et le voit, au microscope, se diviser sous ses yeux, donnant naissance à deux, puis quatre descendants ; il a découvert la division par scissiparité[24] .

Malheureusement, ces brillantes découvertes n'ont pas de suite, et la bactériologie, à peine naissante, tombe dans un demi-sommeil de près d'un siècle. Certes, des descriptions précises de micro-organismes sont faites, tentant d'individualiser différentes espèces (observations de Brassi, Pollender, C. J. Davaine), mais ce sont des études purement morphologiques, et aucun progrès n'est possible tant que l'on ne sait pas cultiver les bactéries de façon pratique[24] [22] [25] . Bien sûr, aussi, les théories selon lesquelles des animalcules sont responsables des maladies progressent ; Von Plenciz insiste sur le rôle d'un « germe vermiculé » spécifique de chaque maladie infectieuse (1762). Mais, fait curieux, aucune relation n'est faite, à cette époque, entre ces théories, d'une part, et les micro-organismes observés, d'autre part[23] .

Vers la fin de cette période, en 1844, un médecin viennois, I. F. Semmelweis, est tout près de la grande découverte. Il pressent l'origine infectieuse et le mode de contagion de la fièvre puerpérale, qui décimait les accouchées dans les hôpitaux. Il incrimine sa transmission par les mains des internes qui soignent ces femmes après avoir fait des autopsies et il impose la désinfection des mains à l'hypochlorite, ce qui réduit beaucoup la mortalité. Mais c'est un tollé ; on le traite de fou[21] [22] [24] .

1.2.2. Pasteur & Koch

Pasteur vient à la bactériologie par ses études sur les fermentations ; il pense en effet qu'il s'agit de processus biologiques, et non d'un mécanisme purement chimique, et il va s'efforcer de le démontrer. Dans son premier mémoire, en 1857, il décrit le ferment lactique comme un organisme vivant, visible au microscope sous l'aspect d'un petit bâton, et capable de se développer dans certains milieux de culture artificiels. À l'occasion de ces travaux, Pasteur a donc mis au point des techniques de culture des microbes en milieux liquide. Il démontre ensuite que la fermentation alcoolique est due à un autre organisme vivant, une levure.



Figure 3 : Louis Pasteur (1822-1895)
par le photographe NADAR

Puis, pendant plusieurs années, il étudie divers ferments, et les différencie par leurs caractères de culture et leurs besoins nutritionnels ; ce sont les premiers essais de classification biochimique des micro-organismes. Des recherches sur la maladie des vers à soie (1865) conduisent alors Pasteur à étudier la pathologie d'origine microbienne. Des vétérinaires et des médecins avaient signalé dans le sang d'animaux charbonneux, des bâtonnets vivants microscopiques dont le rôle était bien contesté. Pasteur démontre que ces êtres vivants, cultivables au laboratoire, inoculables à l'animal, sont pathogènes, c'est-à-dire responsables de la maladie[25] [26] .

Koch, travaillant indépendamment, arrivait aux mêmes conclusions. Puis ce sont les découvertes de nombreux microbes : vibron septique, staphylocoque (1878), streptocoque (1879) responsable de cette fameuse fièvre puerpérale dont s'était occupé Semmelweis. Enfin, assisté de trois médecins, E. Roux, Chamberland et Joubert, Pasteur découvre la possibilité d'immuniser contre une maladie par l'injection du microbe atténué : des cultures vieilles d'une bactérie entraînent, chez l'animal, une maladie peu grave ; mais cet animal est devenu réfractaire au microbe virulent : il est immunisé. C'est le principe des vaccinations[27] [28] [29] [30] .

Koch développait, plus méthodiquement que Pasteur, les techniques microbiologiques : colorations spécifiques des bactéries, milieux de culture adaptés aux différents microbes, culture sur milieux solides permettant d'obtenir des colonies isolées des germes. On lui doit, entre autres, deux découvertes capitales : celle du bacille de la tuberculose, qu'il réussit à isoler et à cultiver, en 1882, après bien des difficultés, et celle du germe du choléra. Les élèves de R. Koch, dont F. Löffler et E. A. Von Behring, poursuivirent son œuvre ; leurs travaux sur le bacille diphtérique et sa toxine furent d'une importance majeure.

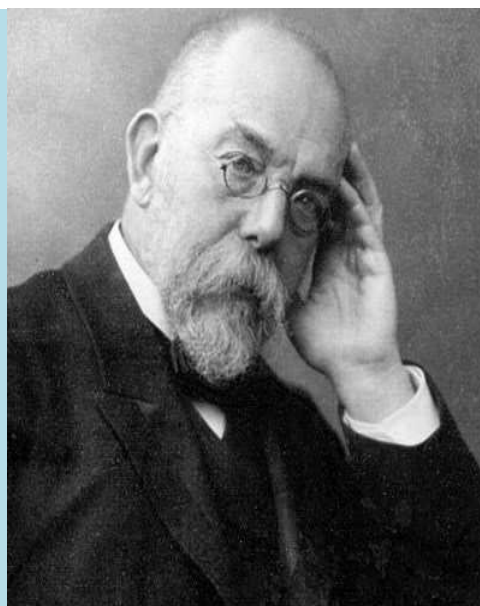


Figure 4 : Robert Koch (1843-1910)

Ainsi, en quelques années, furent découverts la plupart des agents microbiens responsables de maladies infectieuses ; on s'aperçut même que certains de ces germes étaient trop petits pour être vus au microscope ; on les appela « ultravirus », ou virus « filtrants », car ils passaient au travers des membranes ou des filtres qui retenaient habituellement les microbes. L'un d'eux, le virus de la rage, fut cependant cultivé par passage sur animal vivant, ce qui permit à Pasteur de préparer le vaccin antirabique, bien qu'il n'ait jamais pu observer cet agent[29] [31] .

Dans les années qui suivirent, le perfectionnement des méthodes de culture et d'identification des bactéries permit la mise au point de nombreux sérums et vaccins, progrès considérables dans la lutte contre les grandes épidémies.

1.2.3. Vingtième Siècle

Certes, on découvre encore à l'heure actuelle de nouveaux agents pathogènes, tel le bacille de la « maladie des légionnaires » ou de l'ulcère gastrique ; mais on assiste surtout à une série de grandes nouveautés dans le domaine de la technologie et de la biologie moléculaire. Ainsi, l'avènement des antibiotiques révolutionne le pronostic de maladies jusque-là mortelles. L'apparition de la microscopie électronique[32] [33] , puis le perfectionnement des méthodes biochimiques (en particulier l'immunochimie) apportent sans cesse de nouvelles connaissances dans l'ultrastructure de la cellule bactérienne. Les travaux de génétique effectués sur les bactéries par O. T. Avery[34] , J. Lederberg et E. L. Tatum[35] , F. Jacob et E. Wollmann[36] , A. Kornberg[37] et d'autres, permettent peu à peu de décrypter le code et la régulation génétiques ; leur portée est immense, puisqu'elle touche à l'essence même des processus vitaux. L'immunologie, enfin, progresse à grands pas, et la connaissance des moyens de défense de l'organisme déborde largement l'étude des microbes, et débouche, entre autres, sur les greffes d'organes et l'approche immunologique du traitement des cancers.

2. *Bactériologie médicale*

La bactériologie médicale, comme d'autres sciences, est étroitement liée à l'évolution des techniques. Malgré des intuitions parfois anciennes sur l'origine infectieuse de certaines maladies (Fracastor et ses théories sur la contagion, au xvi^e siècle, Semmelweis et son concept sur la transmissibilité de la fièvre puerpérale dans les maternités de Vienne en 1844), ce sont des faits d'observation puis des faits expérimentaux (grâce à la mise au point de l'outil essentiel, le microscope, dont A. Van Leeuwenhoek est l'inventeur indiscuté) qui ont permis d'aboutir à la véritable révolution microbiologique de l'ère pasteurienne. Une liste chronologique, non exhaustive, des découvertes de quelques bactéries agents de maladies infectieuses dominantes, de leur pouvoir pathogène et des mécanismes de défense de l'hôte infecté, montre comment en quelques décennies de la seconde moitié du xix^e siècle est née la bactériologie médicale [Tableau 1:Chronologie des principales découvertes de la bactériologie (avant le vingtième siècle)].[21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31]. L'abord de la bactériologie médicale est indissociable des études de microbiologie générale et de biologie moléculaire qui ont permis de décrire la physiologie et la génétique des bactéries.

Tableau 1: Chronologie des principales découvertes de la bactériologie (avant le vingtième siècle)

1546	Jérôme Fracastor (Fracastorius)	Il affirme l'existence de très petits organismes vivants, invisibles, capables de se reproduire et de se multiplier, qu'il appelle <i>contagium vivum</i> , ou <i>seminaria contagionis</i> . Fracastor pose également les premières bases de l'épidémiologie, en expliquant la contagion : transmission interhumaine par le contact, et transmission à distance par l'air
1659	Athanase Kircher	La première mention d'une observation microbienne directe. Kircher croit voir de minuscules vers dans le sang des malades atteints de la peste
1680	Antoine Van Leeuwenhoek	Il décrit non seulement des protozoaires, mais aussi des bactéries, il observe dans le tartre dentaire « de petits animalcules se mouvant de façon charmante »
1730	Spallanzani	Il réussit le premier à cultiver des bactéries dans des flacons contenant du jus de viande, ce sont les germes de l'air qui contaminent le liquide. Il parvient à isoler un seul microbe dans une goutte d'eau, et le voit, au microscope, se diviser sous ses yeux, donnant naissance à deux, puis quatre descendants ; il a découvert La division par scissiparité
1762	Von Plenciz	insiste sur le rôle d'un « germe vermiculé » spécifique de chaque maladie infectieuse
1844	I. F. Semmelweis	Traité de fou, il pressent l'origine infectieuse et le mode de contagion de la fièvre puerpérale, qui décimait les accouchées dans les hôpitaux. Il incrimine sa transmission par les mains des internes qui soignent ces femmes après avoir fait des autopsies et il impose la désinfection des mains à l'hypochlorite
1848	Devaine	Voit des bacilles dans le sang des animaux atteints du charbon
1856	Pasteur	Entrepren des travaux sur les fermentations et détruit le concept de génération spontanée
1860	Lister	Entrepren des travaux sur la désinfection des plaies
1865	Villemin	Reproduit la tuberculose chez le cobaye
1874	Hensen	Découvre le bacille de la lèpre
1876	Koch	Découvre les spores du bacille du charbon
1879	Pasteur	Démontre le rôle de la bactérie charbonneuse comme agent responsable exclusif du charbon
1879	Neisser	Décrit le gonocoque
1880	Pasteur	Etudie le choléra des poules et découvre les vaccins atténués
1880	Eberth	Découvre le bacille de la typhoïde
1881	Koch	Invente la séparation des bactéries par culture sur milieux solides
1882	Koch	Découvre le bacille de la tuberculose
1882	Metchnikoff	Décrit la phagocytose et les cellules phagocytaires
1883	Klebs	Découvre le bacille de la diphtérie
1883	Malassez et Vignal	Découvrent le bacille de la pseudo-tuberculose
1884	Nicolaïer	Découvre le bacille du Tétanos
1884	Koch	Isole le vibron cholérique
1884	Rosenbach	Décrit le Streptocoque

Ces études ont conduit à mettre au point les procédés d'isolement, d'identification, de typage et la caractérisation des propriétés de virulence, de pathogénécité, de résistance aux agents antimicrobiens, etc...

2.1. Culture et isolement des bactéries

La première étape du diagnostic bactériologique est l'obtention, en culture pure, de la souche bactérienne responsable des dommages observés chez le malade, pour pouvoir ensuite l'étudier. Durant le processus infectieux, les bactéries se sont adaptées aux conditions de vie chez l'hôte, leur prélèvement va consister à les transférer dans un environnement différent où elles risquent de ne pas survivre. Cela impose, d'une part, un délai très bref entre la collecte du produit à analyser et la mise en culture au laboratoire, et, d'autre part, l'utilisation d'un milieu de culture à la composition et à la température d'incubation aussi proches que possible de celles du milieu naturel d'origine (différentes sécrétions ou tissus de l'hôte infecté, sérosités, pus, sang, biopsies d'organes, etc...). Comme les exigences particulières des bactéries dont la présence est soupçonnée sont encore inconnues à ce stade du diagnostic, la règle est d'ensemencer divers milieux empiriques, enrichis ou non en facteurs de croissance (sang ou extraits sanguins, par exemple) et, dans le cas d'associations bactériennes multiples, d'utiliser des milieux sélectifs (Drigalski) contre les bactéries commensales, pour favoriser ainsi la croissance spécifique des bactéries pathogènes incriminées à priori.

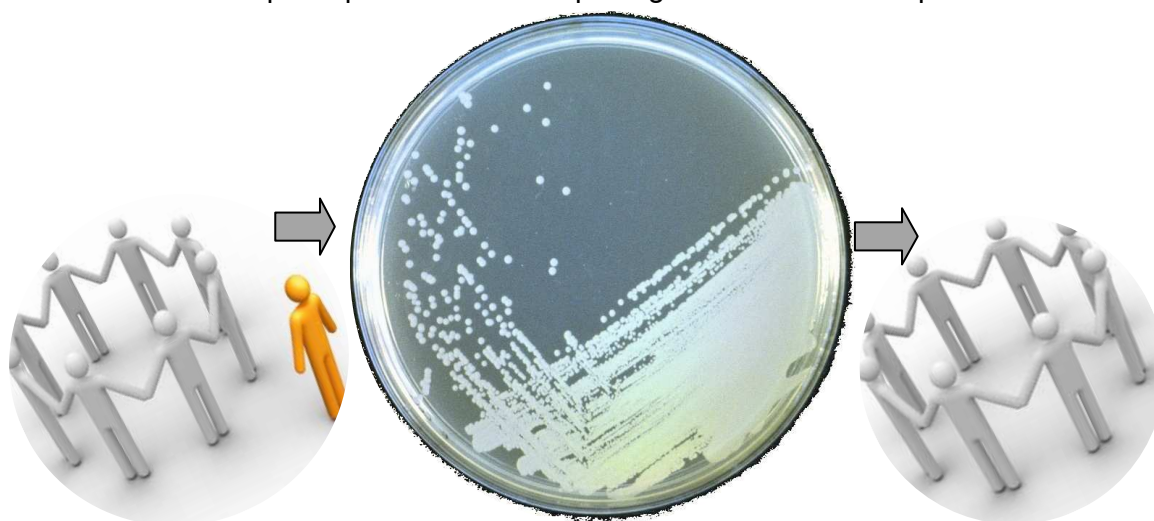


Figure 5 : Isolement de bactéries sur une gélose Mueller-Hinton, après un examen microscopique et une coloration de Gram.

Certaines bactéries ne sont pas cultivables en milieu artificiel ; les bactéries parasites intracellulaires obligatoires (Chlamydiales, Rickettsies) sont isolées par ensemencement sur cultures de cellules eucaryotes, mais d'autres telles que *Treponema pallidum* (agent de la syphilis) ou *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre) et sans doute d'autres agents encore

insoupçonnés ne bénéficient, à ce jour, pas encore de milieu défini permettant leur croissance *in vitro*[38] [39] .

Les milieux sont de différents types. Il s'agit soit de milieux de base permettant la croissance de micro-organismes non ou peu exigeants, soit de milieux enrichis par l'addition de diverses substances (sérum, œuf, sang, vitamines, etc.) qui autorisent la croissance de bactéries plus exigeantes. Il peut s'agir également de milieux rendus sélectifs par addition d'antibiotiques, antiseptiques ou de colorants qui vont inhiber les bactéries sensibles à ces composés. Les milieux d'isolement, contrairement aux milieux de culture, sont des milieux solides qui permettent d'obtenir des colonies isolées.

Les différents milieux de culture utilisés sont indispensables non seulement pour la croissance et la multiplication du pathogène d'intérêt, mais aussi pour permettre par la suite une identification bactérienne et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure. Certains milieux de culture solides (milieux chromogènes) qui grâce à la mise en évidence d'activité enzymatique, permettent l'identification directe de certaines espèces bactériennes, ou l'orientation vers certains groupes de bactéries. Les chromogènes sont des substrats artificiels incolores directement incorporés dans la gélose, qui libèrent des composés colorés directement visibles après dégradation enzymatique (Par exemple, l'activité β -galactosidase produite par *E. coli* produit des colonies roses à pourpres translucide). Ces milieux sont adaptés à l'isolement, l'identification et à la numération des germes urinaires notamment, à titre d'exemple on peut citer, le milieu CHROMagar Orientation® (Becton Dickinson), le milieu CPS ID3® (bioMérieux), UriSelect 4®(Bio-Rad) ou UTI® (Oxoïd). D'autres chromogènes sont développés pour le dépistage du portage génital de *Streptococcus agalactiae*, du portage nasal de *S. aureus* résistant à l'oxacilline, le dépistage des bactéries multi-résistantes ou la recherche de Salmonelles à partir de selles.

2.2. La classification des bactéries

En bactériologie clinique, il est important d'identifier avec précision les souches bactériennes isolées au cours des processus infectieux. En effet, la croissance d'une bactérie permet déjà de prévoir le pouvoir pathogène d'une souche, son appartenance à la flore commensale ou à l'environnement, sa sensibilité aux antibiotiques, etc. De plus, beaucoup de marqueurs d'identification sont également des traceurs épidémiologiques.

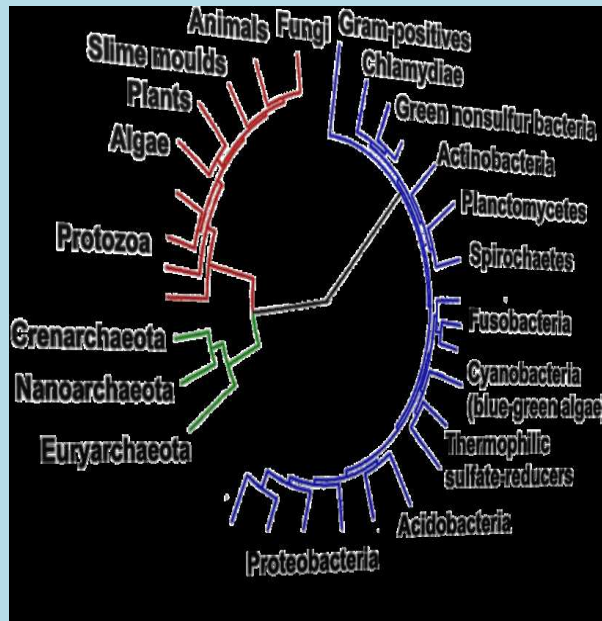


Figure 6 :Arbre phylogénétique montrant la diversité des bactéries, comparées aux autres organismes. Les eucaryotes sont colorés en rouges, les archaea en vert et les bactéries en bleu [14] [8] .

Identifier une bactérie, c'est déterminer à quel groupe taxonomique (taxon) elle appartient. La définition des groupes taxonomiques et les rapports qu'ils ont entre eux (classification bactérienne) sont périodiquement remis à jour dans des ouvrages de référence comme le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

L'unité taxonomique de base est l'**espèce bactérienne**. En toute rigueur, les souches appartenant à une même espèce, dérivent d'un ancêtre commun et possèdent des structures génétiques très voisines (**genospecies**). Les structures génétiques n'étant pas facilement accessibles à l'analyse, on regroupe en général les souches dans des **phenospecies** (ou **taxospecies**) sur la base de leurs caractères phénotypiques et de leur adaptation écologique. Pour des raisons pratiques on peut également être amené à regrouper des bactéries en fonction d'une propriété importante en bactériologie médicale (bactéries entérotoxigènes, bactéries productrices de bêta lactamases, etc.

Les espèces bactériennes sont regroupées sur des bases moins rigoureuses en genres et en familles. Elles peuvent être subdivisées en sous-espèces ou biovars et en sérotypes[40] [41] [42] [43] .

2.3. L'identification bactérienne

Les bactéries susceptibles d'être rencontrées en bactériologie clinique sont en nombre relativement restreint (quelques centaines sont pathogènes) en regard de la grande complexité du monde bactérien. De plus, le diagnostic est très souvent orienté par la nature de l'infection et le type de prélèvement. Le plus souvent, le bactériologiste aura un choix à faire parmi les bactéries présentes à l'isolement et il n'identifiera avec précision que celles qui peuvent jouer un rôle dans le processus infectieux.

Il n'est pas toujours nécessaire de pousser très loin le diagnostic. L'espèce et parfois le sérotype sont presque toujours suffisants. Par contre, les méthodes de diagnostic choisies devront être rapides et permettre de donner un diagnostic présomptif approché 24 heures après le prélèvement, un diagnostic définitif et un antibiogramme interviennent 24 à 48 heures plus tard.

La démarche diagnostique se fait généralement en 3 étapes :

Diagnostic d'orientation,

Diagnostic d'espèce,

Détermination de marqueurs épidémiologiques ou utiles au traitement (sérotype, Biovar, antibiotype ...).

- Le diagnostic d'orientation commence par le repérage des divers types coloniaux sur les milieux d'isolement. Chacune des souches reconnues devra être classée dans un groupe taxonomique, généralement le genre ou la famille. Pour cette importante étape, on fait appel à des marqueurs fiables et de préférence rapides à obtenir (morphologie, Gram, métabolisme énergétique, mobilité, oxydase, catalase, etc.) l'appartenance à un genre ou une famille sera ultérieurement confirmée par les caractères définissant le groupe taxonomique considéré.

- Le diagnostic d'espèce est réalisé grâce à un plus grand nombre de tests diagnostics. Ces tests sont bien standardisés, de nombreux schémas d'identification existent pour les interpréter et des "Kits" diagnostiques performants sont en vente dans le commerce (API Système par exemple). Pour ces raisons, cette deuxième étape n'offre en général que peu de difficulté si toutefois, la première a été bien menée. En effet, la nature des tests d'identification à pratiquer dépend du groupe bactérien dans lequel le diagnostic a été orienté. Utiliser d'emblée une galerie pour entérobactéries sur un germe qui est peut être un *Pseudomonas* ou une *Neisseria* peut aboutir à une impasse ou à une erreur diagnostique.

- La dernière étape consiste à rechercher des marqueurs pouvant influencer le traitement (antibiotype), permettre une compréhension du rôle pathogène de la souche (recherche d'une toxine) ou constituer des marqueurs épidémiologiques (sérotypes, sérolyses).

Une démarche classique de l'analyse effectuée en laboratoire pour la mise en évidence d'une bactérie, à partir d'un prélèvement est schématisée ci-dessous (Figure 7:Schéma de la démarche de l'analyse bactériologique.).

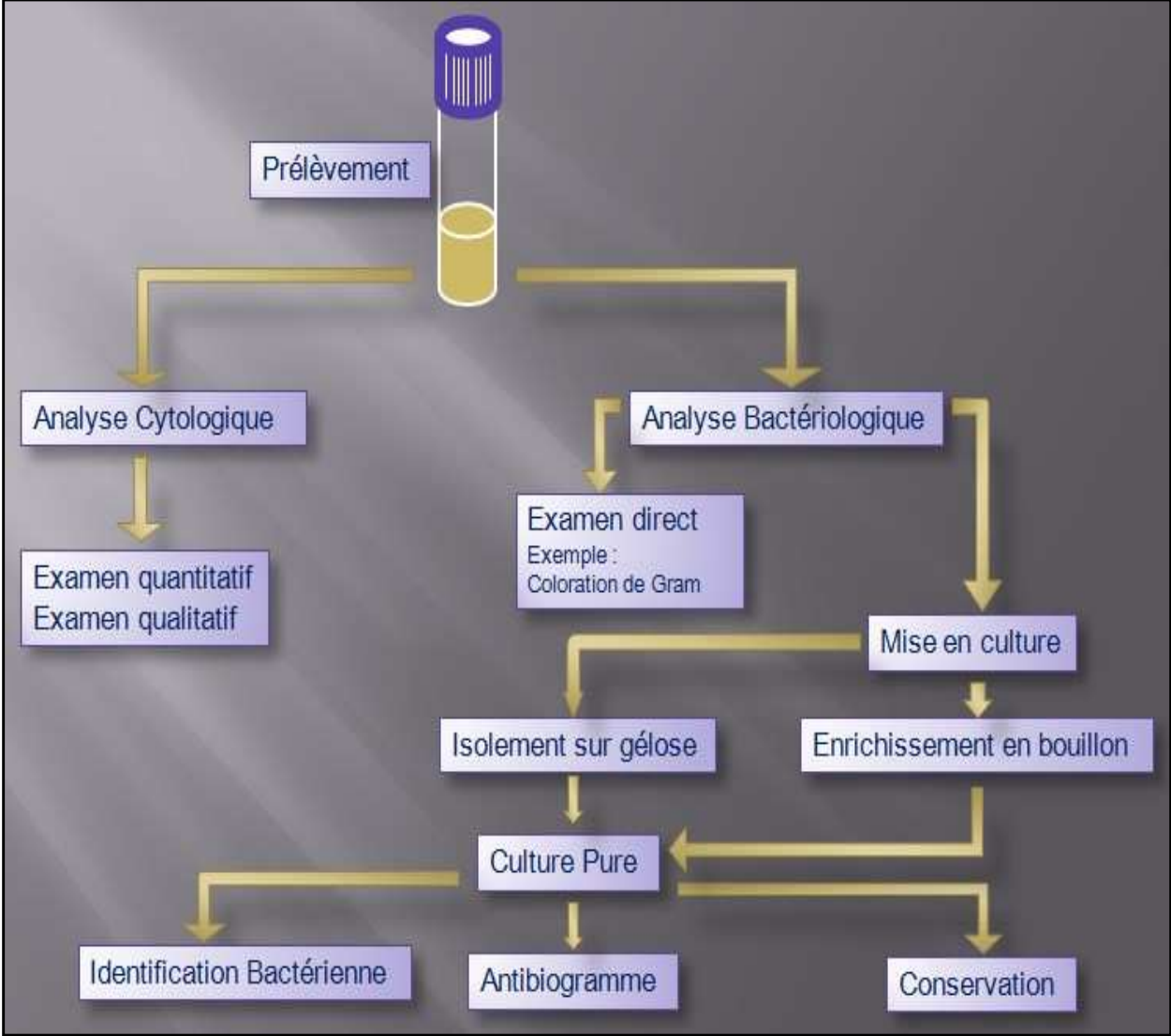


Figure 7:Schéma de la démarche de l'analyse bactériologique.

3. Méthodes d'identification phénotypiques dites conventionnelles

3.1. Identification des principales bactéries en bactériologie clinique

3.1.1. Marqueurs d'identification bactérienne

L'identification d'une bactérie consiste à mettre en évidence un certain nombre de marqueurs taxonomiques (morphologiques, métaboliques, antigéniques, etc.). L'ensemble de ces marqueurs est ensuite comparé à celui des souches types (souches médianes) de chaque espèce définie en taxonomie. La souche étudiée est considérée comme faisant probablement partie de l'espèce avec laquelle elle a plus de caractères en commun[43].

On admet donc que certains marqueurs soient différents de ceux de la souche type ce qui rend compte de la grande variabilité phénotypique des bactéries et également du fait que l'on ne travaille jamais sur des individus isolés, mais sur un grand nombre de cellules bactériennes dont certaines ont pu subir des variations au cours des générations successives donnant naissance à un clone bactérien[44]. En taxonomie, on définit d'ailleurs de "bonnes" et de "mauvaises" espèces. Dans les « bonnes » espèces, la majorité des souches ont des caractères très peu éloignés identiques à ceux de la souche médiane (ex : *S. epidermidis*), alors que dans les « mauvaises » espèces, il existe de nombreuses souches dites excentriques pour lesquelles certains caractères sont différents de ceux de la souche médiane (ex : *E. coli*, *Serratia marcesens*).

Les marqueurs d'identification des bactéries n'ont pas tous le même poids taxonomique. Les plus fiables sont ceux qui conditionnent la survie de l'espèce dans son habitat naturel. Par exemple, la structure pariétale d'une bactérie, le mode d'utilisation des glucides (par voie oxydative ou fermentative), la nature des divers accepteurs finaux d'électrons dans le métabolisme énergétique, sont des caractères importants qui mettent en jeu des voies métaboliques complexes et souvent multigéniques ; on ne peut pas dire qu'une souche fasse partie d'une espèce si l'un de ces marqueurs est en discordance par rapport à la souche médiane. A l'inverse, on peut admettre par exemple qu'un *E. coli* ne soit pas indologène (environ 5% des souches) ou qu'un *Proteus* n'exprime pas d'uréase (environ 10% des souches)[43].

3.1.1.1. Marqueurs structuraux

Ce sont les marqueurs qui rendent compte de la morphologie et de la constitution chimique des cellules bactériennes. La morphologie de la bactérie et la structure générale de sa paroi s'apprécient simultanément grâce à l'observation microscopique après coloration de Gram.

- La coloration de Gram suivie d'un examen microscopique permet de classer les bactéries en deux grands groupes selon la structure générale de leur paroi (bactéries à Gram

positif ou à Gram négatif). Simultanément, il est possible d'observer la morphologie des bactéries (bacilles, coques, spirochètes, etc.), ainsi que le mode de groupement des cellules bactériennes. Ces caractères sont extrêmement importants et fiables.

- Certaines structures peuvent nécessiter des conditions particulières de culture pour être exprimées. C'est le cas des spores (formes de résistances de certaines bactéries) qui n'apparaissent que dans un milieu pauvre ou carencé. Elles peuvent être visualisées au microscope ou mise en évidence grâce à leur thermorésistance.

- La mobilité des bactéries s'apprécie à l'état frais ou en évaluant leur diffusion dans un milieu faiblement gélosé. Ce caractère est lié à la présence de **flagelles** dont le nombre et le mode d'insertion sur la cellule bactérienne sont des caractères importants qui peuvent être mis en évidence par des colorations spéciales (coloration de Rhodes)[45] . L'expression phénotypique de la mobilité est extrêmement variable et dépend souvent des conditions de culture qui devront être bien standardisées pour apprécier ce caractère.

- La sérotypie consiste à mettre en évidence une substance constitutive de la bactérie en utilisant **des anticorps** spécifiques. C'est une façon extrêmement fine d'approcher la structure biochimique des bactéries, dans laquelle on identifie **des épitopes** qui peuvent être communs à des espèces bactériennes très différentes. L'identification sérotypique ne doit donc être utilisée que lorsque la bactérie a déjà été classée dans un groupe bactérien notamment grâce aux marqueurs biochimiques.

- La lysotypie procède également de la reconnaissance spécifique de récepteurs de surface par les bactériophages.

- Sérotypie et lysotypie sont surtout d'excellents **marqueurs épidémiologiques**[46] [47] .

3.1.1.2. Marqueurs cultureux et nutritionnels

Les conditions physico-chimiques nécessaires à la croissance et les besoins nutritionnels de la souche sont des marqueurs faciles à étudier et fiables.

Condition de culture :

Besoin en facteurs de croissance : les facteurs de croissance sont des métabolites essentiels (acides aminés, vitamines, coenzymes bases puriques et pyrimidiques, etc.) que la bactérie doit trouver dans le milieu pour se développer.

La culture en milieu simple non enrichi : permet d'affirmer l'absence de besoins en facteurs de croissance spécifiques (bactéries prototrophes).

La nécessité d'un milieu enrichi : un mélange complexe de diverses substances organiques (extraits globulaires, extraits de levure, mélanges vitaminiques et acides aminés, sang, etc.) permet d'affirmer le besoin en un ou plusieurs facteurs de croissance (bactéries auxotrophes).

La nature des facteurs de croissance peut être déterminée en cultivant la souche dans des milieux ordinaires enrichis en un seul facteur de croissance à la fois.

Les conditions physico-chimiques (température, pH) et le temps nécessaire à la culture, sont également des caractères d'identification importants. L'aspect des cultures et en particulier celui des colonies est très utile pour distinguer les diverses bactéries présentes dans un mélange isolé sur milieu gélosé.

3.1.1.3. Marqueurs métaboliques

Ces marqueurs consistent à déterminer d'une part les **besoins énergétiques et élémentaires** des bactéries et d'autre part à mettre en évidence certaines **enzymes ou voies métaboliques**.

Les méthodes consistent à :

- Démontrer que la souche est capable de croître en présence de tel ou tel substrat comme unique source de carbone et d'énergie (auxanogramme)
- Démontrer que la souche est capable d'utiliser un substrat dans certaines conditions culturales (étude de la voie d'attaque de sucres)
- Rechercher dans une culture le produit final d'un ensemble de réactions métaboliques (acides organiques, hydrogène sulfuré, indole, acétoïne, cadavérine, etc.) ou la disparition d'un substrat (gélatine).

Etude du métabolisme énergétique : La plupart des bactéries rencontrées en médecine tirent leur énergie de l'oxydation de substances énergétiques (bactéries chimio-organotrophes). Ces réactions d'oxydation nécessitent donc des substrats énergétiques donneurs d'électrons (le plus souvent des sucres, utilisés simultanément comme source de carbone) et des accepteurs finaux d'électrons.

L'auxanogramme permet de reconnaître les divers substrats énergétiques utilisables. La souche estensemencée dans un milieu auquel le substrat étudié est ajouté. Une croissance indique l'utilisation du substrat.

Le catabolisme du glucose, pris comme exemple de substrat énergétique, abouti à la formation d'ATP, d'acide pyruvique et de coenzymes réduits qui peuvent être réoxydés par 2 voies :

La voie fermentative dans laquelle les coenzymes réduisent l'acide pyruvique en divers produits de fermentation (alcools, aldéhydes, acides carboxyliques, cétones, lactate, etc.). On dira alors que le glucose est fermenté, ou utilisé par la voie fermentative. Cette voie fonctionne en l'absence d'oxygène (anaérobiose).

La voie oxydative ou respiratoire dans laquelle l'acide pyruvique est dégradé dans le cycle de Krebs et les coenzymes se réoxydent avec production d'ATP en transférant leurs électrons et leurs protons sur la chaîne des cytochromes vers un accepteur final d'électrons.

Cet accepteur peut être l'oxygène, le système ne fonctionne alors qu'en aérobiose (respiration aérobie)

Cet accepteur peut être une autre substance (nitrate, sulfate, acide organique, etc.) et le système fonctionne alors en anaérobiose (respiration anaérobie). On dit que la bactérie "respire les nitrates" (ou les sulfates, etc.) en anaérobiose.

L'étude des voies d'attaque du glucose (ou d'un autre sucre) consiste à étudier la croissance de la bactérie dans un milieu pauvre, faiblement gélosé et supplémenté en glucose (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides ou MEVAG). Ce milieu est désoxygéné par chauffage, ensemencé puis incubé en aérobiose d'une part et en anaérobiose d'autre part. L'attaque fermentative du glucose se traduit par une acidification du milieu incubé en anaérobiose (accumulation d'acides de fermentation). L'attaque oxydative se traduit par une absence d'acidification dans le milieu anaérobie et une croissance avec ou sans acidification dans la zone aérobie du milieu incubé en aérobiose.

L'utilisation des nitrates comme accepteurs d'électrons (respiration des nitrates) peut être recherchée par une bactérie non fermentante. Il suffit de cultiver cette bactérie (normalement aérobie stricte) en anaérobiose (gélose profonde) en présence de glucose (substrat énergétique) et de nitrate (accepteur d'électron). En cas de respiration des nitrates une culture s'observe en anaérobiose.

La réduction des nitrates ne doit pas être confondue avec la respiration des nitrates. Ce test consiste à rechercher après culture dans un bouillon nitraté, la présence de nitrite ou la disparition des nitrates. La réduction des nitrates peut être due à l'enzyme couplé à la respiration des nitrates (Nitrate réductase A) mais également à une nitrate réductase B ayant un rôle dans le métabolisme de l'azote. Une souche qui respire les nitrates possède donc toujours une activité nitrate réductase, mais l'inverse n'est pas vrai.

Les rapports des bactéries avec l'oxygène s'étudient en gélose profonde désoxygénée par chauffage. On distingue :

Les bactéries aérobies strictes qui ne poussent pas qu'en surface (bactérie à métabolisme oxydatif aérobie)

Les bactéries anaérobies strictes qui ne poussent qu'en profondeur (bactéries à métabolisme fermentatif pour lesquelles l'oxygène est toxique),

Les bactéries aéro-anaérobies qui poussent sur toute la hauteur. Ces bactéries possèdent les 2 types de métabolismes ou bien ce sont des bactéries fermentantes insensibles à l'oxygène comme les streptocoques,

Les bactéries microaérophiles qui ne poussent que quelques millimètres sous la surface (bactéries aérobies strictes sensibles aux fortes concentrations d'oxygène).

La réaction de l'oxydase permet la mise en évidence du cytochrome C grâce à l'oxydation de la tétraméthyl-paraphénylènediamine. Le cytochrome C est présent chez beaucoup de bactéries oxydantes mais pas chez toutes.

Une catalase capable de dégrader l'eau oxygénée en eau et oxygène (apparition de bulles d'oxygènes), est présente chez beaucoup de bactéries aérobies ou aéro anaérobies et souvent absente chez les bactéries anaérobies. Cette enzyme sert à la détoxification de l'eau oxygénée apparaissant au cours de certaines réactions métaboliques.

Ces marqueurs ont tous un poids taxonomique important et sont fréquemment utilisés dans les diagnostics d'orientation et de genre[38] .

Recherche de certains enzymes ou voies métaboliques .beaucoup de ces marqueurs ont un poids taxonomique moindre que les précédents mais sont très fréquemment utilisés dans le diagnostic d'espèce. Ces marqueurs consistent à mettre en évidence des activités enzymatiques qui peuvent être recherchées dans une culture en croissance ou après lyse des bactéries libérant les enzymes recherchées. On recherche dans la culture le produit final d'un ensemble de réactions métaboliques (production d'acétoïne, H₂S ou de cadavérine, etc.) ou on évalue la transformation d'un substrat (ONPG, urée, gélatine, etc.) au contact d'une suspension bactérienne.

On peut citer :

L'utilisation des divers sucres avec production d'acides de fermentation et parfois de gaz,

La production d'indole à partir de tryptophane,

La dégradation de l'urée,

Les réactions de désamination ou de décarboxylation des acides aminés,

L'hydrolyse de la gélatine,

La production d'acétoïne par fermentation du glucose[45] .

Etapes de l'identification d'une bactérie

- Diagnostic d'orientation et de genre
- Diagnostic d'espèce
- Sérotypie, Lysotype, biovars, antibiotype

Les différents tests d'orientation phénotypique sont schématisés en dessous (Figure 8, 9,10)

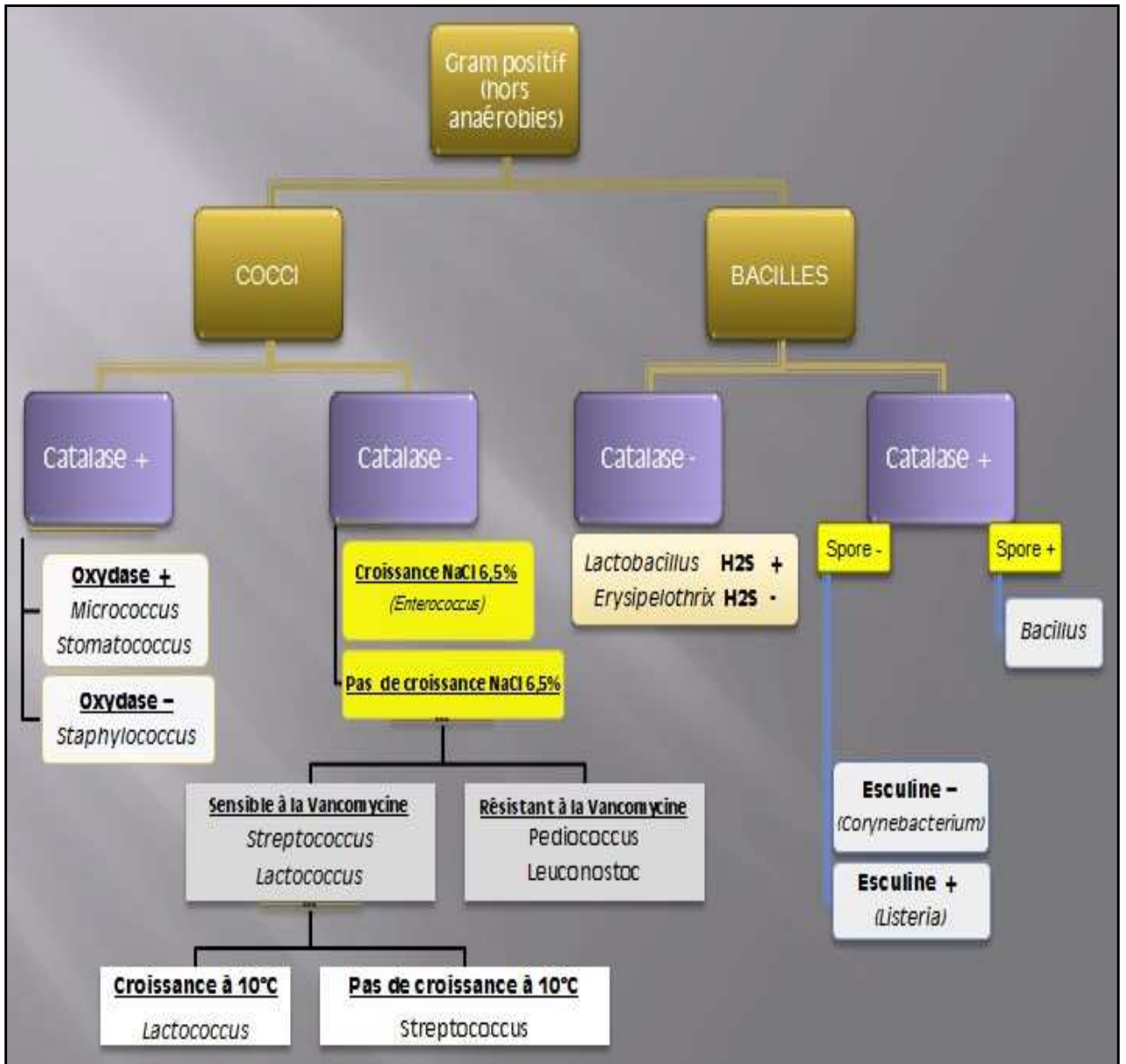


Figure 8 : Les tests d'orientation pour l'identification des bacilles et Cocci à Gram positif

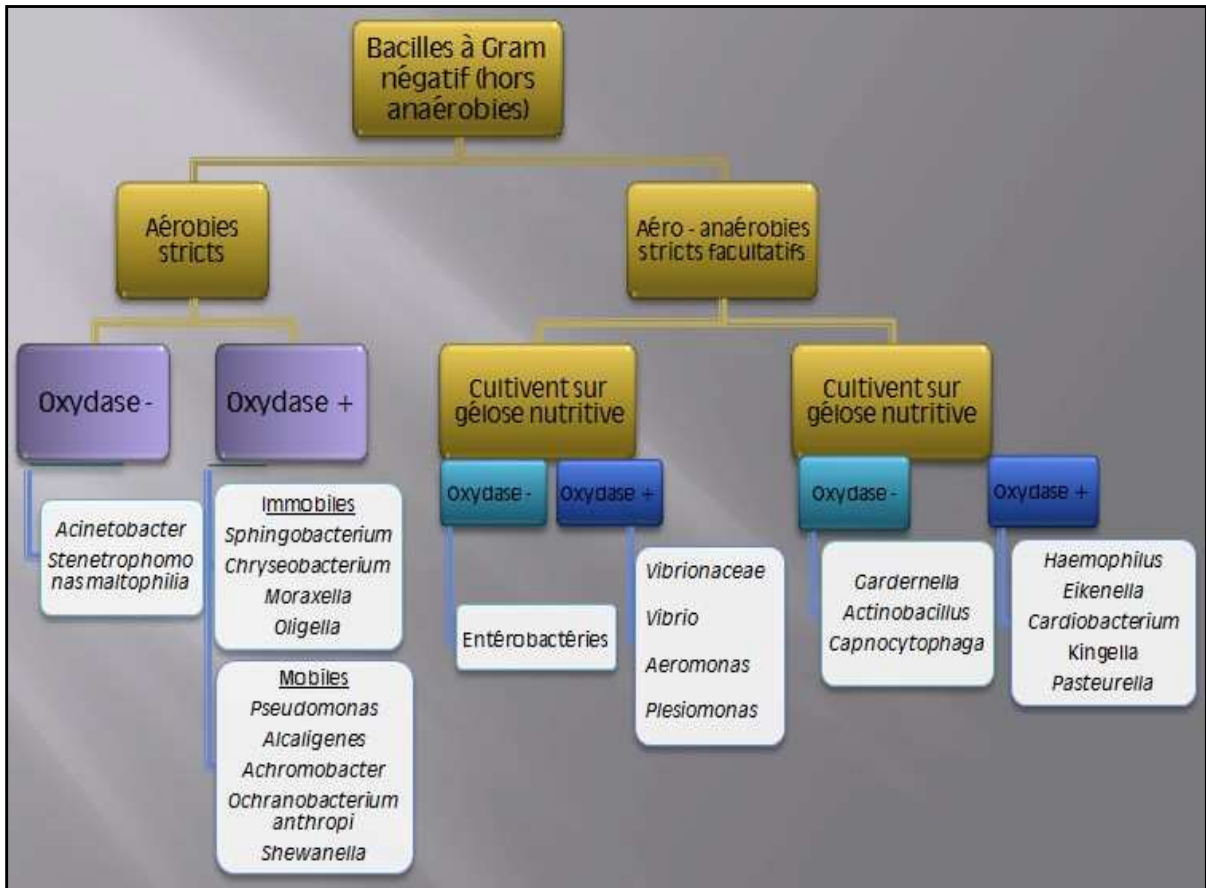


Figure 9: Les tests d'orientation pour l'identification des bacilles à Gram négatif

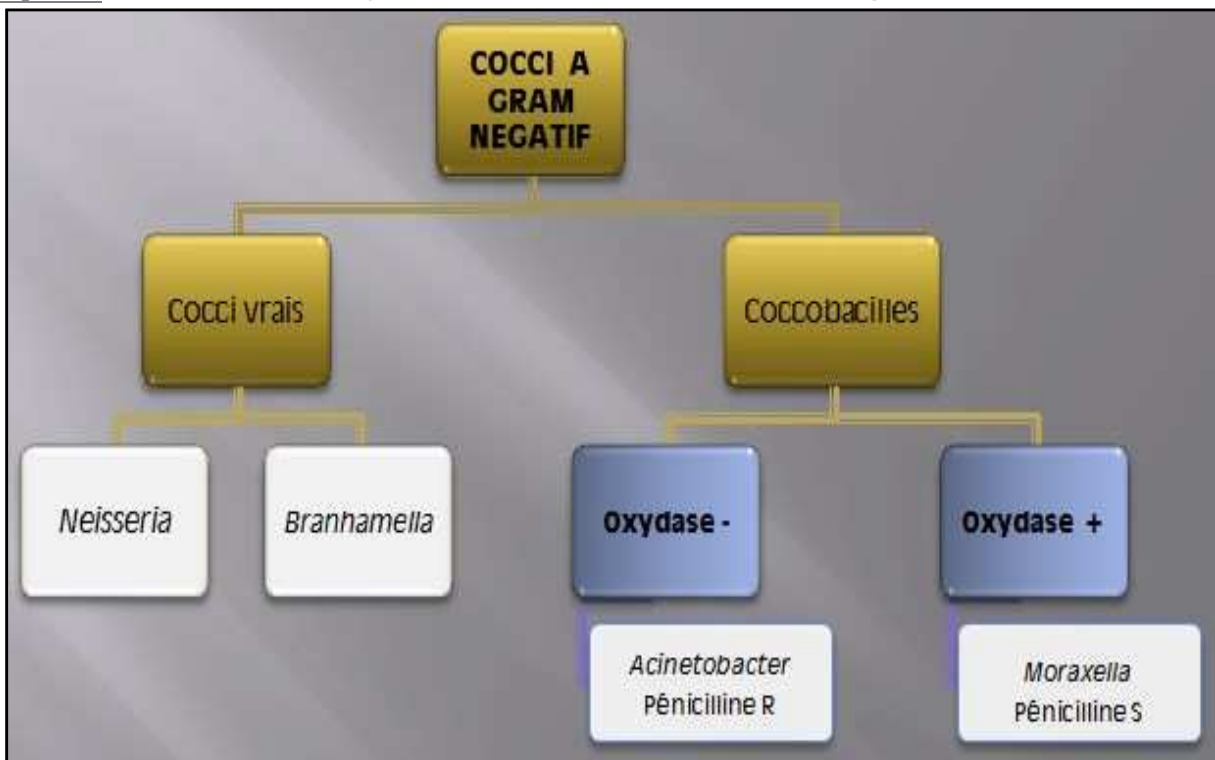


Figure 10: Les tests d'orientation pour l'identification des Cocci à Gram négatif

Dans le tableau suivant, une liste (non exhaustive) des caractères phénotypiques couramment employés pour l'identification bactérienne.

Tableau 2:Caractères utilisés en systématique bactérienne

Observations et tests préliminaires	Coloration (Gram, bleu de méthylène...)
	Morphologie (bacille, coque...etc.)
	Mobilité
	Présence de spores (déformantes, terminales)
	Croissance en aérobiose/anaérobiose
	Hémolyse sur gélose au sang
	Production d'une catalase
Tests métaboliques	Test à l'oxydase
	Test à l'uréase
	Test de l'indole
	Hydrolyse de l'hippurate
	Hydrolyse de l'esculine
	Production d'H ₂ S
Sérologie	Agglutination
	Immunochromatographie
Test d'inhibition	Milieux sélectifs
	Sensibilité à l'optochine
	Antibiotiques
Chimiotaxonomie	Acides gras
	Acides mycoliques
	Système de quinone
	Profil protéique par PAGE
	Pyrolyse - SM

3.2. Les systèmes d'identification manuelle

Tous les systèmes d'identification commerciaux sont basés sur cinq technologies différentes, ou une combinaison de celles-ci. Ils comprennent les réactions basées sur le pH et qui nécessitent 15 à 24H d'incubation, des réactions basées sur les activités enzymatiques et qui nécessitent 2 à 4h, l'utilisation des sources de carbone, la détection visuelle de la croissance bactérienne, ou la détection de volatiles ou non, des acides gras par chromatographie en phase gazeuse[48].

3.2.1. API 20E

En 1971, Washington *et al.* ont publié la première évaluation de l'API 20E, qui appartient depuis 1986 à bioMérieux, Inc (Durham, N.C.)[49]. Un imperméable support en plastique prend en charge 20 cupules qui contiennent des substrats à base de pH et qui n'ont pas

changé depuis que le produit était lancé en 1971. La base de données a augmenté de 87 taxons en 1977 à 102 taxons en 2003 et contient *Y. pestis*. La base de données actuelle est une version 4.0. Les galeries API 20 E ont été comparées à de nombreux systèmes d'identification et en raison de son acceptation par la plupart des laboratoires de microbiologie internationaux, elle est devenue en quelque sorte un "Gold Standard" parmi tous les systèmes mises sur le marché.

Des études ont rapporté une capacité d'identification égal à 87% après 24H d'incubation et 96% après 48H pour les micro-organismes souvent rencontrés dans la routine hospitalière, par exemple, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*,...etc.). Pour les micro-organismes moins souvent isolés dans la clinique comme *Providencia stuartii*, *Escherichia vulneris* la bande API identifie seulement 78,7% des bactéries après 24H[50] .

En 1998, Neubauer *et al.* ont comparé la précision de quatre systèmes commerciaux pour identifier les *Yersinia spp*[51] . Parmi les 118 isolats testés, 93 (78,8%) ont été correctement identifiés avec API 20 E. O'hara *et al.* ont testé huit espèces de *Vibrio* et ont signalé une précision d'identification de 90% pour les *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Photobacterium damsela* par rapport aux tests biochimiques classiques. Cependant, les *Vibrio cholerae* étaient identifiés seulement avec 50% de précision[52] .

3.2.2. ID 32 E

L'ID 32 E de bioMérieux (Marcy l'etoile, France) est largement utilisé en Europe. Il s'agit d'une version améliorée de l'API 20 E et qui contient 32 substrats dans une configuration en plastique similaire à l'API 20 E. Leclercq *et al.* rapportent les capacités du système dans la discrimination entre les isolats d'*E. coli* O157: H7 et *E. coli* non O157. Même si les souches O157 ont montré des réactions biochimiques atypiques, les identifications étaient correctes au niveau des espèces. Il n'y avait pas de profil biochimique unique (numéros) pour les souches O157, mais les chiffres étaient distincts de ceux des autres sérotypes[53] .

3.3. Antibiogrammes

Les antibiotiques utilisables en thérapeutique sont très nombreux et ils sont regroupés en familles selon leur structure chimique, ils sont élaborés par un micro-organisme ou produits par synthèse. Leur activité spécifique se manifeste à dose faible sur les micro-organismes.

L'antibiogramme a pour but de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis ces antibiotiques. Par définition (O.M.S.), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée. La détermination des CMI ne peut être envisagée en routine pour toutes les bactéries isolées et tous les antibiotiques testés et, reste réservée à quelques cas particuliers

(pneumocoque de sensibilité diminuée aux pénicillines, staphylocoques et entérocoques résistants aux glycopeptides, germes à croissance lente, infections sévères, etc.). La technique de l'antibiogramme est largement utilisée pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Chaque antibiotique est caractérisé par son spectre d'activité qui correspond aux différentes espèces bactériennes susceptibles d'être sensibles à son action. Selon les antibiotiques le spectre est limité ou large. Exemples :

- La pénicilline G ou les macrolides ont un spectre limité aux bactéries à Gram positif et aux coques à Gram négatif.
- La colistine a un spectre étroit limité aux bacilles à Gram négatif à l'exception des *Proteus sp.*, des *Providencia sp.*, des *Serratia sp.* ou des *Bacteroides sp.*
- Le métronidazole a un spectre d'activité très particulier, car son action s'exerce uniquement sur les bactéries anaérobies sauf les bacilles anaérobies à Gram positif non sporulés.
- Les aminosides ou aminoglycosides ont un spectre large même si les bactéries anaérobies sont résistantes.
- Les tétracyclines, les phénicolés et les sulfamides ont un spectre large et sont actifs sur les bacilles et les coques, à Gram positif ou à Gram négatif, aérobies ou anaérobies ou aéro-anaérobies. *Enterococcus faecalis* et les lactobacilles sont toutefois résistants aux sulfamides[45] .

Des associations d'antibiotiques sont envisageables, voir même souhaitables, d'abord pour élargir le spectre antibactérien aussi bien pour les infections communautaires que pour les infections nosocomiales, puis pour limiter l'émergence de mutants résistants à un seul traitement.

3.4. Méthodes conventionnelles automatisées

L'AutoMicrobic System de l'année 1973 (AMS) (McDonnell Douglas Corp, Saint-Louis, Missouri) est reconnu aujourd'hui comme étant la première génération du Vitek. Ce système a incorporé un système de manipulation d'échantillons miniaturisés dans un dispositif jetable en plastique, avec la détection microbienne par un mini-ordinateur qui gère le contrôle et le traitement des données. Les résultats d'identification sont obtenus dans un temps de détection de seulement 13H, avec 92% de bonne identification, quand le seuil de micro-organismes atteint $7 \cdot 10^4$ UFC. En 10 ans, différents systèmes ont été mis sur le marché, comme MS-2 (Abbott Diagnostics, Inc, Chicago, Illinois), le Autobac IDX (Pfizer Inc, Groton, Morris Plains, NJ), AutoScan-3 (MicroScan Corp, Hillsdale, N.J.). D'autres produits tels que le spectre BBL (Becton Dickinson) et le Quantum (Abbott Diagnostic) leur apparition était de

courte durée. Toutes ces technologies ont permis l'obtention de résultats valides en peu de temps (4h)[54] .

3.4.1. Vitek bioMérieux

Une première évaluation par Isenberg *et al.* rapporte une précision de 97,8% pour 1020 isolats par rapport les tests biochimiques classiques, avec un temps d'analyse d'environ 8H [54]. Les cartes d'identification des Gram négatif (GNI) ont été introduites en 1989. En 1997 bioMérieux introduit le Vitek2 et ces cartes associées ID-GNB. En 2004 les nouvelles cartes colorimétriques pour Vitek2 sont mises sur le marché. Le Vitek2 peut traiter 60 à 120 cartes à la fois. Une évaluation réalisée par Funke et Funke-Kissling sur 655 isolats représentant 54 taxons a démontré une précision de 97,3% à la fin de la période initiale d'incubation, avec seulement 0,6% d'identification erronées[55] .

3.4.2. Phoenix BD

Ce système conçu et commercialisé par Becton Dickinson a été introduit en 2003. Il permet l'identification rapide des bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif. Un système capable d'analyser 99 panels en une fois, où un panel est réservé pour le thermomètre interne. Une fois les panels inoculés et introduits dans l'instrument, toutes les opérations et analyses sont réalisées automatiquement. Endimiani *et al.* ont testé 136 bactéries non fermentantes à Gram négatif et la concordance des résultats obtenus par Phoenix 100 et le ATB/ID 32 GN (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) était de 95,6%[56][56] . Brisse *et al.* ont testé 134 isolats du complexe *B. cepacia* identifiés auparavant par quatre méthodes moléculaires, et ont signalé un taux d'exactitude de 50%[57] .

4. Identification moléculaire d'une bactérie

Les techniques de biologie moléculaire ont bouleversé l'identification des bactéries, et ont mis en lumière les insuffisances et les erreurs d'identifications phénotypiques qui étaient jusque là seules disponibles[58] [45] .

L'identification moléculaire des bactéries repose essentiellement sur l'analyse de la séquence du gène ARNr 16S. La séquence obtenue au laboratoire est comparée via le réseau internet, à l'aide de logiciel spécialisé avec les banques électroniques de séquences constituées par GenBank (Nucleotide) :

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>), en Europe (<http://www.ebi.ac.uk/>), qui sont des banques publiques que l'on peut consulter librement sur internet, ou bien des banques commerciales.

L'identification bactérienne va reposer sur le pourcentage de similarité des séquences. On admet généralement, qu'une similarité de 99% est identifiante au niveau de l'espèce. Une similarité de 97% identifiante au niveau du genre et qu'en dessous de 97%, il y a une possibilité de nouvelle espèce non décrite dans les banques de données. Par ailleurs, certains logiciels permettent de positionner la séquence obtenue au laboratoire parmi l'ensemble des séquences ARNr 16S disponibles sous forme d'arbres phylogénétiques[59] [60] [61] [62] [63] . Cette possibilité est particulièrement intéressante lorsque l'on détermine au laboratoire une séquence ARNr 16S de similarité inférieure à 97%; cela permet alors d'avoir une idée du groupe bactérien dans lequel se situe la bactérie nouvellement identifiée[64] .

L'identification moléculaire des certaines bactéries peut également être réalisée grâce à l'analyse de la séquence du gène *rpoB*. L'analyse de cette séquence vient en complément de l'analyse de la séquence du gène ARNr 16S pour un certain nombre de groupes et de genres bactériens comme les mycobactéries, pour lesquelles le gène 16S ARNr est peu discriminant[65] . On peut noter également le séquençage du gène *sodA* pour les Streptocoques groupes oraux.

L'identification moléculaire des bactéries est utile dans plusieurs cas de figure : elle est utile pour les bactéries fastidieuses de croissance lente, parmi lesquelles se trouvent évidemment les bactéries intracellulaires, qui sont souvent des bactéries d'identification difficile exprimant peu de caractères phénotypiques, mais également le cas de certains genres bactériens cultivant en milieu axénique comme les mycobactéries. Elle est également utile lorsque l'identification phénotypique n'est pas performante (cas des *Acinetobacter*, exprimant très peu de caractères phénotypiques) ou dans le cas où il existe une discordance entre cette identification phénotypique et la sensibilité aux antibiotiques par exemple. Elle est enfin utile pour toutes les souches bactériennes qui sont isolées dans une circonstance inhabituelle pour laquelle il convient absolument de confirmer l'identification. La dernière application concerne le

contrôle de l'identification des souches qui sont reçues des laboratoires extérieurs, y compris des collections de référence, et montre qu'il y a un taux d'inexactitude qui est compris entre 0.5 et 2%[45] .

4.1. Typage moléculaire des bactéries

Le typage moléculaire des bactéries vient en complément des investigations épidémiologiques réalisées en cas de suspicion de cas groupés ou d'épidémie. L'idée générale est de démontrer que différentes souches appartenant à la même espèce bactérienne forment un clone c'est-à-dire qu'elles sont toutes issues d'une bactérie source commune. L'identification précise des isolats au niveau de l'espèce est donc un pré-requis indispensable. Plusieurs méthodes ont été développées qui peuvent être schématiquement réparties en deux groupes :

4.1.1. Typage moléculaire par analyse de profils

Le premier groupe des méthodes, le plus souvent utilisé actuellement, repose sur l'analyse de profils d'ADN chromosomiques ou de fragments d'ADN chromosomiques colorés par des bases intercalantes fluorescentes comme le bromure d'ethidium ou bien par des sondes marquées avec un fluorochrome. Les bandes ainsi visualisées résultent soit de la restriction des acides nucléiques par des enzymes de restriction : c'est par exemple la méthode de *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) qui repose sur la restriction de l'ADN chromosomique total par des endonucléases à faible fréquence de coupure. La migration des gros fragments d'ADN obtenus sur des gels d'agarose nécessite un appareillage d'électrophorèse particulier[66] , et la coloration des bandes obtenues par du bromure d'ethidium. Un autre exemple, est celui du génotypage d'une mycobactérie en utilisant une hybridation d'une sonde qui reconnaît la séquence d'insertion IS6110, celle-ci est hybridée sur l'ADN chromosomique total extrait des bactéries. Un deuxième groupe de méthodes permet d'obtenir des profils d'amplification, il s'agit d'une façon générique de PCR aléatoires qui utilise de tous petits oligonucléotides comme amorces d'amplification et qui vont amplifier au hasard des régions de chromosome. La technique d'ERIC-PCR est un exemple de typage moléculaire par analyse de profil d'amplification appliquée aux entérobactéries[1] [45] .

Une autre modalité de génotypage repose sur l'analyse de profil d'amplification correspond ant à l'amplification d'éléments répétés à l'intérieur des génomes. En effet, l'analyse des génomes complets a montré que la pluparts des génomes bactériens possédaient des régions répétées et que le nombre de répétition était variable d'une souche à l'autre à l'intérieur de la même espèce. Un produit d'amplification ciblant ces régions répétées aura donc une taille directement proportionnelle au nombre de régions répétées et il est ainsi facile de visualiser sur un simple gel d'agarose ces différentes longueurs et les différents profils correspondant

aux différentes souches. Cette technique est actuellement une technique de référence pour le génotypage de *Mycobacterium tuberculosis* par amplification des VNTR (variable number of tandem repeat)[67] [68] , encore appelés dans le cas particulier *Mycobacterium tuberculosis* des MIRU (Mycobacterial interspersed repetitive units). La technique des VNTR a par ailleurs été appliquée à d'autres pathogènes comme *Yersinia pestis*[69] et *Chlamydomophila psittaci*[70] .

Quelques soit la technique, l'analyse des profils de restriction ou d'amplification repose sur l'hypothèse que les souches appartenant au même clone vont donner le même profil de restriction ou d'amplification. Cependant, ces techniques sont lourdes à mettre en œuvre, elles requièrent souvent beaucoup de matériel génétique pour les techniques de restriction, ce qui est particulièrement laborieux pour des microorganismes particulièrement fastidieux ou des microorganismes particulièrement pathogènes comme l'agent de tuberculose. Par ailleurs, pour certaines bactéries, ces profils de restriction ne peuvent pas être utilisés du fait de leur instabilité lorsque l'on réalise des sous-cultures des bactéries et c'est par exemple le cas de *Yersinia*. Enfin, de façon générale, ces techniques sont mal standardisées, il n'est pas directement possible de comparer les résultats obtenus d'une expérimentation à l'autre et de telles comparaisons requièrent des logiciels d'analyse d'images sophistiqués.

4.1.2. Typage moléculaire par séquençage

Un deuxième groupe de techniques a été très récemment développé qui repose sur le séquençage ou le quasi séquençage de fragments génomiques. Concernant le quasi séquençage, c'est l'analyse des single nucleotides polymorphism (SNP) qui est une nouvelle technique de génotypage des bactéries qui est utilisée de façon récente pour les *Mycobacterium tuberculosis*. Elle repose sur le fait que certaines positions des régions codantes ou non codantes du génome admettent un certain degré de variabilité donnant lieu à ces polymorphismes sur un seul nucléotide. Les SNP peuvent être analysés de façon avantageuse en utilisant le pyroséquençage. Une deuxième méthode repose sur le séquençage de gènes codants pour des enzymes (dit gènes de ménage, *housekeeping genes*). Cette méthode de multiple variable locus analysis (MVLA) est en fait l'adaptation moléculaire de la technique phénotypique d'analyse des variants enzymatiques[71] .

D'autres techniques ont été développées récemment comme la technique *multispacer sequence typing* (MST). Elle repose sur le séquençage des *spacers* qui sont les régions non codantes séparant les gènes dans le chromosome des bactéries[72] [73] . La technique a été appliquée avec succès à des bactéries considérées comme très homogènes sur le plan phylogénétique pour lesquelles aucune méthode de génotypage n'était actuellement disponible, comme *Coxiella burnetii*[73] , *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia conorii* et *Yersinia pestis*[74] [75] [76] .

4.2. Détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques

Il est possible de détecter la présence de gènes codant une résistance aux antibiotiques, comme le gène *mecA* codant la résistance à l'oxacilline chez les *Staphylococcus aureus*. Plusieurs trousse de détection moléculaire de ce gène sont maintenant commercialisées. Il est également possible de détecter des mutations associées à une résistance comme les mutations de gène *rpoB* codant la sous-unité bêta de l'ARN polymérase et dont certaines mutations regroupées dans une petite région, sont associées à la résistance à la rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* et certaines entérobactéries et *Rickettsia*[77] [78] [79] [45] .

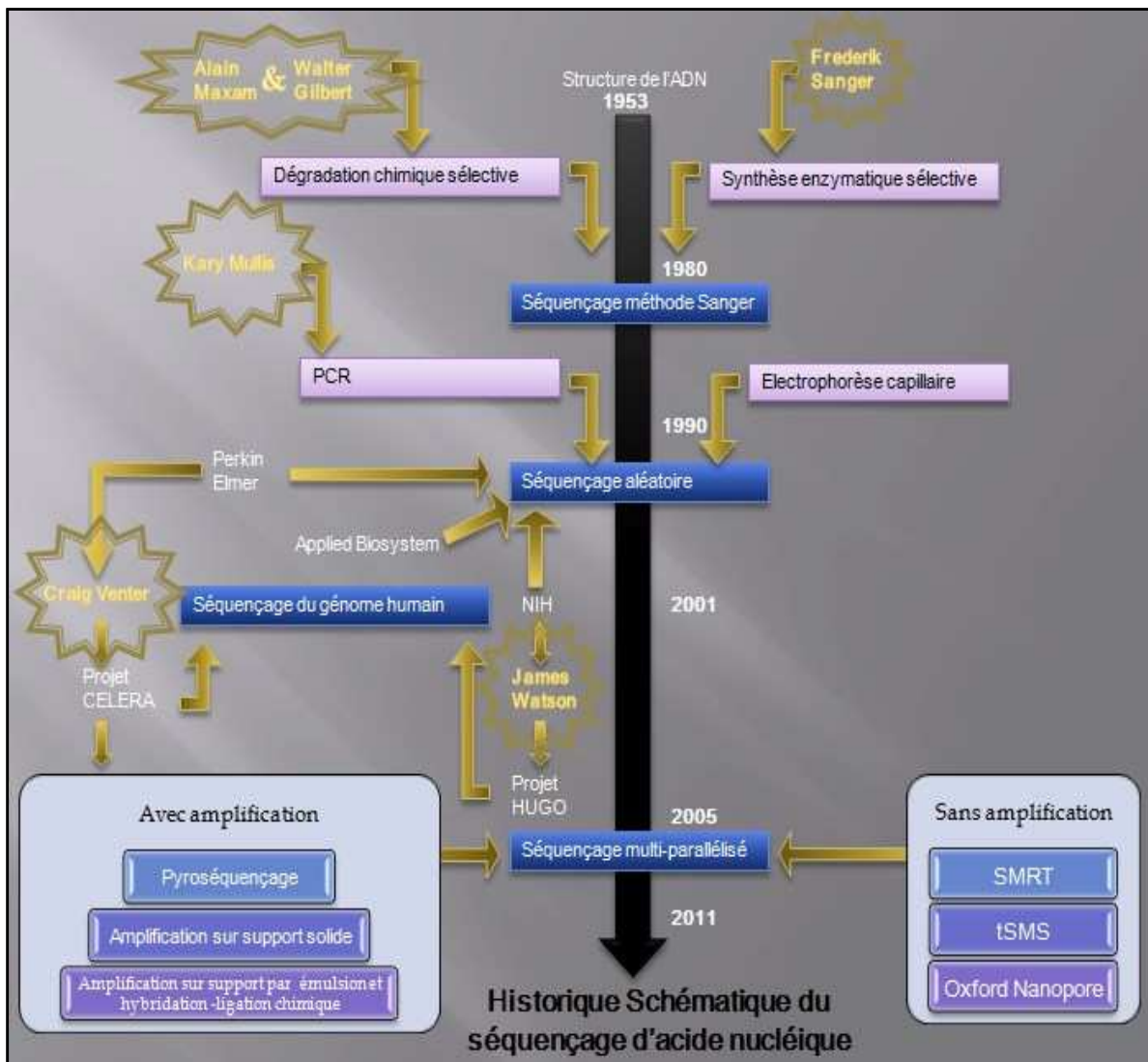


Figure 11 : Historique schématique du séquençage d'acide nucléique

5. Méthodes conventionnelles : Avantages et limites

Les avantages des méthodes génotypiques sur les méthodes phénotypiques sont multiples. Elles seules permettent de détecter des agents infectieux ou potentiellement infectieux non cultivables ou même non identifiés à ce jour. La découverte du ribotypage des ARN 16S a été essentielle pour les progrès de la paléobactériologie, et le séquençage de génomes complets permet de définir des déterminants de virulence (adhésines, invasines, néo-antigènes exprimés *in vivo*, etc.) et de pathogénicité (toxines, enzymes cytotolytiques, etc.) constituant ce que l'on désigne sous le terme d'« îlots de pathogénicité » (cf. *infra*) prédictifs du pouvoir pathogène de micro-organismes actuels ou émergents[80]. La mise au point de techniques d'épidémiologie moléculaire permet de mieux comprendre et donc de prévenir les épidémies et en particulier l'évolution de la résistance aux agents antimicrobiens. L'évolution constante des techniques de microbiologie moléculaire par amplification génique quantitative permet de mesurer la charge infectieuse chez l'hôte et donc d'évaluer précisément l'efficacité des traitements (l'exemple le plus spectaculaire étant la détermination de la cinétique d'élimination de l'ARN du virus de l'immunodéficience humaine, VIH, après polythérapies). La possibilité de détecter la synthèse d'ARN messagers par PCR après transcription reverse (RT-PCR.) peut révéler des gènes silencieux activables sous certaines conditions durant le processus infectieux[81] [82] [83]. Les limites actuelles des méthodes génotypiques sont bien entendu liées au fait qu'elles ne détectent que les acides nucléiques. La découverte des prions, protéines polymorphes incriminées dans l'encéphalite de Creutzfeldt-Jakob, dans l'encéphalite spongiforme bovine, la tremblante du mouton, etc., pose le problème du diagnostic d'agents infectieux transmissibles dépourvus d'acides nucléiques. De même, des maladies auto-immunes et allergiques, secondaires à certaines maladies infectieuses, échappent au diagnostic microbiologique moléculaire, car l'élément pathogénique est ici constitué par les antigènes microbiens persistants indépendamment de toute répllication de l'agent causal[84]. Enfin, les techniques génotypiques utilisent généralement des sondes et des amorces d'amplification prédéterminées et synthétisées à partir de séquences connues. Or les séquences génétiques évoluent et se diversifient de manière non prédictible le plus souvent, ce qui peut conduire à des résultats faussement négatifs.

La détection par des méthodes génotypiques doit être effectuée sur des prélèvements au site de présence de l'agent infectieux. Or, les techniques imposent souvent un échantillon d'un volume limité à quelques dizaines de microlitres et peuvent, de ce fait, omettre le micro-organisme éventuellement localisé dans un site adjacent. La révélation d'une séquence génomique d'un agent potentiellement infectieux ne permet pas de distinguer entre sa simple présence (portage latent en l'absence de maladie déclarée, transit occasionnel d'une bactérie alimentaire, contamination artificielle de l'échantillon à analyser, etc.) et sa causalité

(réplication active dans les tissus et les fluides biologiques, interaction avec l'hôte déclenchant une réponse immunitaire). Elle ne détecte pas d'emblée des mutants éventuels au sein d'un inoculum infectieux qui peut être polyclonal (et même parfois polymicrobien chez un hôte immunodéprimé). Les très hautes performances des techniques d'amplification génique exposent, en contrepartie, au risque de contaminations diverses par des fragments d'ADN exogènes à l'échantillon à analyser ou d'amplicons obtenus dans le laboratoire lors d'une manipulation précédente. Elles peuvent parfois être annihilées par la présence dans le produit à analyser d'inhibiteurs des réactions enzymatiques mises en jeu.

La microbiologie connaît donc une étape cruciale de son histoire où, après avoir permis d'explorer les bases structurales et fonctionnelles de la génétique en créant la biologie moléculaire, celle-ci, à son tour, confère une puissance nouvelle aux performances du diagnostic microbiologique, notamment des agents pathogènes et potentiellement pathogènes.

6. Méthodes d'identification protéomique

6.1. L'ère protéomique et l'identification bactérienne

Depuis son invention dans les années 1980, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a été adoptée pour des applications dans de nombreux domaines de sciences de la vie [85] [86]. Le principe de l'ionisation douce qui permet la possibilité de détecter de grosses molécules non fragmentées et les molécules complexes a poussé la porte ouverte pour l'analyse des protéines [87]. L'adaptation la plus immédiate de MALDI-TOF/MS a été dans le domaine de la protéomique, où le haut débit d'analyse des protéines digérées permet l'identification de très petites quantités de protéines éluées à partir de gels d'électrophorèse, en combinaison avec la disponibilité d'un nombre croissant des séquences de génomes, donc de masse de protéines [88]. L'identification et la classification des bactéries par l'analyse des protéines exprimées par MS a l'avantage que l'analyte détecté est lié à l'identité génétique du microorganisme. La spectrométrie de masse par MALDI-TOF est l'approche la plus largement utilisée fondée sur des protéines bactériennes et leurs classifications taxonomiques. Deux raisons de son utilisation à grande échelle sont relativement liées à la préparation de l'échantillon qui est simple et l'acquisition de données et d'analyse qui est extrêmement rapide. Le seul inconvénient important est que le nombre de protéines détectées par MALDI-TOF est généralement inférieur à 100 qui représente une petite fraction des 2000-5000 protéines putatives présentes dans les génomes bactériens [89]. Cependant, la détection par MALDI-TOF de ces sous-ensembles relativement petits du protéome bactérien semble être suffisante pour l'identification bactérienne et le classement par genre, espèce, sous-espèce, et dans certains

cas, la différenciation au niveau de la souche[4] . (Figure 12 :Workflow (Schéma général) de l'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS).



Figure 12 :Workflow (Schéma général) de l'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS

Un nombre croissant de rapports indiquent que l'identification robuste peut être réalisée sur la base de requêtes de bases de données protéomiques Demirev et al., 1999, 2001[3] [3] [90] ; Pineda et al., 2000, 2003[91] [92] ; Pribil & Fenselau., 2005[93] ; Pribil et al., 2005[94] . Dans tous les rapports, les identifications correctes constamment été obtenues lorsque seules les protéines les plus abondamment exprimées étaient considérées (par exemple protéines ribosomales) ; et elles ont été utilisées dans la base de données[91] . Une fois que les spectres MALDI-TOF MS sont recueillis, l'analyse des données peut être effectuée sous des formes multiples pour discriminer les genres, espèces, souches et même des micro-organismes.

Les applications de l'analyse chimique des micro-organismes ont été explorées depuis de nombreuses années. Les premières tentatives dans l'utilisation massive de la spectrométrie ont été appliquées à la caractérisation de composés polaires et les lipides non polaires, tels que les quinones et les acides gras à longue chaîne[95] [96] . Bien que ces analyses fournies

caractérisations utiles au genre et des espèces, et que le typage des isolats bactériens a également été tentée, en utilisant la spectrométrie de masse par pyrolyse[97] . Toutefois, les approches basées sur des profils de spectres de masse ont été limités par la capacité d'analyse dont la gamme de masse peut aller seulement jusqu'à 1500 Da. Pour les analyses rapides de biomolécules, biopolymères et complexes de macromolécules, c'est à dire, les protéines et les protéines complexes, l'application d'une matrice cristallisantes'est avérée être essentielle pour la préservation de l'intégrité des molécules au cours des procédures d'analyses. Les cristaux de la matrice absorbent l'énergie photonique du laser d'azote, effectuant la désorption et une ionisation (douce) de grandes biomolécules intactes.

Cependant, tous les pics de masse recensés ne sont pas des protéines ribosomales. Au maximum, 50 protéines ribosomiques individuelles (y compris les variantes et fragments) peuvent être identifiées dans la gamme de masse de 3000 à 20000 Da parmi le nombre total de pics, se situant entre 70 et 200 généralement enregistrés dans les spectres de masse de la plupart des échantillons microbiens[86] . Dans les spectres, par exemple, un certain nombre de pics ne pouvaient pas être identifiés par des recherches *in silico* pour les protéines correspondantes. Outre les protéines ribosomales, d'autres protéines identifiables dans un profil MALDI-TOF/MS sont surtout des protéines «structurelles», c'est à dire celles qui n'ont pas une fonction catalytique, mais qui sont constitutives de la structure cellulaire et sa fonction, tels que les facteurs de modulation du ribosome, le carbone régulateurs de stockage, de protéines de choc-thermique, protéines liant l'ADN et de l'ARN chaperonne. Enfin, les allocations considérables de protéines qui peuvent être assignées à des pics dans les spectres de masse sont étiquetées comme identifications «putatives» ou «non caractérisées» dans les bases de données protéomiques[71] .

Malgré, un manque de compréhension et une ambiguïté d'assignement de protéines à tous les signaux de masse en spectre de masse microbien, il a été suggéré de comparer les modèles de masses spectraux directement aux profils protéiques *in silico*, pour surmonter la nécessité d'une base de données de spectres de masse de référence. Avec l'augmentation rapide du nombre des séquences du génome et l'identification des protéines et des enzymes, ainsi que des programmes ciblant les déterminations de séquence du génome pour toutes les espèces microbiennes validement publiés, la base de données dérivée d'une telle approche serait élargie de façon exponentielle.

6.2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse de la matière en fonction de la masse de ses constituants : particules subatomiques, atomes, molécules, macromolécules biologiques ou non, agrégats, etc. Elle offre trois fonctions principales : la résolution des constituants atomiques ou moléculaires, la mesure de leur abondance relative et la mesure précise de leurs masses atomiques ou moléculaires. Contrairement à ce qui se passe à l'échelle macroscopique, où la gravitation sert à déterminer la masse des objets, à l'échelle atomique, c'est la masse inertielle qui est déterminée à travers un processus dynamique[71]. La matière à analyser est injectée, à l'aide d'un système d'introduction, dans le vide poussé de l'appareil où la source d'ions la transforme en particules électriquement chargées "les ions". Ces derniers sont analysés en masse, à l'aide d'un système analyseur qui met en jeu des combinaisons de champs électromagnétiques. Les ions transmis par le dispositif sont détectés, comptés, voire identifiés, à l'aide d'un détecteur. Un ordinateur pilote l'appareil, effectue l'acquisition des données réduites sous forme de spectres de masse qu'il permet d'analyser. Les performances d'un spectromètre de masse se caractérisent par sa limite en masse – la masse la plus élevée qu'il est capable d'analyser – son pouvoir de résolution – son aptitude à séparer des ions de masses voisines – et sa sensibilité. La plus petite quantité de matière qu'il peut détecter ($\leq 10^{-15}$ g)[98]. Lorsqu'il s'agit de mesurer la masse atomique ou moléculaire, il est caractérisé par sa justesse.

6.2.1. Historique

Apparue au début du XX^e siècle, la spectrométrie de masse a apporté des éléments clés dans la compréhension du noyau atomique. Elle est issue de la découverte par Euge Goldstein en 1886, des rayons canaux dus aux ions positifs et de leur analyse par un champ magnétique, par Wilhelm Wien en 1898. En 1912, Joseph John Thomson obtient des spectres de masses de plusieurs composés gazeux : N₂, O₂, CO, CO₂, etc. Il met en évidence les ions négatifs et les ions multichargés. L'année suivante, il découvre les isotopes A (nombre de masse) = 20 et A = 22 du néon [99]. Les innovations qui suivent tentent principalement d'augmenter la sensibilité du dispositif. En 1918, A. J. Dempster construit un spectromètre à focalisation en direction. L'année suivante, Francis William Aston introduit le tri des ions en fonction de leur vitesse, ce qui lui permet de déterminer les abondances isotopiques du néon et de mettre en évidence les écarts entre les masses atomiques réelles et les nombres entiers. En 1932, K. T. Bainbridge, en associant au dispositif un filtre de vitesse de Wien, vérifie expérimentalement l'équivalence entre masse et énergie. Il propose alors la double focalisation en direction et en vitesse, principe qui sera mis en œuvre par E. B. Jordan, J. M. Mattauch et L. F. Herzog. En 1936, F. M. Penning propose de combiner un champ électrique et un champ magnétique pour piéger les ions dans un très faible volume : c'est le piège de Penning. En 1940, A. O. Nier perfectionne la source d'ions à impact électronique.

Ensuite, en 1948, A. E. Cameron invente le spectromètre de masse à temps de vol. Puis, entre 1953 et 1960, W. Paul et H. S. Steinwedel mettent au point l'analyseur quadripolaire, puis le piège ionique quadripolaire qui diffère de celui de Penning par l'absence de champ magnétique. Le piège quadripolaire aura un tel retentissement en physique fondamentale que le prix Nobel sera attribué en 1989 à W. Paul et à H. Dehmelt. Pendant les années 1960, L. G. Smith met au point le spectromètre de masse à radiofréquence. Pour ce qui est des applications, depuis 1950, les techniques d'ionisation se diversifient de façon à s'adapter à la diversité des échantillons à analyser, particulièrement pour la chimie organique. Cette technique d'analyse bénéficie alors du couplage avec un chromatographe en phase gazeuse puis liquide. Les progrès de l'informatique ont permis l'automatisation des réglages de l'appareil ainsi que la mise en œuvre des analyseurs à quadripôle et des pièges ioniques dans de nombreuses applications de la spectrométrie de masse[99] [100] .

6.2.2. Les différents Spectromètres de Masse

L'unité de masse du système international (S.I.) est le kilogramme (kg) ou le gramme (g). À l'échelle microscopique, d'autres unités sont plus pratiques. En physique nucléaire et en chimie, la masse s'exprime souvent par le nombre de masse A , qui par définition est un nombre entier. Pour un atome, il est égal à la somme du numéro atomique Z (nombre de protons) et du nombre de neutrons N du noyau : $A = Z + N$.

On se sert également en physique nucléaire de l'unité de masse atomique, l'uma, qui vaut $1/12$ de la masse de l'atome de carbone ^{12}C : $1 \text{ uma} = 1,660\,540\,2 \times 10^{-27} \text{ kg}$.

En biochimie, cette unité porte le nom de dalton.

Bien que l'élément caractéristique d'un spectromètre de masse soit son système analyseur, le principe des éléments constitutifs est présenté en allant de l'introduction de l'échantillon jusqu'à la détection des ions séparés en masse (Figure 13:Schéma général d'un spectromètre de masse type MALDI-TOF. Dans le spectromètre de masse à temps de vol, le miroir électrostatique présente le double avantage d'augmenter la longueur du trajet et de compenser les effets de la dispersion d'énergie cinétique).

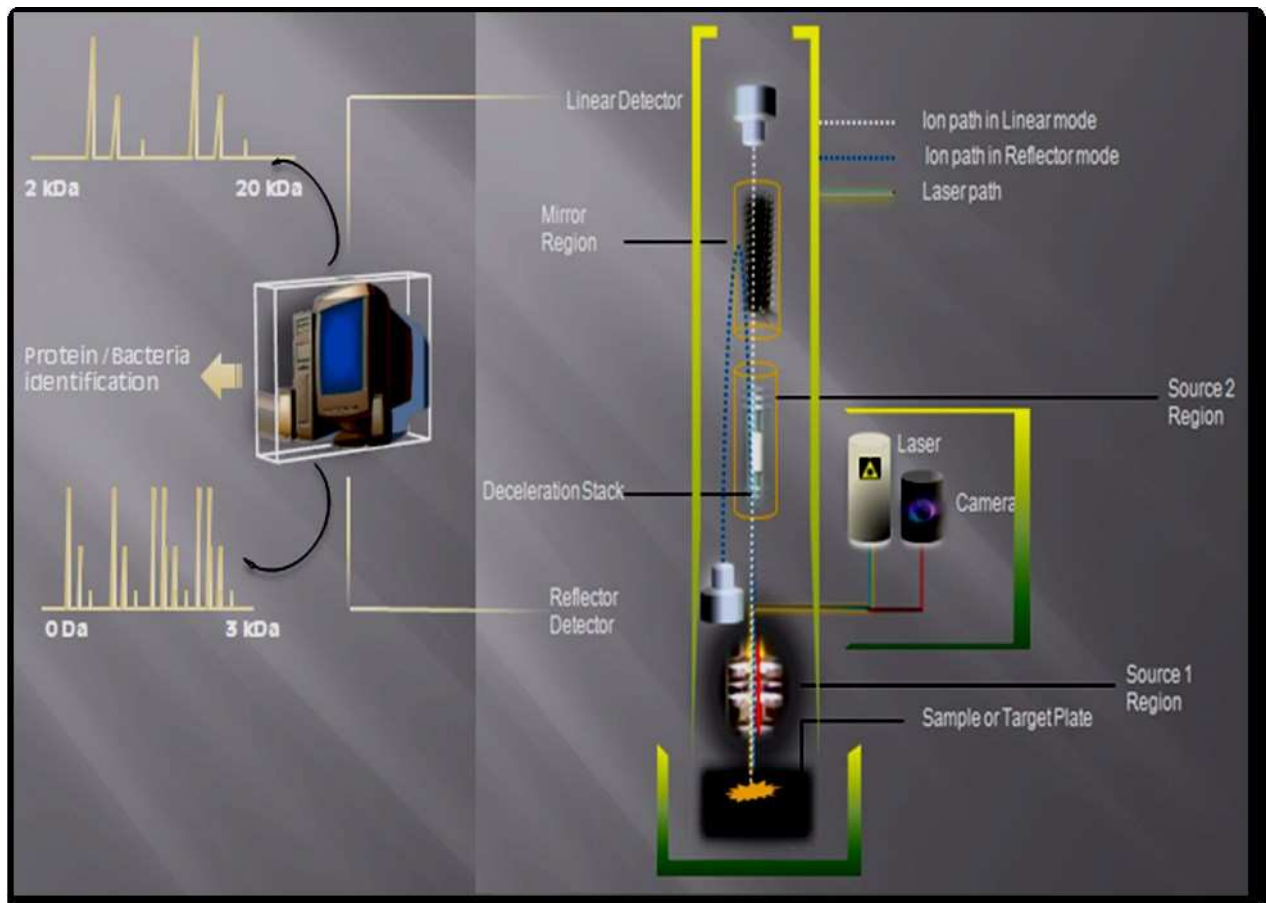


Figure 13: Schéma général d'un spectromètre de masse type MALDI-TOF. Dans le spectromètre de masse à temps de vol, le miroir électrostatique présente le double avantage d'augmenter la longueur du trajet et de compenser les effets de la dispersion d'énergie cinétique

- *Selon Les systèmes d'introduction*

Puisque l'analyse en masse est fondée sur les trajectoires des ions accélérés, il est important que celles-ci ne soient pas perturbées par les collisions des ions avec les molécules du gaz résiduel, d'où la nécessité de placer l'appareillage dans un vide dont la pression résiduelle soit comprise entre 10^{-4} et 10^{-7} Pa. L'échantillon à analyser, suivant son état physique : solide, liquide ou gaz, est introduit dans l'enceinte à vide au moyen d'un dispositif spécifique. Les solides sont introduits dans la source d'ions au moyen d'une canne qui franchit un sas étanche. Les liquides sont généralement vaporisés avant d'être introduits sous forme gazeuse. Les gaz sont d'abord transférés dans un réservoir vide d'air, ils pénètrent dans la source au moyen d'une microfuite réglable[101].

- *Selon Les sources d'ions*

La source d'ions, à partir de l'échantillon, produit des ions qui correspondent à ses différents atomes ou groupe d'atomes constitutifs. Suivant les méthodes mises en jeu, les molécules peuvent même être brisées en une grande diversité de fragments ionisés. L'étude de la structure des molécules organiques et biologiques nécessite de disposer de sources d'ions de

différents types, qui fragmentent plus ou moins les molécules. La production exclusive d'ions monochargés est préférable car la présence d'ions multichargés complique l'identification des pics dans le spectre de masse. Une source d'ions peut être caractérisée par son rendement d'ionisation, son éventuelle sélectivité chimique, sa faculté de ne pas briser les grosses molécules (ionisation douce) ou encore d'être le siège de réactions ions-molécules. Une fois formés, les ions sont extraits de la zone d'ionisation et accélérés par des champs électriques à l'aide d'une optique de focalisation. Celle-ci, constituée de plaques portées à des potentiels réglables, guide les ions vers la fente-source[83]. On peut citer, par exemple, les différentes sources d'ions comme, l'impact électronique, l'ionisation par plasma, ionisation de surface, source à étincelles, ionisation chimique, et beaucoup d'autres. Les sources d'ions utilisées généralement pour des applications protéiques sont les dites Electrospray et la Désorption et ionisation laser. Ces dernières ont le point commun d'utiliser une ionisation dite douce.

Le principe de l'électrospray : Lorsqu'un liquide circule à l'intérieur d'un tube capillaire porté à un potentiel électrostatique très élevé, le liquide, à la sortie, est pulvérisé en très fines gouttelettes électriquement chargées qui s'évaporent rapidement en libérant les ions du soluté[102][103](Figure 14 :Schéma général de la technique d'ionisation douce ESI (Electrospray Ionization)).

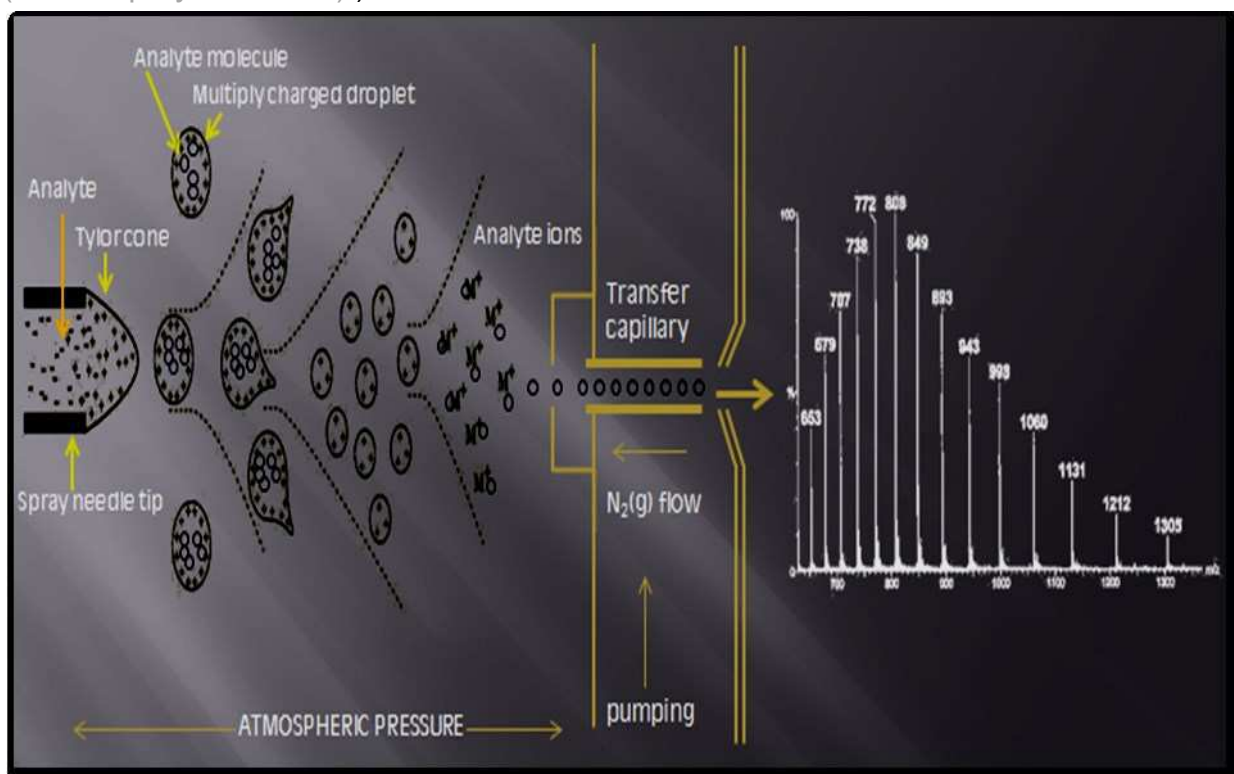


Figure 14 :Schéma général de la technique d'ionisation douce ESI (Electrospray Ionization).

Cependant, nous allons nous focaliser sur la Désorption et ionisation laser, car c'est la plus utilisée et la plus développée dans le domaine des micro-organismes et le protéome.

Désorption et ionisation laser

Un faisceau laser est un étroit faisceau de lumière créé par un processus appelé «émission stimulée». Dans un laser, une alimentation électrique excite les atomes dans un milieu comme le dioxyde de carbone ou de sodium. Ces atomes excités émettent un genre unique de lumière qui est extrêmement cohérent et est d'une très grande pureté spectrale. La création d'un faisceau laser est très difficile, mais théoriquement c'est assez simple. Ce faisceau laser fournit des impulsions lumineuses de forte puissance (10^{10} W/cm²) focalisées sur une petite surface ($\approx 10^{-4}$ cm²) de l'échantillon généralement solide[4]. Cette technique sert à étudier les surfaces ou à déterminer la composition locale de l'échantillon. Elle peut être couplée à l'ionisation de surface ou à l'impact électronique. La désorption-ionisation assistée par matrice (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization : MALDI) consiste à ajouter à l'échantillon une molécule organique, absorbant fortement la longueur d'onde du laser et augmentant ainsi le dépôt d'énergie et l'efficacité. Lorsqu'une forte sélectivité chimique est requise, l'ionisation peut être obtenue en combinant l'effet de deux ou trois faisceaux laser de longueurs d'onde adaptées à une ionisation résonante[104].

- *[Selon Les systèmes analyseurs](#)*

L'ensemble des trajectoires issues de la source d'ions constitue un faisceau d'ions. Bien que le comportement des photons d'un faisceau lumineux diffère de celui des particules chargées, l'optique ionique est fondée sur des concepts similaires à ceux de l'optique géométrique. Par exemple, les concepts de faisceau convergent ou divergent, de lentille, de point de focalisation, de déflexion, sont indispensables à la conception des analyseurs de masse.

Les ions de masse m ont été accélérés dans la source à la vitesse moyenne v_0 par une tension accélératrice V à laquelle correspond une énergie cinétique moyenne E_0 : (1)
$$E_0 = zV = 1/2(mv_0^2)$$

En raison du processus d'ionisation, ils sont affectés d'une dispersion en direction et en énergie cinétique ΔE_0 . Le rôle de l'analyseur, qui est de trier ces particules en fonction de leur masse, est obtenu en soumettant celles-ci à des combinaisons diverses de champs électrique, magnétique ou en radiofréquence. Les ions qui ont même rapport m/z parcourent des trajectoires voisines dans les analyseurs statiques. Au contraire, dans les analyseurs dynamiques, les trajectoires ne sont pas corrélées ; exclusivement, lorsque la condition de stabilité pour le rapport m/z est satisfaite, les ions correspondants atteignent le détecteur[102][103].

Analyseur TOF: ici, nous allons travailler avec un analyseur TOF (Time-Of-Flight) ou analyseur à temps de vol. Dans son principe, cet analyseur est le plus simple de tous. En fait, la relation (1° mentionnée ci-dessus montre qu'il est possible de déterminer le rapport m/z en

mesurant la vitesse V_0 des ions, soit le temps de parcours t (temps de vol) que met un ion à franchir une distance fixe d . $m/z = 2V_0 t^2/d^2$

Pour cela, les ions sont éjectés de la source par paquets très brefs qui définissent l'instant de départ, l'instant d'arrivée étant déterminé par le détecteur. Ainsi, après accélération due à V_0 , les ions volent d'autant plus vite qu'ils sont plus légers. Le pouvoir de résolution croît avec la longueur D et les résolutions en temps du détecteur. Pour augmenter la durée du temps de vol, le trajet est doublé à l'aide d'un miroir électrostatique qui, en plus, compense la dispersion d'énergie cinétique de la source d'ions. La résolution en masse peut atteindre 5 000. Ces appareils peuvent suivre des phénomènes rapides, ils sont donc bien adaptés aux études de cinétique chimique[102][103][104].

La résolution est la capacité d'un instrument de mesure à distinguer entre deux signaux voisins. Plus la résolution n'est élevée, plus la différence entre deux distincts est faible sur le paramètre mesuré. En spectrométrie, la résolution correspond également à la finesse des pics. En considérant le pouvoir séparatif, on peut définir la résolution en spectrométrie de masse comme le rapport $m/\Delta m$ où m est la masse d'un ion considéré et Δm la différence minimale entre le pic considéré et son voisin le plus proche dont il peut être distingué (Figures 15, 16). Selon cette définition, un instrument qui est en mesure de distinguer des ions de masse 100 et 100,1 possède une résolution de $100/(100,1-100)= 1000$. Si l'on considère la largeur des pics, la résolution est donnée par un rapport analogue $m/\Delta m$ où Δm est cette fois-ci la largeur du pic à mi-hauteur. Dans ce cas une résolution de 1000 est atteinte pour un ion de masse 100 dont la largeur à mi-hauteur représente 0,1 Th. Dans ce cas, il est également d'usage d'employer le rapport $\Delta m/m$ exprimé alors en ppm (partie par million). La résolution permet d'obtenir des mesures précises mais pas nécessairement des mesures exactes. L'exactitude dépend en effet de la qualité de la calibration. L'interposition de miroirs électrostatiques sur le trajet ionique a grandement amélioré les performances instrumentales. Ces miroirs, appelés "Reflectron" compensent les différences de vitesse pour une valeur de m/z donnée en imposant des trajets à parcourir d'autant plus longs que les ions sont plus rapides. Désormais, les résolutions obtenues sur les instruments à temps de vol peuvent atteindre environ 20000 dans une gamme de masse compatible avec l'utilisation du reflectron ($m/z < 3000$ Da).

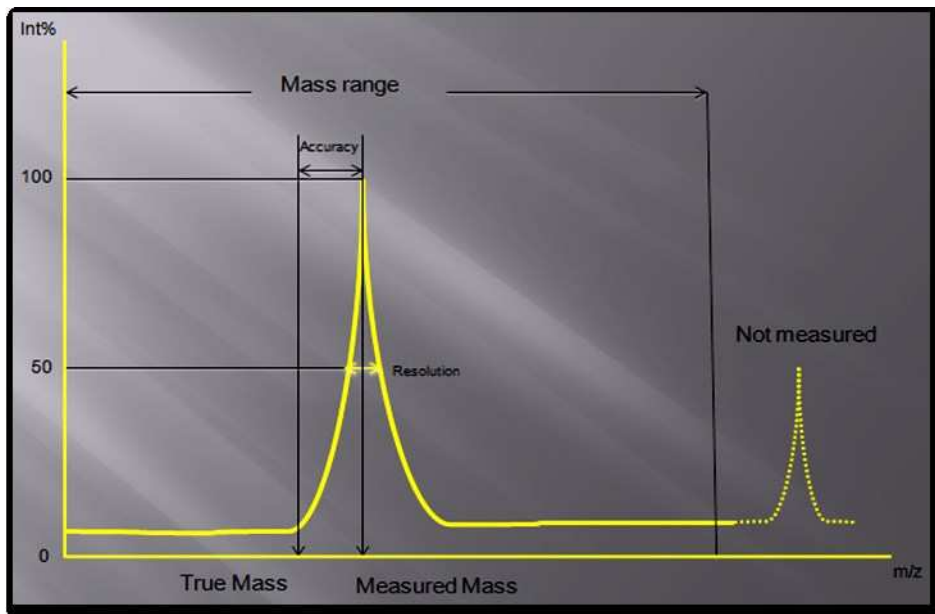


Figure 15: Schéma général d'un spectre de masse. Dans le spectromètre de masse à temps de vol

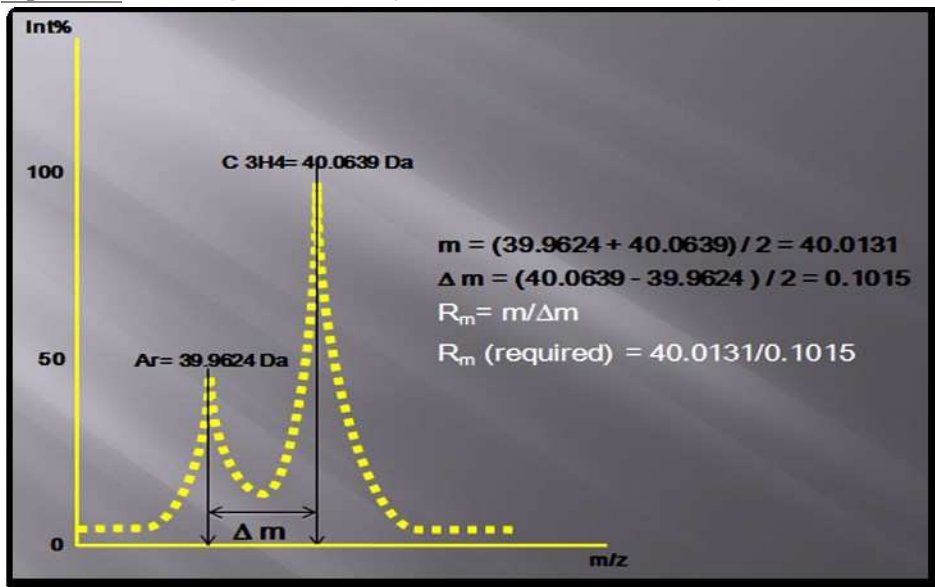


Figure 16 : Calcul de la résolution spectrale dans le spectromètre de masse à temps de vol

- [Selon les Détecteurs](#)

La détection des ions est fondée sur la multiplication d'électrons secondaires. Lorsque les ions énergétiques rencontrent un solide, il y a émission de plusieurs électrons de faible énergie cinétique (conversion ion-électrons). Ceux-ci, à leur tour, une fois accélérés par un champ électrique, produisent des électrons secondaires par choc sur une électrode appelée dynode. Cet effet multiplicatif est mis en cascade dans le multiplicateur d'électrons secondaires. Il peut être couplé à un picoampèremètre et procure alors un gain en courant de l'ordre de 10^4 . Pour des courants plus faibles, il peut aussi fonctionner en régime impulsionnel, avec un gain en charge électrique de 10^8 . Les ions sont alors comptés individuellement. Le même principe est mis en œuvre dans plusieurs types de détecteurs compacts, les dynodes discrètes sont alors

remplacées par une seule électrode semi-conductrice qui assure la répartition du potentiel : multiplicateur magnétique d'électrons, channeltron, galette de microcanaux[100] .

Les taux de comptages sont enregistrés sous la forme de spectres de masse par le logiciel d'acquisition de l'ordinateur qui pilote l'appareil. Ce logiciel effectue la visualisation et le stockage des données. De plus, un logiciel d'analyse effectue les calibrations nécessaires, donne accès aux masses de références ou à la bibliothèque de spectres et assure la présentation des résultats.

6.3. Quelques applications de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse présente un spectre très vaste d'applications, qui s'étend de la recherche fondamentale au contrôle des processus industriels. Seules les principales applications sont présentées ici par domaine scientifique ou technique.

➤ Métrologie

Des mesures de la masse de ^{28}Si , effectuées à une précision de 10^{-11} , ouvrent la voie à une définition microscopique de l'unité de masse, le kilogramme, comme c'est déjà le cas pour les unités de temps ou de longueur. La plus grande cohérence donnée au système international d'unités physiques (système S.I.) est très importante. Cependant, des études supplémentaires sont encore nécessaires pour obtenir une détermination suffisamment précise du nombre d'atomes contenus dans un échantillon macroscopique. En particulier, une très bonne connaissance des espacements interatomiques est indispensable pour passer du volume de l'étalon à sa masse[105].

➤ Physique fondamentale

L'égalité des masses du proton et de l'antiproton a été vérifiée à l'aide d'un piège de Penning, avec une précision de 10^{-10} . Des mesures de masse d'atomes stables, effectuées avec un dispositif du même type, ont permis d'atteindre une précision de 10^{-11} , dans le but d'améliorer la précision sur certaines constantes fondamentales[106] .

➤ Physique nucléaire

Le séparateur électromagnétique d'isotopes est un spectromètre de masse à secteur magnétique capable de délivrer de forts courants. Il sert aussi au tri des fragments de réactions nucléaires pour la production de faisceaux d'ions radioactifs : technique I.S.O.L. (Isotope Separator On-Line). La mesure de la masse du noyau dans son état fondamental fournit une donnée de base pour comprendre sa structure interne (énergie de liaison des nucléons). En s'appuyant sur les masses de noyaux radioactifs de très courte période, on tente de prédire les propriétés de noyaux encore plus instables, non produits actuellement en laboratoire. Ces noyaux, impliqués dans des réactions nucléaires au cœur des étoiles, sont à l'origine des noyaux qui constituent la matière qui nous entoure. Par ailleurs, la mesure de la

différence de masse entre ^3H et ^3He permet la détermination d'une limite supérieure de la masse au repos de l'antineutrino électronique[100] .

➤ Sciences de la Terre

Il s'agit d'un vaste domaine où la spectrométrie de masse est employée pour la mesure des abondances élémentaires et des rapports d'abondances isotopiques : géologie, océanographie, glaciologie, volcanologie, physique de l'atmosphère, étude des météorites, planétologie, etc. Pour mesurer l'abondance d'un élément, on utilise la dilution isotopique, méthode fondée sur la mesure des rapports d'abondances isotopiques, après avoir ajouté à l'échantillon une quantité connue de l'élément dont les abondances isotopiques ont été modifiées. La détermination de l'abondance d'isotopes rares a été considérablement améliorée par la spectrométrie de masse par accélérateur : les ions y sont accélérés à une énergie cinétique supérieure à 1 MeV. La sélectivité de la source d'ions et des réactions d'échange de charge, d'une part, la fragmentation des molécules indésirables, d'autre part, permettent de réduire le taux de contamination isobarique en dessous de 10^{-8} molécules. Le dosage du ^{14}C sert à la datation d'échantillons carbonés. Le dosage du ^{10}Be et de ^{26}Al sert à l'étude du rayonnement cosmique, du champ magnétique terrestre, du mouvement des nappes de charriage et de l'activité solaire ; enfin, ^{129}I sert à l'étude des flux océaniques. La spectrométrie de masse des ions secondaires, ou sonde ionique permet d'effectuer une analyse superficielle de l'échantillon en bombardant chaque point de sa surface par un faisceau d'ions. Cela permet de cartographier l'abondance relative des éléments et les rapports d'abondances isotopiques. Enfin, embarqués dans des ballons stratosphériques, des spectromètres de masse très compacts servent à étudier la chimie moléculaire dans la haute atmosphère ; à bord de véhicules spatiaux, ils sont embarqués pour des études de planétologie (recherche de la vie sur Mars)[100] .

➤ Physique des matériaux et technologies

Ici, la sonde ionique est utilisée pour améliorer les propriétés des composés semi-conducteurs pour la micro-électronique. La nécessité de contrôler la composition à l'échelle atomique a amené à coupler l'ionisation par effet de champ à l'analyse en masse par temps de vol. La sonde tomographique atomique, avec une résolution spatiale de l'ordre de 0,1 nanomètre, visualise et identifie individuellement les atomes situés à la surface de l'échantillon. La spectrométrie de masse trouve une application spécifique dans la technique du vide (industrie spatiale, matériaux), sous la forme du détecteur de fuite et de l'analyseur de gaz résiduels[100] .

➤ Chimie

En chimie minérale, la cellule de Knudsen permet de mesurer les propriétés thermodynamiques d'un composé par injection d'un jet atomique dans la source d'ions d'un

spectromètre de masse. En chimie organique, l'étude des ions métastables est importante pour comprendre les mécanismes de dissociation. Les réactions ion-molécule sont étudiées dans des sources d'ions fonctionnant avec des pressions élevées ou dans des pièges ioniques. L'étude des dissociations par collision contribue à la détermination de la structure moléculaire. Souvent, la mesure de sections efficaces de réaction repose sur l'utilisation de deux spectromètres de masse couplés en tandem. Cette technique est également indispensable à l'étude des polymères et des agrégats ioniques tels que les agrégats de carbone (C_{60}). Le couplage d'un chromatographe en phase gazeuse avec un spectromètre de masse s'effectue à l'aide d'un séparateur à jet moléculaire à plusieurs étages, à membrane ou à tube capillaire chauffé. Pour coupler un chromatographe en phase liquide, le liquide vecteur est éliminé par un système à dérouleur de bande ou par un thermospray. Ces couplages ont des applications très importantes en chimie analytique. De nombreux domaines de recherche et de processus industriels font appel à ces techniques d'analyse quantitative : industrie des parfums, pétrochimie, chimie des polymères, etc.[100] .

➤ Contrôle de l'environnement et activités diverses

L'analyse élémentaire et bactériologique de l'air et des aérosols qu'il contient, l'analyse de l'eau, le suivi des pollutions par les pesticides ou de nombreux processus industriels, l'optimisation des dispositifs polluants tels que les moteurs des automobiles font largement appel à la spectrométrie de masse. Les effets isotopiques dans les processus naturels permettent de contrôler l'origine des produits alimentaires ($^{13}C/^{12}C$). Ces techniques sont aussi utilisées pour la datation et l'identification d'objets historiques (archéologie), d'œuvres d'art (muséographie), etc. Elles sont en usage dans la gestion de problèmes de société : détection des stupéfiants, mise en évidence des fraudes, investigations judiciaires[100] .

➤ Applications biomédicales

Une des plus importantes applications est l'analyse de la structure des biomolécules et de leur identification, notamment les protéines (séquençage des acides aminés). En médecine, quand cela est possible, le marquage isotopique de molécules par des isotopes stables évite l'ingestion par le patient de molécules marquées par un radio-isotope pour le suivi des transferts biologiques à travers les organes. Les principaux domaines d'utilisation sont l'analyse des gaz respiratoires, des gaz sanguins, la mise au point des traitements du cancer. Ces techniques sont aussi largement utilisées en pharmacologie, en toxicologie et pour l'identification des micro-organismes[107] [108] [109] [110] . C'est sur cette dernière application que nous nous sommes intéressé et nous avons tenté d'évaluer lors de cette thèse.



Le travail présenté ici vise à appliquer la spectrométrie de masse type MALDI-TOF à de problèmes d'intérêt médical liés à l'identification des microorganismes et s'inscrit dans la thématique de recherche de l'EA-4438 Physiopathologie et Médecine Translationnelle.

Nous avons appliqué et évalué la spectrométrie de masse à l'identification et au typage des bactéries d'origine clinique.

II. OBJECTIFS DE LA THESE

Ce travail de recherche est articulé en trois parties :

Partie I & II (publication 1) :

Dans cette partie, nous montrons la capacité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF ou MALDIBiotyper™ à différencier et à identifier diverses espèces bactériennes isolées en milieu hospitalier. Les aspects de la mise au point et de la standardisation de différentes approches, sont traités avant d'aborder les applications cliniques. Dans une première approche, pour l'identification des différentes espèces bactériennes les plus fréquemment impliquées en bactériologie médicale, différentes conditions de culture ont été évaluées. Dans le but d'étudier les probables variabilités issues des différents contextes d'analyses et qui peuvent influencer les résultats finaux, dans un premier temps, différentes colonies de la même souche ont été analysées. Ensuite, l'analyse a porté sur des cultures pures de 24 à 72 heures, sur différents milieux de culture, sur des cultures conservées à 4°C et à température ambiante et enfin les différents paramètres liés à la matrice utilisée pour l'ionisation des échantillons. Dans une deuxième approche, pour une reproductibilité nécessaire et la mise en œuvre de cette technique, nous avons participé à une étude multicentrique regroupant 8 laboratoires nationaux et internationaux (France, Allemagne, USA) et les mesures ont été réalisées à partir de deux séries d'échantillons (30 bactéries non fermentantes fournies sur des écouvillons (pour faire des extractions protéiques après culture et des dépôts directs) et 30 échantillons sous forme d'extractions protéiques pour une mesure directe). Les colonies traitées sont âgées de 10 à 18 heures. Une étude comparative entre les méthodes conventionnelles et la procédure MALDIBiotyper™ a été réalisée.

Partie II (publication 2) :

La possibilité d'identifier les bactéries dès la positivité des hémocultures a un intérêt dans la prise en charge clinique du patient, et parfois dans la lecture de l'antibiogramme dès le lendemain de cette positivité. Dans ce chapitre, nous avons abordé l'intérêt de l'identification bactérienne sur les hémocultures positives. Nous avons optimisé un nouveau protocole d'extraction protéique pour l'identification bactérienne directe sans passer par l'étape de l'isolement, qui nécessite généralement 24 heures voir même 48 heures avant d'entamer les différents tests phénotypiques et biochimiques nécessaires. Le but est d'envisager une identification rapide pour une lecture aussi rapide de l'antibiogramme mais aussi pour éviter les tests supplémentaires réalisés sur les contaminants rencontrés dans ce service.

Partie III (publication 3 en préparation) :

Le MALDI Biotyper™ actuellement commercialisé contient quelques lacunes en termes d'identification d'espèces réputées très proches l'exemple des *Escherichia coli* et les *Shigella spp.* Dans ce chapitre, nous exposons la mise en place d'une bibliothèque de spectres de 32 souches appartenant aux genres *Shigella* et *Escherichia*. Nous évaluons la performance de cette base de données dans l'identification au niveau du genre et de l'espèce. La réalisation de cette base de données spectrale a bénéficié des connaissances acquises dans les chapitres précédents telles que celles sur les conditions de culture, sur le prétraitement et traitement informatiques ou encore sur les éléments spectraux discriminants.

Dans l'objectif d'apporter une amélioration de l'algorithme dans ce cas de pathogènes importants, une recherche nous a permis d'établir une base de données sur la base d'un concept de sélection de pics communs des spectres représentant un seul isolat dans la base de données et de biomarqueurs spécifiques à l'espèce. Par ailleurs, la suppression de tous les pics non informatifs et non reproductibles issus des souches cultivées sur un milieu sélectif nous a permis de démontrer les performances de la spectrométrie de masse dans la distinction des *Shigella spp* et les *E. coli* lactose négatif. Trente-deux souches ont servi pour la construction de la banque dont 15 appartenant au genre *Escherichia* et 17 au genre *Shigella*. Le concept et son insertion au logiciel Biotyper sont examinés dans une démarche de valorisation en partenariat avec la société Bruker. Autres souches ont ensuite pu être identifiées correctement (un manuscrit est prêt).

Partie III (publication 4 en préparation) :

Après la possibilité de l'identification des espèces majeures par spectrométrie de masse, nous avons développé dans cette deuxième partie de notre travail l'identification intra-spécifique ou le typage (identification de souches au sein de la même espèce). Cette étape qui se situe au-delà de l'identification de l'espèce, requiert la recherche d'éléments spectraux discriminants faiblement visibles dans les spectres. Ce travail consiste à évaluer l'intérêt de la spectrométrie de masse comme méthode de typage et les applications porteront sur deux agents pathogènes importants pour l'homme : *S. aureus*, *Vibrio sp* pour lesquels nous possédons des collections de souches que nous avons bien caractérisées à l'échelle phénotypique.

Les résultats prometteurs obtenus lors de ce travail ouvrent des perspectives à la poursuite des applications de cette technologie dans d'autres domaines tels que l'évaluation des mécanismes de résistance, la recherche de facteurs de virulence, ou encore à l'étude de l'organisation de biofilms.



« L'art et le métier ne sont pas deux choses séparées. Invention et génie ne peuvent se passer ni de savoir ni de méthode. »

Jacques Copeau

Cette partie comporte les méthodes ainsi que les moyens et outils dont nous avons disposé pour réaliser ce projet de recherche. "Les Souches bactériennes, les milieux de cultures, les solutions et tampons, techniques usuelles diverse, MALDI-TOF, Procédure de profilage et traitement de données"

III. MATERIELS & METHODES

1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans notre projet de recherche sont figurées dans l'Annexe I. Près de 5000 souches bactériennes ont été identifiées dans un cadre d'analyses de routine. Aussi, plus de 201 souches indépendantes de *Staphylococcus aureus*, collectées sur 20 ans provenant de différentes infections comparées pour examiner le pouvoir discriminatoire de la méthode. Pour les autres bactéries à Gram+ 146 souches se répartissent en 17 espèces du genre *Corynebacterium* et 3 espèces proches des Corynébactéries. Une autre liste de bacilles à Gram négatif a été testée contenant 68 souches soit 12 espèces différentes appartenant aux genres : *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* et *Serratia*. Aussi pour tester le pouvoir discriminatoire de la technique de MALDI-TOF MS 32 souches de *E. coli* céfotaximase BLSE ont été collectées et analysées. Toujours dans le même cadre de typage bactérien 58 souches appartenant au genre *Vibrio* ont été aussi analysées et étudiées.

Dans le but de différencier *Shigella sp* et *Escherichia coli* par MALDI-TOF, 98 souches ont été collectées, analysées et étudiées.

L'ensemble de ces souches était déjà identifiées par des méthodes classiques et non classiques (Caractères biochimiques, ADNr 16S). De plus, pour les souches de *S. aureus*, nous connaissons leur production pour un ensemble restreint de toxines. L'antibiogramme de toutes les souches est connu.

2. Production de masse et stockage des isolats

Après identification, une colonie était prélevée à la pipette Pasteur et mise en suspension dans 200 mL de milieu LB (tryptone 10 g, NaCl 10 g, extrait de levure 5 g pour 1 L, pH7,5) pendant 18 h à 37°C sous agitateur. Le culot bactérien était récupéré, lavé dans du PBS, aliquoté en 4 pour permettre les différentes extractions et stocké à -70°C. Les souches peuvent être conservées plusieurs mois à -70°C.

3. Milieux de culture

Milieu 2 x TY (Trypcase-Yeast- Extract) : 1,6 (p/v) bio-trypcase (Biomérieux), 1% (p/v) extrait de levure (Oxoid), 0.5% (p/v) NaCl pH 7.4. Le milieu gélosé contient 1.5% (p/v) d'agar.

Milieu de congélation des souches : 80% (v/v) Brain Heart Infusion (BHI), 10% (v/v) sérum de cheval, 10% (v/v) glycérol (100%).

Milieu Mueller-Hinton : Extrait de boeuf 2 g, hydrolyse acide de caséine 17.5 g, amidon 1.5 g pour un volume de 1 L.

Milieu Blood columbia : gélose au sang (gélose Colombia + 5% de sang de mouton), BioMérieux® France.

Milieu Drigalski : peptone 15.0 g, extrait de levure 3.0 g, extrait de viande 3.0 g, lactose 15.0 g, désoxycholate de sodium 1.0 g, cristal violet 0.005 g, bleu de bromothymol 0.080 g, thiosulfate de sodium 1.0 g, agar 11g, pH=7.4. BioMérieux® France.

Milieu Nutrient Broth N°2: Labo-lemco (Oxoid L29) 10.0 g, Peptone (Oxoid L37) 10.0 g, NaCl 5.0 g, pH 7.5 (Oxoid LTD, Royaume-Uni).

Milieu BHI (Bacto TM Heart Infusion Broth): (25 g/L): Beef Heart Infusion 10.0 g Tryptone 10.0 g, NaCl 5.0 g, (Becton, Dickinson and company- USA).

Agarose: type D-5, T° de gélification 36°C, T° d'infusion 89,3 °C, (EuroMedex).

BD BACTEC™ Peds Plus/F : Milieu pour la recherche et la mise en culture de micro-organismes provenant d'enfants pour lesquels le volume de prélèvement est inférieur à 3 ml. Ces milieux associés à des algorithmes spécifiques optimisent la détection d'organismes significatifs tels que *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*. Quarante mL de bouillon Trypticase soja enrichi, avec résines. (Becton Dickinson, Meylan, France).

BD BACTEC™ Plus Anaerobic/F : Milieu pour la recherche et la mise en culture de micro-organismes principalement ANAEROBIE. Ce flacon n'est pas inoculé lorsque le flacon BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F est utilisé. Vingt-cinq ml de bouillon Trypticase soja enrichi, avec résines. (Becton Dickinson, Meylan, France).

BD BACTEC™ Plus Aerobic/F : Milieu pour la recherche et la mise en culture de micro-organismes, principalement aérobies. Ces milieux contiennent des résines pour l'inhibition des antibiotiques. 25 mL de Trypticase Soja enrichi. (Becton Dickinson, Meylan, France).

4. Solutions et tampons usuels

TEB 10x : 0.89 M Tris-base, 0.89 M acide borique, 25 mM EDTANa₂ (Titriplex III), pH 8.3.

TE : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTANa₂ (TitriplexIII), pH 8.0.

EC Lysis Buffer : 6 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA (Titriplex II), 1 M NaCl, 0.5% (p/v) Brij58, 0.2% désoxycholate de Na, 0.5% (v/v) lauroyl sarcosine.

Tampon de protéolyse : 0.25 M EDTANa₂, 20 mM EGTA, 1% (p/v) Lauroyl sarcosine (p/v), pH 9,0 et 250 µg/mL de protéinase K)

TE PMSF : TE – 0,1 mM PMFS

Tampon PIV : 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA acide, 10 mM EGTA, 1 M NaCl, pH 7.5).

Tampon d'électrophorèse : Running Buffer de BioRad

Lambda Ladder PFG Marker : 1% LMP agarose, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA et 50% glycérol dans le gel en seringue, 50 µg/mL d'ADN du phage lambda ligué statistiquement

(New England Biolabs). Stocké à 20°C, chaque seringue contient environ 25 "Plugs" dont 10 µL de "Plug" contiennent environ 0.5 µg d'ADN.

Réactifs MALDI-TOF

Matrice : α-HCCA : 10 µg, ACN: 200 µL, TFA: 10 µL, H₂O : 190 µL

Le calibrant : Extraits protéiques d'*E. coli*/DH5 alpha.

5. Identification et Antibiogramme (S. aureus)

Les méthodes microbiologiques standards pour l'identification de *S. aureus* ont été la coloration de Gram, la croissance sur milieu gélosé Columbia enrichi en sang de cheval ANC (acide nalidixique et colistine) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), les tests de la catalase, la DNase, la coagulase et le test d'agglutination (Fumouze Diagnostics, Levallois-perret, France). La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton à 37°C avec un inoculum de 10⁶UFC/mL conformément les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2008, 2009 et 2010). Les molécules suivantes sont testées en routine au laboratoire : pénicilline G, amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, kanamycine, tobramycine, gentamicine, tétracycline, érythromycine, lincomycine, pristnamycine, triméthoprim-sulfaméthoxazole, péfloxacin, rifampicine, acide fucidique, fosfomycine, vancomycine, teicoplanine. La production de β-lactamase était détectée par le test à la nitrocéfine (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France).

6. Recherche de la résistance à la méthicilline

Méthode de diffusion

La sensibilité à l'oxacilline a été déterminée par la méthode de diffusion à 37°C en milieu gélosé de Mueller-Hinton contenant 4% de NaCl à l'aide de disques chargés à 5 µg d'oxacilline avec un inoculum de 10⁶ UFC/mL et lecture à 24 ou 48 h. Une souche est considérée comme résistante quand le diamètre d'inhibition est inférieur à 20 mm et pour toute croissance autour du disque. Une souche est considérée comme résistante hétérogène en cas de croissance partielle dans la zone d'inhibition ou de micro-colonies autour du disque. Pour les écouvillons nasaux, la recherche de la méticillino-résistance s'est faite avec le milieu Oxacillin Screen Agar (Becton Dickinson, BD Diagnostics, Germany) selon les recommandations du fabricant : une suspension bactérienne ajustée à 0.5 unité McFarland était ensemencée sur le milieu Oxacillin screen agar sous forme de spot à l'aide d'un écouvillon. Une gélose Columbia au sang était ensemencée en parallèle et selon les mêmes conditions comme témoin de la croissance bactérienne en l'absence d'oxacilline. La lecture se

fait après 24h d'incubation à 35°C : toute culture bactérienne est considérée comme un résultat positif.

7. Identification des souches par le système VITEK2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

Une suspension bactérienne a été ajustée à une norme McFarland de 0.55 à 0.62 dans 2,5 mL d'un 0,45% (poids / volume) de solution de chlorure de sodium. Vitek 2 GN ® contient 47 cartes de tests biochimiques. Le GN est un système entièrement fermé à laquelle aucun des réactifs ne doit être ajouté. La carte a été mis sur la cassette conçue pour Vitek 2, placé dans l'instrument, automatiquement remplis dans une chambre à vide, scellée, incubés à 35,5 ° C, et automatiquement soumis à une mesure colorimétrique par l'utilisation d'une tête de lecture optique de nouveaux toutes les 15 min pour une période d'incubation maximale de 10 h. Le Vitek 2 GN ® carte a été utilisée avec le système Vitek 2, la version XL VT2-135P.

8. Détermination du sérotypage et toxines de cholera

Les souches de *Vibrio cholerae* isolées dans les trois usines de traitement des eaux usées situées près de la ville d'Agadir (Maroc) ont été confirmées sérologiquement en utilisant un test d'agglutination sur lame avec l'antisérum polyvalent spécifique à *V. cholerae* O1 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Les bactéries ont été cultivées dans un milieu CAYE (Casamino Yeast Extract) et les titres de la toxine cholérique (CT) ont été déterminés par agglutination passive au latex inversé (RPLA) selon les recommandations du fabricant (toxine Oxoid, kit de détection de FEP RPLA).

9. Test d'antibiogramme (*Vibrio sp*)

Tous les isolats de *Vibrio cholerae* ont été préalablement examinés pour leur sensibilité à vingt antimicrobiens (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), en utilisant la méthode de diffusion sur disque comme indiqué par la Société Française de Microbiologie (SFM). Les concentrations d'antibiotiques sur les disques utilisés sont en conformité avec les points d'arrêt définis par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-FSM), qui sont normalement utilisés pour la catégorisation clinique des pathogènes bactériens humains. Les mêmes agents antimicrobiens ont été testés pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par des tests automatiques, en utilisant le VITEK 2 AST-n051® cartes (BioMérieux). Les antibiotiques suivants ont été inclus dans l'étude: l'amikacine, amoxicilline / acide clavulanique, l'ampicilline, céfalotine, céfépime, céfotaxime, la céfoxitine, la ceftazidime, la ciprofloxacine, la fosfomycine, gentamicine, acide nalidixique, la

nitrofurantoïne, la norfloxacin, l'ofloxacin, pipéracilline / tazobactam, ticarcilline, tobramycine et le triméthoprime-sulfaméthoxazole.

10. Protocole recherche des SE (A à I) et TSST chez des *S. aureus* par xMAP

Culture

Inoculer 1 colonie d'une gélose au sang dans 3mL de BHI en tube de 14 et incubé sous agitation 1 nuit à 35°C. Centrifuger 5 min à 10 000 x *g*, décanter et congeler le surnageant à -20°C.

Conditionnement de l'échantillon : neutralisation de la protéine A

Décongeler et mélanger 60 µL de surnageant de culture avec 60 µL de Tp (80mM Tris HCl, 280mM NaCl, pH 7,5, Tween 20 à 0.1% et IgG « aspécifiques » de lapin purifiés par affinité (protéine G) à 200µg/mL). Incuber 45min à TA sous agitation.

Protocole xMAP

1) Etablir le plan de plaque (Plaque 148 et 149). Il comprend :

- la gamme d'étalonnage de 16384 à 8 pg/mL (dilution de 2 en 2) : 2 puits par concentration et une gamme par plaque avec les 9 SE mélangées.
- le blanc réactif : 6 puits par plaque
- le blanc échantillon avec 50% de BHI : 2 puits
- un témoin « TBS + » : blanc réactif contaminé artificiellement avec 1024ng/mL de chacune des 9 SE : 2 puits
- un témoin « BHI + » : blanc avec 50% BHI contaminé avec 1024ng/mL de chacune des 9 SE : 2 puits
- les échantillons, après neutralisation de la protéine A : 1 puits par souche.

Rem : les 2 témoins + servent à évaluer le taux de recouvrement dans 50% de BHI.

2) Dans une plaque de 96 puits Multiscreen HTS (Millipore) à filtre (1,2µm), répartir 50 µL (Tp : TBS-T (40mM Tris-Hcl +140mM NaCl pH 7,5 + 0.05% Tween 20) à par puits d'une suspension contenant 9 billes de couleur différentes chacune sensibilisée avec un Ac de lapin dirigé contre une SE, à 10⁵ billes par mL pour chaque SE.

Le couplage s'effectue en présence d'EDC et de sNHS (Uptima): formation d'une liaison amide stable entre les billes carboxylées et l'Ac dans des conditions initiales de 60 µg d'Ac pour 3,25.10⁶ microsphères.

La monospécificité vis-à-vis d'une SE donné est obtenue par immunoabsorption en chromatographie d'affinité à partir d'Ac polyclonaux de lapins déjà purifiés par affinité.

Laver par aspiration 1X à l'aide d'un dispositif Manifold (Millipore) : dépression <5 inches de Hg et lavage avec 100µL (TBS+Tween20 à 0,05%)/puits.

3) Avec une pipette mono-canal, transférer 50µL d'Ag/puits (blanc, standard, contrôle, échantillon selon le plan de plaque).

Agiter à 750rpm (Titramax de Heidoph), pendant 1h30, TA, à l'obscurité.

Laver par aspiration 3X avec 100µL de TBS+0,05% Tween20 par puits.

4) Préparer à partir de solutions mères d'Ac Biotinylés à 100 µg/mL, une solution fille contenant les 9Ac-Bt aux concentrations (antiSEA à SEE : 0,25 µg/mL ; antiSEG, SEH, SEI et TSST à 1,0µg/mL) dans du tampon (TBS+Tween20 à 0,05%, BSA 1%).

Ajouter 50µL de la solution fille par puits avec une pipette multi-canaux (réservoir).

Agiter à 750rpm, pendant au moins 1h, à TA, à l'obscurité.

Aspirer puis laver 3X (aspiration et lavage avec 100µL de TBS+0,05%Tween20)/puits.

Les Ac-Bt sont des Ac polyclonaux de lapin dirigés contre chaque SE et purifiés par affinité. Le couplage covalent s'effectue en présence de sNHS-ic-biotine (Invitrogen)

5) Préparer une solution de SAPE (Streptavidine Phycoérythrine) d'Invitrogen (S21388) à 1µg/mL dans TBS+Tween20 à 0,05% + BSA1% à partir d'une solution mère à 1mg/mL.

Ajouter 50µL de SAPE/puits avec une pipette multi-canaux (réservoir).

Agiter à 750rpm, pendant 15min, à TA, à l'obscurité.

Aspirer et laver 3X (aspiration et lavage avec 100µL de TBS+Tween20 à 0,05%)/puits.

Reprendre dans 125µL de SAPE/puits de TBS+Tween20 à 0,05%.

Agiter à 750rpm, pendant au moins 2min à TA, à l'obscurité.

6) Démarrer la lecture sur Bio-Plex100 selon le plan de Plaque et les instructions de Bio-Rad.

7) Exploitation des résultats

Le signal fluorescent (médiane sur 100 billes de chaque région) net suit une régression non linéaire à 5 paramètres (Biologic 5PL : logiciel incorporé dans Bio-Plex Manager 4.0). A l'aide de la gamme étalon obtenue, le signal net des essais (FI brute-(BlcBHI-Blcréactif149)-Blcréactif) est exprimé en pg/mL.

Détermination de la limite de quantification (LQI)

1^{ère} méthode : il est couramment admis qu'elle correspond à la moyenne du Blc + 10s. Cette limite donne une interprétation reprise dans la 1^{ère} feuille « d+10s » du fichier Excel « synthèse Plq 148 et 149 ». Avec cette définition de la LQI, quel que soit l'SE, des souches avec un titre proche de la LQI sont positives (phénotype +) alors qu'il est permis d'en douter.

2^{ème} méthode : en se basant sur l'observation, le CV% pour les concentrations très faibles de toxines est souvent entre 30 et 50%. Aussi, arbitrairement, avec un CV de 50% pour chaque SE, la LQI correspond à (d+10x0,5xm) (m= moyenne du Blc réactif). Cette limite donne une interprétation reprise dans la 2^{ème} feuille « d+10CV50 » du fichier Excel « synthèse Plq 148

et 149 121211 ». Ce seuil pose un problème pour SEI (et pour SEG dans une moindre mesure), car la production de SEI en BHI semble faible.

Rem : cette méthode produit des seuils différents d'une plaque à l'autre, car les moyennes du contrôle réactif sont significativement différentes selon la plaque.

Cette méthode de phénotypage est à valider par un génotypage des souches.

11. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

11.1. Identification directe des Hémocultures par MALDI-TOF

Séparation (cellules sanguine et bactéries) et protocole d'extraction protéique

Environ 1,5 mL a été récupéré à partir des flacons BC positifs, et injecté avec une seringue dans des tubes BD Vacutainer muni d'un gel séparateur (n = 166 tubes) (Becton Dickinson) ou Z Sérum activateur Clot sept (n = 400) (Greiner Bio One, Courtaboeuf, France). Les tubes ont été centrifugés à 500 x *g* pendant 10 min à température ambiante (TA) pour séparer les cellules sanguines dans le bas du gel et les débris cellulaires et le plasma (surnageant) et les bactéries à la surface du gel. Les culôts bactériens ont été suspendu dans 1,5 mL d'eau stérile, transféré à un microtube Eppendorf et centrifugé à 300 x *g* pendant 1 min à température ambiante pour une meilleure élimination des débris cellulaires toujours présents, ce qui diffère des protocoles antérieurs. Un microlitre de ce surnageant a été transféré à un autre microtube pour recueillir les bactéries après une centrifugation 10 000 x *g* pendant 2 min à température ambiante[6] .

Le culot bactérien a été traité avec de l'éthanol standard / acide formique protocole d'extraction d'acide de protéines pour MALDI-TOF/MS d'identification[6]. Un microlitre d'extrait protéique a ensuite été chargé, en duplicat dans des puits d'une plaque en acier poli TF MTP target plate 384 (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne), couvert de 1,5 µL d'une solution saturée de α-cyano-4-hydroxycinnamique acid/MALDI- TOF matrice dans 50% (v / v) acetonitrile/2.5% (v / v) d'acide trifluoroacétique comme un donneur d'électrons. (Figure 17: Les différentes étapes de l'extraction protéique pour une éventuelle identification par MALDI-TOF/MS à partir des échantillons d'hémoculture.)

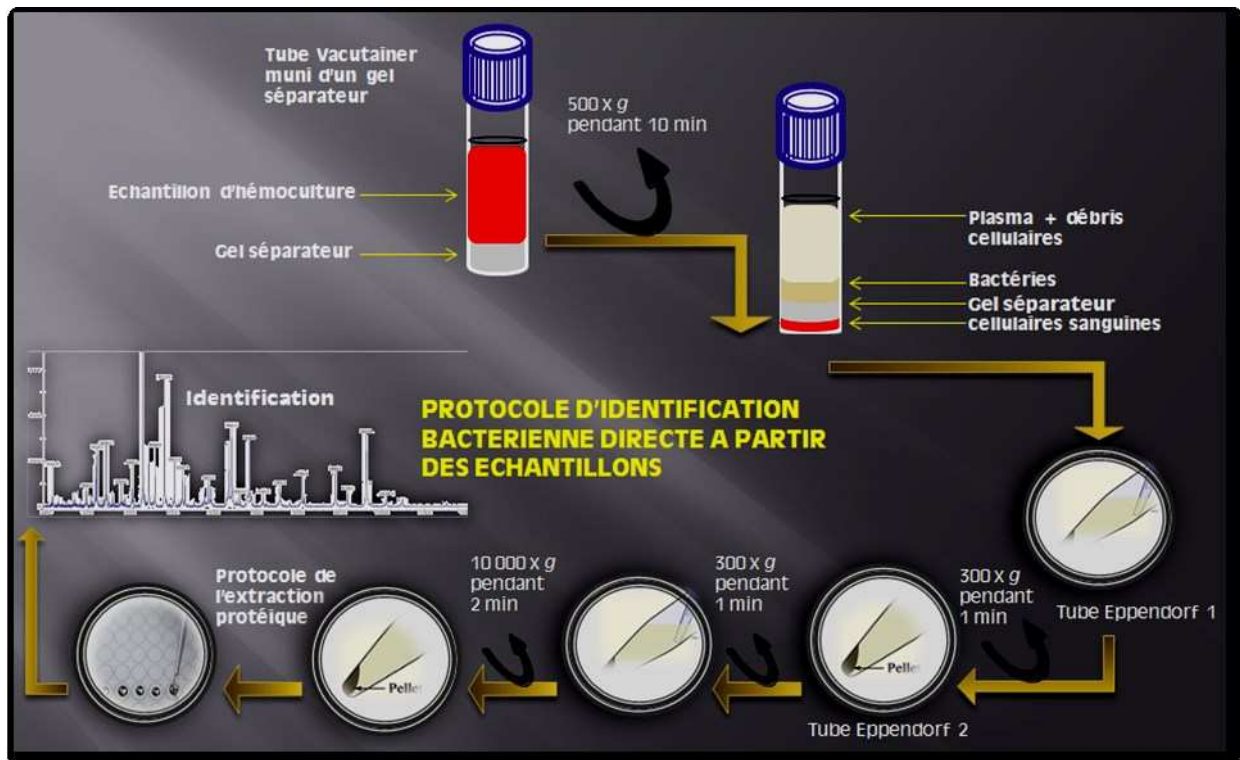


Figure 17: Les différentes étapes de l'extraction protéique pour une éventuelle identification par MALDI-TOF/MS à partir des échantillons d'hémoculture.

11.2. Procédure de profilage des Microorganismes par MALDI-TOF

Culture des microorganismes (matériels de départ) et préparation des échantillons

Nous avons utilisé des cultures fraîches sur gélose au sang de mouton, le plus souvent, incubées pendant 24h à 37 °C ou dans le cas de bactéries à faible croissance, une incubation de plusieurs jours a été réalisée. Si les précultures sont stockées à 4°C la qualité du spectre diminue rapidement (en quelques jours). Le stockage des cultures sur milieu solide à température ambiante pendant plusieurs heures n'est pas recommandé. Il est conseillé d'utiliser le même milieu et les mêmes conditions de croissance pour la culture des microorganismes. L'analyse des cellules lyophilisées est aussi possible.

Cinq à 10 mg de culture bactérienne (2-5 colonies) sont mis en suspension dans 300 µL d'H₂O, puis 900 µL d'éthanol absolu sont ajoutés. Après avoir homogénéisé la suspension, elle est centrifugée pendant 2 min à 13 500 rpm, et le surnageant est éliminé. Une seconde étape de centrifugation peut être nécessaire pour enlever totalement l'éthanol.

Au culot restant sont ajoutés 50 µL d'acide formique 70% (v/v). Le tout est mélangé vigoureusement par pipetage et au vortex, et 50 µL d'acétonitrile pur sont ajoutés avant une homogénéisation délicate, puis le mélange est alors centrifugé pendant 2 min à 13 500 rpm, et le surnageant-échantillon est immédiatement transféré dans un autre tube

Eppendorf (Figure 18: Les différentes étapes de l'extraction protéique pour une éventuelle identification par MALDI-TOF/MS).



Figure 18: Les différentes étapes de l'extraction protéique pour une éventuelle identification par MALDI-TOF/MS

Préparation de la matrice et dépôt de l'échantillon

La solution extemporanée de matrice se compose de 200 à 500 µL de 50% (v/v) acétonitrile, 2.5% (p/v) TFA dans laquelle quelques cristaux de α -HCCA vont saturer la solution. Après avoir vortexé la solution pendant quelques minutes, elle est soniquée pendant 2 min (P : 30 W, F : 50/60 Hz) à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une solution saturée. La solution est centrifugée pendant 1 min à 6000 x g. Un µL de ce dernier est déposé trois fois sur la plaque cible à 384 dépôts en acier et laissé sécher à l'air libre. Le dépôt d'échantillon est finalement recouvert avec 1 µL de la solution matrice et à nouveau laissé à sécher.

Remarque: il faut travailler rapidement pour éviter tout risque d'oxydation de l'analyte pouvant conduire à une modification des pics, surtout avant de l'ajout de la solution matrice.

Mode opératoire pour la détermination des masses

La matrice permet de protéger l'analyte/échantillon d'une ionisation directe (d'où un ratio analyte/matrice, 1:100 à 1:50 000), de refroidir les ions grâce à une distribution plus fine de l'énergie cinétique, d'améliorer le rendement d'ionisation et aussi de ne pas ajuster la longueur d'onde de travail du laser à la longueur d'onde d'absorption de chaque analyte. Le choix

d'utiliser la matrice dépend du type de laser utilisé puisque les molécules de matrice doivent présenter une forte absorption à la longueur d'onde émise par le laser (ici laser à azote, $\lambda=337$ nm), et dépend aussi de la nature des molécules à ioniser, puisque la formation finale d'ions analytes requiert une co-cristallisation préalable de l'échantillon dans la matrice. L'intensité du laser est adaptée à chaque type d'échantillon. Le laser n'est utilisé qu'entre 40 et 60% de sa puissance maximale, laquelle peut-être augmentée ou abaissée grâce à une lentille filtrante. Les spectres de masse sont obtenus en mode positif linéaire à fréquence maximale (20 Hz soit 20 tirs/seconde par point de dépôt) avec une résolution mono-isotopique. Une série de 20 tirs suffira à l'acquisition d'un spectre. Pour un dépôt, 40 séries de 20 tirs seront effectués et les spectres seront traités pour déterminer un spectre moyen par dépôt. La gamme des m/z mesurés va de 1000 à 20000, soit de 1-2 à 20 kDa. L'acquisition automatique des spectres est réalisée en utilisant le logiciel "FlexControl™" (Bruker Daltonics) avec un contrôle de brouillage de l'intensité du laser. Un transfert direct des données vers un logiciel d'identification est possible. (Figure 13:Schéma général d'un spectromètre de masse type MALDI-TOF. Dans le spectromètre de masse à temps de vol, le miroir électrostatique présente le double avantage d'augmenter la longueur du trajet et de compenser les effets de la dispersion d'énergie cinétique)

11.3. Traitement des données avec le logiciel Biotyper1.1™ (Bruker)

Le Biotyper™ 1.1 est un logiciel pour l'analyse des spectres dans le contexte d'une identification microbienne; ces spectres peuvent être générés avec des spectromètres de masse Bruker de type Biflex® ou Refeflex®, Omniflex®, Microflex®, Autoflex® ou Ultraflex®. AXIMA@SARAMIS assurance, AXIMA@SARAMIS confiance, AXIMA@SARAMIS performance (Shimadzu™).

Le Biotyper™ 1.1 est basé sur MATLAB 7.1, il utilise et permet de générer différentes banques de données pour produire à partir des spectres, des listes de pics ou des références de spectres. L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance utilisant les positions de pics, leurs intensités autant que leurs Fréquences d'apparition. De plus, le logiciel permet l'analyse de pics basée sur la génération des principaux composants et sur l'indice de corrélation des composants. Il incorpore toutes les fonctionnalités pour réaliser l'acquisition du spectre de masse, comme aussi pour l'identification et la classification des microorganismes.

Les paramètres de procédure sont définis par l'utilisateur, et les résultats sont déduits par la liste des pics. Le modèle assorti "pattern matching", pour l'identification d'un microorganisme inconnu est accompli par la comparaison de la liste de pics générés avec la banque de

données contenant les informations caractéristiques du spectre de différentes espèces. La banque des spectres est générée par plusieurs mesures d'une espèce ou d'une souche bactérienne connue, puis les informations spécifiques du pic 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 les de spectres d'une seule espèce.

Les microorganismes inconnus sont identifiés en comparant leurs pics individuels à la banque de données. Le "matching score", basé sur les masses identifiées et la corrélation de leurs intensités, est généré et utilisé pour classer les résultats. Pour augmenter la fiabilité des données recherchées, le Biotyper™ 1.1 est capable de corriger les déviations de masses des pics à partir d'un algorithme de re-calibration sophistiqué. Le logiciel peut adapter la calibration d'une nouvelle liste de pics à une liste de pics connue dans des limites ajustables. Des spectres comportant des déviations de masse de 5 000 ppm peuvent être identifiés. Cette fonctionnalité rend l'identification de Biotyper™ 1.1 exceptionnellement robuste et fiable.

Identification, analyse et classification de spectre

Pour l'identification, l'analyse et la classification de spectres, le Biotyper™ 1.1 offre trois approches différentes : MSP (Main Spectra Projection) qui retient tous les spectres avec un bruit de fond égal à 0,1% et PCA (Principal Component Analysis) utilisé pour la classification des bactéries soit en dendrogrammes, soit en deux ou en trois dimensions et qui ne retient que les 70 pics majoritaires avec un bruit de fond égal ou supérieur à 1% ; et enfin CCI (Component Correlation Index) qui est une méthode statistique pour l'analyse des relations entre les spectres et produit des paramètres de distance entre ces derniers[4] . Spécifiquement, pour la séparation de microorganismes très proches, il est recommandé d'essayer tous les outils d'analyse. De plus, la masse des pics de spectres principaux peut être déterminée, afin de permettre une meilleure séparation de spectres très similaires et l'éventuel repérage de certaines protéines.

11.4. Reproductibilité et répétabilité

Pour tester la robustesse de la méthode, une gamme de conditions de culture a été employée. Dix souches de *S. aureus* ont été utilisées, afin d'avoir une vue globale sur les effets qui pourraient perturber ou modifier les spectres et promouvoir les meilleures conditions de culture. De plus, trois souches commerciales d'*E. coli* ont été repiquées 20 fois pour examiner la répétabilité des profils obtenus par le MALDI-TOF/MS. Par ailleurs, des extraits protéiques sur ces dernières souches et des souches de *Staphylococcus* à coagulase négative ont été

réalisés et conservés à 4°C et à 20°C pour déterminer l'effet de la congélation sur la reproductibilité.

Les dix souches de *S. aureus* ont été cultivées dans 5 milieux de culture différents : gélose au sang (milieu solide), Mueller Hinton (milieu liquide), Bacto Heart Infusion (milieu liquide), et Nutrient broth (liquide) et repiquées trois fois à un intervalle de temps de 24 h. Les extraits protéiques des dix souches ont été réalisés dans 24h, 48h et 72h.

12. Electrophorèse en champ pulsé (ECP)

12.1. Principe

L'électrophorèse en champ pulsé (ECP) ou "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) est, tout comme le ribotypage, une technique basée sur l'analyse de l'ADN bactérien qui permet d'associer à chaque souche son empreinte génétique caractéristique, appelée dans ce cas pulstotype[66] . Méthode largement utilisée en bactériologie clinique, l'ECP est une technique manuelle, longue et délicate à mettre en oeuvre, nécessitant un personnel technique hautement qualifié. Après une lyse "*in situ*" des cellules d'une colonie bactérienne dans une matrice semi-solide d'agarose ("Plug"), pour éviter l'agression chimique des solvants et les forces de cisaillement susceptibles d'endommager l'ADN. Le principe de l'ECP est basé sur l'hydrolyse d'un ADN bactérien intact par une endonucléase de restriction à sites rares pour générer une série de fragments dont la taille et le nombre limité sont caractéristiques de l'isolat étudié. Les fragments qui en résultent sont séparés selon une technique particulière d'électrophorèse où un champ électrique alterné multidirectionnel - champ pulsé- est appliqué, mais dont la résultante reste rectiligne. Les fragments séparés sont alors révélés par une simple coloration au BET et génère un pulstotype (empreinte génétique) caractéristique de chaque isolat.

12.2. Préparation d'ADN bactérien total intact en vue en électrophorèse en champs pulsé

A partir d'une préculture de 3 mL, on ensemence 25 mL de milieu 2 X TY puis on incube à 37°C. Lorsque la culture atteint une DO à 600 nm de 0,4, les cellules sont centrifugées pendant 2 min à 5000 x *g* à 4°C. Le culot bactérien est lavé deux fois avec 5 mL de tampon PIV (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA acide, 10 mM EGTA, 1 M NaCl, pH 7,5), resuspendu dans 600 µL du même tampon, puis 300 µL de la suspension sont chauffés à 55°C pendant 10 min avant d'être mélangés à 600 µL d'agarose à bas point de fusion (Appligène, France) liquide 2% (p/v) dans 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0 puis chauffé encore pendant 10 min à 55°

C. Le mélange est ensuite coulé dans les puits (25x3x3 mm³) d'un support en plastique puis refroidi. Les tranches d'agarose ainsi obtenues sont transférées dans des tubes contenant 1,5 mL de tampon de lyse "EC lysis Buffer", 50 µg/mL de lysostaphine (Sigma) et 500 µg/mL de lysozyme (Sigma). La lyse des parois bactériennes emprisonnées dans l'agarose s'effectue pendant toute la nuit à 0°C. Le tampon de lyse est ensuite remplacé par 1,5 mL de tampon de protéolyse (0,25 M EDTANa₂, 20 mM EGTA, 1% lauroyl sarcosine (p/v), pH 9.0, et 250 µg/mL de protéinase K). La digestion dure 24h à 55°C. La protéinase K est éliminée par 4 lavages par du TE à 0,1 mM de PMSF. Les tranches d'agarose sont ensuite lavées 4 fois avec du TE seul pour éliminer le PMSF. Elles peuvent être ainsi conservées pendant 12 mois à 4°C en changeant le tampon tous les mois[66] .

12.3. Hydrolyse de l'ADN

L'enzyme de restriction *Sma*I (CCC/GGG) est utilisé dans les conditions décrites par le fournisseur (Sigma). Le morceau d'agarose (5x3x3 mm) est équilibré pendant 30 min dans 300 µL de tampon *Sma*I à 4°C. L'hydrolyse s'effectue à température ambiante dans un volume final de 60 µL contenant 10 U d'enzyme pendant au moins 3h à 25°C.

12.4. Electrophorèse en champs pulsé pour les *S. aureus* (Migration)

Elle est réalisée sur un appareil GenePath de Bio-RadTM basé sur la méthode de champ pulsé de CHEF (Contoured Clamped Homogeneous Electric Field) ; différents champs électriques sont activés alternativement et situés perpendiculairement l'un par rapport l'autre. Sous l'effet de ces champs alternatifs, les molécules d'ADN progressent dans l'agar plus rapidement que dans un champ linéaire et sont séparées selon leur taille. Le résultat, obtenu en 24h après révélation de l'ADN, est un profil de macro-restriction définissant un pulsotype. Les paramètres de migration étaient les suivants : voltage à 6 V/cm ; angle à 120°; rampe de pulse de 20 à 5 s pendant 24 h pour les fragments de 20 à 200 kb ; une rampe de pulse supplémentaire de 40 à 20 s est réalisée pendant 24 h pour séparer les fragments de plus de 200 kb. Un marqueur de poids moléculaire lambda (concatémères successifs de 48.5 kb) était utilisé. Les gels étaient colorés par du BET et photographiés sous lumière UV.

Le gel préparé de 1% contient 15 puits (14 échantillons et le marqueur de taille : lambda ladder) dans lesquels sont placés les plugs contenant l'ADN (~3 mm), qui sont par la suite recouverts d'agarose. Le tampon d'électrophorèse pur (volume 100 mL) est dilué dans un volume final de 2L d'H₂O (PURELAB) et versé dans le bac d'électrophorèse de sorte à immerger le gel. L'électrophorèse est mise en route pour 19,7 h après avoir lancé la pompe (courant de 70 à 80) et vérifié que la température du tampon est de 14°C. Le programme

choisi pour le champ électrique alterné est celui pour staphylocoque. L'ADN contenu dans le gel est coloré au BET (1 mg/mL) pendant environ 15 min, puis le gel est décoloré dans 500 mL d'H₂O pendant 30 à 60 min. Le gel est finalement révélé aux UV et le système GelDoc™ 1000 (BioRad). Les tailles des bandes d'ADN des échantillons sont déterminées par rapport à celles du lambda « ladder ». Les profils PFGE ont été analysés avec le logiciel Diversity™ database version 2.0 ; BioRad. Les profils de PFGE ont été assignés temporellement et les types ont été définis en fonction des différences d'une ou de plusieurs bandes entre les souches.

12.5. PFGE pour les souches de *Vibrio sp*

L'analyse PFGE a été réalisée avec Genepath Group ® Kit de réactifs 3 selon les instructions du fabricant (Bio-Rad diagnostic, Ivry sur Seine, France). Brièvement, 100 µl de suspension bactérienne ont été centrifugés et remis en suspension dans le tampon fourni par le kit. Les bouchons d'agarose ont été préparés en mélangeant des volumes égaux de suspensions bactériennes avec 1% (poids / volume) à faible point de fusion d'agarose (Bio-Rad). Les cellules dans les bouchons d'agarose ont été lysées par la solution de lyse et incubés 1 h à 37 ° C. Puis les cellules sont traitées avec la protéinase K solution et incubés 18 h à 50 ° C. L'ADN génomique intégrée dans les bouchons d'agarose a été digéré par l'endonucléase de restriction *NotI*. Un standard de taille d'ADN (bactériophage λ échelle; Bio-Rad) a été utilisé comme un marqueur de taille moléculaire. Le champ électrique alterné est réalisé en utilisant le programme "13" pré-enregistrés dans le module de contrôle de l'appareil Bio-Rad, fixé pour 6,0 V / cm à une température de 15 ° C pendant 18 h avec un 1-15 s linéaires temps d'impulsion rampe et avec 50 µM thiourée ajouté à tampon. Les gels ont été colorés par immersion dans une solution de bromure d'éthidium et photographiés sous éclairage UV.

12.6. Lecture (pour les *S. aureus* et les *Vibrio sp*)

La lecture était réalisée à l'aide du logiciel Bio Image version 4.0 (Genomic Solutions Inc.). Les bandes étaient numérotées de 1 à n, de la bande de plus haut poids moléculaire à la bande de plus faible poids moléculaire.

Les images numérisées du gel ont été converties, normalisées en alignant les normes de taille situées dans les couloirs extérieurs du gel à la norme de référence pour la base de données. L'analyse des profils de bandes a été réalisée avec le coefficient de Dice utilisant 1% de tolérance pour la distance de migration de bande. L'analyse de classification hiérarchique a été réalisée et un dendrogramme a été produit avec le logiciel.

12.7. Critères d'interprétation (pour les *S. aureus*)

Selon les critères de Tenover *et al.*, 1995[111] les souches sont considérées comme identiques si toutes les bandes correspondent entre elles, épidémiologiquement reliées s'il y a de une à trois bandes de différence et possiblement apparentées s'il y a 4 à 6 bandes de différence. Les isolats qui diffèrent par 7 fragments ne peuvent plus être considérés comme épidémiologiquement liés.

L'analyse assistée par ordinateur des profils PFGE de bandes a été effectuée en utilisant Fingerprinting II™ (Bio-Rad Laboratories).

12.8. Critères d'interprétation (Pour les *Vibrio sp*):

L'analyse des profils de bandes a été réalisée avec le coefficient de Dice utilisant 1% de tolérance pour la distance de migration bande. Analyse de classification hiérarchique a été réalisée par la méthode du groupe paire non pondéré par la moyenne arithmétique, et un dendrogramme a été produit avec le logiciel.

13. MLST ou (Multilocus Sequencing Typing)

13.1. Principe

Le principe des MLST est l'étude de la variation nucléotidique de fragments d'environ 450 bp de sept gènes domestiques[112] [113] . Chaque séquence différente correspond à un allèle distinct. Environ 30 allèles par locus sont décrits. Chaque souche est caractérisée par un génotype, ou profil allélique, défini par les allèles des locus à l'étude. Cette technique a un pouvoir discriminant supérieur au MLEE et une très bonne reproductibilité. Une banque de données contenant les types de séquence de plus d'un millier de souches est accessible sur Internet permettant des comparaisons rapides entre les souches (<http://www.mlst.net>). Elle est de plus en plus utilisée pour les analyses génétiques des populations et de phylogénie. Un algorithme appelé eBURST (nouvelle implémentation de l'algorithme BURST, Based Upon Related Sequence Types) a été mis au point pour analyser les rapports entre les souches[114] .

13.2. MLST (méthode)

Les séquences d'ADN de sept gènes de ménage ont été analysées. Les séquences de leurs produits de gènes ont été comparés avec ceux dans la base de données EMBL / GenBank en utilisant BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>), et ses homologues ont été

alignées et les régions les plus variables ont été identifiées. Les amorces ont été conçues en utilisant les séquences des régions hautement conservées qui encadrent les régions les plus variables. Chaque paire d'amorces amplifie un fragment interne du gène de ménage (environ 500 pb) et a permis le séquençage précis de ~ 450-bp des fragments de chaque gène sur les deux brins.

Les sept gènes de ménage suivants ont été utilisés dans le schéma MLST finale et les fragments ont été amplifiés en utilisant les amorces indiquées dans le tableau 3: carbamate kinase (*ARCC*), la shikimate déshydrogénase (*aroE*), glycérol kinase (*BPL*), guanylate kinase (*GMK*), phosphate acétyltransférase (*pta*) triosephosphate isomérase (*tpi*), et l'acétyl-coenzyme A acétyltransférase (*yqiL*).

Tableau 3: Séquences des primers utilisés en PCR (MLST)

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
Carbamate kinase (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimate dehydrogenase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTTGTATTAATAACGATATC
Glycerol kinase (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanylate kinase (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA
Phosphate acetyltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -Up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA
Triosephosphate isomerase (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> -Up	TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC
Acetyl coenzyme A acetyltransferase (<i>yqiL</i>)	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC
	<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

L'ADN chromosomique a été extrait par la méthode de Jørgensen et Pennington [115] [115] [115], mais la méthode a été modifiée pour *S.aureus* par l'inclusion de lysostaphine (Sigma) à une concentration finale de 30 µg/mL à l'étape de lyse cellulaire. Les PCR ont été réalisées avec des volumes de réaction de 50 µL contenant 0,5 µg de l'ADN chromosomique (environ 0,5 µg), 0,5 µg de chaque amorce, 1 U de Taq ADN polymérase (Qiagen, Crawley, Royaume-Uni), 5 µL de 10× tampon (fourni avec la Taq polymérase), et 0,2 mM de chaque désoxynucléoside triphosphate. La PCR a été réalisée avec une incubation initiale de 5 min de dénaturation à 95 °C, suivie de 30 cycles de recuit à 55 °C pendant 1 min, extension à 72 °C pendant 1 min, et de dénaturation à 95 °C pendant 1 min, suivie d'une étape d'extension finale de 72 °C pendant 5 min. Les produits amplifiés ont été précipités avec 20% de polyéthylène-glycol-NaCl 2,5 M, remis en suspension dans l'éthanol à 70% à froid, et précipité, et les séquences de deux brins ont été déterminées avec un séquenceur d'ADN

ABIPrism377 avec BigDye et des dideoxynucléotides marqués fluorescentes utilisées dans l'amplification PCR initiale.

Pour chaque locus, les séquences obtenues à partir de tous les isolats ont été comparées et les différentes séquences ont été attribuées des numéros d'allèles. Pour chaque isolat, les allèles de chacun des sept loci définissent le profil allélique qui correspond au ST. Le regroupement des isolats a été réalisé par la méthode (UPGMA) entre les profils alléliques des isolats. La variabilité dans la distribution des sites variables le long de la séquence de chaque fragment de gène a été examinée par le procédé de Sawyer. Les sites polymorphes ont été affichés à l'aide de la sortie de séquence, un programme Macintosh disponible sur le site MLST (<http://mlst.zoo.ox.ac.uk>).

14. Méthodes d'analyse des résultats

14.1. Analyses Statistiques

Les listes des pics dérivées à partir des principaux spectres peuvent être utilisées pour l'identification, aussi bien que pour la génération d'un dendrogramme de classification. Le score obtenu dans ce contexte est utilisable pour la production d'arbres de la famille (dendrogrammes) et l'analyse de la relation des individus.

14.1.1. Classification Ascendante Hiérarchique (Dendrogramme de classification)

Classer, c'est regrouper entre eux des objets similaires selon tel ou tel critère. Les diverses techniques de classification (ou d'"analyse typologique", de "taxonomie", ou "taxinomie" ou encore "analyse en clusters" (amas) visent toutes à répartir n individus, caractérisés par p variables X_1, X_2, \dots, X_p en un certain nombre m de sous-groupes aussi homogènes que possible.

On distingue deux grandes familles de techniques de classification :

- La classification non hiérarchique ou partitionnement, aboutissant à la décomposition de l'ensemble de tous les individus en m ensembles disjoints ou classes d'équivalence ; le nombre m de classes est fixé.
- La classification hiérarchique : pour un niveau de précision donné, deux individus peuvent être confondus dans un même groupe, alors qu'à un niveau de précision plus élevé, ils seront distingués et appartiendront à deux sous-groupes différents.

Choix d'un indice de dissimilarité

De nombreuses mesures de la "distance" entre individus ont été proposées. Le choix d'une (ou plusieurs) d'entre elles dépend des données étudiées.

Distance Euclidienne. C'est probablement le type de distance le plus couramment utilisé. Il s'agit simplement d'une distance géométrique dans un espace multidimensionnel.

- Distance Euclidienne au carré. On peut élever la distance euclidienne standard au carré, afin de "sur-pondérer" les objets atypiques (éloignés).

- Distance du City-block (Manhattan) :

- Distance de Tchebychev :

- Distance à la puissance.

Indices de dissimilarité et distances

On peut également utiliser d'autres indices de dissimilarité puisque Biotyper™ permet d'effectuer la classification à partir du tableau des scores de dissimilarités entre individus.

Un indice de dissimilarité est une "vraie" distance, s'il vérifie également l'inégalité triangulaire

Choix d'un indice d'agrégation

L'application de la méthode suppose également que nous fassions le choix d'une "distance" entre classes. Là encore, de nombreuses solutions existent. Il faut noter que ces solutions permettent toutes de calculer la distance entre deux classes quelconques sans avoir à recalculer celles qui existent entre les individus composant chaque classe.

Les choix proposés sont les suivants :

- Saut minimum ou "single linkage" (distance minimum).

- Diamètre ou "complete linkage" (distance maximum). Dans cette méthode, les distances entre classes sont déterminées par la plus grande distance existant entre deux objets de classes différentes (c'est-à-dire les "voisins les plus éloignés

- Moyenne non pondérée des groupes associés. Ici, la distance entre deux classes est calculée comme la moyenne des distances entre tous les objets pris dans l'une et l'autre des deux classes différentes.

- Moyenne pondérée des groupes associés. La moyenne précédente est étendue à l'ensemble des paires d'objets trouvées dans la réunion des deux classes.

- Centroïde non pondéré des groupes associés. Le centroïde d'une classe est le point moyen d'un espace multidimensionnel, défini par les dimensions. Dans cette méthode, la distance entre deux classes est déterminée par la distance entre les centroïdes respectifs.

- Centroïde pondéré des groupes associés (médiane). Cette méthode est identique à la précédente, à la différence près qu'une pondération est introduite dans les calculs afin de prendre en compte les tailles des classes (c'est-à-dire le nombre d'objets contenu dans chacune).

- Méthode de Ward (méthode du moment d'ordre 2). Cette méthode se distingue de toutes les autres en ce sens qu'elle utilise une analyse de la variance approchée afin d'évaluer les distances entre classes. En résumé, cette méthode tente de minimiser la somme des carrés

(SC) de tous les couples (hypothétiques) de classes pouvant être formés à chaque étape. Les indices d'agrégation sont recalculés à chaque étape à l'aide de la règle suivante : si une classe M est obtenue en regroupant les classes K et L, sa distance à la classe J est donnée par :

$$D(M,J) = [(NJ + NK)D(K,J) + (NJ + NL)D(L,J) - NJD(K,L)] / NJ + NK + NL$$

La méthode de Ward se justifie bien lorsque la "distance" entre les individus est le carré de la distance euclidienne. Choisir de regrouper les deux individus les plus proches revient alors à choisir la paire de points dont l'agrégation entraîne la diminution minimale de l'inertie du nuage. Le calcul des nouveaux indices entre la paire regroupée et les points restants revient alors à remplacer les deux points formant la paire par leur point moyen, affecté du poids 2.

14.1.2. Clustering par MALDIBiotyper™

14.1.2.1. Indice Composite de corrélation

L'indice de corrélation composite est une méthode statistique pour analyser les relations entre les spectres selon Arnold et Reilly (1998)[4] . Pour calculer l'indice composite de corrélation (l'ICC) les spectres sont divisés en intervalles de même taille. Dans chaque d'intervalle, les parties correspondantes de tous les spectres sont comparées les unes aux autres et la corrélation ainsi que la variante maximale de la fonction d'auto-corrélation de intervalle seront déterminées. La composition de corrélations de tous les intervalles fournit l'ICC, qui sera utilisé comme paramètre de distance entre les spectres. Selon[4] ce paramètre de distance sera calculé en tant que produit de corrélation de tous les intervalles. Contrairement à cela, le Biotyper utilise la moyenne géométrique de tous les intervalles, ce qui conduit à des données plus comparables. Une valeur CCI de 1 représente une proche conformité élevée des spectres; et quand elle est proche de 0 cela indique une diversité claire des spectres.

En changeant le nombre d'intervalles utilisés, la force discriminatoire de l'ICC peut être influencée. Avec un faible nombre d'intervalles, des différences dans les spectres sont tolérées dans une certaine mesure, et vice versa un plus grand nombre d'intervalles conduit à une mise en évidence de différences. Notons que dans ce dernier cas les variations statistiques permettront également d'améliorer la différence mais, peuvent conduire à des interprétations erronées. En conséquence, le nombre d'intervalles doit être adapté à l'égard de la qualité des spectres.

Après la détermination de la CCI dans une bibliothèque de spectres connus, un test de comparaison avec des spectres inconnus peut être effectué. Ce calcul peut être utilisé pour une simple classification des espèces inconnues. Une grande valeur de CCI (par exemple supérieur à 0,9) indique une bonne conformité avec les espèces de référence.

Le calcul de la CCI au sein de Biotyper sera effectué sur la base de bibliothèques prétraitées (preprocessed Library). Après la détermination, les valeurs d'ICC sont présentées comme une matrice dans la vue graphique. Le long de la diagonale principale de la matrice des auto-corrélations pour espèces uniques sont proposées. Leurs valeurs doivent être très élevées (supérieur à 0,95) et représentent la qualité statistique des spectres d'une espèce. Les valeurs de l'ICC pour les entrées hors diagonale de la matrice doit être faible pour les espèces très différentes. Les zones où les valeurs de l'ICC sont élevées indiquent des espèces apparentées. (Figure 19 :Les valeurs CCI d'un jeu de spectres affichées en matrice.)

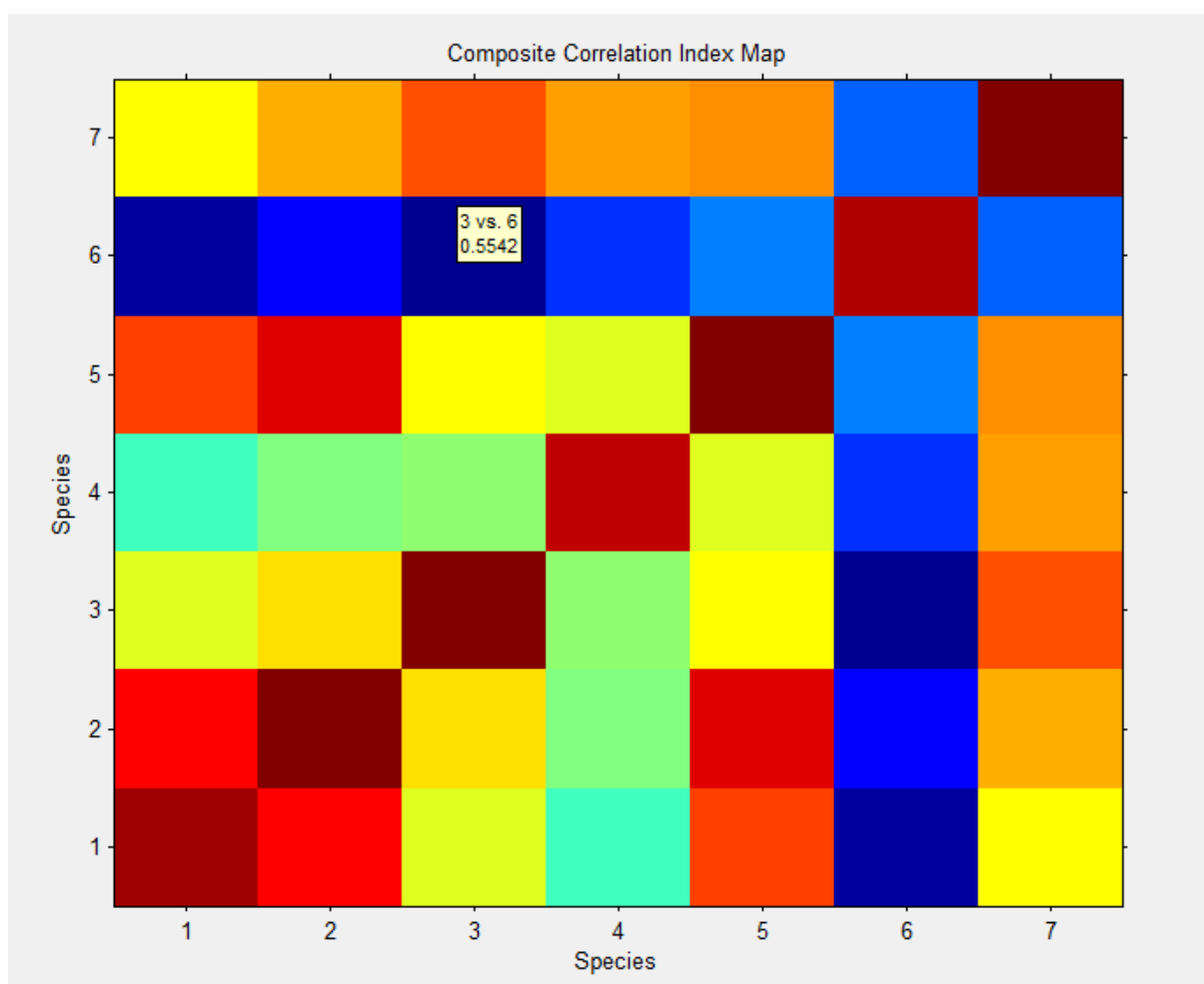


Figure 19 :Les valeurs CCI d'un jeu de spectres affichées en matrice.

14.1.2.2. Analyse des Principaux Composants (PCA)

L'analyse des composants principaux (PCA) est un procédé pour réduire le nombre de variables à des dépendances principales par le biais de la comparaison de différents échantillons, par exemple les spectres de masse. Dans le cas des spectres de masse les variables sont représentées par l'intensité des masses définies. Selon la résolution, le nombre de variables peut être très élevé.

Dans le cadre des caractéristiques d'analyse des principaux composants pseudo-spectres (= principal component, PC) sont produites à partir d'un ensemble de différents spectres uniques. Les PC sont orthogonaux les uns aux autres, n'ont aucune corrélation inverse et représentent les vecteurs propres de la matrice de corrélation des spectres. La partie des vecteurs propres de la matrice de corrélation est déterminée par les valeurs propres, qui sont également utilisées pour le tri. Leur proportion diminue rapidement, ce qui peut être observé à partir du tracé des valeurs propres. L'information principale est contenue dans les premiers PC, la PC effectue l'organisation détaillée de l'information des spectres et les hauts PC contiennent le bruit de fond des spectres. Comme critère pour la sélection des PC, il est utile de ne choisir que celui-ci avec les plus hautes valeurs propres, de sorte que leur somme devrait atteindre 95% de la somme totale. Le Biotyper utilise ce principe pour déterminer le nombre de PC automatiquement.

Chaque spectre unique peut être reconstruit à partir des PC comme la superposition pondérée. Ces poids sont appelés scores, ils peuvent être visualisés par le Biotyper en 2D et 3D Plots. Dans le Plot, tous les points (score) représentent un spectre.

Les scores sont affichés dispersés dans le Plot ([Figure 20: Représentation de la distribution des différents spectres de masse en 2D et 3D par Biotyper 1.1™](#)). Souvent, elles sont regroupées dans des nuages, qui peuvent représenter différentes espèces. En cela, une analyse typologique peut être utilisée pour diviser les espèces en différents clusters [116].

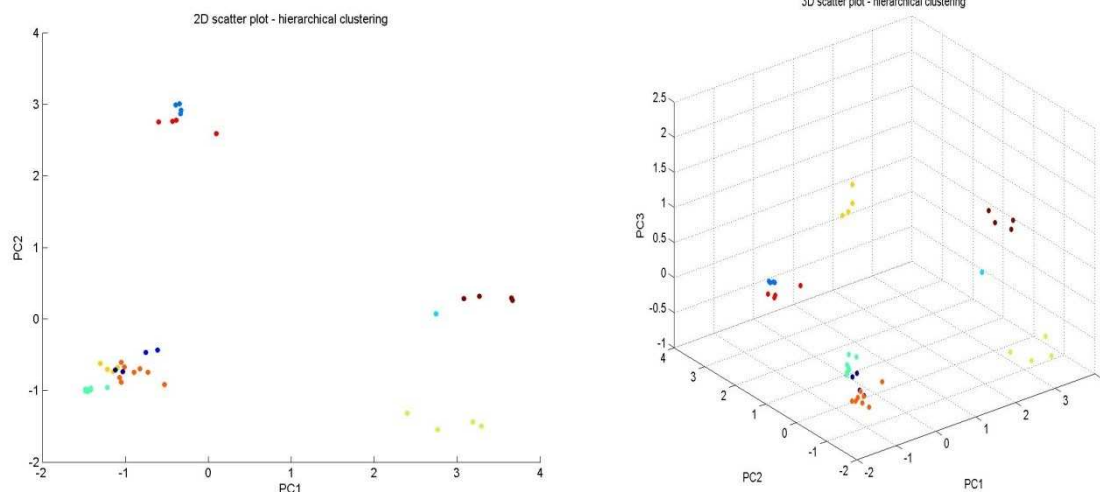


Figure 20: Représentation de la distribution des différents spectres de masse en 2D et 3D par Biotyper 1.1™

14.2. Analyses phylogénétiques

Les méthodes phylogénétiques sont utilisées pour pouvoir comparer les organismes entre eux et établir leur lien de parenté. Sur la base des données obtenues avec les différents marqueurs génétiques, elles permettent de visualiser par les arbres phylogénétiques appelés dendrogrammes, les relations existant entre les isolats.

14.3. Méthodes phénétiques

A partir des matrices de distances calculées sur les bases des données obtenues avec les différents marqueurs moléculaires, un dendrogramme a pu être construit par classification hiérarchique ascendante selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic Average) (Sneath, Sokal, 1962[117]) ou par la méthode NJ (Neighbor-Joining) (Saitou, Nei, 1987[118]). La méthode UPGMA fait l'hypothèse d'une évolution indépendante des différentes lignées à une vitesse constante. La méthode NJ est une méthode agglomérative, qui ne fait pas l'hypothèse d'un taux évolutif constant dans les arbres. Elle produit un arbre non enraciné. La racine peut cependant être localisée par l'utilisation d'un groupe externe. Pour cette étude, l'espèce *S. epidermidis* a été choisie comme groupe externe.

14.4. Identification des Spectres par le Logiciel Biotyper™ (Calcul du matching score)

Sur la base des spectres de références (Base de données) des spectres inconnus peuvent être identifiés. Le processus d'identification compare et aligne les listes de pics de spectres inconnus avec des listes de pics de spectres de références. Dans la première étape les spectres inconnus sont calibrés avec les spectres de références. Pour la calibration, une erreur initiale de masse peut être sélectionnée. Le Biotyper tente de sélectionner et d'aligner les plus hauts pics de chaque spectre tout en étant proche de l'erreur initiale de masse. L'objectif est d'atteindre une homologie très élevée. Dans la deuxième étape, le matching des spectres inconnus avec les spectres de référence sera évalué en se basant sur une valeur de score dédiée. Pour cela, l'information des pics du spectre de référence est transformée en une valeur de score maximal accessible. Chaque pic dans les spectres de référence avec une fréquence de 100% obtient 100 points. Cette fréquence de pics correspond à la reproductibilité du pic respectif au sein des spectres qui ont été utilisés pour la génération de la gamme principale ayant servi à la création de la base de données. Les pics avec des fréquences plus faibles obtiennent des scores appropriés, par exemple un pic de fréquence de 20% obtient 20 points. L'addition de l'ensemble des résultats de points dans un score de points accessibles au maximum. À titre d'exemple un spectre de référence avec : 10 pics de

fréquence de 100%, 5 pics de fréquence de 50%, et 3 pics de fréquence de 10% atteint un score maximum de $1000 (10 * 100) + 250 (5 * 50) + 30 (3 * 10) = 1280$.

Après la calibration chaque pic correspondant du spectre inconnu reçoit une valeur de point dédié aussi. Pour le matching des pics inconnus aux correspondants pics dans le spectre de référence, des fenêtres de masse ajustables sont créées (fenêtre de la masse interne et externe). La fenêtre de masse interne est affectée comme point de pointage complet et la fenêtre extérieure est assignée en corrélation avec la distance de la fenêtre intérieure comme parties de la totalité des points. Un pointage complet signifie que le pic du spectre inconnu recevra le même score, comme le pic correspondant du spectre de référence. Dans le graphique les pics sortant correspondant dans la fenêtre interne (par exemple 200 ppm) sont verts, au sein de la fenêtre extérieure (par exemple 500 ppm) sont jaunes et les pics non-correspondants sont rouges (Figure 21 : Les résultats Graphique d'identification. La partie supérieure montre le spectre contenant des pics inconnus, les pics similaires au sein de la fenêtre intérieure (verte), au sein de la fenêtre extérieure (jaune) et les pics non similaires (rouge). La partie inférieure montre le spectre de référence dédié.). De la valeur du score cumulé du spectre inconnu et le score maximal du spectre de référence, la valeur du score final pour le spectre inconnu sera calculée.

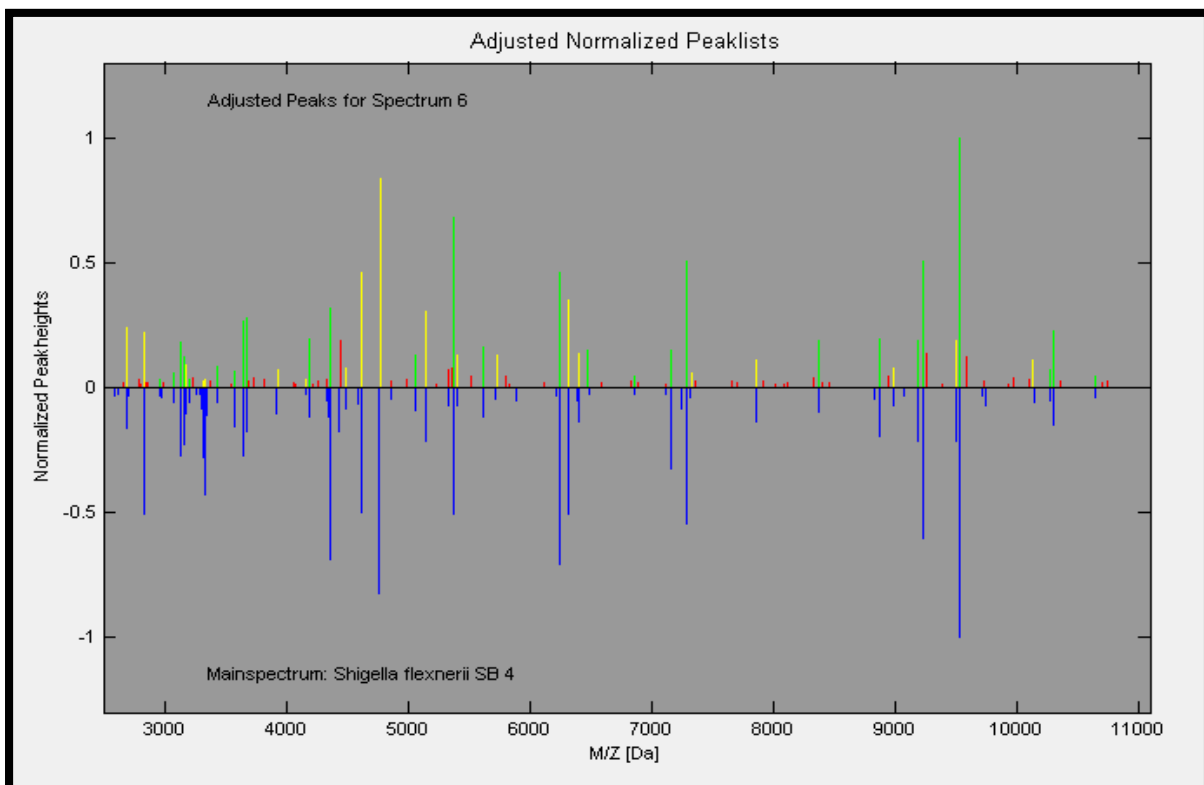


Figure 21 :Les résultats Graphique d'identification. La partie supérieuremontre le spectrecontenant des picsinconnus, les pics similaires au sein dela fenêtrintérieure(verte), au sein dela fenêtreextérieure(jaune) et les picsnon similaires(rouge).La partie inférieuremontre le spectrede référence dédié.

Le **log score** final est calculé de cette façon:

Log score: $\text{Rel Score} \times \text{Rel P-Num.} \times \text{I-Corr.} \times 1000$ (maximum = 1000).

ActSc: La valeur atteint de l'échelleinconnue(réelle score).

Max Sc : La valeurmaximale de pointdu spectrede référence dédié (score maximum).

ScoreRel : Calculé par«Act Sc'/'MaxSc '(maximum =1).

PNk :Nombre de pics similairesau sein dela fenêtrintérieure.

PNb :Nombre depics similairesau sein dela fenêtreextérieure.

PNm :Numéro de laLe total desdespicscueilliesdu spectreinconnu.

Rel P-Num : Calculé par 'PN k' + (0.5 * 'PN b') / 'PN m' (maximum = 1).

I-Corr : la valeur effective de corrélation I = 0.3 (Figure 22)

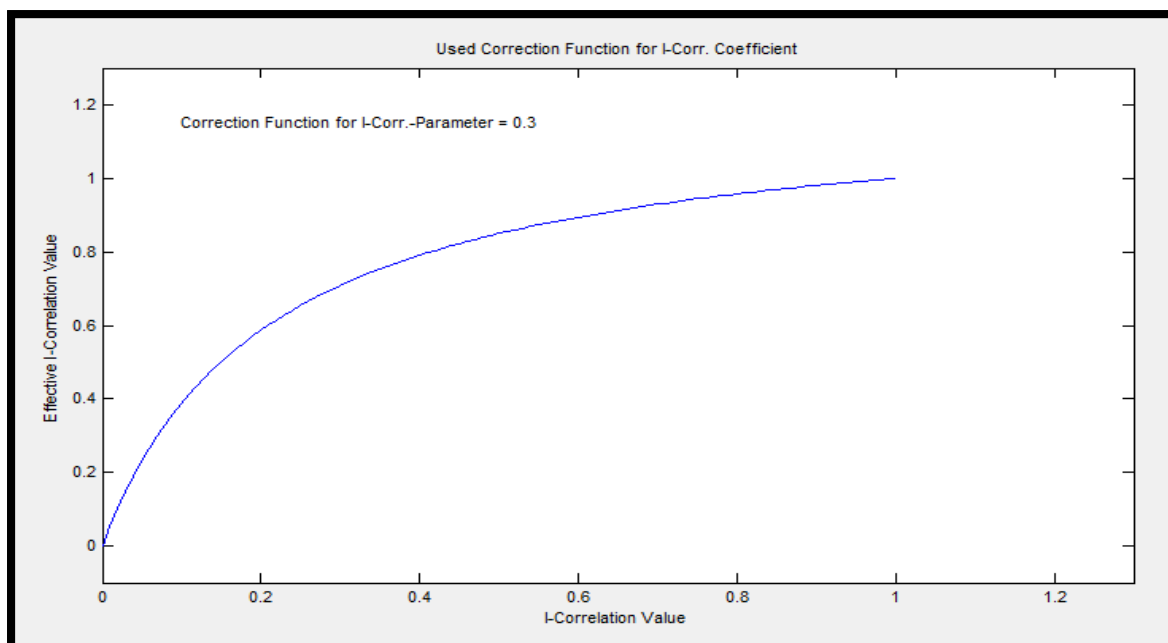
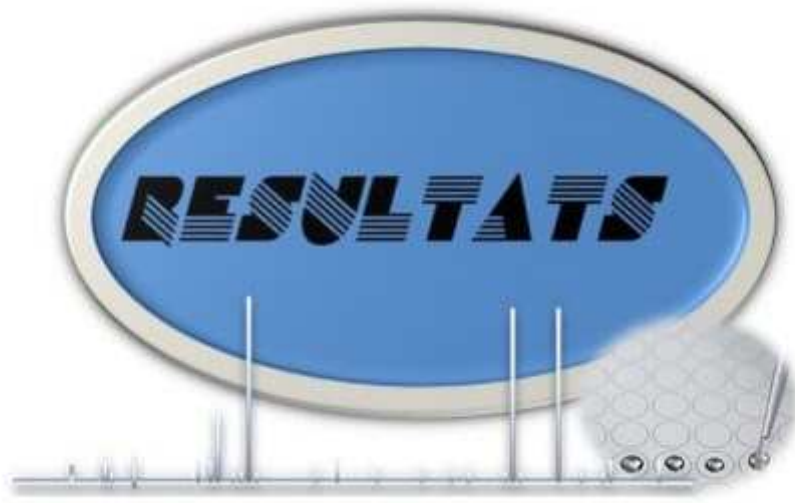


Figure 22: Description graphique de la fonction de correction d'intensité. Sur l'axe des X la valeur-I-corrélation sont donnés et déterminées à partir de la corrélation entre l'intensité réelle d'un spectre inconnu et le spectre de référence. Sur l'axe des Y la valeur effective de I-corrélation qui est corrigée par le paramètre ajusté.

La valeur **ScoreRel** donne une impression du pourcentage des pics d'un spectre de référence qui sont comparables aux pics du spectre inconnu. La valeur ne doit pas être inférieure à 0,3. Parce qu'il peut arriver qu'un spectre de référence ne contienne que quelques pics de référence (par

exemple 5pics), il est possible que des pics coïncident hasardeusement avec des pics du spectre inconnu. En raison de ce fait, le paramètre **RelPnum** vérifie le pourcentage de pics qui sont inconnus ou sont couverts à partir d'un spectre de référence. Le seuil normal pour **RelPnum** est d'environ 0,2. Le **I-Correst** est un paramètre qui donne une impression sur l'intensité et la symétrie des pics identiques (Figure 22). Le résultat final **Log score** donne une idée de la relation des spectres inconnus.



Quand on qualifie un fait nouveau de découverte, ce n'est pas le fait lui-même qui constitue la découverte, mais bien l'idée nouvelle qui en dérive; de même, quand un fait prouve, ce n'est point le fait lui-même qui donne la preuve, mais seulement le rapport rationnel qu'il établit entre le phénomène et sa cause.

ClaudeBernard: "Introduction à l'Étude de Médecine Expérimentale"

IV. RESULTATS

1. *Validation de la méthode*

Chapitre I

L'application de la technique à l'identification des micro-organismes

L'impact des conditions de culture et la préparation des échantillons

Température

Durée d'incubation

Milieux de cultures

Dépôts directs vs Extraction protéique

Reproductibilité inter- et intra-laboratoire

Pour envisager l'identification bactérienne, le spectromètre MALDI-TOF BiflexIII a du être paramétré de manière à régler la puissance et la fréquence du laser, et une calibration à l'aide d'un extrait protéique d'*E. coli* a été réalisée. Nous voulons aussi étudier les capacités discriminantes de cette technique pour l'identification bactérienne, ainsi que pour la comparaison fine pour l'épidémiologie de souches d'espèces données. L'interface spectrométrie de masse avec le logiciel Biotyper™ 1.1 pourrait permettre d'envisager ces deux étapes.

1.1. Répétabilité

Avant de passer à l'utilisation du logiciel Biotyper™ 1.1, nous avons commencé par évaluer la répétabilité de l'analyse par MALDI-TOF/MS des extraits protéiques réalisés sur des souches d'*E. coli* commerciales (XL1, BL21) et de *S. aureus* (Newman ou NTCC8178, Riss et V8 ou ATCC49775). Les souches bactériennes ont été cultivées sur gélose au sang pendant 18h à 37°C et les extraits ont été obtenus comme décrits à la figure 10. Puis à partir de ces extraits, 20 dépôts de 1 µL ont été réalisés sur la plaque cible pour chaque souche. Les différents profils MALDI-TOF/MS acquis sont ensuite comparés entre eux à l'aide de BioTyper™ 1.1, en sélectionnant les pics majoritaires des profils (70 pics via le mode PCA du logiciel). Des dépôts tripliqués acquis par MALDI-TOF/MS de la souche *E. coli* BL21 sous les mêmes conditions de culture, (Figure 23) montrent que les masses de quatre pics sélectionnés arbitrairement sont très similaires pour les trois mesures (ex : m/z des pics choisis de *E. coli* BL21 : (9541/9540.8/9541.4), (7275.6/7275.7/7275.8), (6257/6257.7/6257.2), (5382.3/5382.4/5382.8), soient des oscillations maximales de +/- 0,01%. Les intensités correspondantes de ces pics sont, elles aussi comparables entre elles (100% /76,3% /65,6%), (100%/76,3%/65,6%), (100%/76,3%/65,6%), (100%/76,3%/65,6%), respectivement. Par ailleurs, pour chacun des profils il n'y a pas de variation du nombre total de pics, mais plutôt l'apparition de certains et la disparition d'autres (pics mineurs avec des intensités relativement très basses). La souche 1315, de *S. aureus*, a été cultivée sur gélose au sang à 37°C avec repiquage quotidien permettant l'étude de la reproductibilité de la manipulation à différent temps. Les différents profils enregistrés (Figure 24) sont semblables et nous n'avons pas remarqué de variations des pics majeurs. L'identification était correcte pour chaque profil SM. Cependant, à l'une des extrémités de ces spectres une différence d'intensité existe pour un pic de 1490.4 Da. Cette différence est inhérente aux conditions de matrice et de fréquence laser utilisées pour la mesure en mode linéaire et justifie que seuls les pics de chaque spectre compris entre 2000 Da et 12000 Da soient considérés pour les comparaisons ultérieures.

1.2. Effets de la congélation

Après avoir testé la répétabilité et la reproductibilité, nous voulons tester les conditions de stockage des extraits protéiques. Pour cela, nous avons réalisé des extractions sur plusieurs souches de *S. intermedius* cultivées sur gélose au sang à 37°C pendant 18h puis stockées à 4°C ou à -20°C pendant 1 mois. Les figures 25 et 26 sont représentatives des résultats acquis, nous remarquons que les différents profils de la souche B 169 de *S. intermedius*, acquis par MALDI-TOF/MS sont similaires au niveau du nombre de pics, seules les intensités différentes malgré les précautions prises. En effet, cette fois une diminution de moins de 5% de l'intensité des pics s'observe pour les extraits stockés à 4°C par rapport à ceux stockés à -20°C. La température de stockage des extraits la plus adaptée est donc d'au moins -20°C, ce qui permet de limiter la diffusion des gaz et préserverait la composition chimique des extraits pour une bonne reproductibilité des profils sur un mois ou plus.

Nous avons pu constater que pourvu que les boîtes de culture soient conservées à 4°C, une identification reste possible et efficace à partir de boîtes conservées jusqu'à 54 heures après culture, quelque soit les milieux considérés (géloses sang, chocolat, Drigalski, Mueller-Hinton, Columbia, BCYE,...). (Figure 27)

1.3. Effets des conditions de cultures

Dix souches de *S. aureus* de la collection IBS (SP61, 2976, SP116c, 678, 1320, 3452, 3465, 3475, 11960, 12648) ont été cultivées sur 5 milieux de culture différents à 37°C pendant 18h, 48h et 72h sans repiquage intermédiaire, afin d'avoir une vue globale sur les effets qui pourraient influencer les spectres et promouvoir les meilleures conditions de pré-analyse.

Nous constatons que les milieux de culture ont une influence sur le contenu des spectres des différentes souches, la souche IBS12684 étant prise en exemple dans la Figure 28. Nous constatons que des pics peuvent disparaître en fonction des milieux utilisés et que les spectres acquis après culture sur gélose au sang sont les plus riches en nombre de pics. Concernant le temps de culture, Biotyper™1.1 repère des différences et distingue les souches de manière flagrante quand elles ont été cultivées 18h ou 48h, ou encore durant 72h (Figure 28). Ce classement est observé de la même manière pour toutes les souches. Ceci s'explique par le fait que les bactéries incubées pendant plus de 18h sont en phase stationnaire de croissance ; leur métabolisme est modifié et les phénomènes d'autolyse s'installent. Ainsi, le nombre de ribosomes diminue, certaines régulations sont mises en place et la fréquence de mutations est plus importante du fait du vieillissement des cellules et des carences du milieu de culture et de la présence de métabolites. Il est donc préférable et non obligatoire d'utiliser des cultures fraîches de moins de 24h pour toute analyse. Mais, globalement l'identification

sous différentes conditions de culture est affectée par la valeur du log score calculé, et elle n'est influencée que quand il s'agit de l'identification de bactéries très proches.

1.4. Reproductibilité pour une identification au niveau de l'espèce

La reproductibilité de l'analyse par la MALDI-TOF/MS a été testée sur 5 souches de *S. aureus* (collection IBS n°1315, 1381, 1505, 2978, 3223) et une souche de *Staphylococcus capitis* à coagulase négative (B177) cultivées sur gélose au sang pendant 14 jours à 37°C avec repiquages quotidiens (Figure 24). Les spectres de masse des extraits frais de ces six souches présentent des pics de masse comparables (pics majeurs ; intensité de 10%), et nous ne notons pas de variation des spectres. Cependant, on observe quelques variations d'intensité de quelques pics non dépendants des masses respectives ou de la période de repiquage. Ces variations pourraient être le résultat d'homogénéisations non équivalentes et de pipetages des extraits pour leur dépôt sur la plaque cible. En effet en insistant sur ces phases, nous avons alors obtenu des résultats mieux comparables (15s de vortex et dépôts des tripliqués dans les 30s suivantes).

Nous en déduisons que la reproductibilité de l'analyse des extraits protéiques est bonne, car il y a une constance des pics majoritaires, au moins pendant la période testée de 14 jours. Cependant, les variations d'intensité, et les pics mineurs, bien que minimes nous interpellent quant aux procédures de stockage et d'homogénéisation des extraits, mais aussi sur l'apport de méthodes de préparation automatisées des plaques.

1.5. Reproductibilité pour faire du typage bactérien

Dans le but de tester le pouvoir discriminatoire de la technique MALDI-TOF/MS, plusieurs dépôts du même extrait protéique ont été réalisés à partir d'une souche *E. coli* cultivée sur différents milieux de culture. Des variations ont été remarquées qui sont dûes aux conditions d'homogénéisation de l'extrait protéique. Ces variations représentent en général des pics mineurs et qui peuvent nuire à l'utilisation de la technique dans le cadre du typage des souches bactériennes. Pour améliorer les performances de la technique et sa reproductibilité pour sous-typage les souches de la même bactérie, nous avons procédé à la suppression de ces pics mineurs qui varient d'un spectre à l'autre. Cette suppression des pics variables nous a permis de différencier deux bactéries très proches l'une de l'autre considérées par les méthodes universelles de typage comme une seule espèce (*Escherichia coli* & *Shigella sp.*). Néanmoins, la reproductibilité est améliorée utilisant notre suggestion de supprimer les pics mineurs, augmente le degré de performance d'identification bactérienne, mais aussi la

différentiation des souches appartenant à la même espèce. (Voir : le typage bactérien, partie résultats).

Les différentes conditions de culture ont fait l'objet d'une évaluation supplémentaire où 7 espèces bactériennes ont été analysées. Température, durée d'incubation et les différents milieux de culture utilisés généralement dans la routine hospitalière ont été testés. L'objectif était de tester la robustesse et la sensibilité du calcul du log score dédié à l'identification au niveau de l'espèce si on fait varier les conditions de culture. Les résultats obtenus nous ont montré une reproductibilité efficace par rapport à tous les éléments testés. (Voir ci-dessous Tableau 4).

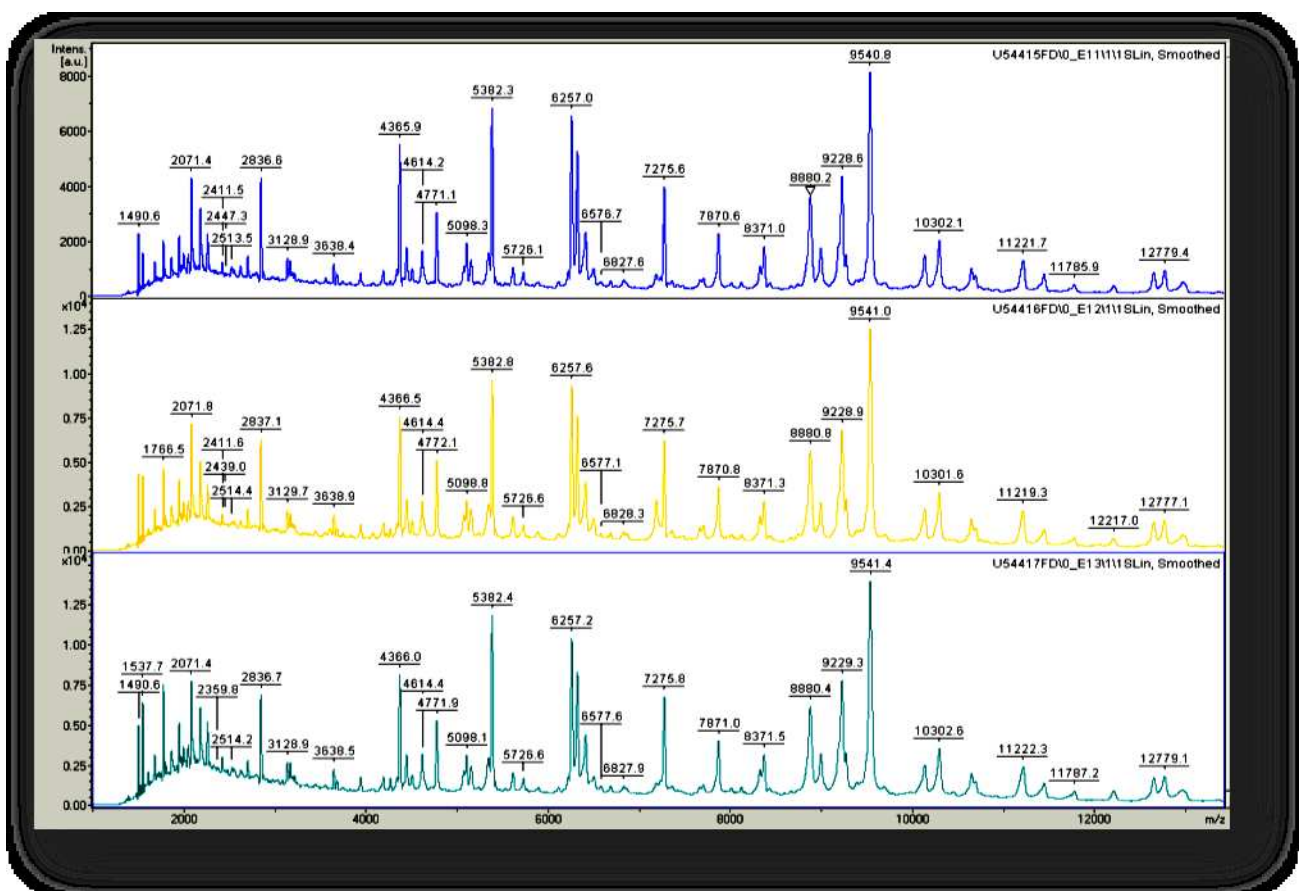


Figure 23: Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF/MS dans les mêmes conditions (20 fois 50 tirs) de la souche commerciale *E. coli* BL21 déposée en tripliqué permettant l'étude de la répétabilité de l'analyse.

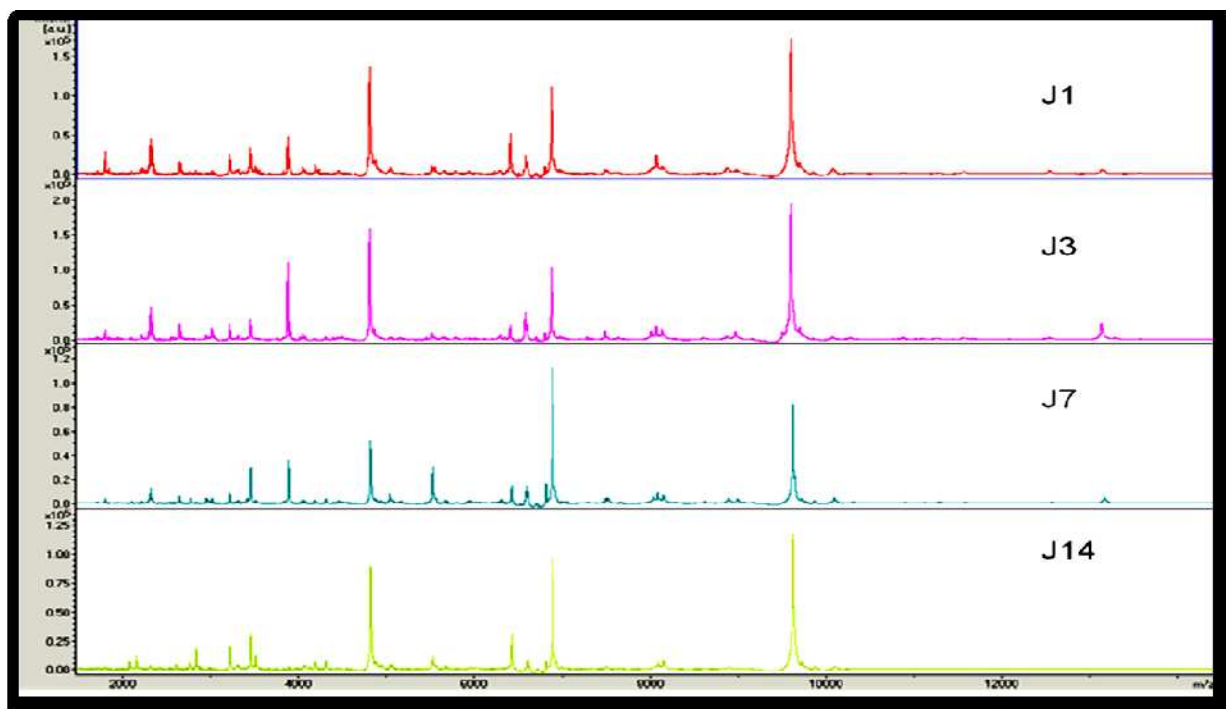


Figure 24: Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF/MS, des extraits frais de la souche 1315, *S. aureus*, cultivé sur gélose au sang à 37°C avec repiquage quotidien permettant l'étude de la reproductibilité de la manipulation à différents temps.

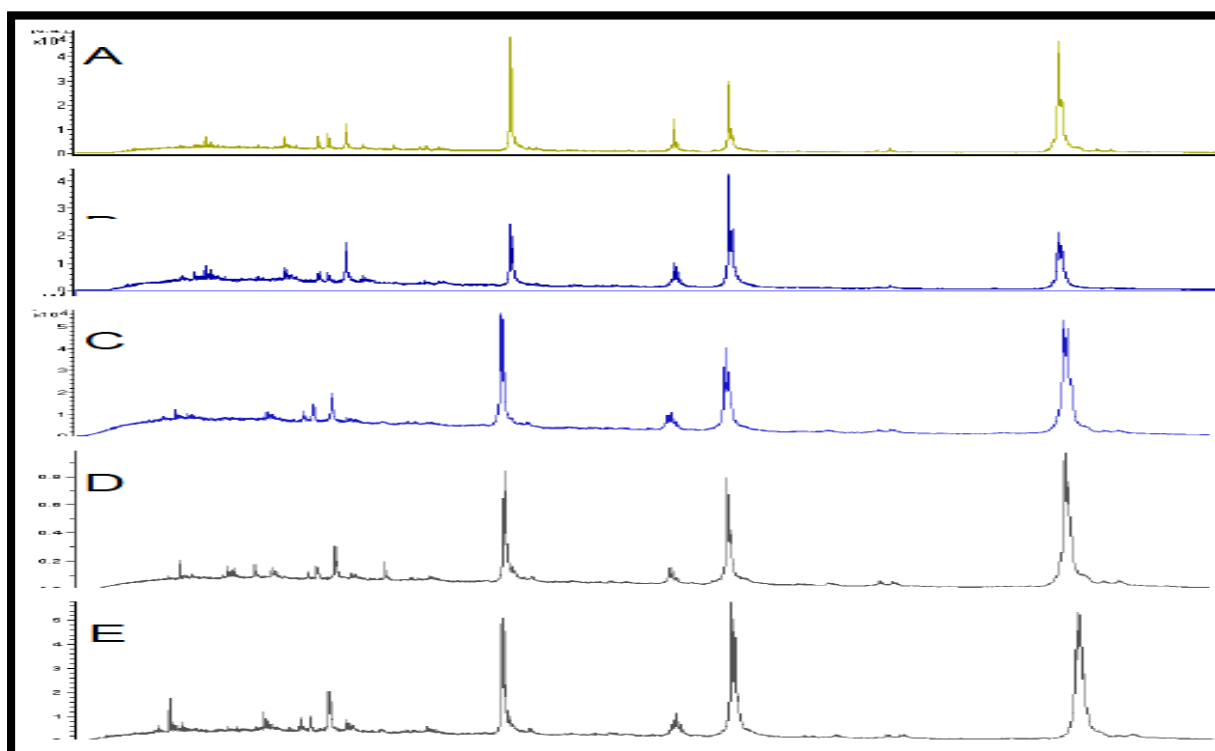


Figure 25: Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF/MS de la souche *S. intermedius* B169 conservée à 4 °C pendant 4 semaines. A : après 24H de conservation ; B : après une semaine ; C : après deux semaines ; D : après trois semaines ; E : après 4 semaines

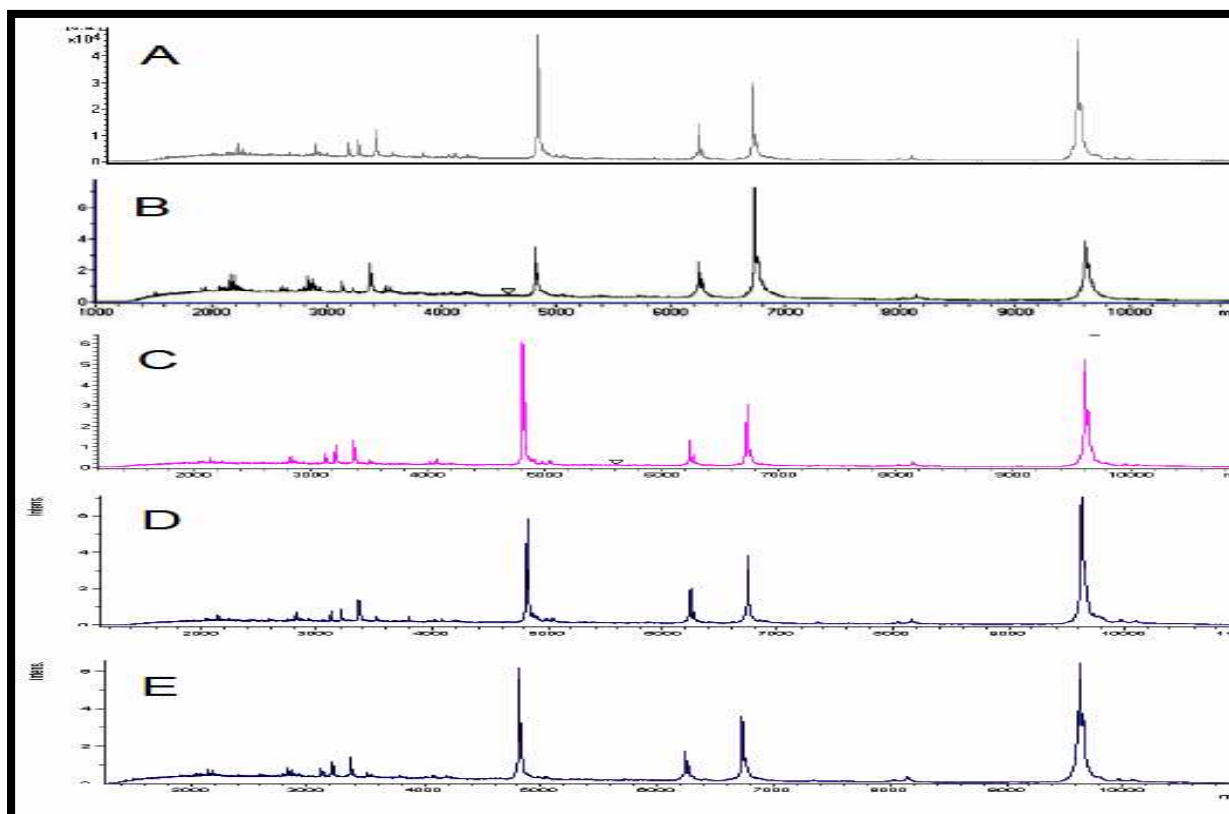


Figure 26: Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF/MS de la souche *S. intermedius* B169 conservée à -20 °C pendant 4 semaines. A : après 24H de conservation ; B : après une semaine ; C : après deux semaines ; D : après trois semaines ; E : après 4 semaines.

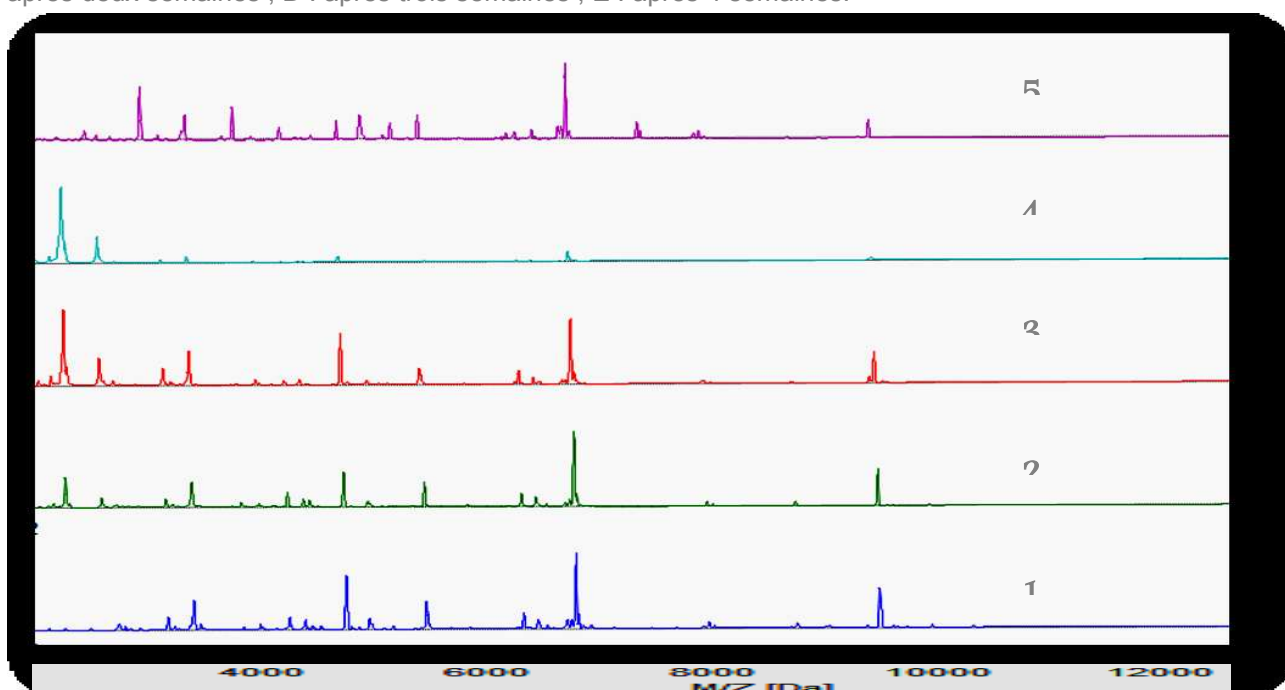


Figure 27: Profils multiples de la souche *S. aureus* 12684 cultivée dans les différents milieux de cultures. Les différents profils sont pré-traités par Biotyper 1.1. 1 : Bacto Heart Infusion (BHI), 2 : Gélose au sang (GS), 3 : Müller Hinton (MH), 4 : Nutrient Broth (N2), 5 : Tryptone Yeast (TY), réalisé par le Biotyper™ 1.1.

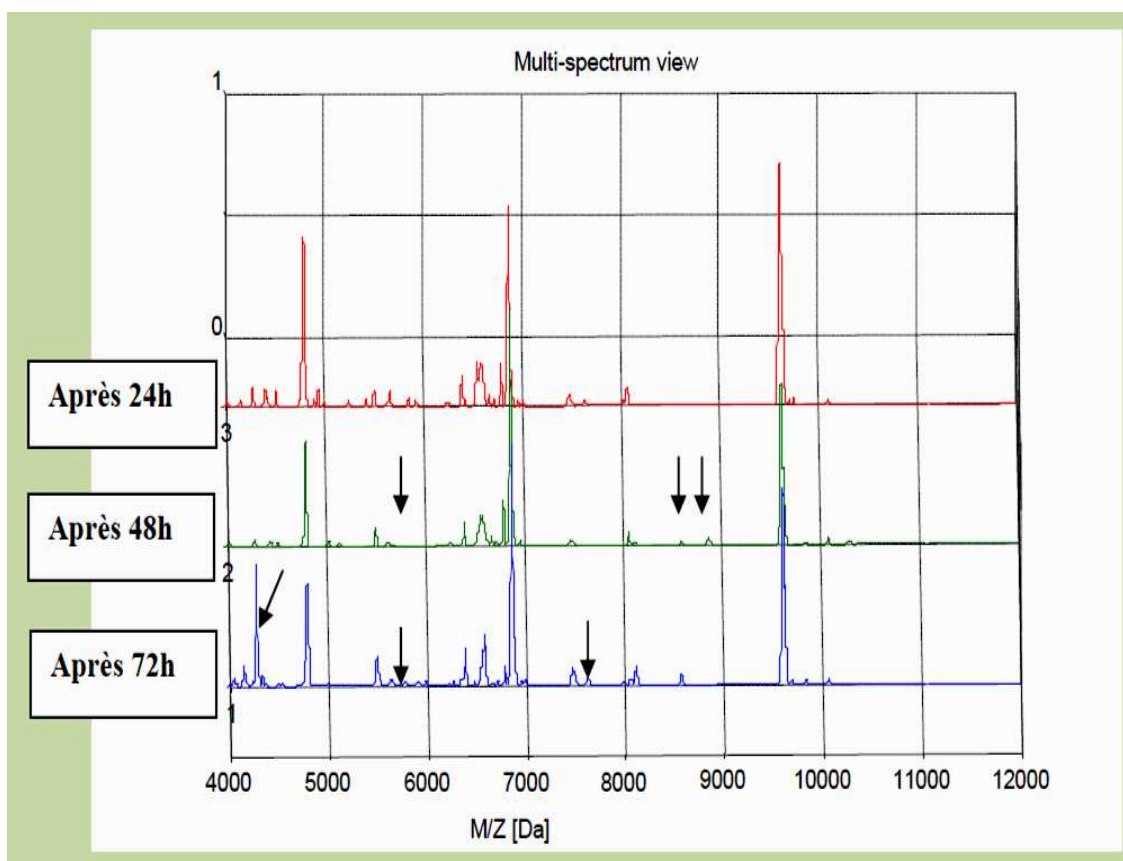


Figure 28: Profils multiples d'une souche de *S. aureus* (12684) cultivée dans le milieu gélose au sang et incubée pendant : 24 h, 48h et 72h à 37°C et sans repiquage quotidien. Les spectres de masse ont déjà été traités par Biotyper™1.1.

Tableau 4 : Effets des conditions de culture (Température, durée d'incubation et milieux de cultures) sur l'identification bactérienne par MALDI Biotyper™ (2 Tableaux)

		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Neisseria mucosa</i>	
		Score 1ère ID							
		Score 2ème ID							
Cultures fraîches (18H)		2.453	2.487	2.440	2.032	2.132	2.243	2.231	
		2.422	2.404	2.339	1.986	2.108	2.115	1.764 (<i>N. macacae</i>)	
Température	37°C	18 + 6H	2.257	2.289	2.234	1.915	1.944	2.056	2.214
			2.087	2.255	2.226	1.801	1.895	2.032	1.782
		18 + 30H	2.339	2.343	2.358	2.191	2.029	1.986	2.187
			2.095	2.267	2.339	1.840	1.906	1.951	1.997 (<i>N. macacae</i>)
		18 + 54H	2.327	2.271	2.329	2.012	2.027	2.085	2.139
			2.007	2.191	2.328	1.831	2.018	2.062	1.871
	ambiante	18 + 6H	2.357	2.484	2.422	1.972	2.186	2.158	2.218
			2.275	2.367	2.350	1.830	2.029	2.052	1.988 (<i>N. macacae</i>)
		18 + 30H	2.288	2.348	2.373	1.845	2.052	2.155	2.212
			2.159	2.244	2.259	1.769	2.026	2.046	1.838
		18 + 54H	2.321	2.470	2.384	1.856	2.169	2.068	1.917
			2.233	2.360	2.365	1.762	2.166	2.037	1.869
4°C	18 + 6H	2.412	2.489	2.503	2.007	2.140	2.252	2.185	
		2.359	2.289	2.433	1.979	2.112	2.159	1.936 (<i>N. macacae</i>)	
	18 + 30H	2.289	2.357	2.344	1.995	2.105	2.117	2.001	
		2.157	2.157	2.301	1.889	2.087	2.089	1.934	
	18 + 54H	2.205	2.251	2.352	1.865	2.073	2.127	2.011	
		2.002	2.225	2.298	1.789	2.029	1.975	1.875 (<i>N. macacae</i>)	

Milieux de cultures	Souches testées				
	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Haemophilus influenza</i>
	Score 1ère ID / Score 2ème ID				
Gélose chocolat	2.479	2.406	2.360	1.411	2.384
	2.315	2.400	2.301	1.305	2.050
Gélose Columbia + 5% sang	2.465	2.445	2.291	2.043	
	2.403	2.238	2.252	1.997	
Gélose Mueller Hinton	2.451	2.452	2.341	2.329	
	2.353	2.322	2.306	2.302	
Drigalski	2.429	2.453			
	2.216	2.405			
Gélose chocolat + Bacitracine					2.089
					1.965
Hueller Hinton + 5% sang				2.295	
				2.180	

1.6. Reproductibilité inter-laboratoire

Pour qu'une technique soit applicable dans un laboratoire, celle-ci doit avoir une haute reproductibilité inter-laboratoire. Cette dernière, a été entamée par le biais de plusieurs laboratoires internationaux (Amérique, Europe et de l'Asie). Cette étude multicentrique a été réalisée par 8 laboratoires où chaque collaborateur a reçu 60 échantillons de bactéries non-fermentantes (30 échantillons représentaient des suspensions alcooliques et 30 autres sur écouvillons, et cultivés par la suite sur un milieu complet (Gélose au sang), a été réalisée sur 3 spectromètres de masse différents (Ultraflex, Biflex et Microflex) de la marque Bruker Daltonics™. Dans notre laboratoire nous avons utilisé un spectromètre de masse BIFLEXIII. Les résultats ont été rapportés dans l'article[5] ci-dessous.

1.7. ARTICLE (1) : Identification Bactérienne

High Interlaboratory Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Species Identification of Nonfermenting Bacteria

J. Clin. Microbiol., 2009, 47(11):3732-4.

Mellmann,^{1*} F. Bimet,² C. Bizet,² A. D. Borovskaya,³ R. R. Drake,⁴ U. Eigner,⁵ A. M. Fahr,⁵ Y. He,^{6†} E. N. Ilina,³ M. Kostrzewa,⁷ T. Maier,⁷ L. Mancinelli,⁸ **W. Moussaoui**,⁹ G. Prévost,⁹ L. Putignani,⁸ C. L. Seachord,⁴ Y. W. Tang,⁶ and D. Harmsen¹⁰

Institute of Hygiene, University Hospital Muenster, D-48149 Muenster, Germany,¹ Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur, Department of Microbiology, Institut Pasteur, F-75724 Paris, France,² Research Institute of Physical-Chemical Medicine, 119992 Moscow, Russia,³ Department of Microbiology and Molecular Cell Biology, Center for Biomedical Proteomics, Eastern Virginia Medical School, Norfolk, Virginia,⁴ Labor Limbach, 69126 Heidelberg, Germany,⁵ Departments of Medicine and Pathology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee 37232,⁶ Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany,⁷ Microbiology Unit, Bambino Gesù Children's Hospital, Health Care and Research Institute, 00165 Rome, Italy,⁸ Institut de Bactériologie UR Physiopathologie et Médecine Translationnelle, F-67000 Strasbourg, France,⁹ Department for Periodontology, University Hospital Muenster, D-48149 Muenster, Germany¹⁰

*Corresponding author. Mailing address: Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 41, D-48149 Münster, Germany. Phone: 49-251-83 52136. Fax: 49-251-83 55688. E-mail: mellmann@uni-muenster.de

Present address: Futian Hospital, Guangdong Medical College, Shenzhen, China.

RESUME (Français)

La spectrométrie de masse Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation/time-of-flight est apparue comme une alternative rapide, et une solution rentable pour l'identification des espèces bactériennes. Dans cette étude internationale (8 laboratoires participants), l'identification de manière aveugle de 60 échantillons de bactéries non fermentants, a atteint 98,75% de reproductibilité inter-laboratoire. Seuls 6 des 480 échantillons ont été mal identifiés en raison d'un échange (4 échantillons) ou de contamination (1 échantillon) ou non identifiés en raison de l'intensité du signal insuffisante (1 échantillon).

ABSTRACT (ENGLISH VERSION)

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry has emerged as a rapid, cost-effective alternative for bacterial species identification. Identifying 60 blind-coded nonfermenting bacteria samples, this international study (using eight laboratories) achieved 98.75% interlaboratory reproducibility. Only 6 of the 480 samples were misidentified due to interchanges (4 samples) or contamination (1 sample) or not identified because of insufficient signal intensity (1 sample).

Introduction

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has emerged as a fast and cost-effective alternative for bacterial species identification in microbiology. On the basis of mass analysis of the protein composition of a bacterial cell, which is assumed to be characteristic for each bacterial species, it is possible to determine the species within few minutes, starting from whole cells, cell lysates, or crude bacterial extracts (2, 3, 5, 6). The proof of principle of MALDI-TOF MS for bacterial species identification was shown a decade ago (2, 5, 6); however, due to low reproducibility, it has not been widely adopted in clinical microbiology. We have recently shown that use of a larger mass range for detection (2,000 to 20,000 Da), dedicated analysis software for spectral pattern matching, and a high-quality reference database of spectra generated from quality-controlled culture collection strains resulted in accurate species identifications, with high intralaboratory reproducibility (7). For interlaboratory reproducibility, there are only very limited data available (8, 10). We therefore evaluated the interlaboratory reproducibility for MALDI-TOF MS-based species identification in a multicenter study, applying the above-described MALDI-TOF MS improvements.

(This study was presented in part at the 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [ECCMID] in Helsinki, Finland, 16 to 19 May 2009.)

Results

Sixty blind-coded samples were shipped worldwide by mail to eight laboratories with access to Bruker MALDI-TOF MS platforms and personnel trained in MALDI-TOF MS-based species identification (Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur [CRBIP], Department of Microbiology, Institut Pasteur, Paris, France; Department of Microbiology and Molecular Cell Biology, Center for Biomedical Proteomics, Eastern Virginia Medical School, Norfolk, VA; Labor Limbach, Heidelberg, Germany; Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia; Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany; Institut de Bactériologie, Strasbourg, France; Microbiology Unit, Bambino Gesù Children's Hospital, Health Care and Research Institute, Rome, Italy; and Molecular Infectious Diseases Laboratory, Vanderbilt University Hospital, Nashville, TN). Samples 001 to 030 of the 60 samples included pure cultures of different nonfermenting bacteria, either culture collection strains from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) and Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (LMG, Gent, Belgium), or strains isolated at the Institute of Hygiene, Münster, Germany, during routine diagnostic efforts. They contained single strains of *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* (DSMZ 30030), *Brevundimonas andropogonis* (DSMZ 9511), *Brevundimonas aurantiaca* (DSMZ 4731), *Burkholderia caribensis* (DSMZ 13236), *Brevundimonas diminuta* (DSMZ 7234), *Brevundimonas intermedia* (DSMZ 4732), *Brevundimonas vesicularis* (DSMZ 7226), *Comamonas nitratorans* (DSMZ 13191), *Comamonas testosteroni* (DSMZ 50244), *Flavobacterium johnsoniae* (DSMZ 2064), *Inquilinus limosus* (DSMZ 16000), *Sphingobacterium mizutaii* (DSMZ 11724), *Pseudomonas beteli* (LMGZ 978), *Pseudomonas boreopolis* (LMGZ 979), *Pseudomonas extremorientalis* (DSMZ 15824), 13 *Pseudomonas aeruginosa* strains (DSMZ 50071 and 12 clinical isolates), and 2 *Stenotrophomonas maltophilia* strains (clinical isolates). The 16 culture collection strains listed above were among the 248 strains used for constructing a nonfermenter reference database (7). All species designations were unambiguously confirmed using partial 16S rRNA gene sequencing as described elsewhere (7). Samples 031 to 060 contained preprocessed cell extracts from the first 30 strains as described recently (7). Accompanying the samples, each participating laboratory received a “sample cultivation and preparation guide” and a “result reporting guide” to facilitate and standardize data generation and interpretation. Briefly, the laboratories were asked to streak out samples 001 to 030 onto blood agar plates (irrespective of the vendor) and to incubate them for 48 h at 30°C in an ambient atmosphere. Using a single colony, extraction for MALDI-TOF MS analysis was initiated. For preprocessed samples 031 to 060, the guide included instructions for matrix preparation and MALDI-TOF MS analysis (7). For spectral calibration, the Bruker bacterial test standard (*Escherichia coli* lysate) was used during the measuring step. All laboratories used the MALDI Biotyper 2.0

software package (Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany) and the MALDI Biotyper database, containing spectra of more than 2,800 microorganisms (including the 248 nonfermenter species) as reference data. The software generates a list of probable species identifications ranked by the log(score) value, which reflects the peak matches as well as intensities and results in values between 0 and 3 (0 to 100% pattern match). After comparison of an unknown spectrum with all reference spectra of the database, the log(score)s are ranked. Values of ≥ 2.0 were required for secure identification at the species level and values between < 2 and ≥ 1.7 for secure identification at the genus level. Results based on log(score) values of < 1.7 were rated as not identifiable. These thresholds were empirically determined based on the whole MALDI Biotyper database contents.

Each of the eight participating laboratories received 60 blind-coded samples for MALDI-TOF MS-based species identification. The aggregated results for each laboratory and the machines used are shown in Table Table1.1. Of the total 480 samples, 474 (98.75%) were correctly identified at the species level by using the highest log(score) value for the identified species after MALDI-TOF MS spectral comparisons. Five of the remaining six samples were misidentified, and one sample did not result in any valid species designation, due to low signal intensity. Overall, six of the eight laboratories identified all 60 samples correctly (Table (Table1).1). Four hundred sixty-seven of the 480 samples (97.29%) with log(score) values of ≥ 2 (mean, 2.353; standard deviation, 0.146) were identified, indicating a probable secure species identification level (Table (Table1).1). Twelve of the remaining 13 samples showed log(score) values between 1.7 and 2, which correlated with at least a secure identification at the genus level; only sample 044, which was not identified, due to low signal intensity, had a log(score) value of 0. The 12 samples were distributed among four laboratories; no pattern of an especially problematic sample was discerned. The five misidentified samples showed log(score) values of ≥ 2 . Figure Figure11 displays the mean log(score) value for each sample and its standard deviation. Of the 60 samples investigated, only sample 044 showed a significantly higher standard deviation and lower mean value due to the failure in laboratory B. There was no significant difference between the mean log(score) values of cultured samples versus those of preprocessed samples as determined by *t* test statistics ($P = 0.20$).

Besides the lack of comprehensive reference databases for spectral comparisons and of sophisticated software tools for data interpretation, the broad use of MALDI-TOF MS for species identification was hampered in the past by the limited reproducibility (9). Dedicated software tools are now available, along with comprehensive databases for some genera (e.g., anaerobic [4] or nonfermenting [7] bacteria), and intralaboratory reproducibility has been proven (7); however, interlaboratory reproducibility remained unclear. Therefore, we present here for the first time a large international multicenter study, using 60 blind-coded

nonfermenting bacterial samples, showing a high interlaboratory reproducibility, with 98.75% correct species identifications (Table (Table1).1). There was no significant difference in achieved log(score) values between cultured and preprocessed samples, indicating that both methods were equally reproducible. In contrast to previous studies (9), the Bruker system yields high reproducibility if a minimum standard is followed, as recommended in the “sample cultivation and preparation guide.” Although all six mis- or nonidentified samples were preprocessed samples, only in sample 044 of laboratory B was a failure due to low signal intensity noted. For the remaining misidentified samples, sample interchange (four samples) or contamination with skin flora (one sample; *Staphylococcus epidermidis*) was a highly likely reason for misidentification. Not only were samples correctly identified at a high rate, but reliability was high: 97.29% of all log(score) values were >2, the threshold for a secure species identification. It was even possible to correctly identify 12 of the 13 samples with log(score) values of <2. This level of reproducibility is usually achievable only with DNA sequence-based methods (1). Moreover, sending preprocessed (inactivated and therefore noninfectious) samples greatly facilitated the exchange of specimens.

In summary, this study demonstrated that MALDI-TOF MS has become a highly reproducible alternative platform for partial 16S rRNA gene sequencing for the identification of bacterial species in the microbiology laboratory. Whereas MALDI-TOF MS has a higher discriminatory power than 16S rRNA gene PCR, the latter is more sensitive, but neither of them can adequately resolve mixed bacterial samples.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by OPBG Grant Ricerca Corrente 200702P002153.

We thank Isabell Ramminger and Ursula Keckevoet (Münster, Germany); Leopoldo Dimiziani (Rome, Italy); Ulrike Wild and Anke Veldenzer (Heidelberg, Germany); Beatrix Wegmann (Bremen, Germany); Haijing Li, Criziel Quinn, and Beth Mutai (Nashville, TN); and Gongyi Shi and Sam Fu (Fremont, CA) for skillful technical assistance.

M. Kostrzewa and T. Maier have declared a potential conflict of interest. They are both employees of Bruker Daltonik, GmbH, the company that produces the MALDI-TOF MS instruments and the software mentioned in the manuscript. All other authors have declared that no competing interests exist.

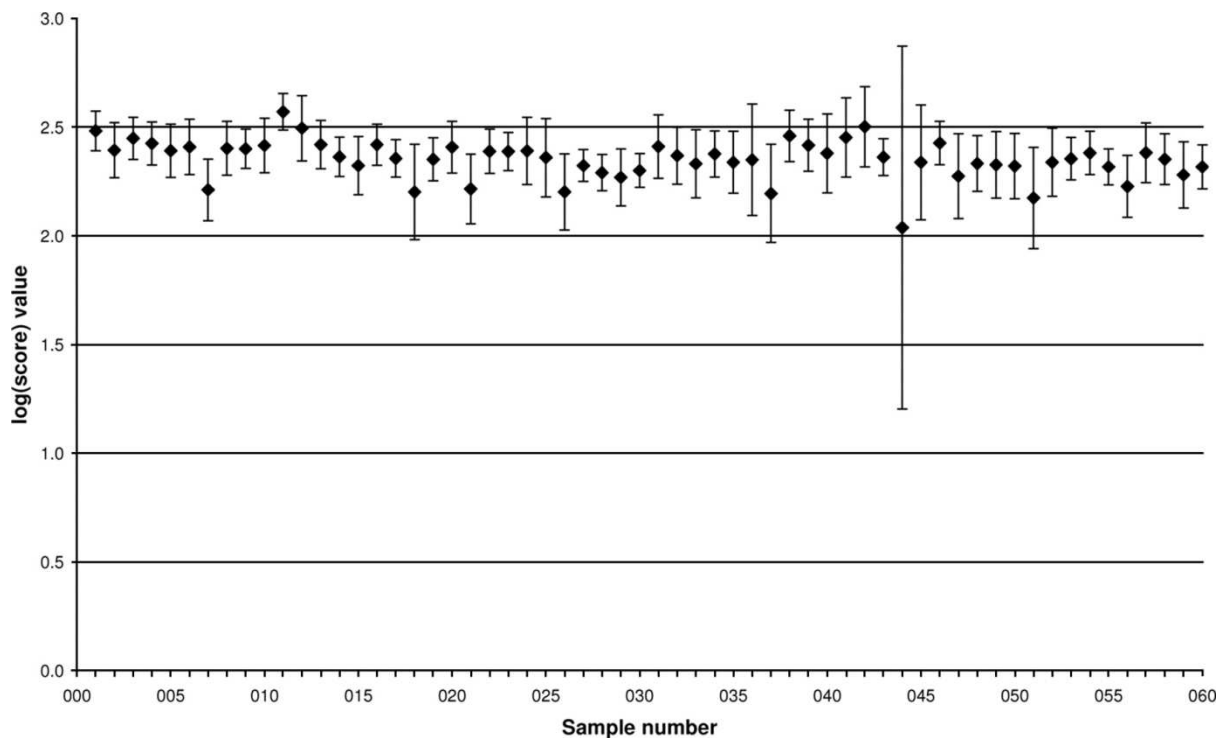
Table 1 : Aggregated log(score) values and final species identification results for each of the eight participating laboratories (not specified) for 60 blind-coded samples ($n = 480$ in total) containing nonfermenting bacteria either as pure culture or as preprocessed cell extract

Laboratory	MALDI-TOF MS instrument (purchase yr)	No. (%) of log(score) values			No. (%) of samples	
		≥ 2	$<2-1.7$	<1.7	Correctly identified	Mis- or nonidentified
A	Microflex LT (2007)	60 (100)	0 (0)	0 (0)	60 (100)	0 (0)
B	Autoflex LT (2002)	53 (88.33)	6 (10.0)	1 (1.67)	58 (96.67)	2 ^a (3.33)
C	Microflex LT (2007)	60 (100)	0 (0)	0 (0)	60 (100)	0 (0)
D	Ultraflex III (2007)	59 (98.33)	1 (1.67)	0 (0)	56 (93.33)	4 ^b (6.67)
E	Microflex LT (2007)	58 (96.67)	2 (3.33)	0 (0)	60 (100)	0 (0)
F	Microflex LRF (2005)	57 (95.0)	3 (5.0)	0 (0)	60 (100)	0 (0)
G	Biflex (1999)	60 (100)	0 (0)	0 (0)	60 (100)	0 (0)
H	Microflex LT (2009)	60 (100)	0 (0)	0 (0)	60 (100)	0 (0)
Total		467 (97.29)	12 (2.5)	1 (0.21)	474 (98.75)	6 (1.25)

^a One of the two samples yielded a log(score) value of ≥ 2 , and the other sample had a log(score) value of <1.7 .

^b All four samples yielded log(score) values of ≥ 2 .

Figure 1: Mean log(score) values and standard deviations for all 60 blind-coded samples identified using MALDI-TOF MS, calculated from the results for all eight participating laboratories.



REFERENCES

1. Aires-de-Sousa, M., K. Boye, H. de Lencastre, A. Deplano, M. C. Enright, J. Etienne, A. W. Friedrich, D. Harmsen, A. Holmes, X. Huijsdens, A. Kearns, A. Mellmann, H. Meugnier, J. K. Rasheed, E. Spalburg, B. Strommenger, M. J. Struelens, F. C. Tenover, J. Thomas, U. Vogel, H. Westh, J. Xu, and W. Witte. 2006. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 44:619-621.
2. Claydon, M. A., S. N. Davey, V. Edwards-Jones, and D. B. Gordon. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 14:1584-1586.
3. Fenselau, C., and P. A. Demirev. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 20:157-171.
4. Grosse-Herrenthey, A., T. Maier, F. Gessler, R. Schaumann, H. Bohnel, M. Kostrzewa, and M. Kruger. 2008. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe* 14:242-249.
5. Holland, R. D., J. G. Wilkes, F. Rafii, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees, and J. O. J. Lay. 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10:1227-1232.

6. Krishnamurthy, T., P. L. Ross, and U. Rajamani. 1996. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 10:883-888.
7. Mellmann, A., J. Cloud, T. Maier, U. Keckevoet, I. Ramminger, P. Iwen, J. Dunn, G. Hall, D. Wilson, P. Lasala, M. Kostrzewa, and D. Harmsen. 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 46:1946-1954.
8. Walker, J., A. J. Fox, V. Edwards-Jones, and D. B. Gordon. 2002. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J. Microbiol. Methods* 48:117-126.
9. Wang, Z., L. Russon, L. Li, D. C. Roser, and S. R. Long. 1998. Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun.Mass Spectrom.*12:456-464.
10. Wunschel, S. C., K. H. Jarman, C. E. Petersen, N. B. Valentine, K. L. Wahl, D. Schauki, J. Jackman, C. P. Nelson, and E. White V. 2005. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16:456-462.

Outre le manque de base de données de référence complète pour les comparaisons spectrales et d'outils logiciels sophistiqués pour l'interprétation des données, une large utilisation de MALDI-TOF/ MS pour l'identification des espèces a été entravée dans le passé par une reproductibilité limitée [119]. Des logiciels dédiés sont maintenant disponibles, avec des bases de données complètes pour certains genres (par exemple, anaérobies [120] ou des bactéries non-fermentantes [121] [119] [119]), et la reproductibilité intra-laboratoire a été approuvée; Cependant, la reproductibilité inter-laboratoire demeurait floue et insuffisante. Par conséquent, nous présentons ici pour la première fois une large étude multicentrique internationale. En aveugle, 60 bactéries non-fermentantes ont été utilisées. Différents spectromètres de masse ont été utilisés dans cette investigation. En tout, 8 spectromètres de masse (4 MicroFlex LT, 1 MicroFlex RLF, 1 Biflex 1990, 1 AutoFlex LT et 1 UltraFlex III) ont été utilisés. Walker *et al.*, 2002 [122], ont démontré une variabilité entre les deux appareils de spectrométrie de masse utilisés (>75%). Dans notre étude, les appareils MicroFlex ou Biflex ont tous donné une identification correcte au niveau de l'espèce à 100% par contre l'UltraFlex était seulement à un niveau de 94% et l'Autoflex à 97%. Nous pensons que cela n'est dû qu'aux erreurs techniques concernant l'extraction protéique ou la richesse des spectres obtenus, une richesse liée principalement à l'ionisation de l'échantillon et non à l'appareil utilisé.

Il n'y avait pas de différence significative des valeurs (log score) entre les échantillons de bactéries cultivées et les échantillons prétraités (suspension alcoolique). Cela indique que les deux méthodes étaient également reproductibles. Contrairement aux études précédentes [119], le système Bruker donne une reproductibilité élevée si une norme minimale de préparation d'échantillon est suivie.

Dans cette étude, nous avons pu constater la haute reproductibilité de la spectrométrie de masse en terme d'identification de bactéries non fermentantes (>98.75%). Ce pourcentage pouvait néanmoins atteindre 99.79% s'il n'y avait pas eu d'erreur humaine (contamination et interchangeabilité d'échantillons). Le seul échantillon non identifié lors de cette investigation (Echantillon 044) est dû à un mauvais signal influencé probablement par une mauvaise qualité de la matrice ou bien une extraction alcoolique non aboutie. Ces observations impliquent que l'erreur est en général due à l'intervention humaine (contamination) et non pas à la technique ou la machine elle-même. De plus, la sensibilité de la mesure par cette technique est assez puissante. Le logiciel MALDI Biotyper™ montre un log score d'identification recommandé par Bruker Daltonics, à l'échelle de l'espèce qui corrélait avec 97.25% des échantillons. Mais, nous avons constaté, qu'un score compris entre 1.7 et 2 corrélait aussi avec une identification

jusqu'au niveau de l'espèce, soit le cas de 1.5% des échantillons. Ce niveau de reproductibilité n'est généralement réalisable qu'avec des méthodes comme le séquençage d'ADN[123] .

La base de données et les appareils de spectrométrie de masse utilisés sont tous de la marque Bruker Daltonics™. Dans une étude récente, Marko *et al.*,2012[124] , ont comparé le système Biotyper (Bruker) et Vitek MS (bioMérieux) pour l'identification de 200 bactéries non-fermentantes. Les auteurs ont montré que l'accord d'identification au niveau de l'espèce/complexe /genre avec les méthodes de référence était plus élevé pour le système Biotyper de Bruker (97% vs 89,5%, p =0,004), mais une étape d'extraction était souvent exigée.

Martiny *et al.*, 2012[125] , ont comparés les systèmes MicroFlex LT (Bruker Daltonics), Vitek MS RUO (AXIMA Assurance Saramis-database, bioMérieux) et Vitek MS IVD (bioMérieux). Le pourcentage de l'identification au niveau de l'espèce était identique, (92,7%) pour Biotyper et 93,2% pour Vitek MS.

En conclusion, outre sa rapidité et le coût faible de consommable, MALDI-TOF MS a montré une grande capacité d'analyse et une haute reproductibilité inter-laboratoire concernant l'identification des bactéries au niveau de l'espèce.

*La spectrométrie de masse type MALDI-TOF &
l'application de la technique à l'identification
bactérienne*

L'identification dans la routine hospitalière

L'identification directe à partir des échantillons de prélèvement

2.1. Capacités de Biotyper™1.1 pour l'identification et la classification bactérienne

Notre premier objectif sera de pouvoir vérifier l'efficacité de ce logiciel dans les tâches d'identification et de classification lui étant attribuées. Des paramètres inclus dans le logiciel sont définis par défaut : à chaque pic donné est attribuée une valeur qui correspond à l'intensité de chaque pic. Le pic qui a la plus haute intensité aura une valeur arbitraire de 1,0; les autres pics auront une valeur correspondante relative par rapport au maximum de 1, et la plus petite valeur considérée comme significative sera de 0.001. Ces paramètres ont été modifiés, afin d'optimiser les résultats. Nous avons retenu les pics qui ont une valeur d'intensité relative d'au moins 0.004.

2.1.1. Test succinct de classification de diverses bactéries

Les capacités d'identification de Biotyper™ 1.1 ont été testées sur différentes souches et espèces bactériennes (Gram positif et Gram négatif). Les résultats de la [Figure 29](#) montrent qu'en comparant avec le Biotyper™ 1.1, 8 espèces différentes appartenant à différents genres, ont été correctement classées. Ainsi, nous n'observons que les bacilles à Gram négatif, composés des genres *Escherichia* et *Citrobacter* d'une part, et les bacilles à Gram positif composés des genres *Corynebacterium* et *Staphylococcus* d'autre part, forment deux clusters bien séparés.

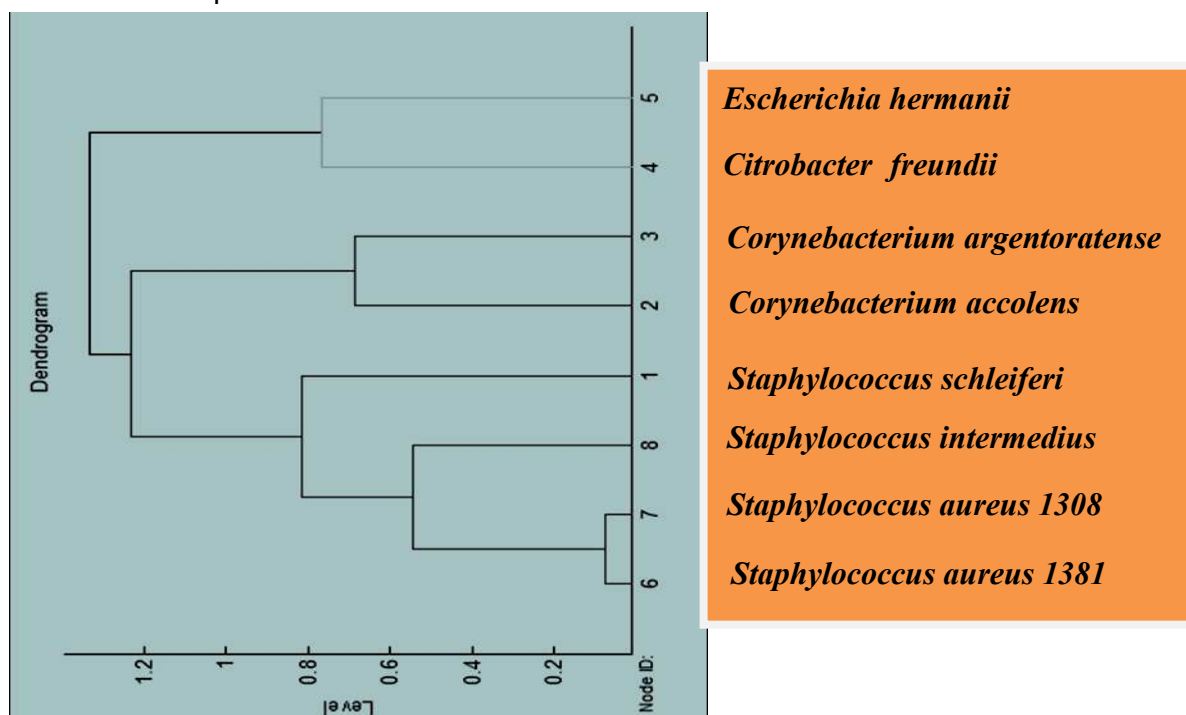


Figure 29 : Dendrogramme démonstratif de huit souches différentes provenant de trois genres différents réalisé par le logiciel Biotyper™1.1 de Bruker.

2.1.2. Classification et identification de bacilles à Gram négatif

L'étude des bacilles à Gram négatif paraît assez simple, car leur paroi peu épaisse procure un bon rendement d'extraction des protéines, et leurs spectres sont donc assez riches. Nous avons testé des bactéries appartenant à différents genres de la famille des *Enterobacteriaceae* : *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* (Figure 30). Les résultats d'identification révèlent la pauvreté de la base de données utilisée initialement (Version 2008) par l'absence de certaines espèces dans celle-ci. On remarque que l'identification de genre est toujours obtenue avec des scores maximaux (>2). Ces identifications sont aussi satisfaisantes pour les espèces déjà répertoriées comme *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter braakii*, *Escherichia coli*... avec des scores d'identification positive (>2), tandis que pour *Escherichia hermanni*, une espèce non encore incluse (Database 2008), l'identification répondait *Klebsiella pneumoniae* avec un score faible (1,534). Afin d'éviter le risque de confusion, la banque de données dédiée à l'identification nécessitait donc d'être renforcée par les spectres de souches bien identifiées par ailleurs (hybridations ADN/ADN, séquences ARN 16S, séquences gènes *sodA*, *rpoB*,...).

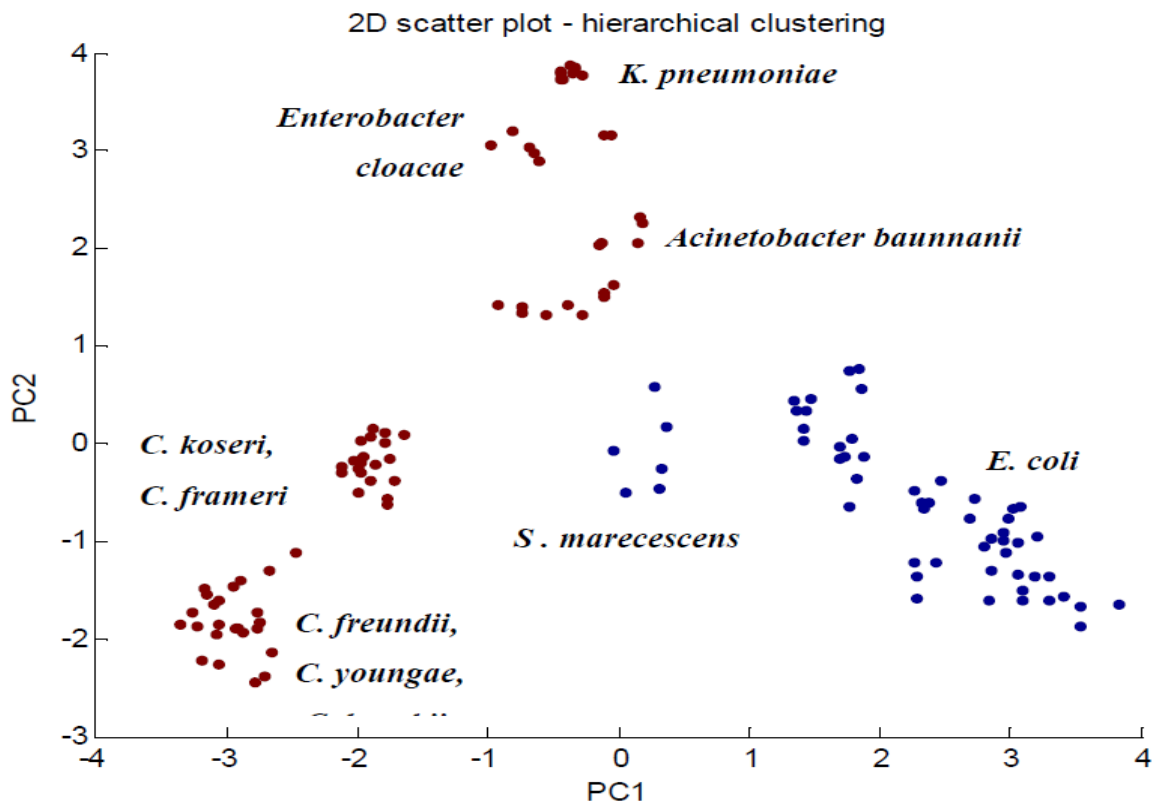


Figure 30: 2D plot pour la classification des 68 souches de bacilles Gram négatif. (BioTyper™1.1 de Bruker Daltonics)

2.1.3. Corynébactéries : constitution d'une banque de données et identification

Le genre *Corynebacterium* comprend près de 70 espèces dont au moins 35 peuvent être isolées chez l'homme. Les bactéries du genre *Corynebacterium* sont d'habitude identifiées grâce à leurs caractères biochimiques (fermentation de sucres, activités enzymatiques) réunis sur une galerie d'identification standardisée (APICoryné, bioMérieux). Dans cette étude, nous avons d'abord évalué la capacité de la technique MALDI-TOF/MS pour l'identification de 17 espèces et sous espèces de *Corynebacterium* (Tableau 5).

Tableau 5: Identification de 17 espèces du genre *Corynebacterium* par le logiciel Biotyper™1.1 et une base de données spécifique aux Corynébactéries, selon 2 propositions: prise en considération des 10, ou 100 pics les plus intenses. Les valeurs d'identification en termes de pourcentage de certitude sont données pour les premiers et le second choix.

		Résultats d'identification			
N° de la souche	Espèce	10 pics		100 pics	
		1 ^{ière} identification	2 ^{ème} identification	1 ^{ière} identification	2 ^{ème} identification
99	<i>C. accolens</i>	<i>C. accolens</i> (69%)	CDC-G1 (34%)	<i>C. accolens</i> (71%)	CDC-G1 (39%)
77	<i>C. afermentans</i>	<i>C. afermentans</i>	<i>C. afermentans lipophilum</i>	<i>C. afermentans</i> (63%)	<i>C. afermentans lipophilum</i> (31%)
127	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i> (63%)	<i>C. striatum</i> (31%)	<i>C. amycolatum</i> (56%)	<i>C. striatum</i> (17%)
112	<i>C. argenteratens</i>	<i>C. argenteratens</i> (56%)	<i>C. striatum</i> (17%)	<i>C. argenteratens</i> (62%)	<i>C. striatum</i> (14%)
36	<i>C. diptheriae</i>	<i>C. diptheriae gravis</i> R4 (84%)	<i>C. diptheriae belfanti</i> R9 (69%)	<i>C. diptheriae gravis</i> R4 (84%)	<i>C. diptheriae belfanti</i> R9 (69%)
27	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. urealyticum</i> (66%)	<i>C. jeikeium</i> (66%)	<i>C. urealyticum</i> (66%)	<i>C. jeikeium</i> (66%)
85	<i>C. macginleyi</i>	<i>C. macginleyi</i> (86%)	CDC-G1 (18%)	<i>C. macginleyi</i> (86%)	CDC-G1 (18%)
102	<i>C. minitissimum</i>	<i>C. minitissimum</i> (52%)	CDC-G1 (24%)	<i>C. minitissimum</i> (61%)	<i>C. macginleyi</i> (15%)
83	<i>C. propinquum</i>	<i>C. propinquum</i> (71%)	<i>C. lipophile gpe</i> F1 (14%)	<i>C. propinquum</i> (71%)	<i>C. lipophile gpe</i> F1 (14%)
98	<i>C. pseudodiphthericum</i>	<i>C. pseudodiphthericum</i> (67%)	<i>C. seminale</i> (14%)	<i>C. pseudodiphthericum</i> (67%)	<i>C. seminale</i> (14%)
64	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i> (49%)	<i>C. urealyticum</i> (22%)	<i>C. pseudotuberculosis</i> (49%)	<i>C. urealyticum</i> (22%)
2	<i>C. seminale</i>	<i>C. seminale</i> (88%)	<i>C. accolens</i> (16%)	<i>C. seminale</i> (88%)	<i>C. accolens</i> (16%)
12	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i> (92%)	<i>C. urealyticum</i> (18%)	<i>C. striatum</i> (92%)	<i>C. urealyticum</i> (18%)
68	<i>C. ulcerans</i>	<i>C. ulcerans</i> (78%)	<i>C. diptheriae mitis</i> R6 (16%)	<i>C. ulcerans</i> (78%)	<i>C. diptheriae mitis</i> R6 (16%)
18	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i> (44%)	<i>C. minitissimum</i> (12%)	<i>C. urealyticum</i> (44%)	<i>C. minitissimum</i> (12%)
136	CDC-F1	<i>C. lipophile gpe</i> F1 (40%)	<i>C. pseudodiphthericum</i> (23%)	<i>C. lipophile gpe</i> F1 (32%)	<i>C. pseudodiphthericum</i> (23%)
94	CDC-G1	CDC-G1 (69%)	<i>C. striatum</i> (20%)	CDC-G1 (69%)	<i>C. striatum</i> (20%)

Ces espèces étaient déjà identifiées par les méthodes de biologie moléculaire (hybridations moléculaires et séquences d'ADN16S et le gène *rpoB*). Sachant que la banque de données dont nous disposions ne comprenait que 6 espèces de ce genre (Version 2008), nous avons

décidé de constituer une première banque de données comprenant trois souches représentatives des espèces en notre possession [1-2 souches-types + 1 souche(s) clinique(s)] pour l'utiliser ensuite à l'identification des autres souches, indépendantes des premières. Les capacités d'identification ont été sollicitées sur la considération des 10 ou 100 pics les plus importants. Le Tableau 5 montre que la première identification se démarque toujours nettement de la seconde, et que quelque soit le nombre de pics considérés les résultats ne sont pas remarquablement affectés. Cependant, même si toutes les souches ont été correctement identifiées, certaines ne l'ont été qu'avec des scores de 44 à 55% ce qui donne des log score de 1.32 et 1.65 (*C. urealyticum*, *C. pseudotuberculosis*) ; cela pose des questions autant sur la diversité de certaines espèces que sur l'efficacité d'extraction pour certaines d'entre elles.

2.2. Application de la spectrométrie de masse en routine hospitalière

Nous avons eu l'opportunité de tester la qualité de l'identification par la spectrométrie de masse en parallèle de la routine bactériologique pour divers secteurs de prélèvements qui furent successivement confrontés à l'étude. Les bactéries étaient toutes prélevées sur des boîtes de re-isolément et l'identification réalisée sur un spectromètre MicroFlex LT™ (Bruker Daltonics). Durant le temps imparti, ce sont 531 échantillons qui ont été examinés. La base de données utilisée était celle de 2008 (environ 1600 espèces). Si nous ne considérons pas seulement les scores d'identification > 2,0, mais considérons en plus les 12 identifications satisfaisantes obtenues après répétition ainsi que les insuffisances d'annotation dans la banque de données (*Pseudomonas geniculata*, *Pseudomonas beteli* vs *Stenotrophomonas maltophilia* ; 3 cas), la concordance de l'identification vis à vis des techniques classiques atteint 89,6%. Il est également utile de préciser que dans 6 cas (1,1%) la spectrométrie de masse a fourni une identification de genre et d'espèce lorsque l'identification classique ne fournissait que le genre.

Au total, les entérobactéries représentent 38%, le groupe staphylocoque + streptocoque + entérocoque représente 23%, les anaérobies 12%, les aérobies strictes 14% ; les autres sont des bactéries diverses ou fastidieuses. L'identification en double a uniquement permis de corriger quelques erreurs humaines ; il n'y a jamais eu de discordance de réponse imputable à l'équipement MALDI-TOF. (Tableau 6).

Dans le cas où les bactéries anaérobies (64 souches) sont exclues, la concordance s'élève à 93 %. Les entérobactéries, les entérocoques et les staphylocoques ont plus de 95% de concordance alors que les streptocoques et *Pseudomonas* et apparentés ont une concordance de 82 % et 86 %, respectivement. Seulement 57 % des souches de *S.*

maltophilia sont correctement identifiées. Les anaérobies présentent une concordance insuffisante (43 %) notamment pour le genre *Clostridium* et met en reflet quelques lacunes de la banque de données où certaines espèces ne sont pas encore représentées ou encore à un seul exemplaire. En ne retenant que les identifications ayant un score de fiabilité de l'identification atteignant un niveau de garantie, soit supérieur à 2 (87 % des 531 souches), la concordance est de 95 % et de 97 % pour les souches aérobies et anaérobies aéro-tolérantes (90% de 467 souches). Ceci pourrait provenir de la date exacte d'étiquetage de certaines souches dans une banque académique de souches bactériennes. (Tableau 7).

Dans 1,2% des cas, la spectrométrie de masse fournissait une identification d'espèce avec un très bon score de fiabilité, mais en discordance avec les approches classiques.

Dans 1% des cas, aucune des approches discutées ne fournissait d'identification.

Dans 3% des cas, la spectrométrie de masse ne fournissait d'identification fiable que sur le genre. Dans 4% des cas, de réelles discordances étaient observées, elles concernaient surtout les anaérobies, et *Streptococcus mitis/oralis* versus *Streptococcus pneumoniae*, ou *Acinetobacter sp.* (Tableau 8).

Le séquençage de l'ADN 16S a permis :

- de préciser le très faible taux d'erreur lorsque la spectrométrie de masse procure une identification dotée d'un bon score de fiabilité
- des identifications par spectrométrie de masse dont les scores sont compris entre 1.8 et 2.0, mais dans les trois premiers choix indiquent une seule et même espèce présentent une pertinence à considérer
- d'intégrer des références encore absentes, ou de multiplier les alinéas pour certaines espèces dans la banque de données en particulier pour les anaérobies
- de souligner de manière plus ostensible la difficulté à identifier des bactéries comme *Nocardia sp.*, *Streptococcus mitis/oralis*.

Cette expérience réalisée sur une banque de données (05/2008) comprenant 1600 espèces montre, avec une qualité d'identification d'au moins 90%, que la spectrométrie de masse peut devenir un outil intéressant pour l'identification bactérienne.

Tableau 6 : Résultat d'identification (tout score confondus) par Microflex LT & MALDI Biotyper™2.0 de 531 échantillons sur une période de 1 mois dans le laboratoire de bactériologie de Strasbourg (2008).

Bactéries (nombre de souches)	Concordances espèces	Concordances genres
Entérobactéries (202)	199 (98,5%)	200 (99 %)
Entérocoques (53)	51 (96,2 %)	52 (98,1 %)
Streptocoques et app. (40)	33 (82,5 %)	36 (90 %)
<i>S. aureus</i> (39)	38 (97,4 %)	38 (97,4 %)
Staph coagulase – (37)	37 (100 %)	37 (100 %)
<i>Acinetob.</i> , <i>Pseudomonas</i> et apparentés (74)	64 (86,5 %)	65 (87,8 %)
Anaérobies (64)	28 (43,4 %)	38 (59,4 %)
Bactéries diverses (22)	12	17
Total = 531	462 (87 %)	483 (91 %)
Total – anaérobies = 467	434 (92,9 %)	445 (95,3 %)

Tableau 7: Résultat d'identification (score > 2: 86,8% des souches) par Microflex LT & MALDI Biotyper™2.0 de 531 échantillons sur une période de 1 mois dans le laboratoire de bactériologie de Strasbourg (2008).

Bactéries (nombre de souches)	Concordances espèces	Concordances genres
Entérobactéries (194/202)	192 (99 %)	193 (99,5 %)
Entérocoques (51/53)	50 (98 %)	51 (100 %)
Streptocoques et app. (31/40)	30 (96,8 %)	30 (96,8 %)
<i>S. aureus</i> (37/39)	37 (100 %)	37 (100 %)
Staph coagulase – (36/37)	36 (100 %)	36 (100 %)
<i>Acinetob.</i> , <i>Pseudomonas</i> et apparentés (63/74)	59 (93,7 %)	60 (95,2 %)
Anaérobies (37/64)	25 (67,6 %)	31 (83,8 %)
Bactéries diverses (12/22)	9 (75 %)	12 (100 %)
Total >2 : 461 sur 531 souches (86,8 %)	438 (95 %)	450 (97,6 %)
Total – anaérobies > 2 : 424 sur 467 souches (90,1 %)	413 (97,4 %)	419 (98,8 %)

Tableau 8 :Résultat d'identification (Discordance: score >2 (11/424 souches) par Microflex LT &MALDIBiotyper™2.0 de 531 échantillons sur une période de 1 mois dans le laboratoire de bactériologie de Strasbourg (2008).

Identification Microflex	Identification laboratoire
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Enterobacter kobei</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterococcus phaenolicola</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Pseudomonas geniculata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Pseudomonas geniculata</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Pseudomonas beteli</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Achromobacter ruhlandii</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
<i>Aeromonas culicicola</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
<i>Neisseria flavescens</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>

2.2.1. Bactéries dites difficiles : Méthodes conventionnelles VS MALDI-TOF/MS & Biotyper™

Durant dix huit mois (Janv 2009 à Juillet 2010) nous avons évalué la capacité d'identification du système pour les bactéries dites difficiles où les méthodes conventionnelles n'arrivaient pas à les identifier correctement. Généralement, ces bactéries sont envoyées aux centres de séquençage pour une éventuelle identification et d'autres subissent plusieurs tests supplémentaires afin de garantir la bonne espèce. Dans cette étude d'évaluation, les échantillons ont été fournis 2 à 3 fois par semaine des différents services du laboratoire de bactériologie de Strasbourg. Au total, 977 bactéries identifiées, avec un pourcentage de 95% d'identifications correctes. Les 5% restant représentaient des lacunes de la base de données utilisée des années 2009 et 2010. Cependant, la moitié des 5% des bactéries non identifiées ont été correctement identifiées en utilisant la base de données 2011. Les résultats obtenus pour ces bactéries ont montré une grande capacité d'identification à l'échelle de l'espèce comparée aux méthodes traditionnelles.

2.2.2. La préparation des échantillons (La technique de dépôt direct (« smear »))

Cette technique de dépôt direct a été comparée aux extraits protéiques et présente un avantage en termes de rapidité d'analyse et d'utilisation de consommables. Pour cette technique il est fortement souhaitable d'étaler un film bactérien très fin sur la plaque cible du spectromètre à l'aide d'un cône de pipette, cure-dent, ...etc. Il faut donc veiller à bien plaquer

les bactéries sans déposer une trop grande quantité de matériel biologique, car cela risque de minimiser l'ionisation, et l'acquisition de bons spectres de masse. La limite de détection, par exemple pour *E. coli* vivant est de 10^5 cellules par point de dépôt.

Une fois secs, ces dépôts sont recouverts de matrice et l'identification peut débuter. Au départ et lors de la précédente étude en parallèle à l'identification des échantillons utilisant le protocole d'extraction protéique (pendant un mois), nous avons aussi évalué cette technique du smear (dépôt direct) sur une période d'une semaine. En total, 59 souches ont été analysées par cette méthode. ([Tableau 9](#), [Tableau 10](#)). Avec le pourcentage d'identification enregistré, cette technique et durant cette première expérience, a montré ses limites. Seules les bactéries à Gram négatif comme les *Pseudomonas* et les *Enterobacteriaceae* ont eu des taux d'identification très importants (100% et 94,7% respectivement). Cependant, les bactéries à Gram positif (les *S. aureus*, Les *Streptococcus* et les *Enterococcus* ont eu un score équivalent à 75% de bonne identification, ce qui n'est pas satisfaisant vu le nombre de bactéries rencontrées dans la routine hospitalière.

Pour corriger les erreurs éventuelles liées à l'étalement des souches et qui a induit à des pourcentages faibles d'identification pour la première étude, une deuxième évaluation de cette technique a été réalisée en 2009. Nous avons testé cette technique sur 41 micro-organismes différents en parallèle à la technique de l'extraction protéique en comparant les scores d'identification ([Tableau 11](#)). La technique de dépôt direct montre sa fiabilité et sa rapidité par rapport à l'extraction protéique. Alors que cette dernière demande 45 minutes de travail pour 24 échantillons en double dépôt, la technique de Smear ne demandera que 20 minutes. De plus, le pourcentage de déviation des scores de l'identification entre les deux techniques appliquées sur la quarantaine de souches d'espèces différentes, était inférieur à 2%.

Le reste des résultats de cette investigation est détaillé en **ANNEXE I**

Tableau 9 :Résultats d'identification obtenus par la technique du Smear (tout scores confondus)

	Species Concordance	Genus Concordance
Enterobacteriaceae (19)	94,7 %	94,7 %
Enterococcies (4)	75 %	75 %
Streptococcies (4)	75 %	75 %
S. aureus (8)	75 %	75 %
SCN (8)	25 %	50 %
Anaerobes (7)	28,5 %	28,5 %
Others bacteria (4)	20 %	60 %
Pseudomonas parents (4)	100 %	100 %

Tableau 10:Résultats d'identification obtenus par la technique du Smear (scores > 2)

	Species Concordances	Genus Concordances
Enterobacteriaceae (15/19)	100 %	100 %
Enterococci (1/4)	100 %	100 %
Streptococci and parents (2/4)	100 %	100 %
S. aureus (3/8)	100 %	100 %
Pseudomonas parents (2/4)	100 %	100 %
Anaerobes (3/7)	66 %	66 %
Various bacteria (2/5)	0 %	50 %
SCN (3/8)	33 %	66 %

Tableau 11 :Déviations des scores de fiabilité d'identification pour 41 espèces bactériennes par les techniques d'extraction protéique et de dépôt direct comparées par le système MALDI-TOF/MS BiotyperTM2.0

Espèce	Score smear	Score extraction	% Déviation
<i>Actinobaculum schaalii</i>	1.829	1.944	5.92%
<i>Actinomyces neuui ssp neuui</i>	2.11	2.117	0.33%
<i>Alcaligenes faecalis ssp faecalis (Gram -)</i>	2.523	2.687	6.10%
<i>Bifidobacterium animalis ssp lactis</i>	2.154	2.315	6.95%
<i>Bordetella bronchiseptica (Gram-)</i>	2.512	2.522	0.40%
<i>Brevundimonas intermedia (Gram-)</i>	2.591	2.549	(-).1.65%
<i>Brevundimonas vesicularis (Gram-)</i>	2.489	2.35	(-).5.91%
<i>Burkholderia andropogonis (Gram-)</i>	2.54	2.334	(-).8.83%
<i>Burkholderia caribensis (Gram-)</i>	2.404	2.257	(-).6.51%
<i>Comamonas nitrativorans (Gram-)</i>	2.582	2.525	(-).2.26%
<i>Comamonas testesteronii (Gram-)</i>	2.428	2.425	(-).0.12%
<i>Corynebacterium falsenii</i>	2.114	2.328	9.19%
<i>Corynebacterium simulans</i>	2.341	2.41	2.86%
<i>Corynebacterium striatum</i>	2.595	2.584	(-).0.42%
<i>Dermabacter hominis</i>	1.93	2.003	3.64%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.453	2.504	2.04%
<i>Enterococcus faecium</i>	2.612	2.621	0.53%
<i>Escherichia coli (Gram-)</i>	2.484	2.502	0.72%
<i>Flavobacterium johnsoniae (Gram-)</i>	2.552	2.508	(-).1.75%
<i>Helcococcus kunzii</i>	2.179	2.446	10.92%
<i>Kocuria rhizophila</i>	2.087	2.367	11.83%
<i>Lactobacillus jensenii</i>	2.222	2.434	8.71%
<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	2.389	2.191	(-).9.04%
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.54	2.58	1.56%
<i>Morexella sg morexella (Gram-)</i>	2.165	2.251	3.82%
<i>Pasteurella multocida (Gram-)</i>	2.359	2.51	6.0%
<i>Propionibacterium acnes</i>	1.753	1.826	4.99%
<i>Pseudomonas aeruginosa (Gram-)</i>	2.549	2.512	(-).1.47%
<i>Pseudomonas beteli (Gram-)</i>	2.513	2.387	(-).5.28%
<i>Pseudomonas extremorientalis (Gram-)</i>	2.542	2.511	(-).1.23%
<i>Sphingobacterium mizutai (Gram-)</i>	2.616	2.614	(-).0.08%
<i>Staphylococcus caprae</i>	2.214	2.222	0.37%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.267	2.353	3.66%
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2.363	2.438	3.08%
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2.108	2.209	4.57%
<i>Staphylococcus warneri</i>	2.103	2.215	5.06%
<i>Stenotrophomonas maltophilia (Gram-)</i>	2.259	2.385	5.28%
<i>Streptococcus anginosus</i>	2.367	2.419	2.15%
<i>Streptococcus constellatus ssp constellatus</i>	2.12	2.185	2.97%
<i>Streptococcus intermedius</i>	2.079	2.097	0.86%
<i>Streptococcus salivarius</i>	2.172	2.224	2.34%
MOYENNE	2.322	2.362	1.76%

2.3. L'identification directe à partir des échantillons

2.3.1. Les Hémocultures

Toujours au titre des applications de la spectrométrie de masse dans la routine hospitalière, nous avons abordé l'intérêt de l'identification bactérienne MALDI-TOF dans les hémocultures positives versus Bactec 9240™ (Becton Dickinson), hors hémocultures « mycobactéries ». Pour cela, nous avons élaboré un protocole spécifique. Cette approche nécessite la reprise de 1.5 mL d'hémoculture et l'élimination des éléments figurés du sang contaminant. Dans cet objectif, trois centrifugations sont nécessaires. La première (2000 rpm) est réalisée sur un tube « vacuette » gélosé (Type Z serum Sept Clot Activator, Greiner BioOne®), la seconde est effectuée à 1000 rpm à partir d'une suspension dans 1.5 ml d'H₂O des bactéries restées à la surface de la gélose, elle permet une nouvelle séparation des éléments figurés, la troisième centrifugation à vitesse maximale permet la sédimentation des bactéries. D'éventuelles traces de sang peuvent encore être éliminées avant que le sédiment soit soumis à l'extraction bactérienne. Durant 5 semaines d'activité, ce sont 242 échantillons positifs qui ont ainsi pu être traités. Nous avons constaté que le temps nécessaire pour accomplir l'identification de 12 échantillons était de 1 heure. Dans cette série, les staphylocoques représentent 43%, les entérobactéries représentent 32%, les entérocoques et les streptocoques 17%, les anaérobies strictes 0,9% et autres 7,85%.

Les résultats obtenus par spectrométrie le jour de positivité de l'hémoculture montrent une concordance de l'identification de 97,52% au niveau du genre et de 95.86% au niveau de l'espèce. Les discordances concernent des échantillons polymicrobiens, et ceux où aucune identification n'a pu être obtenue. Il doit être noté que pour toute réponse de la spectrométrie de masse, une concordance au moins partielle était observée en fonction du polymicrobisme de l'échantillon. La possibilité d'identifier les bactéries dès la positivité des hémocultures a un intérêt dans la prise en charge clinique du patient, et parfois dans le choix de l'antibiogramme dès le lendemain de cette positivité. Et c'est pourquoi une telle étude a été envisagée.

2.4. ARTICLE (2) : Identification Bactérienne

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials

W. Moussaoui¹, B. Jaulhac¹, A.-M. Hoffmann¹, B. Ludes², M. Kostrzewa³, P. Riegel¹, G. Prévost¹

Article first published online: 11 OCT 2010 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03356.x
Clin Microbiol Infect, 2010, 16(11):1631-8.

Keywords:Bacteraemia; bacteria; blood cultures; identification; mass spectrometry

Abstract

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is now widely used for marker/multi-biomarker detection in medical diagnosis. We tested a new protocol for bacterial identification from blood culture broths in hospital routine by using collection tubes with separator gels on 503 included samples examined over 3 months, where 1.5 mL was injected by a syringe into BD Vacutainer tubes from BACTEC-positive bottles, before processing for bacterial protein extraction. Samples were loaded in duplicate onto the MALDI MS target, allowing a series of 12 samples to be processed in duplicate within 80 min by using Biflex III and BioTyper 2.0 software (Bruker). Including polymicrobial samples, 193 of 213 of Gram-negative bacteria (91.08%) and 284 of 319 of Gram-positive bacteria (89.02%) were correctly identified at the species level. *Enterobacteriaceae* constituted 35.15% of all species found, *Staphylococaceae* 37.96%, *Streptococaceae* and *Enterococaceae* 20.85%, *Pseudomonadaceae* 1.69%, and anaerobes 2.44%. In most of the polymicrobial samples, one of the species present was identified (80.9%). Seven isolates remained misidentified as *Streptococcus pneumoniae*, all belonging to *Streptococcus mitis*. *Staphylococcus aureus* was identified better when grown on anaerobic medium, and MALDI BioTyper identification scores as low as 1.4 were pertinent, provided that four successive proposals of the same species were given. This new protocol correlates with conventional microbiology procedures by up to 90%, and by >95% for only monomicrobial samples, and provides a decreased turn-around time for identification of bacteria isolated from blood cultures, making this technology suitable also for blood cultures, with less delay and cost decreases in bacterial diagnostics, and favouring better care of patients.

Introduction

Sepsis is related to multiple organ dysfunctions, with a high mortality rate (10–40%), and requires microbiological tests to establish bacteraemia by using blood culture (BC) [1]. The presence of microorganisms in the bloodstream is diagnosed in only 4–12% of all BCs in hospitals, with sometimes false-negative results, and up to 65% of intensive-care patients showing symptoms of sepsis are already under presumptive antimicrobial treatment. Thus, rapid bacterial diagnosis would sometimes enable more appropriate therapy [2]. Automated BC techniques have considerably increased the performance of bacterial analyses as compared with classical techniques, and media have evolved considerably over the past 30 years [3,4]. Few delays are requested for positive BCs, and other days remain to be resolved for the processing of identification, based on phenotypic features, from enriched cultures. A number of analytical methods may now be used for the detection and identification of bacteria, but may take several days to identify the pathogen. Therefore, rapid bacterial identification from BCs, which may influence both presumptive antimicrobial therapy and antimicrobial susceptibility testing, remains a challenge [5]. Wide research efforts are being made to solve this problem and to find ways of improving identification, especially for sepsis cases; examples are PCR [3], fluorescence *in situ* hybridization and high-throughput DNA sequencing [3,4,6,7].

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) allows identification of most of the pathogenic bacteria grown on agar plates from isolated colonies within a few minutes, and has proven efficiency and reproducibility [8–13]. Plasma represents up to 55% of the total blood volume, and offers a good opportunity to recover grown bacteria [14], as they are mostly present in the extracellular compartment. In this study, we compared MALDI-TOF MS with conventional methods by injecting 1.5 mL of positive BC medium into serum separator tubes, and using a new protocol for bacterial separation. Protein extraction from recovered bacteria was a prerequisite for MALDI-TOF BioTyper-assisted bacterial identification following new rules.

Materials and Methods

Samples

Blood specimens from adult patients were systematically collected on BACTEC containing anaerobic (BACTEC anaerobic (BAA)) or aerobic (BACTEC aerobic (BA)) resins. Bottles containing 8–12 mL of whole blood were incubated in BACTEC 9240 instruments (Becton Dickinson, Meylan, France) for 5-day for the standard incubation protocol or less if a positive signal was detected. Nine paediatric bottles were included in this study. The direct

identification of bacteria from both positive aerobic (BA) and anaerobic (BAA) bottles by MALDI-TOF MS was performed serially in parallel with the routine protocol for 5 days a week over a 13-week period at the laboratory of bacteriology of Strasbourg University Hospital from 15 December 2008 to 22 December 2008 and from 12 January 2009 to 1 March 2009, and for another period from 1 April 2009 to 7 May 2009, for staff reasons and to overlap several seasons. After subculture on agar plates, any positive BC was simultaneously treated for bacterial identification with conventional procedures, including Vitek II cards or API galleries (BioMérieux, Craponne, France), and, if necessary, with complementary individual biochemical or enzymatic tests.

Separation (blood cells and bacteria) and protein extraction protocol

Approximately 1.5 mL was recovered from positive BC vials, and injected with a syringe into either Clot activator and gel BD Vacutainer tubes ($n = 166$) (Becton Dickinson) or Z Serum Sept Clot Activator ($n = 400$) (Greiner Bio One, Courtaboeuf, France). Tubes were centrifuged at 500 g for 10 min at room temperature (RT) to separate blood cells at the bottom of the gel from plasma and cell debris and bacteria at the surface. Bacterial sediment was suspended in 1.5 mL of sterile water, transferred to an Eppendorf microtube, and centrifuged at 300 g for 1 min at RT for better removal of cell debris still present; this differs from previous protocols [15,16]. One microlitre of this supernatant was transferred to another microtube to collect bacteria after a 10 000 g centrifugation for 2 min at RT.

The bacterial pellet was treated with the standard ethanol/formic acid protein extraction protocol for MALDI-TOF MS identification [12]. One microlitre of protein extract was then loaded in duplicate into wells of a polished steel TF MTP 384 target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), covered with 1.5 μ L of a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid/MALDI-TOF matrix in 50% (v/v) acetonitrile/2.5% (v/v) trifluoroacetic acid as an electron donor.

MALDI-TOF MS parameters and bacterial identification

All mass spectra were acquired with a Biflex III MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) with a nitrogen laser (337 nm, 3 mW, 10 MHz) operated in the positive linear mode (delay 400 ns, voltage 20 kV, mass range 2–20 kDa), and integrated with Flex Control 3.0 software (Bruker Daltonics). Initial laser shots with relatively high energy (40%) to ‘clean the matrix’ (matrix blast effect) were performed. The laser energy was then decreased (20%) until the signals disappeared, to generate the desired spectrum after smoothing, baseline subtraction, normalization, and peak picking [12]. Each spectrum was obtained as described previously [9]. Spectrum files were transferred to BioTyper Automation Control 2.0 (Bruker Daltonics) software, which compares the obtained spectrum with the

spectra database (MALDI BioTyper DB Update_2.0.4.0; 3290 entries, 1960 microorganism species; Bruker Daltonics). *Escherichia coli* DH5 α was used as a ‘positive control’ for correct sample preparation, correct instrument tuning and, especially, for correct calibration to avoid even small differences in spectrum generation. *E. coli* was prepared with the same sample preparation protocol as used for the other samples. Calibration was performed with six constant and major proteins, including a peak at 10 299.09 Da, and two additional proteins, RNase A (13 683.2 Da) and myoglobin (16 952.3 Da) (Bruker Daltonics recommendations). The mass accuracy after external calibration with known *E. coli* protein signals was about 500 p.p.m.

Spectrum quality criteria were as follows: high spectrum reproducibility, little noise and a flat baseline (signal-to-noise ratio above 15), presenting as many peaks as possible (maximum = 300), and an averaged resolution of 600 ($M/\Delta M$) within the range of m/z selected for analysis (2000–20 000 Da).

From the cumulative data comparison of the unknown spectrum and a best-fitting given spectrum in the library, a final log score value for the unknown spectrum was calculated, ranging from 0 to 3, representing the reliability of the identification. For identification of bacterial colonies on agar plates, BioTyper recommendations are that score values should be divided into three intervals: a log score ≥ 2.0 is mainly considered to be the threshold for a match at the species level [12], 1.7–2.0 indicates a close relationship (at least at the genus level), and < 1.7 indicates identification of unknown reliability. However, for BCs, varying bacterial densities and bacterial yields may lead to the use of different rules, such as the consecutive proposed identifications, when similar. The total time needed to perform the whole bacterial identification process for 12 samples loaded in duplicate was 80 min.

Results

During a 3-month period, we tested 566 blood samples originating from anaerobic, aerobic and paediatric blood vials. For this comparison of MALDI-TOF MS results with those obtained by routine techniques, 28 bacteria were discarded from the overall study, as routine techniques only provided identification at the genus level, and they were considered to be contaminants. MALDI-TOF Biotyper was able to identify all of these specimens at the species level (mainly *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci (CoNS)). All included samples were treated under the same conditions. Eleven yeasts identified by routine techniques were also excluded, because the study was focused only on bacterial identification. Twenty-four negative BCs were also tested in a blind manner throughout the study. They all were all negative with MS identification.

For the remaining 503 samples issued from 378 patients, 532 bacteria were identified with usual techniques corresponding to the synthetic identifications obtained from BC BAA or BA

broths, when available (Table 1). MALDI BioTyper never provided contradictory results from BA and BAA cultures, and identified 477 of these 532 bacterial isolates, representing a percentage of 89.66% of correct whole bacterial identification as compared with conventional methods, including 21 polymicrobial samples. Among the 477 bacterial strains identified by MALDI BioTyper, 378 were identified with a high score (from 1.9 to 2.7), and 71 were identified with a lower average score (from 1.7 to 1.9). However, 28 bacteria were correctly identified by taking into account the succession of at least four identical proposals of identification given by BioTyper 2.0 for at least four distinct database strains of a given species, provided that these scores were all >1.43–1.40. In such conditions, any identification with four or more identical proposals was a correct one, whereas those with scores <1.35 were mainly not correct or random. These 28 bacteria identified with a lower score were five *S. epidermidis*, four other CoNS, eight *Staphylococcus aureus* (grown in BAA), four *Streptococcus pneumoniae*, two *Streptococcus pyogenes*, one *Streptococcus dysgalactiae*, two *E. coli*, one *Enterobacter cloacae*, and one *Acinetobacter junii*. Thus, such a procedure improves correct identification for almost 6%.

The 477 correctly identified samples were distributed as follows: 187/202 *Staphylococcaceae*, 176/187 *Enterobacteriaceae*, 66/76 *Streptococcaceae*, 31/35 *Enterococaceae*, 8/9 *Pseudomonaceae*, 5/13 anaerobes, and 4/10 remaining isolates (Table 1). The 21 polymicrobial samples corresponded to 50 bacteria identified by conventional techniques. Thus, 482 monomicrobial BCs led to 459 correct MALDI BioTyper identifications, i.e. 95.22%.

Monomicrobial BCs (482 samples)

The 459 correct BioTyper identifications were distributed among different bacterial groups as follows: *Enterobacteriaceae*, 170/172 (98.84%); *Pseudomonaceae*, 8/8 (100%); *Acinetobacter baumannii*, 1/1; and *Neisseria meningitidis*, 1/1; *Staphylococcaceae*, 183/192(95.31%); enterococci, 26/26(100%); *Streptococcaceae*, 65/73 (89.04%); and anaerobes, 5/9 (44.44%) (see Table 1).

Gram-negative microorganisms (187 bacteria)

The usual rank order of frequency in bacteraemias from teaching hospitals for *Enterobacteriaceae* is as follows: *E. coli* > *Klebsiella* spp. > *Serratia* spp. > *Enterobacter* spp. = *Proteus* spp. > others [17]. Here, a similar rank order was observed; *E. coli*, with 105/106 isolates correctly identified, constitutes the predominant species found among *Enterobacteriaceae* (170/172). The other *Enterobacteriaceae* were also correctly detected: *Klebsiella pneumoniae*, 24/24; *Enterobacter cloacae*, 15/16; *Serratia marcescens*, 8/8; *Klebsiella oxytoca*, 8/8; *Citrobacter freundii*, 3/3; *Enterobacter aerogenes*, 6/6; and *Proteus*

mirabilis, 1/1. Concerning non-fermenting species, 7/7 *Pseudomonas aeruginosa* and 1/1 *Pseudomonas putida* strains were correctly identified at the species level, with high score values. One sample containing *A. baumannii* and one containing *N. meningitidis* were identified. Furthermore, Gram-negative anaerobes were correctly detected, here 5/5 *Bacteroides fragilis*. Overall, 98.93% (185/187) of Gram-negative bacteria were correctly identified in monomicrobial samples.

Table 1: List of microorganisms identified with standard methods and with MALDI BioTyper 2.0 from 503 blood cultures during the study period

Microorganisms	All samples (identified with standard methods)	Monomicrobial isolates identified with MALDI-TOF MS/identified with standard methods	Polymicrobial isolates identified with MALDI-TOF MS/identified with standard methods
Gram-positive bacteria (284/319 identified)			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	123	115/118	3/5
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	47/49	0/1
Other coagulase-negative Staphylococci	29	21/25	1/4
<i>Enterococcus faecalis</i>	29	22/22	3/7
<i>Enterococcus faecium</i>	6	4/4	2/2 ^a
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	38	36/37	1/1
<i>Streptococcus disgalactiae</i>	12	12/12	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10	10/10	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6	6/6	0
<i>Streptococcus mitis</i> ^b	6	0/5	0/1
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	1/1	0
<i>Streptococcus oralis</i>	1	0/1	0
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	0/1	0
<i>Streptococcus vestibularis</i>	1	0	0/1
<i>Propionibacterium acnes</i>	4	0/4	0
<i>Clostridium</i> sp.	2	0	0/2
Gram-negative bacteria (193/213 identified)			
<i>Escherichia coli</i>	114	105/106	4/8 ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	24/24	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	19	15/16	1/3 ^a
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	8/8	0
<i>Serratia marcescens</i>	8	8/8	0
<i>Citrobacter freundii</i>	6	3/3	1/3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	6/6	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1/1	0
<i>Salmonella</i> sp.	1	0	0/1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5	1/1	2/4 ^a
<i>Acinetobacter junii</i>	1	0	0/1
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	1/1	0/0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	7/7	0/1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	0	0/3
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1/1	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	6	5/5	0/1
<i>Bacteroides ovatus</i>	1	0	0/1
Blind negative controls (24)			
Total	532 ^c	459/482 (95.22%)	18/50 (36%)

1. MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.
2. Number of bacteria correctly identified: polymicrobial samples included 477/532 (89.66%). No negative control produced a significant mass spectrum (no reliable identification).
3. ^aFour isolates were, in fact, identified at scores <1.4, and were not taken into account.
4. ^b*Streptococcus mitis* misidentified as *Streptococcus pneumoniae*.

^cOnly isolates (without 24 negative controls).

Gram-positive microorganisms (295 bacteria)

The most frequently detected bacterium in BCs was *S. epidermidis* [3]. It was detected in 115/118 isolates, despite the fact that it is known to grow more slowly in BC than other Gram-positive organisms. Forty-seven of 49 isolates were correctly identified as *S. aureus*, when grown on BAA medium. When *S. aureus* was grown on BAA medium, 25 and 14 isolates were identified with scores of >1.9 and >1.7, respectively, whereas eight other samples were identified as *S. aureus* with succession scores >1.45. For the same samples incubated in BA medium, only four isolates were identified with scores >1.9, 11 with scores >1.7, and two with scores >1.45 where four identical and successive species were proposed. The difference between scores for the two culture conditions was statistically significant (Student's *t*-test, $p < 0.05$). The remaining CoNS were correctly identified in 21/25 cases by MALDI Biotyper. Overall, nine *Staphylococcaceae* strains were unidentified by MALDI BioTyper, mainly because of the lower level of bacterial culture or difficulty in the protein extraction procedure, such as poor separation of blood cells, which remained in contact with bacteria on the separator gel, or because the separator gel did not adhere sufficiently to the tubes.

Various *Streptococcus* species were also detected (65/73) in this series: 36/37 *Streptococcus pneumoniae*, 12/12 *Streptococcus disgalactiae*, 10/10 *Streptococcus pyogenes*, 6/6 *Streptococcus agalactiae*, 1/1 *Streptococcus anginosus*, and 0/1 *Streptococcus sanguinis*. *Streptococcus mitis* (0/5) and *Streptococcus oralis* (0/1) were misidentified by this technique as *Streptococcus pneumoniae*. Enterococci were all correctly distinguished: 22/22 *Enterococcus faecalis* and 4/4 *Enterococcus faecium*. Gram-positive anaerobes in monomicrobial samples were only represented by unidentified *Propionibacterium acnes* (0/4). MALDI- BioTyper correctly identified 274/295 (92.88%) Gram-positive bacteria. Thus, 95.22% of monomicrobial isolates were identified in these 482 samples. Most of the poorly identified Gram-positive bacteria belonged to CoNS and to *Streptococcus* (seven and ten isolates, respectively).

Polymicrobial blood cultures

Twenty-one polymicrobial samples generated 50 isolates by routine classical identification (Table 2). MALDI-TOF MS identification used the same procedure, but bacteria were identified by considering the ten identification proposals provided by Biotyper. In fact, polymicrobial samples were suspected when MALDI BioTyper proposed two alternative species that were identified with score values >1.7. Table 3 shows that, for samples containing two or more species, BioTyper identification may give iterated, but mixed, proposals of two distinct species, but with significant scores presumably according to the

relative abundance of each bacterium. For such cases, BioTyper allows the superimposition and comparison of the sample spectrum with library spectra (Fig. 1). It is then possible to further analyse the different proposals. Among polymicrobial samples, 15 had two growing species identified with standard methods (Table 2). For these samples, MS identified one species in 12 of the cases. For eight of these samples, scores were >1.9, two others were correctly identified with a >1.7 score, and two were identified with a >1.4 score. However, two bimicrobial samples gave correct identification of three bacteria at scores <1.4; they were not considered. Nevertheless, identification proposals by BioTyper may become random with a lower cut-off. We always obtained at least one correct identification for the four trimicrobial samples, where five bacteria were identified with scores >1.7, except for one with a score of 1.675 (Table 2). No reliable identification was obtained for a bimicrobial sample and the single quadrimicrobial sample. All *Stenotrophomonas maltophilia* strains that were found only in polymicrobial samples remained unidentified. Finally, MALDI BioTyper identified 18 bacteria, 8/25 Gram-negative and 10/25 Gram-positive, respectively, according to the rules established in this study.

Overall, MS succeeded in identifying 89.66% (477/532) of the bacteria identified by conventional procedures, contained in 503 BC samples.

Table 2 :The 21 polymicrobial samples identified by both methods (conventional methods and MALDI BioTyper 2.0)

Standard method identification	MALDI BioTyper identification	Score value
1. CoNS, coagulase-negative staphylococci.		
2. ^a Misidentification at the species level.		
3. ^b ID scores <1.4 were not taken into account, despite correct identification.		
<i>Escherichia coli</i> + <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	2.021
<i>Enterococcus faecalis</i> + CoNS	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.145
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Streptococcus mitis</i> ^a	<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Streptococcus pneumoniae</i> ^a	1.777–1.760
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.213
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.036
<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	1.948
<i>Enterococcus faecium</i> + CoNS	<i>Enterococcus faecium</i>	2.403
<i>S. epidermidis</i> + <i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	1.740
<i>S. epidermidis</i> + <i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	2.021
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + <i>Salmonella</i> sp.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.695
<i>Enterobacter cloacae</i> + <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	1.535
<i>A. baumannii</i> + <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>A. baumannii</i>	1.316 ^b
<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	1.321–1.2 ^b
<i>Bacteroides fragilis</i> + CoNS	No reliable identification	–
<i>Bacteroides ovatus</i> + <i>S. epidermidis</i>	No reliable identification	–
<i>Staphylococcus hominis</i> + <i>Staphylococcus vestibularis</i> + <i>Acinetobacter junii</i>	<i>S. hominis</i>	1.675
<i>A. baumannii</i> + <i>Citrobacter freundii</i> + <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>A. baumannii</i>	1.930
<i>C. freundii</i> + <i>A. baumannii</i> + <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>C. freundii</i> , <i>A. baumannii</i>	1.993–1.757
<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Clostridium</i> spp.	<i>E. coli</i>	1.962
<i>E. coli</i> + <i>Enterobacter cloacae</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>E. coli</i>	2.149
<i>E. coli</i> + <i>C. freundii</i> + <i>Clostridium</i> spp. + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. coli</i>	2.168

Table 3. MALDI BioTyper 2.0 identifications: examples of proposals given for a monomicrobial sample and for two polymicrobial samples

ID Rank	Monomicrobial example: <i>Escherichia coli</i>	Polymicrobial example: <i>E. coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Polymicrobial example: <i>E. coli</i> and <i>Clostridium perfringens</i>
1	<i>E. coli</i> ATCC 25922 Score: 2.499	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> 9295_1 Score: 2.106	<i>E. coli</i> ATCC 35218 Score: 1.758
2	<i>E. coli</i> DH5a Score: 2.369	<i>E. coli</i> ATCC 35218 Score: 2.104	<i>C. perfringens</i> ATCC 3626 Score: 1.658
3	<i>E. coli</i> MB11464_1 Score: 2.352	<i>E. coli</i> MB11464_1 Score: 1.964	<i>E. coli</i> ESBL_EA_RSS1528T Score: 1.632
4	<i>E. coli</i> DSM 30083T Score: 2.295	<i>K. pneumoniae</i> 37585 PFM Score: 1.867	<i>C. perfringens</i> NCTC 4964 Score: 1.628
5	<i>E. coli</i> ATCC 25921 Score: 2.273	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> DSM 30104T Score: 1.855	<i>E. coli</i> MB11464_1 Score: 1.611
6	<i>E. coli</i> NISSL Score: 2.265	<i>E. coli</i> B421 Score: 1.848	<i>C. perfringens</i> NCTC 8346 Score: 1.608
7	<i>E. coli</i> SBL_EA_RSS_1528 Score: 2.174	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i> DSM 16358 Score: 1.817	<i>C. perfringens</i> NCTC 8237 Score: 1.564
8	<i>E. coli</i> ATCC 35218 Score: 2.156	<i>E. coli</i> ATCC 2592 Score: 1.811	<i>E. coli</i> B421 Score: 1.531
9	<i>Escherichia fergusonii</i> DSM 1369 Score: 2.106	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>rhinoscleromatis</i> DSM 16231 Score: 1.776	<i>C. perfringens</i> NCTC 3110 Score: 1.461
10	<i>Escherichia albertii</i> DSM 17582T Score: 2.099	<i>K. pneumoniae</i> 37595PFM Score: 1.763	<i>E. coli</i> ATCC 25922 Score: 1.412

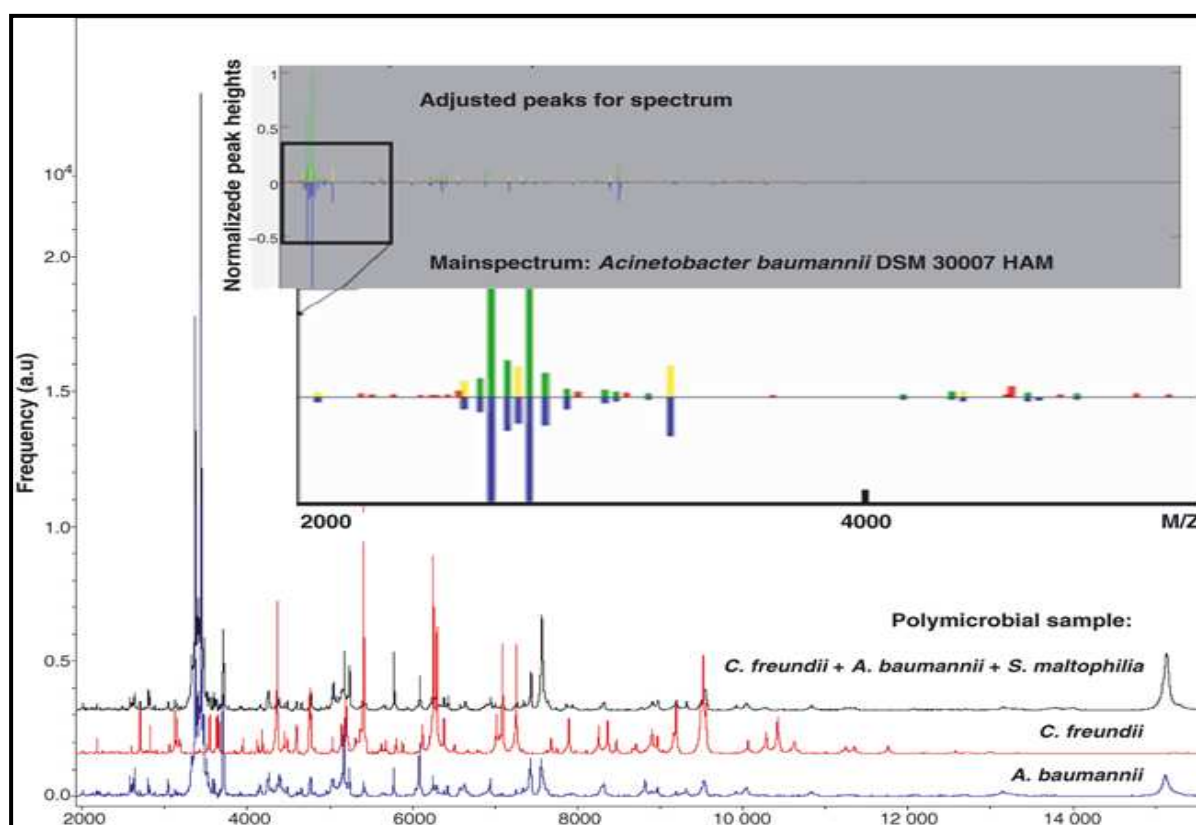


Figure 1. Identification of polymicrobial results displayed within the BioTyper 2.0 graphic view. The mass spectra shows the difference in peaks (presence or absence) and their intensity between the sample spectrum and those of bacteria identified at first proposals. The upper part of the figure within the inner windows shows the unknown spectrum containing perfectly matching peaks (0–200 p.p.m.) in green, imperfectly matching peaks (200–500 p.p.m.) in yellow, and non-matching peaks in red. The lower part (blue) shows the dedicated main spectrum included in the database.

Discussion

Even though BC is considered to be the reference standard for the detection of microorganisms in blood samples [2], it remains dependent on different factors, such as bacterial density [18], bacterial adaptation to new growth environments, individual rates of growth, competition between bacteria, and initial antimicrobial therapy. The delay in identification mostly remains unsatisfactory for clinicians, who often initiate presumptive antimicrobial therapy prior to precise diagnosis. Shortening the delay in providing dedicated therapy may strengthen its specificity, and would have a beneficial effect on the recovery of patients [3]. Because of the high sensitivity of MS in detecting peptides and the possibility of identifying bacteria with software such as Biotyper, it has been possible to demonstrate the high quality of identification [12].

Here, we propose a new protocol and rules for the identification of bacteria from BCs with MALDI-TOF BioTyper, which allowed 89.66% correct and single-step identifications among a total of 532 microorganisms from 503 blood samples, including polymicrobial samples from small volume of BC. Monomicrobial samples were correctly identified at the species level in 95.22% of cases. All bacteria were identified within the 2–3 h following BC positivity. The largest series consisted of 16 daily consecutive samples. Using a Vacutainer tube containing 1 mL of separation gel and two low-speed centrifugations from no more than 1.5 mL of BC, we observed better separation of bacteria from blood cells and more accurate bacterial identification than is possible with some published procedures which makes it difficult applying these to paediatric blood cultures [16,19,20]. In such an approach, a low level of bacteria and contamination by blood components may alter the stereotypes of bacterial protein spectra, and full adhesion of gel to tube walls is obligatory for good separation and recovery of bacteria. Protein extraction remains obligatory. Some authors have attempted more direct protein extraction, even from low volumes of BC, but have mainly obtained lower correct identification rates at the species level [11,15,21], or have needed more time, e.g. incubation with saponin treatment and with enrichment broth for 12% of BCs [15,21]. Gel separator Vacutainer tubes seem to be a good compromise for rapid and accurate bacterial identification with MS. With respect to other, more rapid, protein extraction protocols, we prefer to spend more time on protein extraction and obtain better bacterial identification from BCs.

As observed earlier, Biotyper sometimes proposes correct identical identifications with scores lower than 1.9 or 1.7, but with identical successive proposals. We decided to take them into account when four successive proposals referred to different strains of a single species. Thus, when four successive proposals with first scores >1.4 were given for BCs, species identification for BCs was never false in this series. The low or varying amounts of bacteria

recovered here may have an impact on the intensity of peaks that may allow adaptation to previous recommendations [21]. In this study, the proposed rules that consider successive proposals with scores between 1.4 and 1.7 allow identification of 5.2% more bacteria.

For polymicrobial samples, mixed proposals of two bacteria may be observed with significant scores (Table 3), but in the case of blood samples, attention will be given to check at the next isolation plate grown for antimicrobial susceptibility, for further bacterial identification if necessary. This may help to validate the initial status of blood samples, if not precluded earlier by Gram staining. In this work, BC did not contain charcoal which was recently referred as less favourable [22]. Those blood samples from adults were systematically cultured in both BAA and BA medium, whereas we included nine BCs from paediatric bottles with only one *P. acnes* unidentified.

Stenotrophomonas maltophilia, which was encountered only in polymicrobial cultures in this work, was not identified. *P. acnes* was another bacterium that was never identified by BioTyper 2.0 during the study period. Since this time, the library of spectra has been improved, and allows such identification. There was no misidentification for *Streptococcus pneumoniae*, but *Streptococcus mitis/oralis* samples were misidentified as *Streptococcus pneumoniae*. This problem, already noted [15,19], is more related to the quality of spectra resulting in difficulty in segregating the three species *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus pneumoniae*. Such identification may be achieved with further plate culture by testing the Optochine sensitivity or bile solubility. Incubation in BAA medium as compared with BA medium significantly improved the quality of spectra and identification of staphylococci, especially *S. aureus* ($p > 0.5$). Spectra from *Staphylococcus* species remain quite scarce as compared with those from other bacteria, such as *Enterobacteriaceae*, and low amount of material may rapidly impact on the quality of identification. In two recent studies, identification of *S. aureus* remained quite poor, with averages of 78% [16] and 76% [11], whereas other authors have reported a better ratio of 90% [21,23] when considering low scores > 1.5 , but not successive proposals. These last authors suggested that bacterial counts should be between 10^7 and 2×10^9 CFU to ensure good identification, whereas lower or greater counts would not be as satisfactory. Ferroni *et al.* [15] used a two-step consideration of proposals, and established a 60% matching defined by their system, which stipulates that the second proposal gives 50% matching at least to confirm species identification; if not, secondary identification of species group, genus, family was considered. Christner *et al.* [21] considered BioTyper scores > 1.5 as being critical for the identification of 8% of the isolates, but without considering polymicrobial samples. Nevertheless, we observed some limits to the identification of coagulase-negative samples with such an approach. Thus,

we propose consideration of a succession of four proposals with first scores >1.4 for BC samples. This means that libraries would have, in turn, to increase each species by at least four representative strains.

In conclusion, we propose protein extraction and consideration of score values of MS BioTyper for up to 90% bacterial identification from whole monomicrobial and polymicrobial BC samples. This rapid identification allows lower costs for laboratories and the use of a single approach to identify a very large panel of bacteria, and will provide better information to clinicians for dedicated antimicrobial therapy, possibly contributing to a decrease in antimicrobial pressure in hospitals.

Acknowledgements

This work was supported with grants from EA4438, Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales. W. Moussaoui is funded by Région Alsace. B. Ludes is thanked for support with MALDI-TOF MS. In memoriam to Pr Y. Prémont. The authors acknowledge Strasbourg University Hospital personnel from the bacteriology blood culture service. We thank Bruker company for their collaboration.

References

- 1 Nolte FS, Williams JM, Jerris RC et al. Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240). *J Clin Microbiol*1993; 31: 552–557.
- 2 Chen JR, Lee SY, Yang BH, Lu JJ. Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive Bact/ALERT blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect*2008; 41: 259–264.
- 3 Lehmann LE, Alvarez J, Hunfeld KP et al. Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit Care Med*2009; 37: 3085–3090.
- 4 Kudo M, Matsuo Y, Nakasendo A et al. Potential clinical benefit of the in situ hybridization method for the diagnosis of sepsis. *J Infect Chemother*2009; 15: 23–26.
- 5 Wilson ML, Weinstein MP. General principles in the laboratory detection of bacteremia and fungemia. *Clin Lab Med*1994; 14: 69–82.
- 6 Shimada J, Hayashi I, Inamatsu T et al. Clinical trial of in-situ hybridization method for the rapid diagnosis of sepsis. *J Infect Chemother*1999; 5: 21–31.
- 7 Muldrew KL. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr*2009; 21: 102–111.
- 8 Keys CJ, Dare DJ, Sutton H et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol*2004; 4: 221–242.

- 9 Mellmann A, Cloud J, Maier Tet al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol*2008; 46: 1946–1954.
- 10 Sauer S, Freiwald A, Maier Tet al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE*2008; 3: e2843.
- 11 La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE*2009; 4: e8041.
- 12 Mellmann A, Binet F, Bizet Cet al. High interlaboratory reproducibility of MALDI-TOF mass spectrometry based species identification of non-fermenting bacteria. *J Clin Microbiol*2009; 47: 3732–3734.
- 13 Honisch C, Chen Y, Mortimer Cet al. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc Natl Acad Sci USA*2007; 104: 10649–10654.
- 14 Jose L, Garcia L, Neubert TA. Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. *J Chromatogr A*2007; 1153: 259–276.
- 15 Ferroni A, Suarez S, Beretti JLet al. Real time identification of bacteria and yeast in positive blood I culture broths by MALDI-TOF-mass spectrometry. *J Clin Microbiol*2010; 48: 1542–1548.
- 16 Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol*2010; 48: 1481–1483.
- 17 Bryan CS. Clinical implications of positive blood cultures. *Clin Microbiol Rev*1989; 2: 329–353.
- 18 Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr*1996; 129: 275–278.
- 19 Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*2010; 48: 444–447.
- 20 Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra Iet al. Direct identification of microorganisms from blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*2010; doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03257.
- 21 Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive I blood culture bottles using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol*2010; 48: 1584–1591.
- 22 Szabados F, Michels M, Kaase M, Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect*2010; doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03229.

Les flacons d'hémoculture représentent une solution complexe avec de multiples protéines non bactériennes isolées du sang du patient et d'agents de croissance. Ces protéines spécifiques modifient le profil bactérien MS obtenu par MALDI-TOF/MS et elles ont un effet néfaste sur la performance de l'algorithme utilisé pour interroger la base de données contenant les profils MS des bactéries. La préparation d'un culot bactérien à partir d'hémocultures positives comprend une étape de centrifugation différentielle pour éliminer les cellules sanguines, une étape de lyse des érythrocytes et une étape de lavage pour supprimer d'autres composants non bactériens. L'application de ce protocole permet une identification de <1 h par rapport à l'identification biochimique.

Dans cet article, nous avons éprouvé l'efficacité d'un nouveau protocole pour l'identification des bactéries dès la positivité des cultures. Ce nouveau protocole avec MALDI-TOF Biotyper, a permis 89,66% d'identifications correctes en une seule étape sur un total de 532 micro-organismes à partir de 503 échantillons de sang, y compris les échantillons polymicrobiens et à partir d'un petit volume. Les échantillons monomicrobiens ont été correctement identifiés au niveau de l'espèce dans 95,22% des cas. Toutes les bactéries ont été identifiées après une positivité de 2-3 hBC. En utilisant un tube Vacutainer muni d'un gel séparateur contenant 1 mL et deux centrifugations à basse vitesse, nous avons observé une meilleure séparation des bactéries à partir des cellules du sang et une identification bactérienne plus précise que ce qui a été réalisé avec certaines procédures publiées [126] [127] [128]. Dans une telle approche, un faible niveau de contamination des bactéries par des composants sanguins peuvent modifier les stéréotypes des spectres protéiques bactériens, ainsi une bonne adhésion de gel sur les parois du tube est obligatoire pour une bonne séparation et une bonne récupération des bactéries. L'extraction des protéines demeure obligatoire. Certains auteurs ont tenté une extraction des protéines plus directe, même avec de faibles volumes d'hémoculture, mais ont surtout obtenu des taux d'identification correcte inférieurs au niveau de l'espèce [129] [130] [131], ou avaient besoin de plus de temps, par exemple une incubation avec un traitement saponine et avec le bouillon d'enrichissement à 12% de BCS [130] [131]. Les tubes Vacutainer muni d'un gel séparateur semblent être un bon compromis pour l'identification bactérienne rapide et précise. En ce qui concerne les protocoles d'extraction de protéines, il est sans doute préférable de passer plus de temps sur l'extraction des protéines et obtenir une meilleure identification des bactéries à partir des BCS.

Les différentes études récemment réalisées en utilisant différents protocoles pour l'identification directe des micro-organismes par MALDI-TOF/MS à partir des hémocultures positives montrent souvent un bon pourcentage d'identification correct (>80%). Ce

pourcentage en général est différent d'une étude à l'autre et cette variation est dûe principalement aux éléments suivants: les protocoles d'extraction utilisés et la nature des microorganismes trouvés dans les échantillons d'hémoculture. Cependant, le protocole ainsi que la considération des 5 propositions d'identifications successives pour la validation d'une identification, utilisés dans notre expérience semble avoir plus d'efficacité concernant les bactéries à Gram positif surtout les *Streptococcus* (89%) et les *Staphylococcus* (95%) par rapport l'ensemble des études faites sur ce sujet. Une seule étude a été réalisée sur la présence des microorganismes eucaryotes dans les échantillons d'hémoculture et leurs identifications par le système MALDI-TOF/MS (Ferreira *et al.*, 2010)[132] . Cette dernière n'a pu identifier qu'un seul germe et cela uniquement au niveau du genre. La raison principale est le nombre relativement faible du (des) microorganismes secondaires qui pourraient être présent dans ce cas de figure (échantillons d'hémoculture), mais aussi la présence de résidus sanguins qui peuvent altérer les performances de la comparaison utilisée par les algorithmes d'identification. Raison pour la quelle Marinache-Patrice *et al.*, 2010[133] ont créé une base de données de référence spécifique aux champignons où ils ont inoculé des flacons d'hémoculture négatifs, différents champignons et levures. Dans notre investigation (résultats non publiés), 18/18 organismes eucaryotes (que des levures) ont été identifiés correctement au niveau de l'espèce dont 3 étaient présents dans des échantillons polymicrobiens. Toutes les études concernant les échantillons polymicrobiens (> 2 microorganismes) s'accordent sur le fait qu'une seule bactérie est souvent identifiable. Cependant, notre méthode concernant un mélange polymicrobien contenant deux bactéries permet dans 90 % des cas une identification correcte des deux germes. Une comparaison entre les résultats obtenus dans les différentes études faites, utilisant le BACTEC (Becton Deckinson), montrent une meilleure performance par rapport aux résultats obtenus à l'aide de Bact/Alert (Biomérieux) (30% avec charbon) et < 8% (sans charbon).

Concernant l'utilisation d'un protocole d'extraction protéique et la méthode dite "Smear", la première reste de loin la meilleure, en évitant ainsi des pics contaminants provenant des éléments sanguins qui génèrent des spectres relativement faibles en termes de richesse en pics et de mauvais résultats d'identification. Ferreira *et al.*, 2010c[132] a montré une performance de plus de 76% utilisant le protocole d'extraction protéique alors que la méthode "smear" a montré 46% d'identifications correctes. Bruker Daltonics a fourni récemment un protocole spécifique concernant l'usage de la MALDI-TOF pour l'identification des bactéries présentes dans les hémocultures positives. Cependant, ce dernier en le comparant à notre protocole utilisé dans l'article publié présente quelques inconvénients vis-vis de son utilisation. Sa complexité est largement comparable à notre protocole et les différentes étapes le rendent

beaucoup plus lourd en terme de rapidité, pour une efficacité d'identification annoncée n'excédant pas 85%.

La spectrométrie de masse type MALDI-TOF

&

Le typage bactérien

Le typage bactérien et l'identification à l'échelle de sous-espèce

Outils de typage & Biomarqueurs

Les Corynébactéries

Les Vibrio sp

La discrimination des Shigella sp et E. coli

Les Staphylococcus aureus

3.1. Épidémiologie moléculaire

Outre la mise au point de techniques sensibles et rapides de dépistage et d'identification des bactéries, les techniques d'analyse des acides nucléiques ont permis des avancées spectaculaires en épidémiologie moléculaire. En effet, des techniques phénotypiques telles que les profils de caractères biochimiques, la sérotypie, la lysotypie et la détermination du profil de résistance aux antibiotiques sont parfois insuffisantes pour caractériser une même espèce bactérienne incriminée chez des patients différents dans un processus épidémique. Des mutations parfois minimes, mais critiques ne peuvent être révélées par l'analyse phénotypique classique.

De nombreuses techniques d'analyse génétique sont disponibles et ne cessent d'évoluer, depuis l'identification des plasmides contenus dans la cellule bactérienne jusqu'au séquençage de gènes spécifiques, chromosomiques ou plasmidiques, qui peuvent ensuite être comparés à des séquences référencées dans des banques de données internationales.

L'analyse du contenu plasmidique implique l'extraction de l'ADN total et la séparation de l'ADN plasmidique de l'ADN chromosomique grâce à la relative résistance de l'ADN circulaire des plasmides à la dénaturation par la chaleur ou le pH alcalin. La migration des ADN plasmidiques, en gel d'électrophorèse, selon leur taille et leur conformation moléculaire, permet d'établir un profil type pour chaque souche bactérienne et parfois d'identifier des plasmides codant pour des caractères de résistance aux antibiotiques, des toxines, des facteurs d'adhésion des bactéries aux constituants des cellules de l'hôte, ou des plasmides cryptiques (dont le produit des gènes est inconnu).

L'empreinte génétique chromosomique et/ou plasmidique, après coupure de fragments d'ADN par des endonucléases de restriction spécifiques de séquences génomiques, déjà évoquée plus haut, offre des profils typiques pour chaque clone dont on peut ensuite identifier chaque fragment par hybridation selon Southern. L'utilisation d'endonucléases de restriction, ayant de rares sites de coupure sur le génome d'une espèce donnée, permet d'obtenir des fragments d'ADN de grande taille qu'une endonuclease classique, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) permet aisément de visualiser et de comparer d'une souche à l'autre.

Le *ribotyping* fait appel à la caractérisation des gènes de l'ARN ribosomal 16S représentés à l'état de trois à cinq copies par génome bactérien et qui sont hautement conservés au sein du monde bactérien. Le ribotyping permet de discerner très finement des différences entre deux clones d'une même espèce bactérienne et contribue, grâce à l'amplification génique par PCR, d'identifier de nouveaux agents pathogènes non caractérisés à ce jour par les techniques de culture et d'identification phénotypique.

La bactériologie moléculaire a donc bouleversé les méthodes centenaires de la microbiologie. À tel point qu'il se développe parfois des querelles des « anciens et des modernes » sur le choix des techniques de diagnostic et de typage opposant les partisans des méthodes classiques de culture et d'identification phénotypique aux partisans du « tout moléculaire ». La considération des avantages et limites réciproques permet en fait de retenir le principe de l'utilisation de ces deux approches, qui sont synergiques. Du fait d'abord de leur coût éventuellement très important, mais aussi de la complexité des protocoles, ces techniques de biologie moléculaire ont leurs limites et constituent un challenge surtout au niveau financier pour les laboratoires des organismes de santé.

3.2. La spectrométrie de masse sur les protéines bactériennes et l'épidémiologie : rêve ou réalité

La genèse des spectres de masse des protéines bactériennes dans des conditions bien établies est remarquablement reproductible. BioTyper™ 2.0 effectue l'identification sur l'ensemble des pics compris entre 3000 et 15000 Da en intégrant tous les pics dont les aires varient d'un facteur de 1 à 1000. La construction des dendrogrammes de comparaison est basée sur les scores de similarité. De plus, une analyse à variation multiple basée sur l'analyse des composants principaux (PCA) est possible (voir matériel et méthode). En outre, le logiciel offre l'utilisation de l'indice de corrélation des composants qui est une méthode statistique pour l'analyse des relations entre les spectres et équivaut à un paramètre de distance entre ces derniers[4] .

MALDI-TOF/MS permet l'identification des microorganismes au niveau des espèces et parfois à la sous-espèce, mais plusieurs études ont montré que les exigences pour MALDI-TOF/MS dans le typage microbien sont dépendamment différentes et plus complexes que celles requises pour l'identification microbienne dans la routine. C'est un défi pour les laboratoires cliniques qui veulent utiliser MALDI-TOF/MS comme outil de typage des souches dans la routine pour une meilleure réactivité dans le suivi des souches nosocomiales et multirésistantes. Relativement peu de biomarqueurs (5-10 pics) sont généralement nécessaires pour l'identification des isolats microbiens au niveau des espèces, alors qu'un plus grand nombre de pics reproductibles est nécessaire pour l'identification des sous-espèces[134] . Beaucoup d'études citées dans ce manuscrit utilisant la procédure de MALDI-TOF/MS ne pouvaient pas identifier directement les entités taxonomiques, comme l'espèce ou la sous-espèce avec une précision proche de 100%, sans l'aide de méthodes basées sur l'ADN. Le typage microbien et donc la caractérisation microbienne au niveau des sous-

espèces nécessitent différents protocoles de préparation des échantillons et des procédures analytiques différentes[135] .

Pour le typage de souches et l'identification de sous-espèces bactériennes, une optimisation rigoureuse du nombre de dépôts ainsi que des paramètres logarithmiques pour l'obtention de spectres de masse reproductibles même pour les pics mineurs semble être cruciale. Le défi est d'obtenir un nombre suffisant de marqueurs reproductibles avec des spécificités de l'espèce[134] [135] [136] . Dans cette application, les paramètres suivants ont leur importance : la procédure de préparation des échantillons (bactéries entières ou d'extraction de protéines), la concentration en protéines, le type de matrice, l'échantillon (ratio de la matrice, la concentration d'acide (TFA) ajoutée à la matrice), et le milieu de croissance sont des exemples de paramètres techniques qui peuvent avoir une influence significative sur le spectre MALDI-TOF/MS[134] [137] .

3.3. Discrimination des sous espèces du genre *Corynebacterium*

Le classement des 146 souches de *Corynebacterium* ou apparentées a été réalisé avec Biotyper™1.1, puis a été comparé aux dendrogrammes obtenus sur des bases phylogénétiques avec d'autres souches. Afin de produire un dendrogramme pertinent basé sur les spectres de masse, nous en avons édité plusieurs types. Cette fois, ce n'est plus le nombre de pics considérés que nous avons fait varier. Nous avons considéré les 100 premiers pics, et nous avons basé des dendrogrammes édités sur 33, 40 ou 60 noeuds d'embranchements. Le chiffre 33 correspond au nombre d'espèces de Corynébactéries, de leur sous-espèces, et de ribotypes différents pour *C. diphtheriae*.

A 33 nœuds (Figure 33), nous obtenons une bonne différenciation d'espèce par la spectrométrie de masse et BioTyper™1.1 comparée à celle des arbres phylogénétiques de distinction d'espèces construits par les séquences d'ARN 16S et le gène *rpoB* (Figure 35). Nous distinguons également trois des quatre sous-groupes de *C. jeikeium*. Seuls des représentants de l'espèce *C. propinquum* sont positionnés à différents niveaux du dendrogramme, ce qui se répétera pour les dendrogrammes à 40 ou 60 nœuds (Figure 33&Figure 34), mais en restant proches de *C. pseudodiphthericum* ou de *C. ulcerans* alors que les arbres phylogénétiques les placent toujours proches de *C. pseudodiphthericum*. A 40 noeuds, on observe l'éloignement de certaines espèces comme *C. argentoratense* qui était groupée avec *C. striatum* dans le dendrogramme à 33 noeuds alors que dans le dendrogramme à 40 noeuds elle occupe une seule branche et *C. striatum* se répartit en deux branches, le groupe non identifié CDC G1 reste isolé.

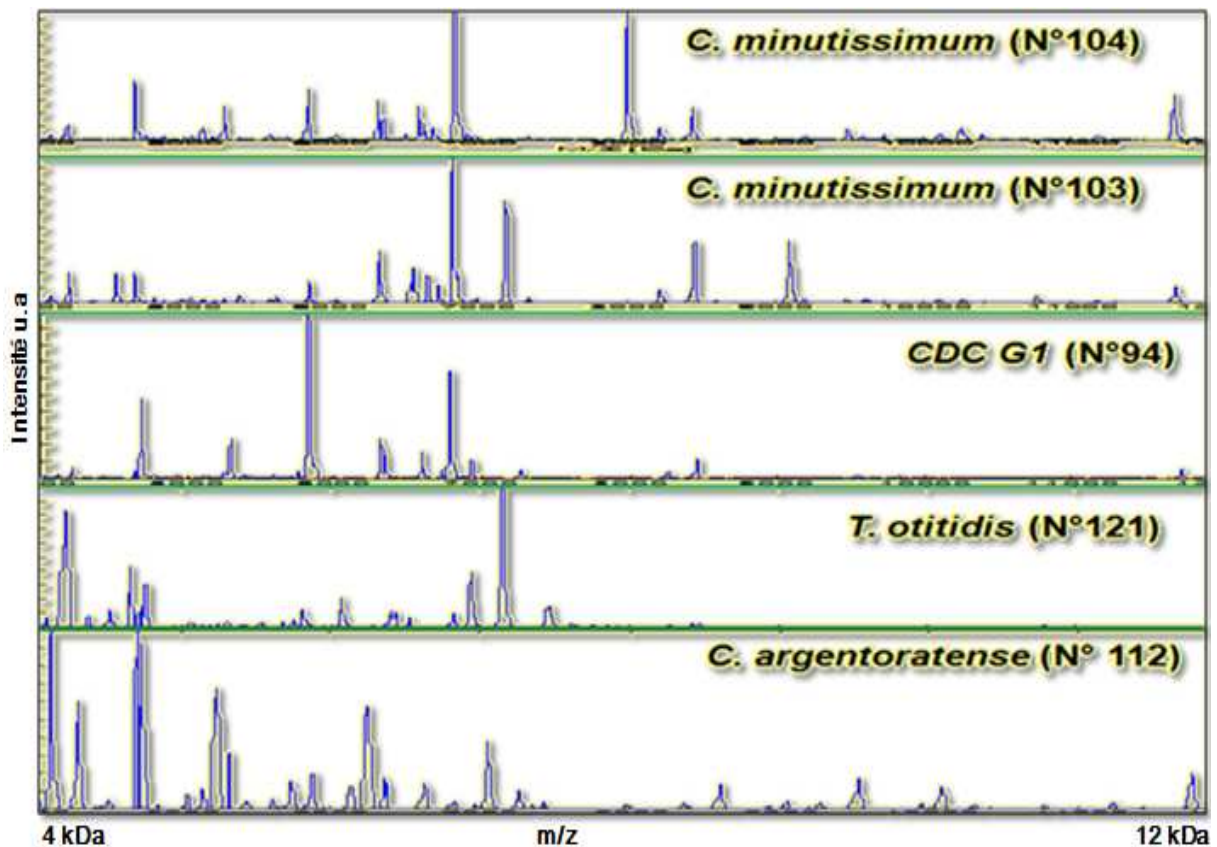


Figure 31 : Différents profils de différentes espèces de *Corynebacterium*

A 60 noeuds, les 4 groupes biochimiques de *C. jeikeium* sont bien différenciés tandis que les différentes souches d'espèces telles que *C. striatum*, *C. argentoratense*, *C. amycolatum* et *C. minutissimum* se différencient aussi (Figure 34). On peut naturellement aussi observer les différences entre les profils des différentes espèces (Figure 31). Ces dernières figures montrent les différences entre les spectres que ce soit au niveau du nombre total de pics ou au niveau de l'intensité de ces derniers. De plus, il est possible d'observer des différences entre les profils de souches très proches, tels que ceux provenant de l'espèce *C. striatum*, ou de souches éloignées, tels que ceux issus de l'analyse de l'espèce *C. minutissimum*. Le dendrogramme de la Figure 36, représente les différentes espèces utilisées pour la construction de la base de données.

Remarque: les paramètres ici utilisés pour la construction des dendrogrammes de classification (année 2008) sont différents de ceux utilisés en 2011. (Voir ANNEXEII).

ANNEXE II

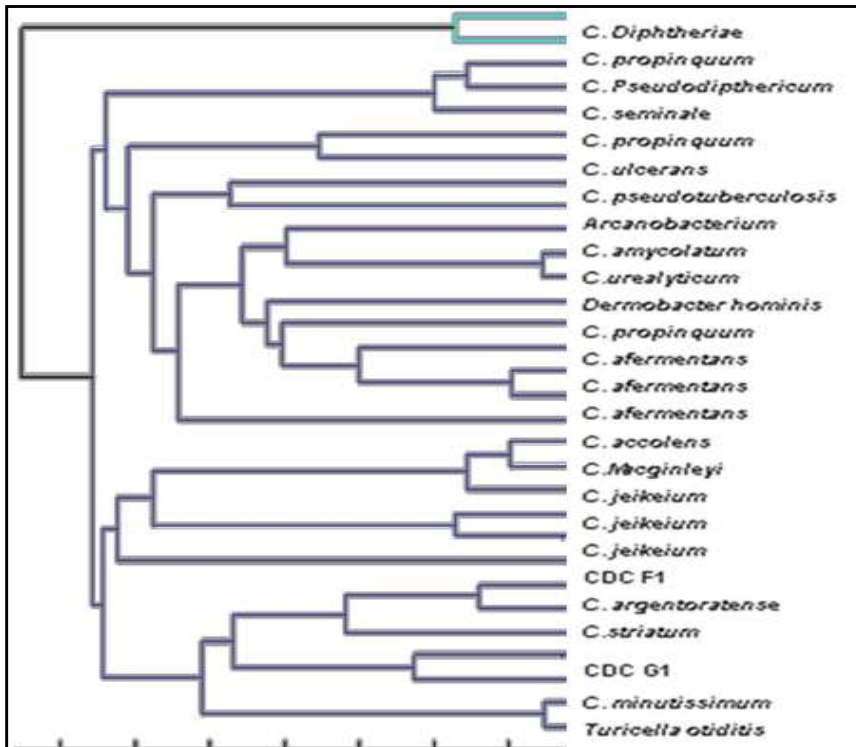


Figure 32 : Dendrogramme de classification de 146 souches du genre *Corynebacterium*, réalisé par le Biotyper™ 1.1 avec 33 branches

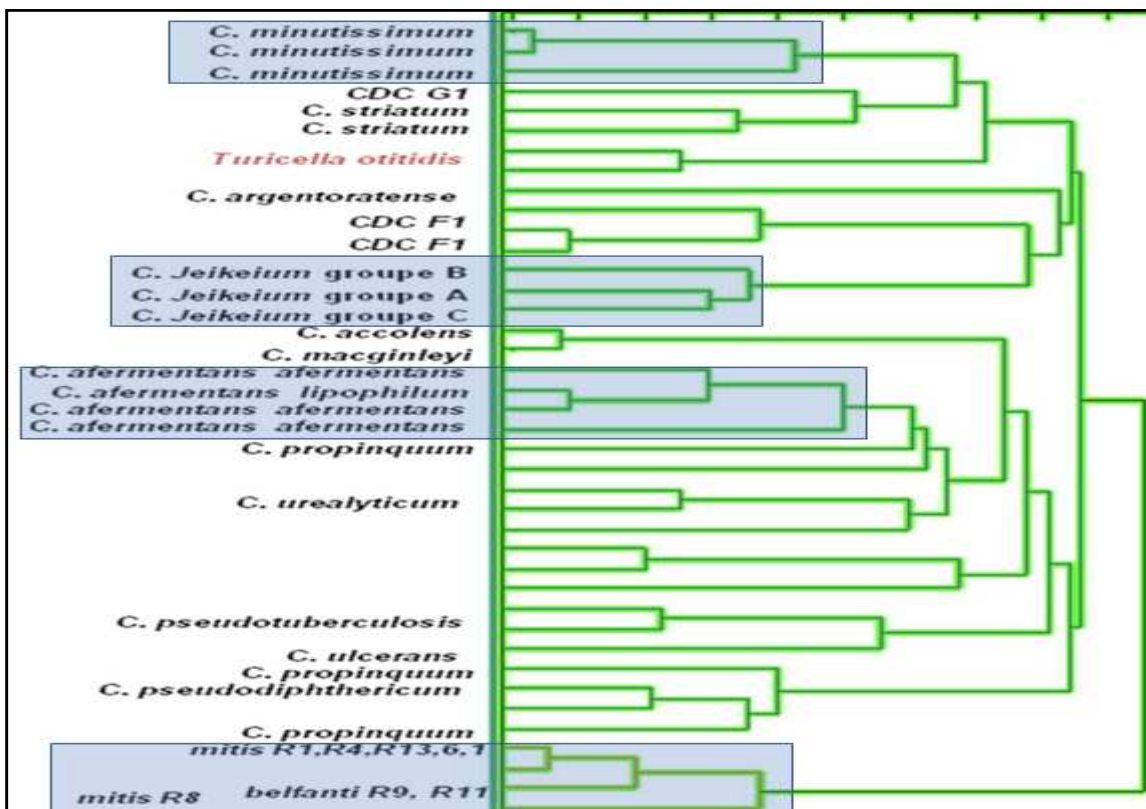


Figure 33: Dendrogramme de classification de 146 souches du genre *Corynebacterium*, réalisé par le Biotyper™ 1.1 avec 40 branches

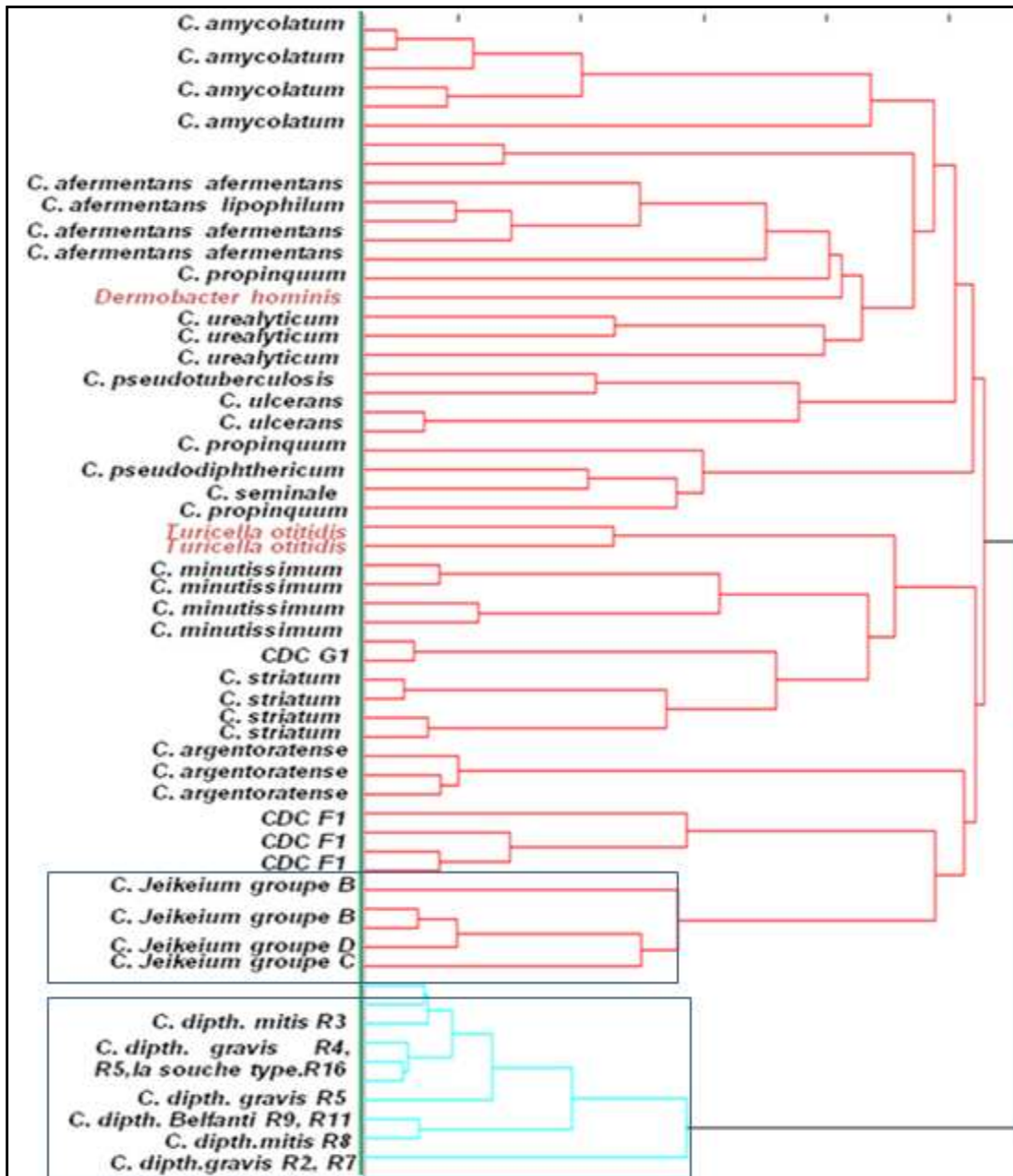


Figure 34 :Dendrogramme de classification à 60 branches de 146 souches bactériennes du genre *Corynebacterium* établi par le Biotyper™1.1 de Bruker Daltonics

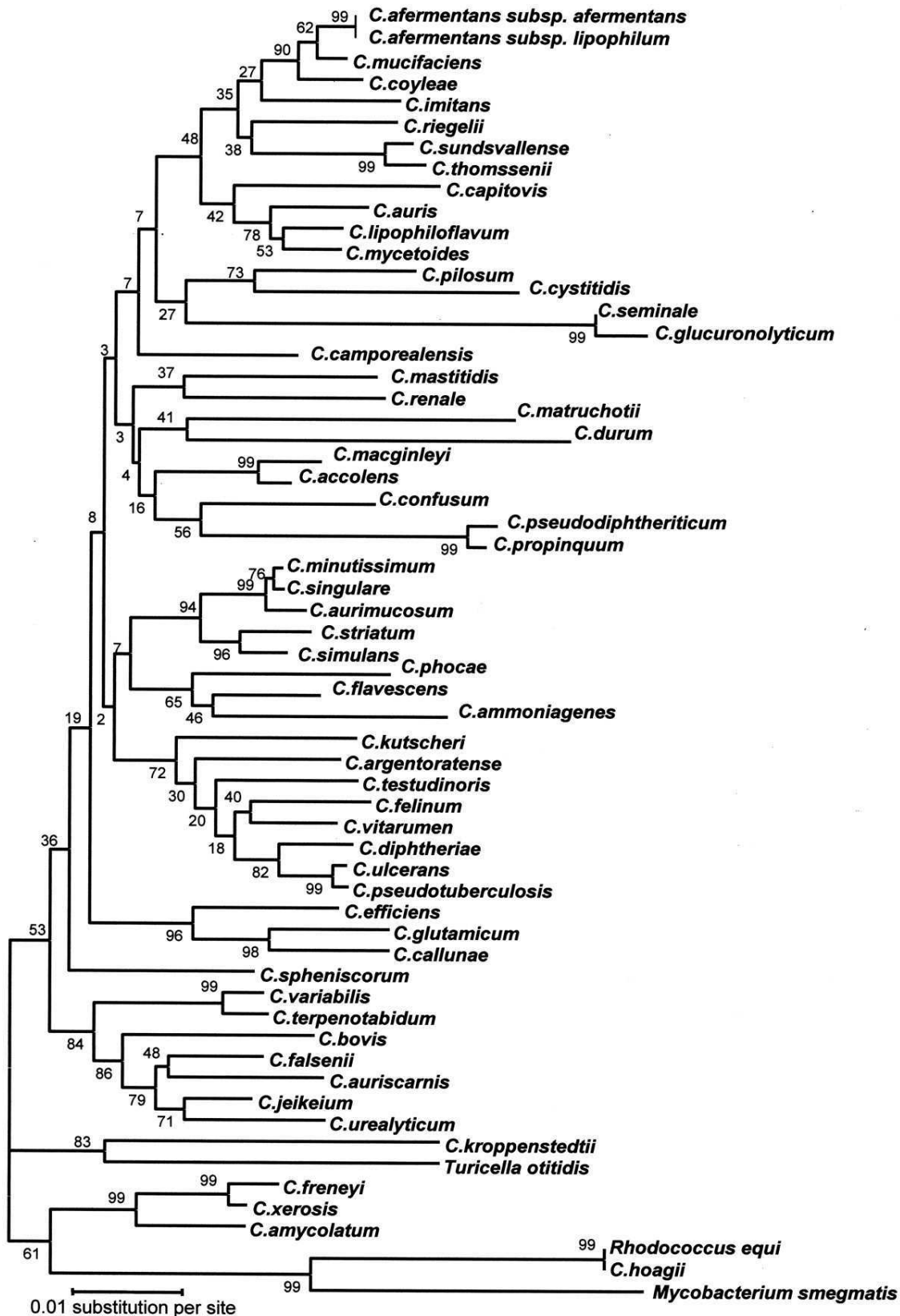


Figure 35: Arbre phylogénétique de 61 espèces appartenant au genre *Corynebacterium*, par la comparaison des séquences de l'ADNr 16S.

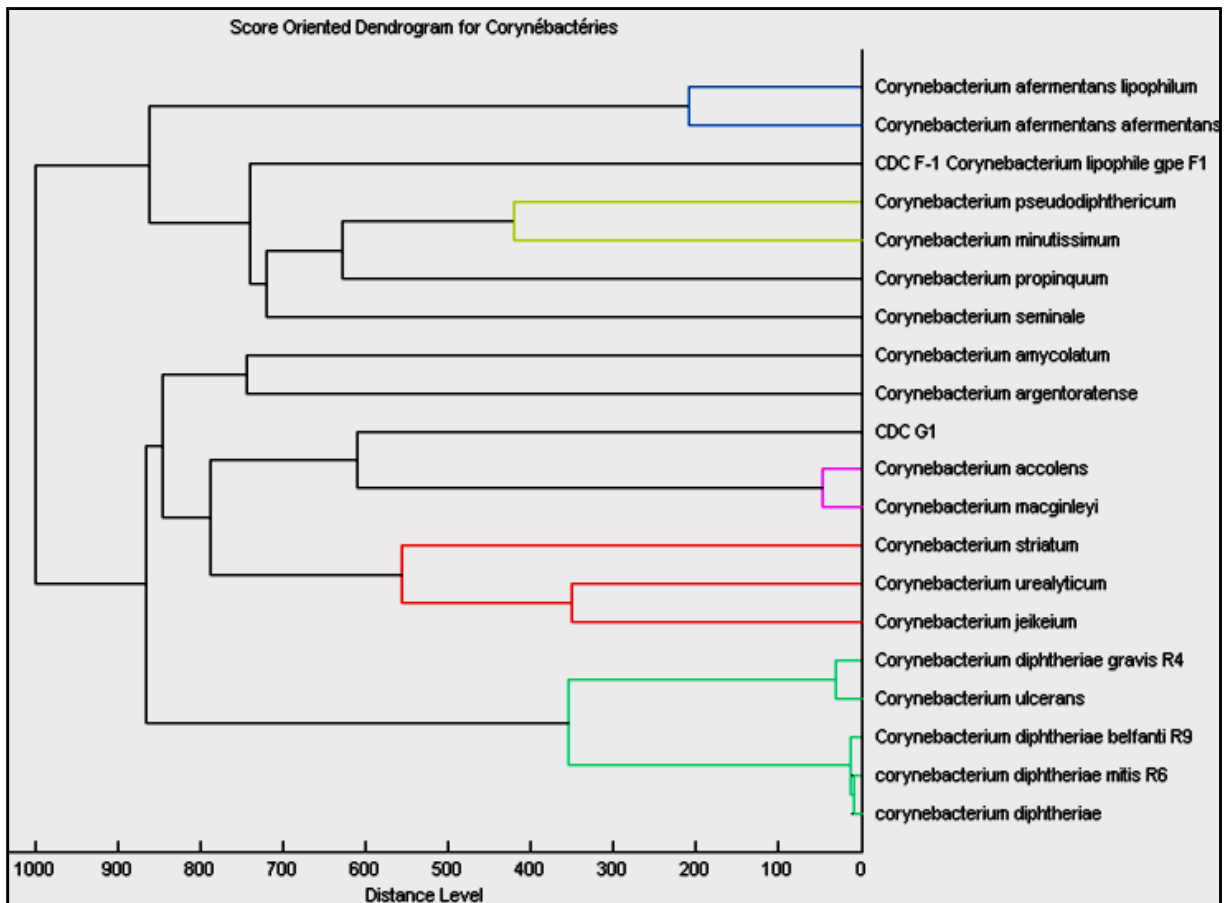


Figure 36: Dendrogramme de toutes les souches du genre *Corynebacterium* réalisé par le Biotyper™ 1.1 et une banque de données provisoire réalisée par le laboratoire.

3.4. Possibilités offertes par Biotyper™1.1 dans le typage des bactéries à Gram négatif comme à Gram positif

Une variété d'algorithmes et de visualisations de clustering sont accessibles. Comme décrit au-dessus, pour une prise de considération des pics, et si l'on fixe une échelle de distance entre espèces d'un même genre de 0 à 1, on peut observer que des espèces différentes se positionnent, par les analyses BioTyper à des distances supérieures à 0,3. Dans l'application citée, une distinction des sous-espèces est également envisageable. Les fonctionnalités du logiciel permettent non seulement d'établir des dendrogrammes mais aussi des séparations dans deux ou trois dimensions où PC1, PC2 et PC3 représentent des distances paramétriques reconstituées dans l'espace (Figure 37).

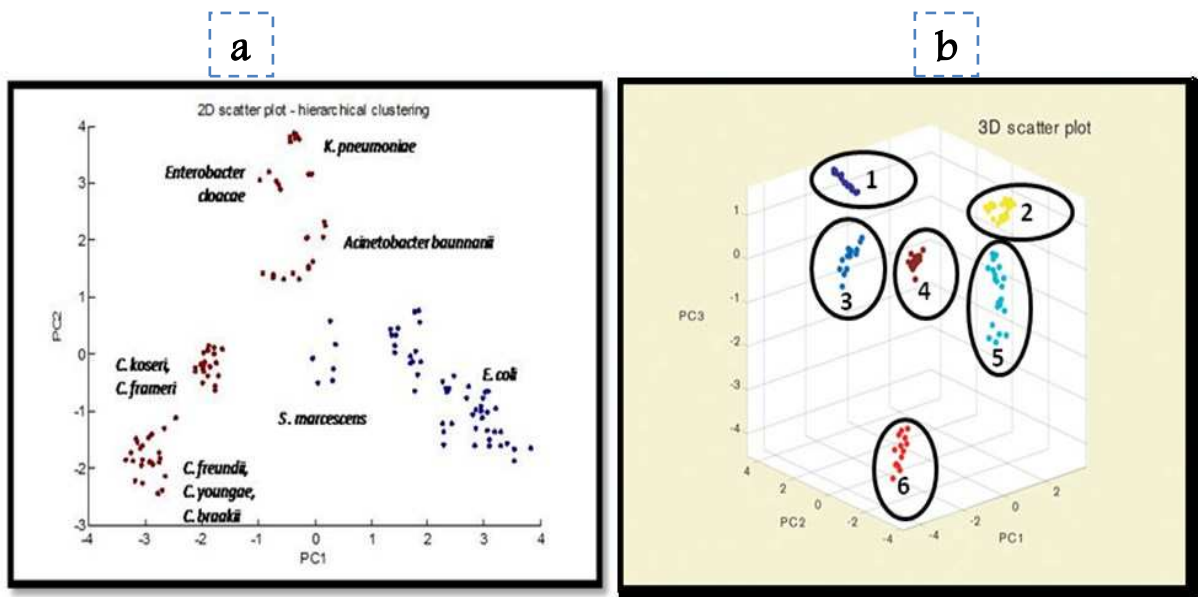


Figure 37: **a** : Une distribution à deux dimensions de spectres de différentes souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* : *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter youngae*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter farmeri* et *Escherichia coli*. **b** : « 3D scatter plot scores » des 3 principaux composants pour 6 espèces individuelles du genre *Pseudomonas*, soit *P. oleovorans*, *P. fluorescens*, *P. putida* DSM291, *P. mendocina*, *P. putida* souche B401, *P. veronii*.

L'échelle de prise en considération peut être amplifiée de 1 à 250 (ou 0,004 à 1), la sensibilité de classification devient plus importante sans qu'il y ait d'influence du bruit de fond. Dès lors, les approches de typage des souches bactériennes, à partir des données spectrales acquises pour l'identification sont accessibles. Ainsi, en s'intéressant à un groupe de 31 souches d'*Escherichia coli* - Céfolaximase + qui n'avaient pas été différenciées par d'autres méthodes, nous avons pu distinguer deux groupes de souches dont les distances sont plus de 30% de l'échelle arbitraire appliquée et de nouvelles dichotomies apparaissent dans ces sous-groupes (Figure 38). La signification de ces derniers devrait être alors raccordée à des éléments tant moléculaires que chimiques. Une autre illustration est issue de l'enquête sur *Staphylococcus aureus* isolé des hémocultures dans deux services différents des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.



Figure 38 :Dendrogramme de classification des 31 souches d'*E. coli*/BLSE productrices d'une Cefotaximase, réalisé par le Biotyper™1.1. Les souches, ont été cultivées sur gélose au sang pendant 24h à 37°C puis stocké à -20°C pendant 2 semaines avant de passer à l'analyse par MALDI-TOF/MS.

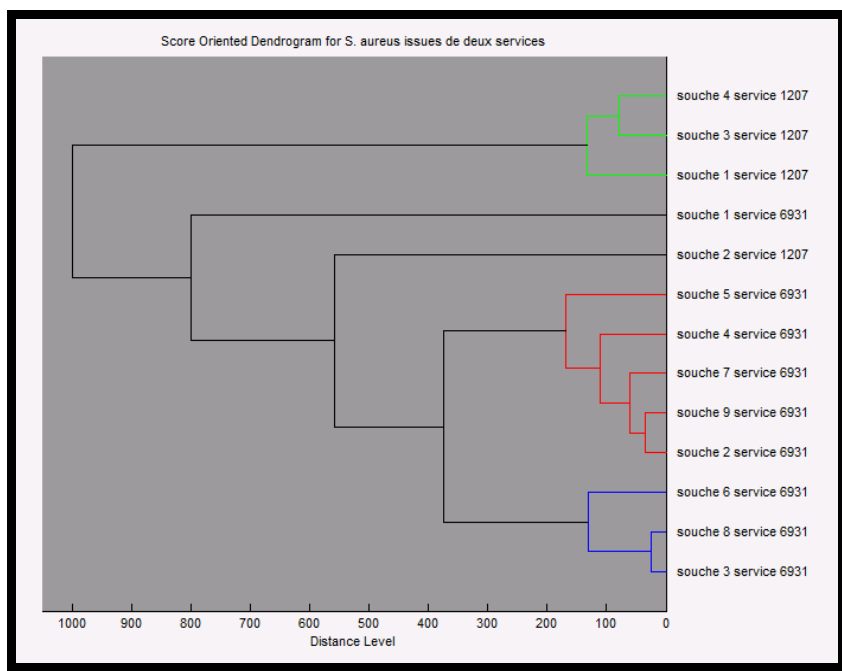


Figure 39 : Classification de quelques souches de *Staphylococcus aureus* isolées de deux services de médecine hospitalière provenant d'hémocultures positives.

Sur les 13 souches concernées, une différenciation est possible en 5 branches de dendrogramme d'une dichotomie supérieure à 0,2/1. Par contre, deux groupes de 5 et 3 souches se situent dans une dichotomie inférieure à 0,2/1, et posent à nouveau la question des relations clonales permettant d'assembler ou distinguer les souches (Figure 39).

3.5. ARTICLE 3 : Les vibrio « comparaison entre l'électrophorèse en champs pulsé et la MALDI-TOF ».

Vibrio cholerae est un pathogène de la flore intestinale qui provoque une diarrhée aiguë connue principalement par le nom de choléra. Diarrhée endémique répandue dans de nombreuses parties du monde, en particulier dans les pays en voie de développement. *V. cholerae* a été isolé dans différents milieux aquatiques, surtout marins, baies, estuaires et autres eaux saumâtres[138] . On sait très peu sur la présence et la survie de *V. cholerae* non-O1 dans les boues d'épuration. Ces organismes habituellement sont responsables de cas sporadiques, de diarrhées et rarement d'épisodes épidémiques. Leur intérêt n'a cessé de croître depuis que *V. cholerae* non O1 a causé une maladie de type choléra-like et s'est ensuite propagée sous une forme épidémique[139] .

Les techniques moléculaires telles que l'hybridation ADN-ADN, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), le séquençage d'ADNr 16S et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) sont plus discriminants et informatives pour la mesure des liens de parenté. La diversité peut être utilisée avec profit pour retracer les sources épidémiologiques[140] .

La MALDI-TOF/MS des micro-organismes intacts a révélé des empreintes de masses spectrales caractéristiques des fractions désorbées de la surface cellulaire[2] [141] [142] . Ainsi, cette information a pu être utilisée pour l'identification rapide des espèces à Gram négatif et à Gram positif, et aussi pour différencier les souches d'une seule espèce[2] [143][144] . Avec le développement rapide et l'amélioration de cette technique au cours de la dernière décennie, ces méthodes ont été utilisées de façon intensive pour rechercher des biomarqueurs capables de différencier les sous-espèces, ainsi que les isolats[2] [145][146] .

Dans cette étude, un total de 21 isolats de *Vibrio cholerae* non-O1 ont été récoltés à partir de trois usines de traitement des eaux usées à Agadir, Maroc. Les isolats ont été analysés par analyse biochimique, l'antibiogramme, l'électrophorèse en champ pulsé et les profils MALDI-TOF MS ont été comparées. Plus de 67% des isolats étaient sensibles aux agents antimicrobiens testés et 14% se sont avérés résistants à l'acide nalidixique et au triméthoprime-sulfaméthoxazole.

L'électrophorèse en champ pulsé (digestion *NotI*) a révélé que les souches *V. cholerae* non-O1 ont un niveau inférieur d'homogénéité génétique, les profils de restriction des ADN chromosomiques entiers regroupent les isolats des *V. cholerae* O1 et *V. alginolyticus* dans un cluster distinct de *V. metschnikovii* et *V. cholerae* non-O1. Par ailleurs, pour un gain supplémentaire de précision analytique et de fiabilité dans l'analyse, nous avons utilisé des dendrogrammes générés par le Biotyper 1.1™ basés sur des profils spectraux MALDI-TOF des isolats. Toutes les signatures m / z de toutes les souches testées indiquent que les données des spectres de masse contenaient des renseignements suffisants pour distinguer les souches de *V. cholerae*.

Occurrence of *Vibrio cholerae* non-O1 in three wastewater treatment plants in Agadir (Morocco)

Rkia Eddabra¹, Wardi Moussaoui², Gilles Prévost², François Delalande³, Alain Van Dorsselaer⁵, Olivier Meunier⁴, Jean-Michel Scheffel² and Rachida Mimouni¹

(1) Laboratoire des Systèmes Aquatiques: Milieu Marin et Continental, Equipe: Ecotoxicologie et Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, B.P. 8106, Agadir, Morocco

(2) UPRES EA-4438, Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine, Université Louis Pasteur, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

(3) INSERM U682, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, Université de Strasbourg, 67200 Strasbourg, France

(4) Laboratoire d'Hygiène Hospitalière, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France

(5) Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, IPHC-DSA, ULP, CNRS, UMR7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

Received: 11 May 2010. Accepted: 27 August 2010 Published online: 10 September 2010

World J Microb Biot, 2011, 27(5):1099-1108.

Abstract

A total of 21 isolates of *Vibrio cholerae* non-O1 strains were isolated from three wastewater treatment plants in Agadir, Morocco. The isolates were analyzed by biochemical analysis, antibiogram, pulsed-field gel electrophoresis and the MALDI-TOF patterns of their protein masses were compared. Over 67% of isolates were susceptible to antimicrobial agents tested and 14% proved resistant to both trimethoprim-sulfamethoxazole and nalidixic acid. Typing by pulsed-field gel electrophoresis with *NotI* digestion revealed that the *V. cholerae* non-O1 strains from Agadir (Morocco) have a lower level of genetic homogeneity, the restriction patterns of whole-chromosomal DNA grouped the *V. cholerae* O1 and *V. alginolyticus* strains into a separate cluster from *V. metschnikovii* and *V. cholerae* non-O1 isolates. Furthermore, to gain additional analytical accuracy and reliability in the analysis we used dendrogram based on MALDI-TOF spectral patterns generated by the BioTyper 1.1™ software. All *m/z* signatures of all strains tested indicate that the mass spectral data contained sufficient information to distinguish between strains of *V. cholerae*.

Keywords MALDI-TOF – Pulsed-field gel electrophoresis – *Vibrio cholerae* – Wastewater

Introduction

Municipal wastewater contains a variety of pathogenic microorganisms and high content of organic matter (Amahmid et al. [2002](#); Mimouni et al. [2006](#)). Therefore, it may induce a number of potential risks for public health and environment (Sharma et al. [1998](#); Godfree and Farrell [2005](#); Shannon et al. [2007](#)). Bacterial pathogens in sewage include many species (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Vibrio*, and pathogenic *Escherichia coli* (Gerba and Smith [2005](#); Aström et al. [2006](#)).

Vibrio cholerae is an intestinal pathogen that causes severe watery diarrhea known as cholera. The pathogen is a noninvasive, gram-negative bacterium responsible for severe epidemics of cholera and endemic diarrhea in many parts of the world, especially in developing countries. *V. cholerae* has been isolated in different aquatic environments, especially marine, bays, estuaries, and other brackish waters (Colwell and Spira [1992](#)). But very little is known about the occurrence and survival of *V. cholerae* non-O1 in sewage sludge. The scientific interest in *V. cholerae* non-O1 strains, the organisms usually responsible for sporadic cases and rarely for small epidemic episodes, has been growing since *V. cholerae* O139 caused a cholera-like disease and then spread in an epidemic form (Filetici et al. [1997](#)).

Recently, the development of modern molecular techniques by analyzing biological material have increased and was applied to the detection, identification and enumeration of bacterial

strains in water, food, clinical and environmental samples (Gilbride et al. [2006](#)). Molecular techniques such as DNA-DNA hybridization, restriction fragment length polymorphism (RFLP), 16S rDNA gene sequencing and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) are more discriminating and informative for measuring strain relatedness, diversity and can profitably be used to trace epidemiological sources (Sur et al. [2007](#)). With the rapid development and improvement of mass spectrometry during the last decade, these methods have been used expansively to profile bacterial proteins from cell extracts and intact cells (Ryzhov and Fenselau [2001](#); Claydon et al. [1996](#); Honisch et al. [2007](#)). MALDI-TOF MS of intact microorganisms has been shown to produce characteristic mass spectral fingerprints of moieties desorbed from the cell surface (Claydon et al. [1996](#); Bright et al. [2002](#); Keys et al. [2004](#)), allowing this information to be used for rapid identification of Gram-negative and Gram-positive species and even differentiate between strains of a single species (Claydon et al. [1996](#); Hazen et al. [2009](#); Dieckmann et al. [2010](#)).

We aimed to better know about efficiency of municipal wastewater treatment plants regarding the retention of *Vibrio* strains, and studied its presence during treatment by infiltration percolation system of Agadir, a country currently facing increasing pressure of water pollution from both domestic and industrial wastewater. As part of our study on microbial pathogens in wastewater, we isolated some *Vibrio* pathogens (Eddabra et al. [2010](#)), and in this paper, we report the antibiotic susceptibility of the *V. cholerae* isolates as well as their pulsed field gel electrophoresis patterns. Finally, we tested the ability of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to characterize and discriminate between *V. cholerae* strains isolated in wastewater samples.

Materials and methods

Wastewater samples

Samples were obtained from three municipal wastewater treatment plants (WWTPs) located in the Agadir city (Morocco). The following WWTPs by infiltration percolation, having very different capacities were sampled: Ben Sergao (750 m³/day or 10,000 population equivalent), Drarga (1,000 m³/day) and MZar (54,000 m³/day). Wastewater samples were analyzed over 6 months (sampling each 15 days: from January to June 2007). They were collected at distinct points throughout the treatment process, from raw sewage (RW) at entry to the treatment plant, from primary effluent after decantation (DW), and from treated wastewater (TW) after infiltration in sand. A total of 108 wastewater samples were collected from the WWTPs (for each WWTP: 12 samples coming from RW, 12 from DW and 12 from TW). All samples were collected in sterile 1L bottles, kept at 4°C and analyzed within 4 h.

Isolation of *Vibrio* strains

A wastewater sample of 50 mL was inoculated into 450 mL of double strength alkaline peptone water (APW, Difco) for a pre-enrichment, incubated for 6 h at 37°C; then 1 mL of this pre-enrichment was inoculated into 10 mL of simple alkaline peptone water (pH 8.6) and incubated at 37°C for 18 h (Colwell and Kaper 1977). Culture of 0.1 mL taken from the surface in each enrichment tube was then incubated at 37°C for 24 h onto a selective medium of thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar, TCBS (Thio-sulfate-citrate-bile salts-sucrose, Difco), and subsequently, *Vibrio* colonies were selected for their morphological characteristics. Isolates obtained from the preliminary selection were tested with the following screening tests: Kligler iron agar tubes/slants, oxidase, indole.

Identification of strains by VITEK 2 system (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France)

A bacterial suspension was adjusted to a McFarland standard of 0.55–0.62 in 2.5 mL of a 0.45% (wt/vol) sodium chloride solution. Vitek 2 GN® card contains 47 biochemical tests. The GN is a fully closed system to which no reagents needs to be added. The card was put on the cassette designed for Vitek 2, placed in the instrument, automatically filled in a vacuum chamber, sealed, incubated at 35.5°C, and automatically subjected to a colorimetric measurement by use of a new optical reading head every 15 min for a maximum incubation period of 10 h. The Vitek 2 GN® card was used with Vitek 2 system, version VT2-XL 135P.

Determination of serotyping and cholera toxin

The *Vibrio cholerae* strains isolated in the 3 wastewater treatment plants located in the Agadir city (Morocco) were confirmed serologically using a slide agglutination test with specific polyvalent antiserum to *V. cholerae* O1 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette-France). Bacteria were cultured in CAYE medium, and the titers of cholera toxin (CT) were determined by reversed passive latex agglutination (RPLA) according to manufacturer’s recommendations (Oxoid toxin, detection kit VET-RPLA).

Antimicrobial susceptibility testing

All the isolates of *Vibrio cholerae* were preliminarily examined for their susceptibility to twenty antimicrobials (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette-France), using the disk diffusion method as set by the French Society for Microbiology (FSM). Concentrations of antibiotics on disks used were in accordance with the breakpoints defined by the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (AC-FSM), which are normally used for the clinical categorization of human bacterial pathogens (Soussy 2005). The same antimicrobial agents were tested for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by automatic testing, using the VITEK 2 AST-N051® cards (BioMérieux). The following antimicrobials were included in the study: amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, cefalotin, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, ciprofloxacin, fosfomicin, gentamicin, nalidixic acid, nitrofurantoin, norfloxacin, ofloxacin, piperacillin/tazobactam, ticarcillin, tobramycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

For the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) study, 25 *Vibrio* strains were analyzed. They included 21 strains of the non-O1 *Vibrio cholerae* isolated in wastewater samples and four strains representing a species other than non-O1 *V. cholerae*, one strain of *Vibrio alginolyticus*, one strain of *Vibrio metschnikovii* and one clinical isolate of *Vibrio cholerae* O1. PFGE analysis was performed with Genepath® Group 3 Reagent Kit according to manufacturer's instructions (Bio-Rad Diagnostic, Ivry sur Seine, France). Briefly, 100 µL of bacterial suspension were centrifuged, and resuspended in the buffer provided by the kit. Agarose plugs were prepared by mixing equal volumes of bacterial suspensions with 1% (wt/vol) low-melting-point agarose (Bio-Rad). Cells in the agarose plugs were lysed by lysis solution and incubated 1 h at 37°C. Then cells were treated with proteinase K solution and incubated 18 h at 50°C. The genomic DNA embedded within agarose plugs was digested with *NotI* restriction endonucleases. A DNA size standard (bacteriophage λ ladder; Bio-Rad) was used as a molecular size marker. Pulsed field gel electrophoresis migration is performed using the program "13" pre-recorded in the monitoring module of the Bio-Rad apparatus, set for 6.0 V/cm at a temperature of 15°C for 18 h with a 1–15 s linear ramp pulse time and with 50 µM thiourea added to running buffer. Gels were stained by immersion in ethidium bromide solution and photographed under UV illumination. Computer-assisted analysis of the PFGE banding pattern was performed using Fingerprinting II™ software (Bio-Rad Laboratories). Digitized images of the gel were converted, normalized by aligning the size standards located in the outer lanes of the gel with the reference standard for the database. Analysis of the banding patterns was performed with the Dice coefficient using 1% tolerance for the band migration distance. Hierarchical cluster analysis was performed by the unweighted pair group method by arithmetic average, and a dendrogram was produced with the software.

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis (MALDI-TOF MS)

Bacterial strains: *V. cholerae* non-O1 strains were sampled from colonies grown on Columbia blood agar (BioMérieux Marcy l'Etoile-France). A single colony of each isolate was suspended in 1 mL sterile deionised water, washed and centrifuged (5,000×g for 2 min). *Inactivation of bacteria:* The bacteria were suspended in 300 µL water and inactivated by the addition of 900 µl ethanol at room temperature. The samples could be stored at room temperature for several days or at 4–8°C for several weeks (Moussaoui et al. [2009](#)). *Abundant Proteins extraction:* This step was performed at room temperature. Suspension of inactivated bacteria was centrifuged at 5,000×g for 2 min and the supernatant was discarded. Another centrifugation was performed in certain cases for 2 min at 5,000×g and residual supernatant

was discarded. 50 μ L of 70% formic acid were added to the “pellet” (5–10 mg, or less bacterial material), and mixed to resuspend the bacteria. Then 50 μ L acetonitrile were added, and the sample was mixed carefully. The solution was centrifuged at $5,000\times g$ for 2 min. The supernatant (50–80 μ L) was transferred to a new tube immediately.

MALDI preparation: This step was performed at room temperature. One microliter of the supernatant was placed onto a 384 spot polished steel target plate and led dry in air. Then, 1 μ L of matrix (3 mg/mL solution of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% (vol/vol) acetonitrile/2.5% trifluoro acetic acid (vol/vol)) was overlaid onto the dried sample and led dry in air. This simple preparation method provided homogenous samples to enable automated measurements and sufficiently reproducible mass spectra (Mellmann et al. 2009). To increase data reliability, we applied each bacterial sample three times onto the target plate.

MALDI-TOF/MS parameters: Mass spectra were acquired using an Ultraflex II MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). Measurements were performed in linear positive ion detection mode, using a nitrogen laser $\lambda = 337$ nm at maximum frequency of 20 Hz. Spectra were collected as a sum of 500 shots across a spot. Mass range of 2,000–20,000 m/z was used for analysis throughout the mass spectrometry. *Escherichia coli* strain DH5 alpha with known mass values of ribosomal proteins was used for external calibration (Ryzhov and Fenselau 2001).

Data acquisition and processing: Automated spectrum acquisition was performed using the Auto Execute™ software (Bruker Daltonics) with fuzzy control of laser intensity.

Spectra analysis generated data that included both peak position and intensity. Mass spectra were analyzed with Flex Analysis software 2.4 (Bruker Daltonics). Further bacterial data analysis were performed by BioTyper™ 1.1 software developed by Bruker Daltonics. After smoothing of the spectra, baseline correction, and peak picking, the resulting peak lists were used by the program to calculate and to store a main spectrum containing the average peak mass, average peak intensity, and frequency information.

Identification and comparison of all strains was performed using a maximum of 100 peaks with a signal-to-noise (S/N) ratio of 3 were selected in the range of 3,000–15,000 Da. Afterwards the main spectra were generated as a reference using all spectra given for a single microorganism. For strains comparison, 75 peaks were picked automatically, which occurred in at least 25% of the spectra and with a mass deviation of 200 ppm, called here principal component analysis (PCA), was used to calculate their similarity. The hierarchical clustering uses a dendrogram based algorithm to form tree-like structures from the distance of *V. cholerae* strains (the scores of PCA) and links them together by a linkage algorithm. For microorganism identification, the raw spectra of the unknown bacteria were imported into the MALDI BioTyper™ software and analyzed by standard pattern matching (with default

parameter settings) against the main spectra of 3,290 microorganisms (1,960 species), used as reference data, in the BioTyper database (these spectra are an integrated part of the BioTyper software).

Results

During the 6 month period from January to June, 58 samples were positive to *Vibrio* spp. from this 21 samples were positive to *V. cholerae*.

In this study, 20 isolates were identified as *V. cholerae*, and one strain (no 84) was identified by Vitek 2 system at 50% as *Aeromonas sobria* and at 50% as *Vibrio metschnikovii*, PCR amplification of the complete 16S rRNA gene was performed for this strain (*Vibrio* spp.). Amplification products were subjected to direct sequencing, and a 100% match was noted with the *V. cholerae* GenBank sequence accession number O801M080770. All *Vibrio cholerae* strains belonged to non-O1 serogroup and did not produce the cholera toxin (CT).

Results of antimicrobial susceptibility testing for each isolate are summarized in Table 1. About 47.61% of *V. cholerae* non-O1 isolated at different sampling points of the studied WWTPs were susceptible to all the antimicrobial agents tested, four strains being fosfomicin (FOS) resistant. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and nalidixic acid (NAL) was detected in 3/21 isolates, while a single isolate was resistant to amoxicillin (AMX) and ticarcillin (TIC). One strain was resistant to three antibiotics SXT, NAL and cefoxitin (FOX), and two isolates were resistant to four antibiotics (AMX, TIC, FOS, NAL or FOX).

Table 1 shows the distribution of 21 *Vibrio cholerae* isolated from the different sewages. *V. cholerae* non-O1 was isolated throughout the period of the sampling except in January.

Table 1 Antimicrobial resistance phenotypes for *Vibrio cholerae* non-O1 isolates obtained in different sewages from three wastewater treatment plants (WWTP)

WWTP	Origin	Isolate number	Date of isolation	Antimicrobial resistance	
Mzar	RW	8	2007/04/16	AMX, TIC	
		9	2007/05/07	FOS	
	DW	13	2006/12/18	FOS	
		20	2007/04/16	(-)	
		27	2007/02/05	SXT, NAL	
	TW	25	2006/12/18	(-)	
		30	2007/03/26	SXT, NAL, FOX	
Drarga	RW	37	2007/02/13	(-)	
		43	2007/05/14	(-)	
	TW	54	2006/12/11	AMX, TIC, FOS, FOX	
		61	2007/04/10	FOS	
		64	2007/05/14	FOS	
Ben Sergao	RW	69	2007/04/16	(-)	
		70	2007/05/07	(-)	
		76	2007/03/12	SXT, NAL	
	DW	77	2007/03/26	SXT, NAL	
		78	2007/04/10	(-)	
		92	2007/05/14	(-)	
		93	2007/06/05	(-)	
		TW	84	2007/03/12	AMX, TIC, FOS, NAL
			88	2007/05/07	(-)

RW, DW, TW: raw, decanted and treated wastewater. (-): indicates susceptibility to all antimicrobial agents tested

AMX Amoxicillin, TIC Ticarcillin, FOS Fosfomycin, SXT Trimethoprim-sulfamethoxazole, NAL Nalidixic Acid, FOX Cefoxitin, Antimicrobial susceptibility

Pulsed-field gel electrophoresis

Both enzymes *Sfi*I and *Not*I were used to perform PFGE analysis at the beginning of this study. PFGE patterns obtained by *Sfi*I digestion appeared as a smear on the gel, even when thiourea was added to the running buffer, so that they were further confirmed by *Not*I digestion. Consequently, *Not*I macro-restriction was employed for this study.

The *Not*I restriction enzyme displayed the chromosomal genome into 11–21 fragments (Fig. 1) which ranged from 48.5 to 533 kb. Out of the 21 strains of *V. cholerae* non-O1 examined in this study, 17 were successfully characterized by PFGE after genomic DNA digestion with *Not*I. Using *Not*I, 4 of 21 strains (25, 78, 88, and 93) could not be typed by PFGE, whereas ten strains only were typed with *Sfi*I.

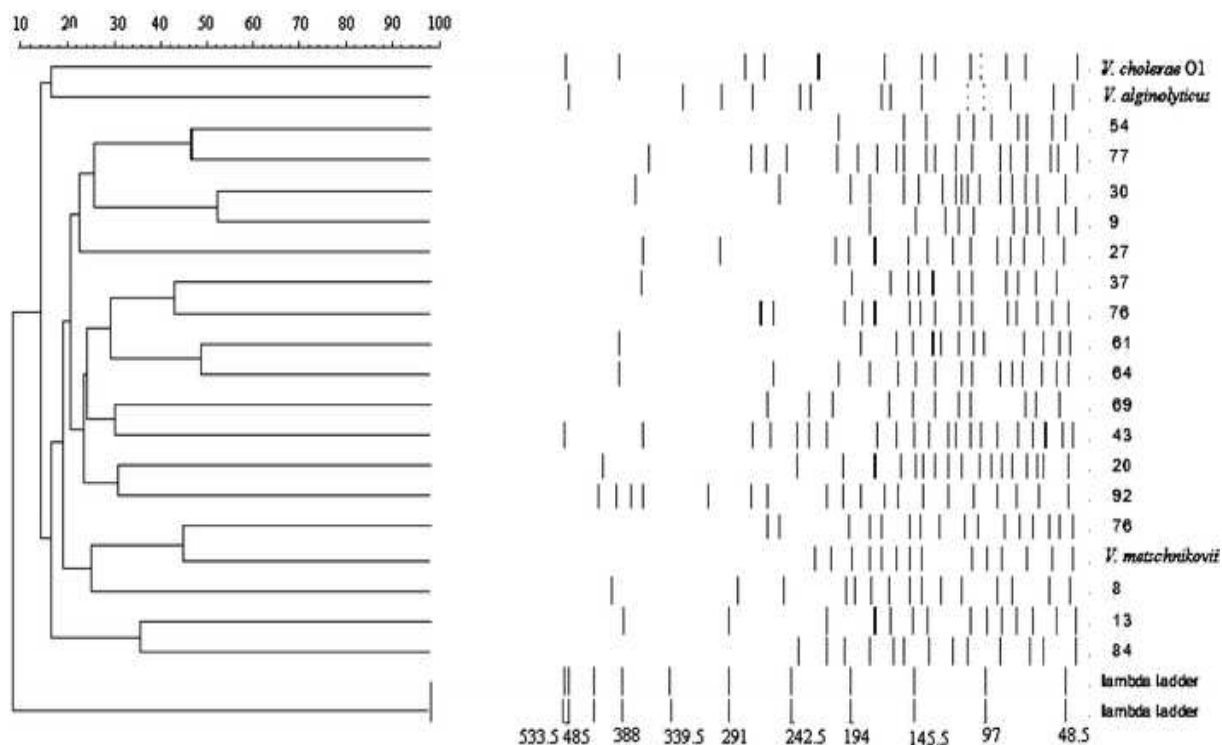


Fig. 1 Digitized PFGE analysis of *NotI*-digested profiles obtained from genomic DNA of *V. cholerae* non-O1 isolates. The dendrogram construction used the Molecular Fingerprinting II™ (Bio-Rad) software. PFGE band similarity exceeding 80% was used as the criterion

The *NotI* restriction patterns were clustered, and a dendrogram for the strains examined revealed a variety of PFGE *NotI* patterns for the *V. cholerae* non-O1 strains (Fig. 1). In general, different unrelated PFGE patterns were identified among *V. cholerae* isolates regardless to the isolation source or wastewater treatment plant origin.

Based on the Tenover's criteria of PFGE analysis (Tenover et al. 1995), strains were grouped into two clusters I and II according to the similarity scores calculated according to Dice method. Cluster I contains *V. cholerae* O1 and *V. alginolyticus*. In contrast, cluster II contains all of non-O1 *V. cholerae* isolated in wastewater samples, with *V. metschnikovii* strain.

MALDI-TOF MS analysis

MALDI-TOF analysis produced distinguishable peaks using intact cells. In the *m/z* range between 2 and 12 kDa, 20–25 important peaks were observed in the spectra of *Vibrio* strains. However, peaks with lower intensity, were found above 14 kDa. Spectra in range 2–12 kDa were extremely similar for triplicates analyzed of each isolate but were distinguishable among all *Vibrio* species, which proves the reproducibility of this method. Figure 2 shows an example of a MALDI-TOF profile, in which the masses of some characteristic peaks are indicated. Each strain of *Vibrio* is defined by its unique mass distribution corresponding to a characteristic spectrum. It can be used for identification and authentication for cluster formation, and the isolates were distinctly different

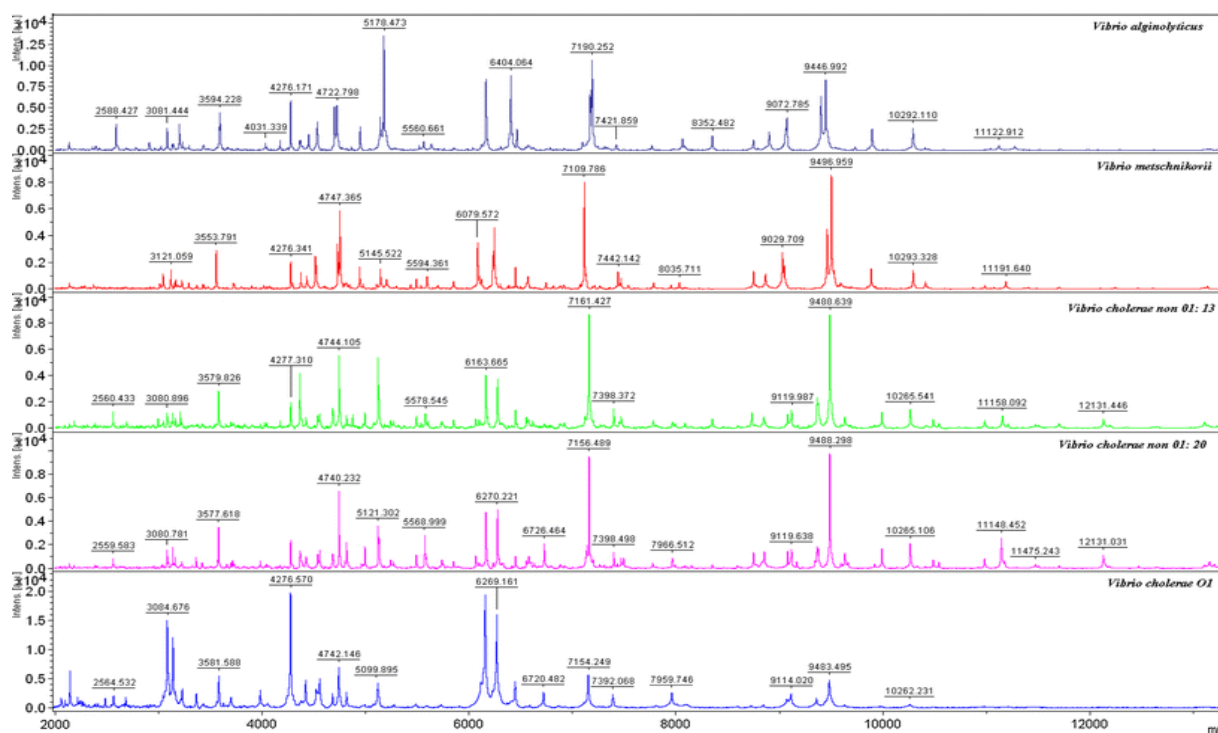


Fig. 2 Examples of MALDI-TOF mass spectra of intact cells from selected group representatives of *Vibrio* strains belonging to *V. cholerae* non-O1 isolated in wastewater treatment plants, *V. metschnikovii*, *V. alginolyticus*, and *V. cholerae* O1. Main masses between 2,000 and 12,000 Da are indicated. The absolute intensities of the ions are shown on the *y* axis, and the masses (in Da) of the ions are shown on the *x* axis. The *m/z* value stands for mass to charge ratio. For a single positive charge, this value corresponds to the molecular weight of the proteins

The spectra are typically composed of about 20–25 peaks which serve as biomarkers for the characterization and grouping of isolates. The spectra show many interspecies similarities as well as species-specific biomarkers. Under the test conditions (intact cells grown on solid medium, with matrix and 50:50 acetonitrile–water solution plus 2.5% TFA as solvent), some peaks having an average *m/z*: $2,560 \pm 20$ Da, $3,120 \pm 80$ Da, $4,270 \pm 10$ Da, $4,720 \pm 30$, $5,130 \pm 10$ Da, $6,240 \pm 30$ Da, $7,160 \pm 20$ Da, $9,440 \pm 40$ and $10,290 \pm 30$ Da were common in spectra of all *Vibrio* strains, which may constitute biomarkers that could allow group-specific clustering. It has to be noted that the base peak intensity is about 10^4 (arbitrary units), and the relative intensity of each peak for each strain is different, i.e., peak at *m/z*: 4,276 for *V. cholerae* O1 has an intensity of about 2×10^4 arbitrary units and has an intensity of about 0.2 arbitrary units 10^4 for *V. cholerae* non-O1, this can be related to concentration and location of proteins in the bacterial cell and biophysical properties of proteins such as solubility, hydrophobicity, basicity, and compatibility with MALDI. In general, most of the proteins detected by MALDI protein bacterial profiling derive from highly abundant, basic ribosomal proteins (Sauer et al. 2008).

To examine the ability of MALDI-TOF MS to cluster *V. cholerae* non-O1 isolates on the basis of similarity in their MS spectral patterns, data were analyzed by principal component analysis (PCA) and based on main spectra calculated by the Biotyper™ software, a

dendrogram could be generated. The dendrogram shows the percentage spectrum identity for all investigated *Vibrio* strains. Species with distance levels over 300 had completely different mass signal patterns. Strains clustering with distance levels lower than 300 could be classified up to the species and at strains level. The limit of resolution was set by the distances derived from measurement variability. Figure 3 shows a dendrogram of the different *Vibrio* strains. Three distinct groups could be delineated. MALDI cluster A contains 5 *Vibrio* strains (*V. cholerae* O1, *V. cholerae* N°88, *V. metschnikovii*, *V. cholerae* N°84 and *V. alginolyticus*). MALDI cluster B contains 11 *V. cholerae* strains. MALDI cluster C contains 7 strains of *V. cholerae* non-O1.

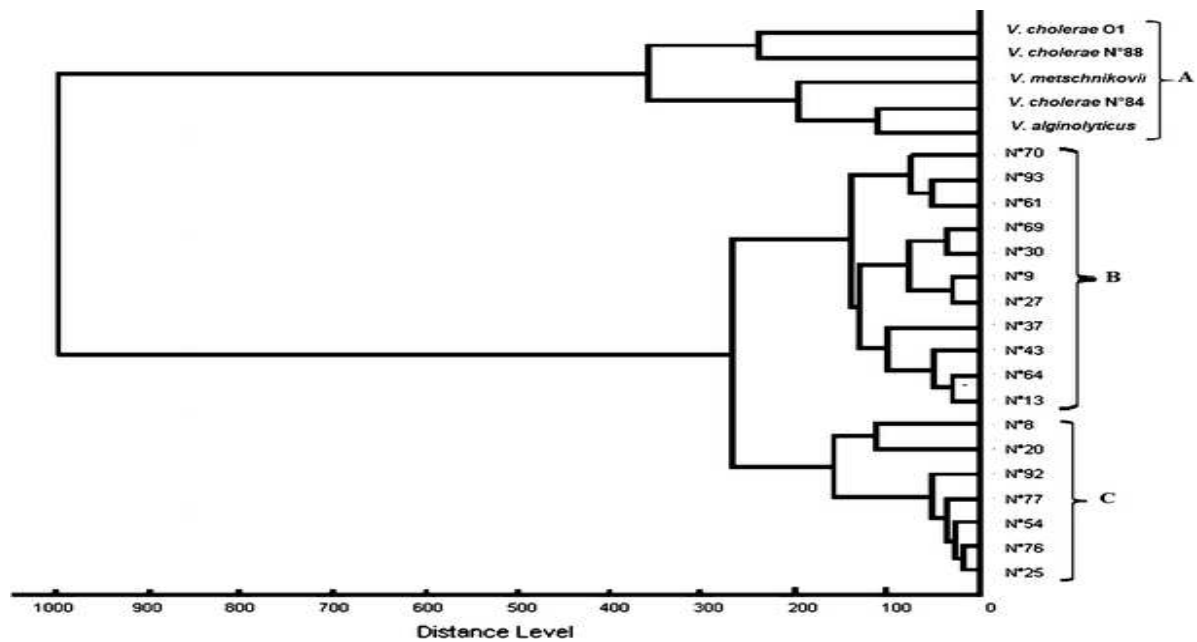


Fig. 3. Classification of bacteria. Based on the protein mass patterns, bacterial strains can be clustered hierarchically. A dendrogram generated by this approach including different *Vibrio* strains

Discussion

Vibrio cholerae is an autochthonous bacterium of aquatic environments (Morris 1990, Annick et al. 2006). Strains of *V. cholerae* not agglutinating with O1 antiserum are referred to as non-O1 or nonagglutinating, have been recognized as the causative agent of outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis (Arita et al. 1986; Singh et al. 2001; Albert et al. 2004). Based on the results of the present study, detection of *V. cholerae* non-O1 in different samples of wastewater, especially in treated wastewater, concludes that the wastewater treatment plants do not remove or inactivate all pathogenic microorganisms (Chauret et al. 1999). This gives rise to an important role as a transmission vehicle for *V. cholerae* non-O1. Lesne et al. (1991) and Mezrioui et al. (1995), report similar results in experimental waste stabilization ponds (WSP) at Marrakech (Morocco), where they found that the system didn't significantly reduce *V. cholerae* non-O1 counts between the inflow and outflow points of the system.

The presence of *V. cholerae non-O1* was higher in hottest months (April, May and Jun), then in cold months (January, February). The cold (or hot) period corresponds to months when the water temperature is below (or above) 22°C. This temperature was the average water temperature for the whole period of study (6 months). This could be explained by the effect of some abiotic factors (Temperature, pH and salinity) acting during treatment on *V. cholerae non-O1* survival. According to the literature, it is known that temperature plays a dominant part in *V. cholerae non-O1* survival in aquatic environments (Mezrioui and Oufdou 1996, Louis et al. 2003). These authors noted that *V. cholerae* abundance increases as a function of temperature. It is important, particularly where effluent reuse is being considered, to know the degree of protection that treatment systems can provide, especially the risks associated with the presence of *V. cholerae non-O1* in effluent will be greater if these bacteria are antibiotic-resistant.

The use and misuse of antibacterials in human and veterinary therapy, however, is affecting the advent of single and multiple antibiotic resistant strains (Levy 2001) and the presence of antibiotics in wastewaters, reported with increasing frequency, is recognized as an important contributor to the whole selection of antibiotic-resistant organisms (Baquero and Blazquez 1997). In some of the recent findings, it was established that vibrios can act as reservoirs of antimicrobial resistance, and that in *V. cholerae*, antibiotic-resistant genes could be found on transmissible plasmids (Dupont et al. 1985) that may contribute to the multiple antibiotic resistance and exhibited resistances to ampicillin, neomycin, tetracycline, gentamicin, streptomycin, sulfonamide, furazolidone, chloramphenicol and fosfomicin (Thungapathra et al. 2002, Melano et al. 2002). Integron and SXT elements were described as vehicles in the transport of resistance genes (Burrus et al. 2006). In this study, all environmental isolates were non-O1 serotype, strains resistant to SXT (19%) also showed resistance to NAL, and the majority of AMX resistant strains showed resistance to other antibiotics such as NAL, TIC, and FOS. However, ampicillin's resistance has been reported and increases for *V. cholerae non-O1* strains (Morris et al. 1985, Sciortino et al. 1996). The presence of plasmids has not been examined, but they might explain differences in the frequency of resistant strains.

Previous studies revealed high diversity in nontoxigenic strains, especially the non-O1 and non-O139 isolates, through molecular subtyping techniques including ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis, and amplified fragment length polymorphism (Jiang et al. 2000, Faruque et al. 2004). In this study, we used PFGE to investigate the genome contents of nontoxigenic O1 strains. The data obtained by PFGE suggest that *V. cholerae non-O1* isolated from different wastewater treatment plants during this investigation are largely heterogeneous at the genomic level. A major concern for this study was the presence of a high level of PFGE untypeable *V. cholerae non-O1* strains with NotI (about 19%). Strains that

are untypeable by PFGE may probably be the result of methylation of genomic DNA (Xydas et al. 1996), or its degradation during the process (Wong et al. 2004).

An additional purpose to this study was to investigate the ability of MALDI-TOF MS-based bacterial fingerprinting to rapidly distinguish between and characterize environmental isolates of *V. cholerae non-O1* using the Biotyper™ 1.1 software. MALDI-TOF/MS method is based on the detection of mainly ribosomal protein fractions of bacteria, which are the most abundant and conserved (Suh and Limbach 2004).

The dendrogram based on MALDI-TOF mass spectral profiles of *V. cholerae non-O1* isolated from the three wastewater treatment plants was different to those determined by PFGE, albeit both methods have here been shown to produce “fingerprints” that are strain-specific. Moreover, with MALDI-TOF Biotyper™ 1.1 and according to chosen parameters we observed a powerful and a considerable discrimination of bacterial isolates. Whole-cell MALDI-TOF/MS has the potential to be useful for rapid taxonomy based on protein biomarkers (Lay 2000) to resolve closely related strains of *Vibrio.sp*, because the intraspecies sequence variations in term of molecular mass, as much as the interspecies variations (Chun et al. 1999). Cluster analysis of MALDI-TOF/ MS-derived fingerprint data revealed a higher degree of species-specific grouping compared to that observed with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), i.e., *V. metschnikovii* strain, being part of cluster that gathers *Vibrio cholerae non-O1* strains in PFGE analysis, branches outside this cluster by MALDI TOF analysis.

The advantages of using MALDI-TOF/MS-based protein mass spectral fingerprinting for microorganisms as well as for their differentiation at the subspecies level are easiness and rapidity of analysis combined with relatively simple sample preparation techniques. The potential for rapid identification of candidate biomarkers, even when minimal genetic data are available also contribute an interesting field to explore.

MALDI-TOF/MS is shown to be a rapid and powerful tool for the fast and simple discrimination of *Vibrio* species, which could be useful to establish and to track epidemics.

In conclusion, the present study shows that *Vibrio cholerae non-O1* isolates survive to treatment processes of wastewater facilities. Moreover, the majority of isolates appear to be resistant to one antibiotic at least, thus posing a potential health risk to the communities.

Acknowledgments We thank Dr A. Van Dorsselaar (UMR-7178), Pr B. Ludes (EA-4438) for access to MALDI-TOF facilities, and Institut de Bactériologie for Vitek II facilities.

References

1. Albert M, Anderson L, Varkey JB, Petti CA, Liddle RA, Frothingham R, Woods CW (2004) Non-O1 *Vibrio cholerae* septicemia: case report, discussion of literature, and relevance to bioterrorism. *Diagn Microbiol Infect Dis* 49:295–297
2. Amahmid O, Asmama S, Bouhoum K (2002) Urban wastewater treatment in stabilization pond: occurrence and removal of pathogens. *Urban Water* 4:255–262
3. Annick RP, Baron S, Lesne J, Fournier JM, Quilici ML (2006) Specific detection of *Vibrio cholerae* in marine ecosystem by a colony hybridization assay after culture on selective medium. *Hydroecol Appl* 15:97–105
4. Arita M, Takeda T, Honda T, Miwatani T (1986) Purification and characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* 52:45–49
5. Aström J, Carlander A, Sahlén K, Stenström TA (2006) Fecal indicator and pathogen reduction in vegetation microcosms. *Water Air Soil Poll* 176:375–387
6. Baquero F, Blazquez J (1997) Evolution of antibiotic resistance. *Trends Ecol Evol* 12:482
7. Bright JJ, Claydon MA, Soufian M, Gordon DB (2002) Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J Microbiol Methods* 48:127–138
8. Burrus V, Marrero J, Waldor MK (2006) The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* 55:173–183
9. Chauret C, Springthorpe S, Sattar S (1999) Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Can J Microbiol* 45:257–262
10. Chun J, Huq A, Colwell RR (1999) Analysis of 16S–23S rRNA Intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol* 65:2202–2208
11. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 14:1584–1586
12. Colwell RR, Kaper J (1977) *Vibrio* species as bacterial indicators of potential health hazards associated with water. In: Hoadley AW, Dutka BJ (ed) *Bacterial indicators/health hazards associated with water*. ASTM STP 635, Philadelphia, pp 115–125
13. Colwell RR, Spira WM (1992) The ecology of *Vibrio cholerae*. In: Barua D, Greenough WB III (eds) *Cholera*. Plenum Medical, New York, pp 107–127
14. Dieckmann R, Strauch E, Alter T (2010) Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *J Appl Microbiol* 109:199–211
15. Dupont MJ, Jouvenot M, Couetdic G, Michel-Briand Y (1985) Development of plasmid-mediated resistance in *Vibrio cholerae* during treatment with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Antimicrob Agents Chemother* 27:280–281
16. Eddabra R, Mimouni R, Meunier O, Moussaoui W, Prévost G, Scheffel JM (2010) MALDI-TOF MS analysis and molecular typing by pulsed field gel electrophoresis of environmental *Vibrio* isolates. *Proceedings of ECCMID 20th*, Vienna, Austria
17. Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Dziejman M, Hasibu Rahman M, Sack DA, Balakrish Nair G, Mekalanos JJ (2004) Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. *PNAS (Proc Natl Acad Sci USA)* 101:2123–2128
18. Filetici E, Bonadonna L, Ciccozzi M, Anastasio MP, Fantasia M, Shimada T (1997) Phenotypic and genotypic biotyping of environmental strains of *Vibrio cholerae* non-O1 isolated in Italy. *Appl Environ Microbiol* 63:4102–4106
19. Gerba CP, Smith JE (2005) Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J Environ Qual* 34:42–48
20. Gilbride KA, Lee DY, Beaudette LA (2006) Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J Microbiol Meth* 66:1–20
21. Godfree A, Farrell J (2005) Processes for managing pathogens. *J Environ Qual* 34:105–113
22. Hazen TH, Martinez RJ, Chen Y, Lafon PC, Garrett NM, Parsons MB, Bopp CA, Sullards MC, Sobecky PA (2009) Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 75:6745–6756
23. Honisch C, Chen Y, Mortimer C, Arnold Oliver Schmidt C, Van Den Boom D, Cantor CR, Shah HN, Gharbia SE (2007) Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10649–10654
24. Jiang SC, Louis V, Choopun N, Sharma A, Huq A, Colwell RR (2000) Genetic diversity of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 66:140–147
25. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M, Shah HN (2004) Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol* 4:221–242
26. Lay JO Jr (2000) MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *Trends Anal Chem* 19:507–516
27. Lesne J, Baleux B, Boussaid A, Hassani L (1991) Dynamics of non-O1 *Vibrio cholerae* in experimental sewage stabilization ponds under arid mediterranean climate. *Water Sci Technol* 24:387–390

28. Levy SB (2001) Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin Infect Dis* 33(Suppl 3):S124–S129
29. Louis VR, Russek-Cohen E, Choopun N, Rivera ING, Gangle B, Jiang SC, Rubin A, Patz JA, Huq A, Colwell RR (2003) Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 69:2773–2785
30. Melano R, Petroni A, Garutti A, Saka HA, Mange L, Pasterán F, Rapoport M, Rossi A, Galas M (2002) New Carbencillin-Hydrolyzing β -Lactamase (CARB-7) from *Vibrio cholerae* Non-O1, Non-O139 Strains Encoded by the VCR Region of the *V. cholerae* Genome. *Antimicrob Agent Chemother* 46:2162–2168
31. Mellmann A, Bimet F, Bizet C, Borovskaya AD, Drake RR, Eigner U, Fahr AM, He Y, Ilina EN, Kostrzewa M, Maier T, Mancinelli L, Moussaoui W, Prévost G, Putignani L, Seachord CL, Tang YW, Harmsen D (2009) High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization time of light mass spectrometry-based species identification of non fermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 47:3732–3734
32. Mezrioui N, Oufdou K (1996) Abundance and antibiotic resistance of non-O1 *Vibrio cholerae*, strains in domestic wastewater before and after treatment in stabilization ponds in an arid region (Marrakech, Morocco). *FEMS Microbiol Ecol* 21:277–284
33. Mezrioui N, Oufdou K, Baleux B (1995) Dynamics of non-O1 *Vibrio cholerae* and fecal coliforms in experimental stabilization ponds in the arid region of Marrakech, Morocco, and the effect of pH, temperature, and sunlight on their experimental survival. *Can J Microbiol* 41:489–498
34. Mimouni R, Eddabra R, Benzine L, Aarab D, Cherradi MA, Moukrim A (2006) Qualité Microbiologique et Physico-chimique des Eaux Usées de Ben Sergao Epurées par Infiltration Percolation après Quinze Ans de Fonctionnement de la Station (Sud-Ouest, Maroc). Proceedings of 3rd international conference on water resource Mediter Bassin, Liban
35. Morris JG Jr, Drusano GL, Tenney JH (1985) In vitro susceptibility of pathogenic *Vibrio* species to norfloxacin and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 28:442–445
36. Morris JG (1990) Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiol Rev* 12:179–191
37. Moussaoui W, Bouakaze C, Prevost G (2009) Applications de la spectrographie de masse MALDI TOF à l'identification bactérienne. *Bull Soc Fr Microbiol* 24:293–302
38. Ryzhov V, Fenselau C (2001) Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem* 73:746–750
39. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K (2008) Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE* 3(7):e2843. doi:10.1371/journal.pone.0002843
40. Sciortino CV, Johnson JA, Hamad A (1996) Vitek system antimicrobial susceptibility testing of O1, O139, and non-O1 *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* 34:897–900
41. Shannon KE, Lee DY, Trevors JT, Beaudette LA (2007) Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Sci Total Environ* 382:121–129
42. Sharma C, Thungapathra M, Ghosh A, Mukhopadhyay AK, Basu A, Mitra R, Basu I, Bhattacharya SK, Shimada T, Ramamurthy T, Takeda T, Yamasaki S, Takeda Y, Balakrish Nair G (1998) Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. *J Clin Microbiol* 36:756–763
43. Singh DV, Matte MH, Matte GR, Jiang S, Sabeena F, Shukla BN, Sanyal SC, Huq A, Colwell RR (2001) Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl Environ Microbiol* 67:910–921
44. Soussy CJ (2005) Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. <http://www.sfm.asso.fr/>
45. Suh MJ, Limbach PA (2004) Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. *Eur J Mass Spectrom* 10:89–99
46. Sur D, Dutta S, Sarkar BL, Manna B, Bhattacharya MK, Datta KK, Saha A, Dutta B, Pazhani GP, Choudhuri AR, Bhattacharya SK (2007) Occurrence, significance & molecular epidemiology of cholera outbreaks in West Bengal. *Indian J Med Res* 125:772–776
47. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233–2239
48. Thungapathra M, Amita Sinha KK, Chaudhuri SR, Garg P, Ramamurthy T, Nair GB, Ghosh A (2002) Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes aac(6)-Ib, dfrA5, dfrA12 and ereA2 in Class I Integrons in Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrob Agent Chemother* 46:2948–2955
49. Xydas S, Lange CS, Phil D, Neimark HC (1996) Effect of methylation on the electrophoretic mobility of chromosomal DNA in pulsed-field agarose gels. *Appl Theor Electrophor* 6:43–47

3.5.1. Discussion de l'ARTICLE 3 : Typage des *Vibrio cholerae*

Dans cette étude, nous avons utilisé la PFGE pour enquêter sur le contenu du génome des souches *Vibrio cholerae* O1 non toxigènes. Les données obtenues par PFGE suggèrent que *V. cholerae* non-O1 isolées de différentes usines de traitement de eaux usées au cours de cette enquête sont largement hétérogènes au niveau génomique. Une préoccupation majeure de cette étude était la présence d'un haut niveau de PFGE de souches *V. cholerae* non-O1 non typables avec *NotI* (environ 19%). Les souches qui sont non typables par PFGE peuvent probablement être le résultat de la méthylation de l'ADN génomique [147], ou de sa dégradation au cours du processus [148].

MALDI-TOF/MS est principalement basé sur la détection des fractions protéiques ribosomales des bactéries, qui sont les plus abondantes et conservées [149]. Un objectif supplémentaire de cette étude était d'étudier la capacité des profils spectraux bactériens MALDI-TOF/MS pour distinguer et caractériser rapidement les isolats environnementaux de *V. cholerae* non-O1 en utilisant le logiciel Biotyper™ 1.1.

Le dendrogramme basé sur les profils de masse spectrale MALDI-TOF de *V. cholerae* non-O1 isolées à partir des trois usines de traitement de eaux usées a été différent de ceux déterminés par PFGE, mais les deux méthodes ont montré une capacité de produire des « empreintes » qui sont spécifiques à la souche. En outre, avec MALDI-TOF Biotyper™ 1.1 et selon les paramètres choisis, nous avons observé une discrimination considérable des isolats bactériens. MALDI-TOF/MS a un potentiel utile à la taxonomie et l'épidémiologie rapide basée sur des biomarqueurs protéiques [150] pour résoudre les souches étroitement apparentées de *Vibrio sp.*, car il y a des variations de séquences intraspécifiques en terme de masse moléculaire, autant que des variations de l'inter-espèce [151]. Le clustering des données MALDI-TOF/MS ont révélé un degré de regroupement d'espèces spécifiques plus élevé par rapport à celui observé avec l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), exemple, la souche *V. metschnikovii*, fait partie d'un cluster qui rassemble les souches *Vibrio cholerae* non-O1 dans l'analyse PFGE, alors qu'elle se trouve sur une branche en dehors des *Vibrio cholerae* non O1 par l'analyse MALDI-TOF/MS.

L'analyse des spectres a été réalisée par les outils associés à l'algorithme Biotyper 1.1™ et la génération des dendrogrammes s'est faite par défaut dans un premier lieu, puis dans un second temps et pour faire une comparaison adéquate, les différents profils spectraux après processing ont fait l'objet de comparaisons utilisant le même logiciel qui a servi à créer un dendrogramme de classification des profils PFGE. Les différents pics de chaque spectre de masse ont été considérés comme une entité différente utilisant l'outil de création de pseudogel

qui ressemble à un profil de restriction de la PFGE. Le dendrogramme généré à partir du pseudogel (Biotyper1.1™) et le dendrogramme généré à partir des différents pulsotypes nous a permis de conclure sur le pouvoir discriminant des profils spectraux réalisés par MALDI-TOF/MS.

Dans un article récent dont nous aurons la possibilité de discuter ci-après, nous avons montré qu'au sein même des différents dépôts de la même souche bactérienne beaucoup de pics mineurs sont assez variables et du coup peuvent jouer un rôle déterminant quand à l'utilisation de cette technique comme outil de typage. Ces éléments sont assez cruciaux et doivent être présents dans une bonne méthode de typage, par conséquent les résultats de typage obtenus dans cette étude sur les *Vibrio* méritent un re-examen concernant ces points variables utilisant la procédure que nous avons développée récemment et qui nous a permis de différencier deux bactéries très proches (*E. coli* et *Shigella*).

3.6. ARTICLE 4 : Discrimination des *E. coli* & *Shigella sp*

3.6.1. L'identification des *E. coli* et des Shigelles est-elle possible par MALDI-TOF?

Les identifications correctes constamment étaient obtenues par MALDI-TOF/MS lorsque seules les protéines les plus abondamment exprimées (par exemple protéines ribosomales) ont été dans la base de données [92]. Une fois que les spectres de MALDI-TOF/MS sont recueillis, de formes multiples de l'analyse des données peuvent être effectuées sur ces données pour discriminer les genres, espèces, souches et même des micro-organismes. Sur cette base, nous avons essayé d'effectuer plusieurs tests de discrimination entre les différentes souches de la même bactérie utilisant le Biotyper1.1™ et quelques traitements *in silico* des différents profils spectraux. Le but d'abord était de discriminer deux bactéries très proches (*Shigella.sp* vs *E. coli*), et utiliser la même procédure dans un but de typage bactérien (utilisation universelle).

3.6.2. L'identification des *Shigella* et des *Escherichia coli* par MALDI Biotyper™

Environ 1,1 million de morts et de 160 millions de cas par an sont attribués à la shigellose. De nombreuses analyses moléculaires impliquant l'hybridation de l'ADN, l'électrophorèse enzymatique multilocus, et le séquençage des gènes de ménage indiquent qu'*Escherichia coli* et tous les membres du genre *Shigella* appartiennent à la même espèce. Tous les systèmes commerciaux utilisés actuellement pour l'identification des microorganismes par MALDI-TOF/MS ne peuvent différencier ces deux bactéries. Pour distinguer les souches pathogènes

de haute pertinence clinique des souches moins pathogènes ou non pathogènes, le genre *Shigella* a été défini sur la base des phénotypes biochimiques, sérologiques et cliniques. Toutefois, l'identification des agents pathogènes conventionnels à partir d'échantillons fécaux par culture sélective et dosages biochimiques sont complexes et fastidieuses. L'objectif de ce rapport était d'évaluer la sensibilité et la spécificité de MALDI-TOF MS afin d'explorer son pouvoir discriminant pour détecter des différences subtiles entre les deux genres *Escherichia coli* vs *Shigella* sp. Nous avons essayé de repérer des biomarqueurs de peptides en utilisant d'abord une analyse préliminaire basée sur un élément qui influence la physiologie microbienne, c'est à dire les conditions de culture (température, milieu de culture), mais aussi des facteurs liés aux protocoles et le traitement des données. Des informations sur les modifications globales de ces composants de surface cellulaire peuvent alors apparaître, permettant que cette information soit utilisée pour l'identification des espèces de *Shigella*. En outre, nous avons comparé deux protocoles utilisés pour identifier les bactéries par ce système (smear ou le dépôt direct de la colonie et l'extraction de protéines), le but est alors d'instaurer les éléments idéaux pour une meilleure discrimination reproductible.

Dans ce travail, un critère objectif pour marquer la qualité des données des spectres est décrit, et en fonction des conditions techniques, un protocole optimal pour l'analyse des pics reproductibles des spectres de masse est établi. Ce nouveau concept est testé par le logiciel Biotyper™ 1.1 pour valider MALDI-TOF/MS pour l'identification de *Shigella* et *Escherichia coli* (pathogènes ou commensales). Deux bases de données incrémentées par des souches différentes récoltées dans notre laboratoire ou d'autres centres nationaux et internationaux. Nous démontrons la capacité de cette technique pour séparer les deux genres et identifier les souches au niveau de l'espèce à partir d'un milieu solide.

3.6.3. PreDatabase et les effets des conditions de culture

Base de données par défaut (tel que décrite dans le manuel de Biotyper 1.1™)

Pendant le processus de génération de spectres d'une base de données principale appliquée à *E. coli* et *Shigella* sp, trois pre-databases successives de Biotyper ont été créées et enregistrées pour d'autres applications, tel que décrit et recommandé par le fabricant (Biotyper™ 1.1 le manuel). L'algorithme choisit automatiquement les pics significatifs (tous les spectres de la même souche ont été comparés les uns aux autres et un score attribué).

Dans notre application, cette base de données sera utilisée comme une preDatabase, car il ne représente pas la base de données finale. Pour obtenir les conditions optimales et représentatives, plusieurs preDatabases étaient créées représentant des paramètres différents comme la température T °, le temps d'incubation, milieu de culture et préparation de l'échantillon, chacune pouvant affecter les pics générés constituant un spectre. Une fois la

preDatabase créée pour chaque condition de culture bactérienne, la comparaison entre preDatabases des différentes conditions de croissance a été réalisée. FlexAnalysis™ 3.0 (Bruker Daltonics) a été utilisé pour une inspection visuelle. En outre, Biotyper™1.1 a permis une analyse de comparaison de cluster utilisant des dendrogrammes et des distributions en 2D. Se basant sur ces comparaisons, les spectres acquis dans des conditions optimales (conditions où les bactéries sont mieux séparées) ont été sélectionnés et conservés pour créer une base de données finale.

3.6.4. Un nouveau concept pour la base de données finale

Nous avons développé un nouveau concept pour la création d'une nouvelle Database. Par défaut, l'algorithme a créé une bibliothèque dédiée (contenant des spectres de référence spécifique du genre et de l'espèce). La fonction intégrée - Set Editor - dans Biotyper™1.1 permet un dépistage visuel des différentes informations concernant les pics présents dans le spectre moyen (10 spectres bruts appariés pour chaque isolat), l'intensité du pic, Signal sur bruit S/N, fréquence de l'apparition des pics dans les 10 spectres moyennés en un spectre ... etc ; mais aussi permet de supprimer des pics ou leur donner des valeurs qui peuvent faire la différence. En se basant sur les informations données par Set-Editor (Biotyper™1.1) et pour une grande reproductibilité de la nouvelle stratégie, la méthode a consisté à sélectionner des pics ayant une fréquence de 100% pour un (Figure 9) isolat donné. Un pic doit être présent dans les 10 spectres constituant le spectre moyen de l'isolat (ou l'entrée dans la base de données). Après la suppression des pics non reproductibles, ce spectre moyen réduit pour un isolat donné contient encore assez de pics pour obtenir une identification précise. Par conséquent, les spectres réduits n'éliminent pas les informations utiles pour le calcul d'un log score, au contraire il leur confère une valeur proportionnelle plus importante. La variabilité dans l'intensité spectrale n'a pas été éliminée. Cette approche a été réalisée sur toutes les souches incluses ou non dans la base finale. La base de données finale a été sauvegardée pour les tests d'identification en aveugle. Une répétition de l'analyse des échantillons donnés a été réalisée (n = 5) afin d'obtenir des spectres ne contenant que des pics reproductibles. Les conditions optimales observées dans cette étude pour générer des spectres pouvant être utilisées pour la création d'une banque capable de différencier les deux bactéries étaient les suivantes : (culture sur milieu Drigalski, T 37°C, 10 spectres pour chaque souche, α -4-cyano hydroxycinnamique comme matrice, et l'extraction protéines pour la préparation des échantillons).

3.6.5. Article (RETENU)

Discrimination of *Shigella spp* and *Escherichia coli* O157, non-O157 and lactose negative *E. coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry and MALDI Biotyper™

Wardi Moussaoui¹, Jean-Michel Scheftel¹, Thierry Naas², Philippe Riegel¹, Benoît Jaulhac¹, Markus Kostrzewa³, Gilles Prévost^{1*}

1. Université de Strasbourg, CHRU Strasbourg, Faculté de Médecine, Physiopathologie et Médecine Translationnelle EA-4438, 3 rue Koeberlé, F-67000, Strasbourg, France.

*Corresponding author: Tel: 33 3 68 85 37 57, Fax : 33 3 68 85 38 08,

Email: prevost@unistra.fr

2. French National Reference Center for *Shigella*; Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, Paris, France.

3. Bruker Daltonik, Hambourg, Germany.

Résumé

La spectrométrie de masse est désormais une méthode étendue pour l'identification des bactéries cultivables, mais les solutions disponibles ne permettent pas l'identification de bactéries comme *E. coli* et *Shigella sp*. Une méthode utilisant la spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS a été développée pour différencier *E. coli* de *Shigella sp*. Une première base de données dédiée a été construite, rassemblant des spectres de masses de protéines abondantes de 32 souches indépendantes et représentatives des quatre espèces pathogènes de *Shigella sp*, d'*Escherichia coli* lactose négatif et positif. La procédure génère des spectres très reproductibles des isolats cultivés sur milieu Drigalski. Pour la comparaison et l'affinement des analyses, les spectres ont été analysés par MALDI Biotyper™ 1.1 en utilisant des méthodes de regroupement et de classement (Dendrogramme, 2D, 3D clustering). Les pics communs au sein d'un groupe de souches appartenant à une espèce donnée ont été retenus pour la constitution d'une banque de données. Ces pics sont ensuite comparés à ceux contenus dans les spectres d'échantillons ne contenant également que des pics reproductibles. Ces pics spécifiques d'espèce ont permis de différencier les bactéries isolées, mais également dans des mélanges polymicrobiens (*E. coli* et *Shigella sp*). La validation de la procédure a été réalisée en aveugle par une série de soixante autres isolats indépendants d'origine géographique et clinique variés. Cette nouvelle approche a été validée dans deux sites pour l'identification fiable d'*Escherichia coli* et *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* et *Shigella boydii*. Sur la même base qui ne considère que des pics hautement reproductibles à l'intérieur d'une espèce donnée, le pathogène *E. coli* O157a a été correctement distingué d'*E. coli* non pathogène. Cette dernière méthode pourrait également avoir une pertinence pour le typage des souches bactériennes.

Abstract (English)

Mass spectrometry is now an extended method for identification of cultivable bacteria, but the current solutions do not provide identification of *Escherichia coli* vs *Shigella* species. A confident method was developed to differentiate *E. coli* from *Shigella* sp using MALDI-TOF/MS. A dedicated database gathering mass spectra of abundant proteins from 32 independent strains representative of the four pathogenic *Shigella* sp, lactose negative and positive *Escherichia coli* was built by a procedure that generate highly reproducible spectra of isolates cultured on Drigalski medium. For a further comparison and refinement of analyses, spectra were analyzed using Flex analysis and the Biotyper™ software that offers dendrogram and clustering facilities. A series of sixty six further independent isolates of various origins were tested in a blind manner. This new suitable approach was reproduced in two different centers giving confident identification for *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Shigella boydii*. No confusion between lactose negative *Escherichia coli* and *Shigella* sp was recorded. Furthermore, several peaks were further found to be able to differentiate each of the considered species. Moreover, on the basis of species/subtype-specific peaks that only retain sets of variable peaks, pathogenic *E. coli* O157 was correctly distinguished from non-pathogenic *E. coli* and *Shigella* sp. This latter method may have pertinence for bacterial strains typing.

Key-words: Mass spectrometry, reproducible peaks, *Shigella* species, *Escherichia coli*, identification

INTRODUCTION

Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and the four pathogenic *Shigella* species are important human pathogens responsible for a majority of cases of endemic bacillary dysentery prevalent in developing countries. Worldwide, 1.1 million deaths and 160 million cases per year are attributed to shigellosis. Whereas the current classification scheme recognizes four species within genus *Shigella*: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, and *S. sonnei*, representing A, B, C, and D serotypes, respectively (1, 2), several studies and molecular evidences involving DNA-DNA hybridization, Multilocus enzyme Electrophoresis, and sequencing of housekeeping genes revealed that enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* species belong in fact to a single taxon (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). *Shigella* are gram-negative, non sporulating, rod-shaped and lactose-negative bacteria that can be defined on biochemical, serological, and clinical phenotypes, showing particular virulence for humans or primates. These conventional identifications involve selective cultures and biochemical assays that are quite complex, cost and time consuming (12).

The recent development of mass spectrometry (MS) provides opportunities for a wide identification of cultivable microorganisms (13). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS), over other methods of mass spectrometry has the advantage that intact cells can be taken directly from a colony and analyzed within few minutes. MALDI-TOF/MS produces a protein-based mass spectral fingerprint (14, 15, 16, 17). In addition to ribosomal proteins, and based on the results of Shah et al., 2002 (18); and Keys

et al., 2004 (19), surface and virulence proteins (e.g. electron transport, signal transduction, secretion systems, toxins, adhesins,...) influence mass spectra contents (15, 17). Although the amino acid sequences of ribosomal proteins and others are highly conserved, slight sequence variations occur even at the subspecies and strain level (15). Therefore, this method would have the potential to be rapid for identifying or typing of bacteria. To allow this potential be spread and rapid identification be applied, a large database of well characterized bacteria is required. Actually, the database provided by Bruker Daltonics contains more than 2000 different species (3995 main spectra, 2011), many of them represented by diverse strains, leading to the biggest comprehensive data resource. However, any available databases and comparison softwares, due to their close relationships do not offer efficient differentiation between *E. coli* and *Shigella sp*, but are only containing *E. coli*.

We investigated an approach to discriminate *Shigella* and *E. coli* using MALDI-TOF/MS profiling for the detection of subtle differences between them. Therefore, we screened peptides expressed under different culture conditions (temperature, media, time of incubation) to differentiate *Shigella* species from *E. coli*. In addition, we compared both smear and protein extraction protocols actually used to identify bacteria by this system to select the ideal one for this investigation. Objective criteria for data processing of spectra are described. Based on technical conditions, an optimized protocol for the creation of a specific database and the analysis of mass spectra fingerprinting is established. A new strategy was initiated using prototype software Biotyper™1.1. Using various strains obtained from different centers, we demonstrate the ability of this technique to separate both genera and identify *E. coli* and *Shigella* at the species level.

MATERIALS & METHODS

Chemicals

Acetonitrile and the matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), formic acid (Merck, Darmstadt), ethanol (Carlo Erba Reagents) were used without any further purification.

Strains (Reference strains & clinical isolates)

Both reference strains and clinical isolates used for the construction of the database and for the evaluation of the new method (Table 1, supplementary data) were kept frozen at -80°C until tested. The further processed database included 32 randomly chosen independent strains composed of 15 strains of *Escherichia coli* (6 lactose positive & 5 lactose negative & 4 pathogenic *Escherichia coli* O157) and 17 strains of *Shigella sp* (5 *Shigella sonnei*, 6 *Shigella flexnerii*, 3 *Shigella boydii* and 3 *Shigella dysenteriae*) (Table 1). They were obtained from the

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Strasbourg (25 strains), from the French National Reference Center for *Shigella*; Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre (4 strains), and Bruker Daltonics (3 strains).

Sixty six independent clinical isolates were obtained from patients at the “Centre Hospitalier Régional Universitaire de Strasbourg” (n=23), from Bruker Daltonics (n=16), from the French National Reference Center for *Shigella*; Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre (n=16), and from the private laboratory BIO67 (n=11). They were all analyzed in a blind manner. Identification of all the isolates was previously performed by conventional methods and further confirmed by serotyping and 16S rDNA sequencing (Table 1, supplementary data).

Growth conditions

Each isolate of the processed database was analyzed at defined culture conditions: incubations at 30°C or 37°C, for 24H or 48H, and grown either on Drigalski-, Columbia blood, or Mueller-Hinton agar plates and BHI medium. In case of physiological differences, results from colony-to-colony comparison were investigated to evidence possible differences.

Protocols for sample preparation

Protein extraction procedure:

The microorganisms were suspended in 300 µL of distilled water, and further inactivated by adding 900 µL of ethanol. After homogenization, the suspension was centrifuged at 7000 x *g* for 2 min and the pellet was dried. Then, 50 µL of 70% of formic acid were added to the pellet and the suspension vortexed to optimally liberate proteins. Fifty µL of acetonitrile were added and briefly vortexed. Samples were centrifuged again at 7000 x *g* for 2 min, supernatant was transferred to another Eppendorf tube and samples were ready for use in MALDI-TOF/MS. One µL of the supernatant was spotted onto a 3 mm circle of a 384 wells MALDI polished steel target plate (Bruker Daltonics), dried and covered by 1µL of HCCA and further let dry (HCCA saturated solution: HCCA in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid was used as previously described)(22).

Smear procedure: One colony is applied as a thin film directly onto the MALDI target steel plate and covered with HCCA solution. Samples were dried and analyzed by mass spectrometry. This time-reducing procedure was only applied to a subset of samples.

MALDI-TOF / MS

Raw spectra presented in this paper were acquired on BiFlexIII™ (Bruker Daltonics) equipped with a nitrogen laser source ($\lambda = 337$ nm, 3 mW, 10 MHz) operated in the positive linear mode (delay 400 ns, voltage 20 kV, mass range 2–20 kDa), (Bruker Daltonics). Samples covered by

matrix were ionized using initial laser shots with relatively high energy (40%) to clean the matrix (matrix blast effect). The laser energy was then decreased (20%) until the background signals disappeared. A sum spectrum was obtained from 340 laser shots. The sum of 340 single spectra collected within the parameters set above was retained if the signal to noise ratio was > 3 . Calibration was performed with Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics) containing six *E. coli* constant proteins and RNase A (13 683.2 Da) and myoglobin (16 952.3 Da). *E. coli* DH5 α was also used as a positive control for correct sample preparation, correct instrument tuning and, especially, for correct peaks calibration in order to avoid even small differences in spectrum generation. *E. coli* was prepared with the same protein extraction preparation protocol as used for the other samples, or smeared when considered. The mass accuracy after external calibration with known *E. coli* protein signals was about 500 ppm.

Data acquisition

After smoothing, baseline subtraction, normalization, a software prototype, MALDI Biotyper™1.1 (Bruker Daltonics) was used to process spectra for the creation of a specific database and to compare spectra allowing microorganisms identification. For spectra smoothing, the Savitsky-Golay method was applied with a frame size of 25 Da; the correction method was multipolygone with 2 runs and maximum normalization. Processing parameters were as follows: resolution 1, adjustment: spectra compressing 10 (compressing factor =10). For the processed database, we finally considered the masses in the range from 2500 Da to 11000 Da. A 0.1‰ a.u. for intensity threshold was set for the acceptance of peaks. Error mass tolerance on peaks was equal to ± 6 Da. The molecular characterization of prominent MALDI signals was not done and the precision of mass measurement was 200 ppm. Ten independent spectra from independent spots and colonies were recorded for each chosen isolate constitutive of the library. For these isolates, a list of peaks (main spectrum) was generated. It contains information about averaged masses, averaged intensities, and the relative abundances of peaks having criteria listed.

RESULTS

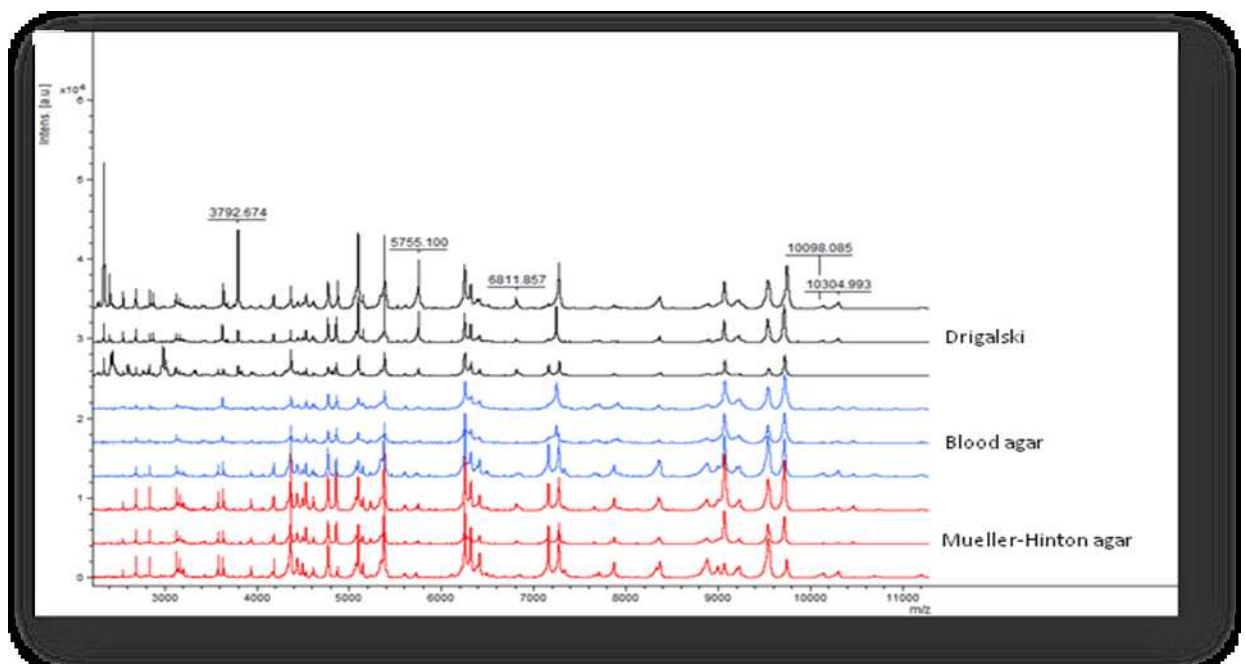
Elimination of non constant peaks and creation of a processed library database

The frequency of lactose negative *E. coli* identified by conventional methods in the microbiology laboratory of the Strasbourg University Hospital is about 5 to 10% of the overall *E. coli*. We included six strains of lactose negative *Escherichia coli* in the library as these bacteria are those mainly confusing with *Shigella sp.* The basic idea of our identification approach is, to remove initially, any peaks which might not be reproducible from raw spectra.

This non-informative element was established after numerous experiences observed in different growth conditions.

For example, three different colonies of one given *E. coli* isolate were randomly selected from a single Drigalski agar plate. Their identity log scores obtained by using Biotyper were 2.145, 2.234, and 2.342, respectively. Such a result supports the idea that some non constant features impact these scores and may have involvement onto identification of related bacterial species. Furthermore, colonies of the same isolate cultivated onto Columbia blood agar, Drigalski and Mueller-Hinton were analyzed under the same conditions, using the protein extraction protocol (3 CFU/3 spectra/one medium)(Figure 1A, i.e). Analysis of spectra showed that even for spectra which were well identified by the MALDI Biotyper ($\log_{\text{score}} > 2$), some variation of peaks existed between different media. Most often, peaks detected under 2500 Da mostly were non-specific both for *E. coli* and *Shigella* representative isolates (see arrows on Figure 1B) Thus, the mass range for identification was restricted from 2500 Da to 11000 Da.

Figure 1A:colonies of the same isolate (*E. coli*) cultivated onto Columbia blood agar, Drigalski



and Mueller-Hinton were analyzed under the same conditions, using the protein extraction protocol (3 CFU/3 spectra/one medium).

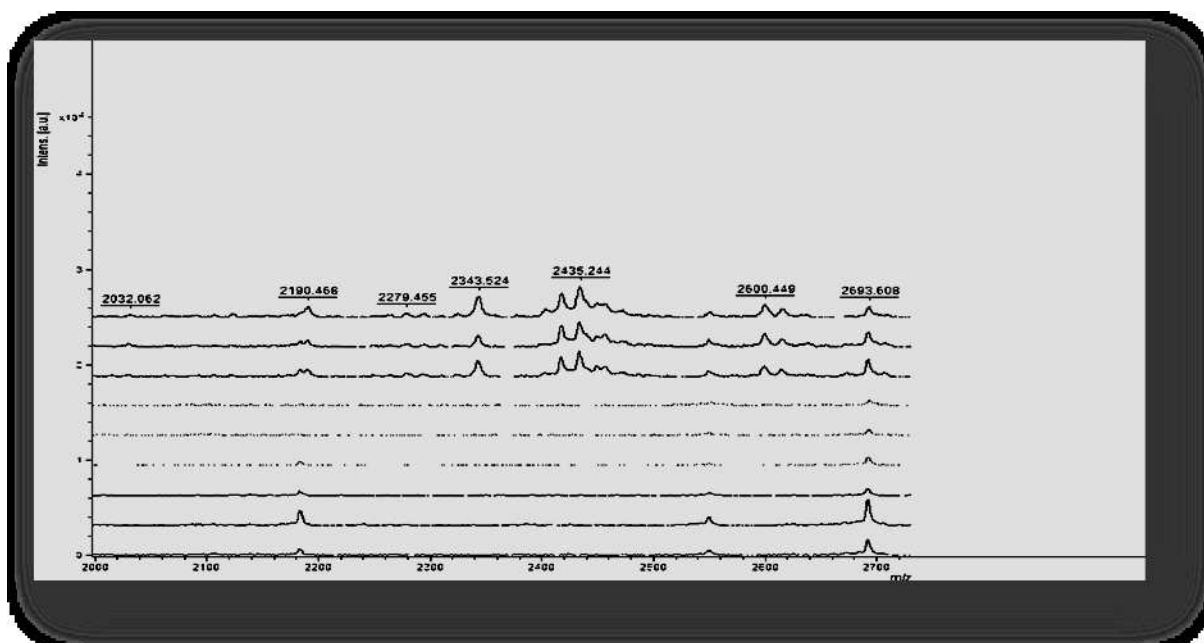


Figure 1B: Recorded *m/z* of *E. coli* isolate in the range of 2000 to 2500 Da.

Thereafter, simple test of 10 consecutive colonies grown on a single plate of agar medium proved that some mass peaks remain variable and may affect the reproducibility of a whole spectrum. We started a systematic comparison of the reproducibility of peaks in spectra ($n=3$) for 10 CFU issued from isolates selected for the reference library, and grown under different conditions as mentioned above. We observed variation of peaks in mass spectra derived from bacteria cultured on the same medium: both the ion intensities and the ions resolution changed (Figure 1C).

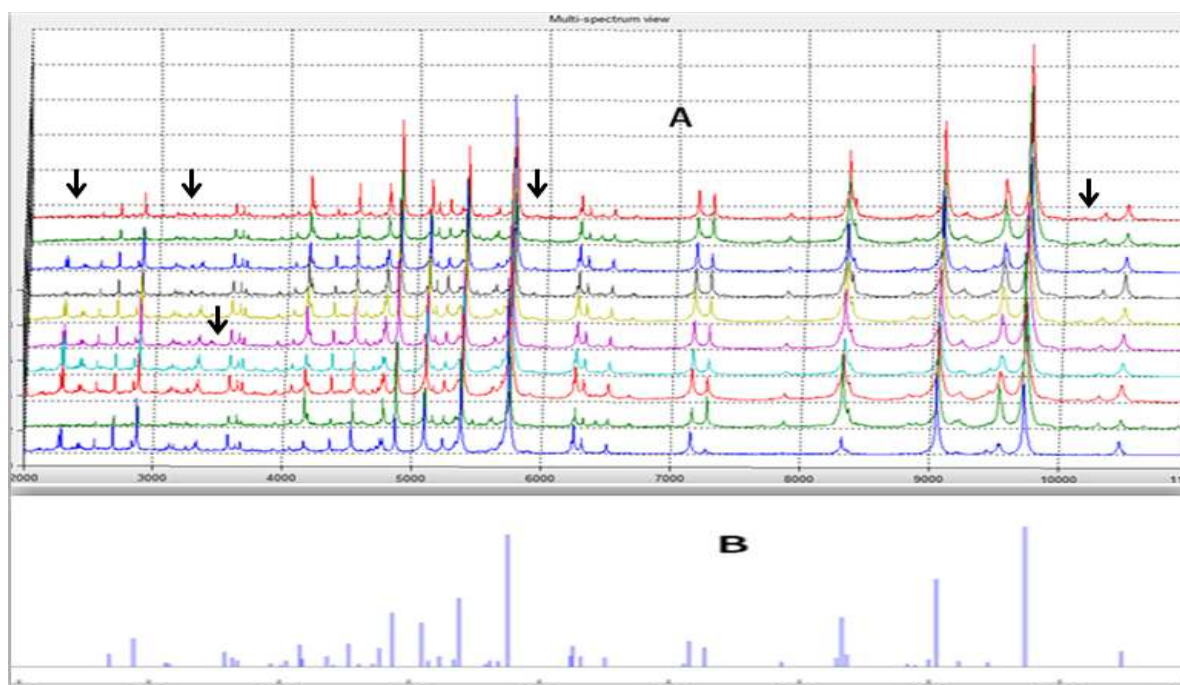


Figure 1C: -*A* 10 consecutive colonies grown on a single plate of Drigalski agar. Some mass peaks remain variable and may affect the reproducibility of a main spectrum (from 2000 to 2500 Da). -*B* A representative main spectrum of these colonies after suppression of variable peaks.

Despite these changes do not often influence bacterial identification at the species level using the MALDI Biotyper, they may influence identification (scores) for very closely related species and subspecies. Environmental factors also greatly contribute to variations of the spectra (Figure 2a & 2b) and may be associated with different intensities of peaks and presence or absence of discrete peaks, according to physiological effects of these conditions.

Again, these varying peaks may impair the identification of very closely related species or at subspecies level (Figure 2b). For example, cultures of both *Escherichia coli* or *Shigella* sp on Drigalski agar plates evidenced that this medium provides the most peak-rich and intense spectra, with a limited number of non constant peaks (see an example in *merging* Figure 2).

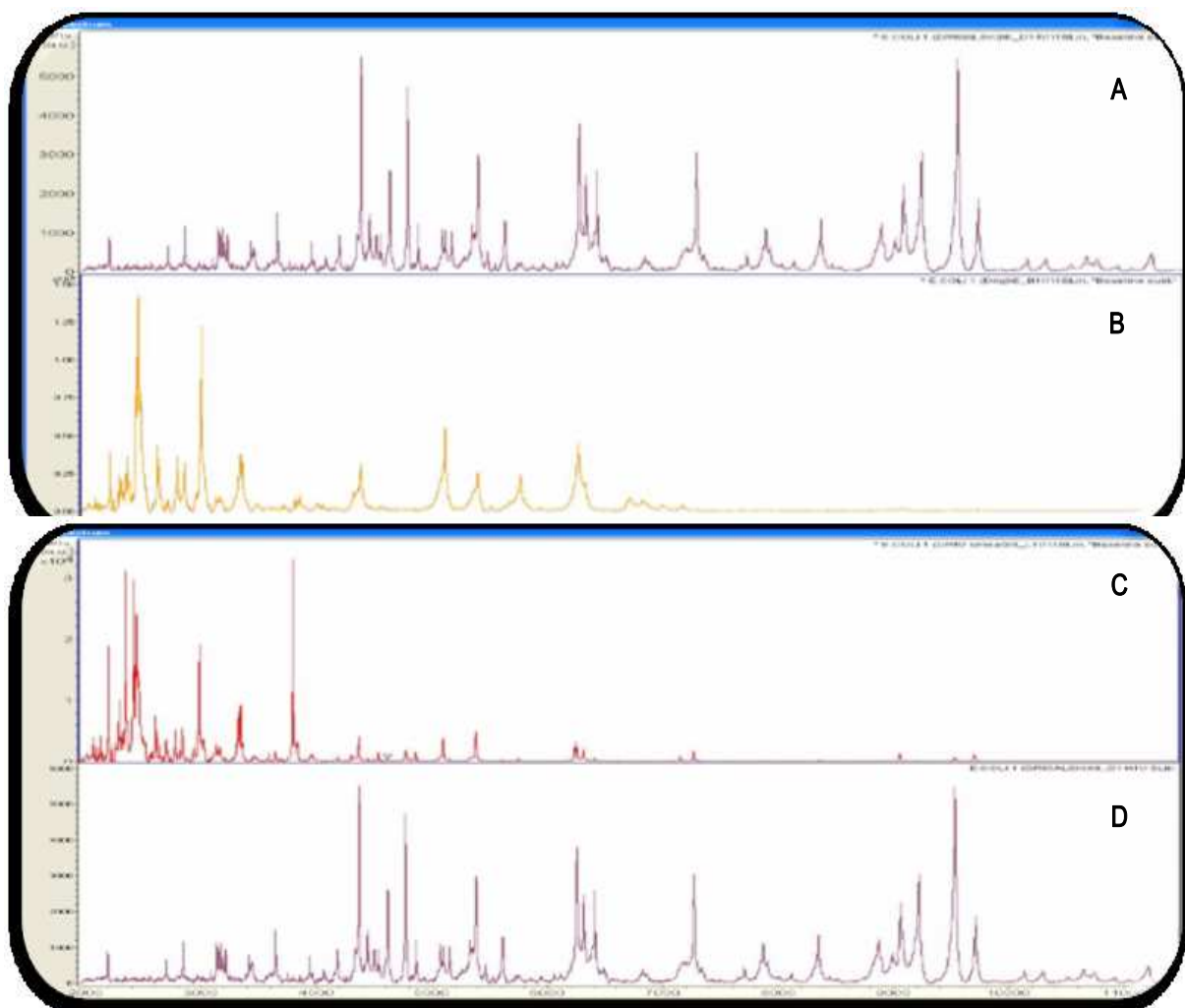


Figure 2a: Mass spectra of a given *E. coli* isolate after 24h incubation (A) and after 48H of incubation (B) onto a Drigalski agar plate. (C) and (D) spectra show the difference between spectra acquired by FlexControl™ 3.0 using two different protocols: (C: represent smear protocol and D represent Ethanol/protein extraction).

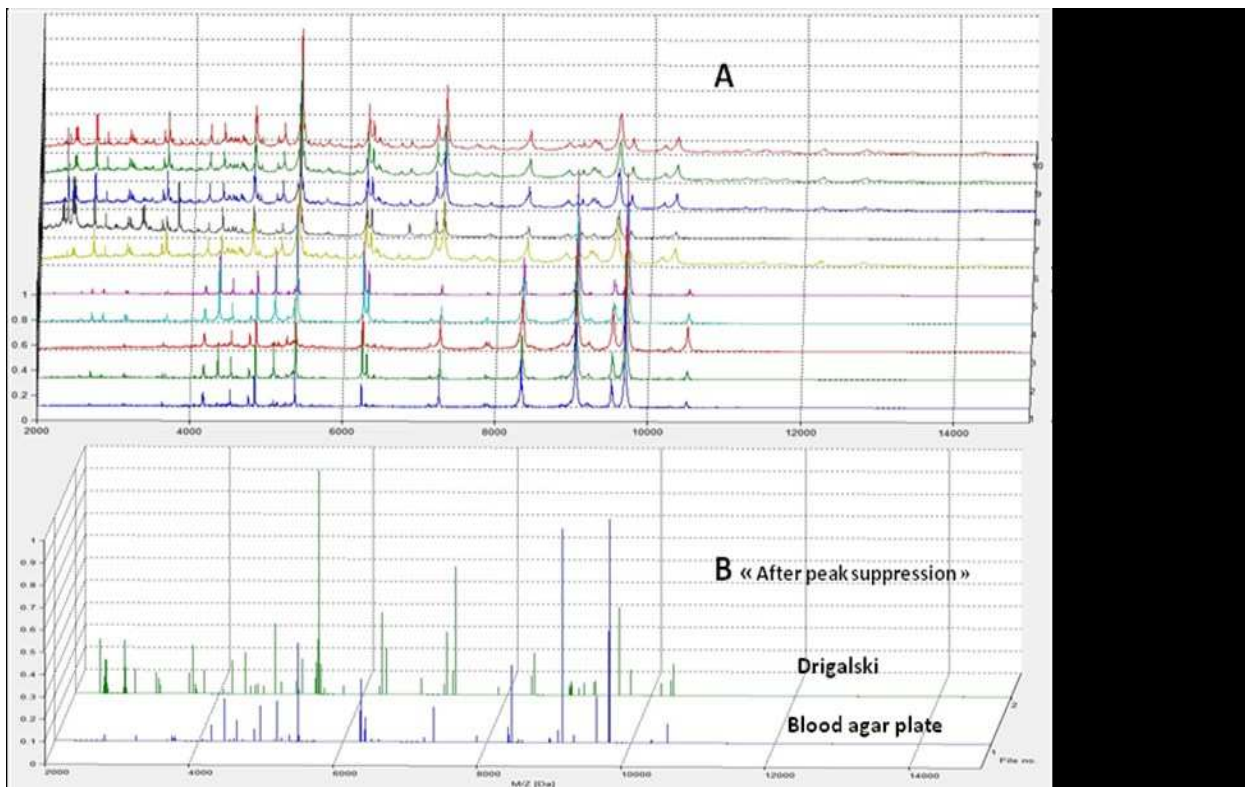


Figure 2b :-A 5 spectra of *Escherichia coli* grown on Drigalski agar plate compared to 5 spectra of the same *E. coli* culture on blood agar plate evidenced that this medium provide the most peak-rich and intense with a limited number on variable peaks. -B main spectra of each sample (Drigalski vs Blood agar) after elimination of variable peaks

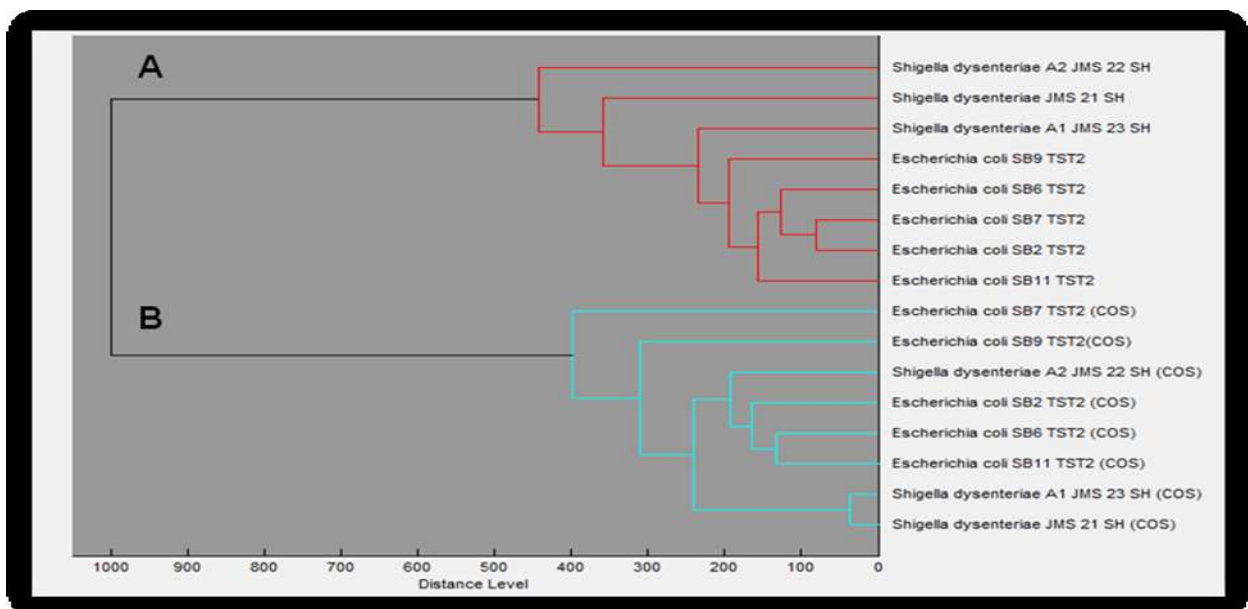


Figure 3: Cluster analysis of different strains of *E. coli* and of *Shigella dysenteriae*, both of them cultivated on Blood agar plate (complete medium) and on Drigalski agar under the same condition. Dendrogram was obtained with Biotyper1.1 by using Euclidean as a distance of measure and Ward as method of linkage. **A**) Drigalski separate both genus compared to **B**) COS " (Blood agar plate).

The selective Drigalski medium agar plate showed the best ability to separate the two genera using a dendrogram classification or 2D, 3D cluster distribution by Biotyper algorithm (Figure 3A & 3b).

Furthermore, temperatures tested (30°C & 37°C) and time of incubation also had an influence on the distribution of both genera (Figure 4).

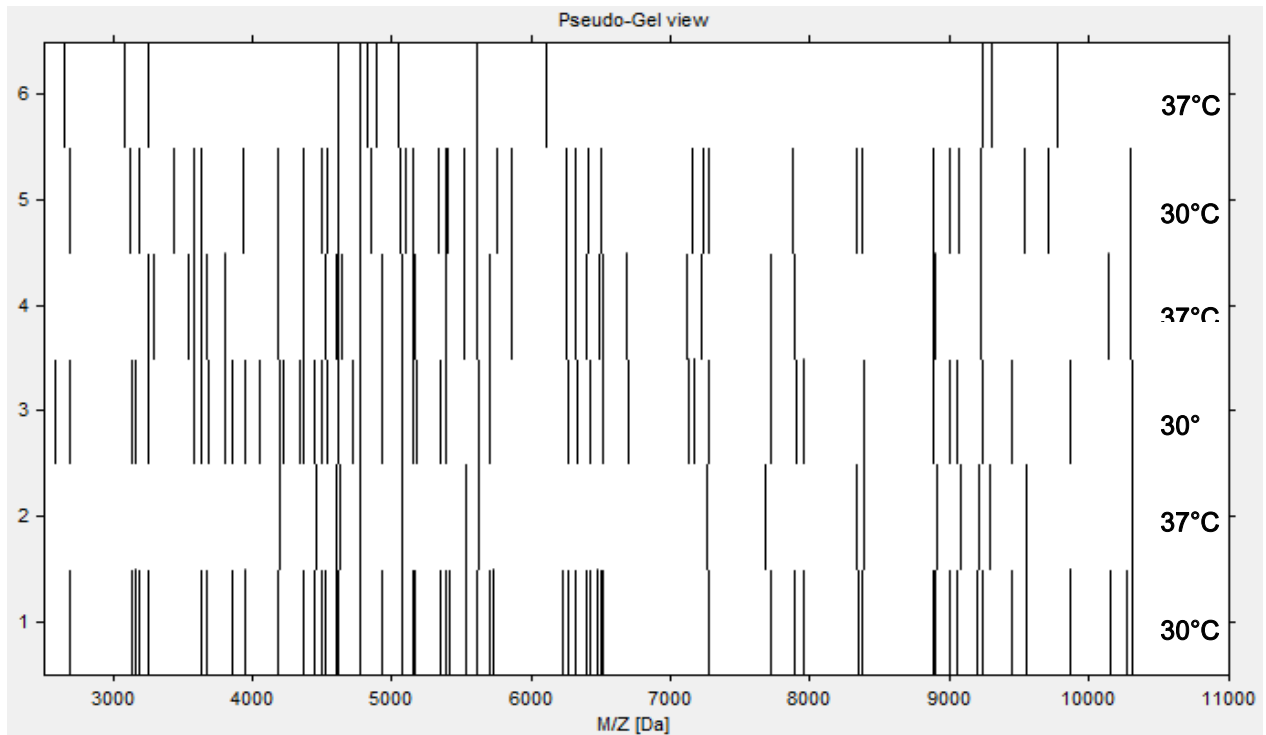


Figure 4: PseudoGel view (Biotyper™1.1) of six spectra representing 6 samples of two *E. coli* O157 (numbered 1, 2, 3, and 4) and one *E. coli* non-O157 (numbered 4 and 6) cultivated at 30°C (1, 3, 6) and at 37°C (2, 4, 5). Variable peaks in the six spectra were removed previously.

Such non constant peaks also have various intensities and various masses. Percentage of variable peaks removed for each isolate cultivated on Drigalski agar plate at 37°C was different for Lactose negative or Lactose positive strains and also depended on the *Shigella* species. For example, all lactose positive isolates had $\geq 55\%$ of variable peaks; however, lactose negative isolates had $\leq 45\%$. Moreover, 80% of isolates of either *S. sonnei* or lactose negative *E. coli* had $\geq 55\%$ of common peaks and 20% had $\geq 40\%$. Isolates of *S. flexnerii* was the species that had greatest number of peaks in common. Thus, we chose Drigalski medium for the cultures at 37°C of the two bacterial species and have eliminated peaks not reproducible on this medium for each strain (ex Figure 5). Moreover, it rapidly appeared that the smear procedure generated peaks with quite lower intensities than those acquired after protein extraction and may lead to more non constant peaks with lower intensities.

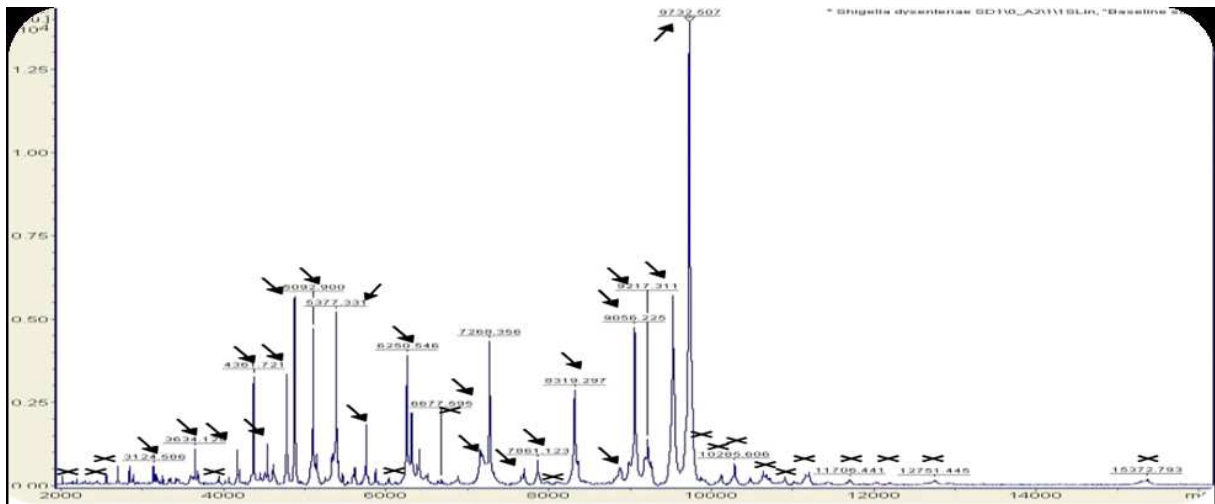


Figure 5: Example of final data retained after removing variable peaks. Here a strain of *Shigella dysenteriae*. Peaks designated by an arrow will be retained while others will be removed from the final spectrum.

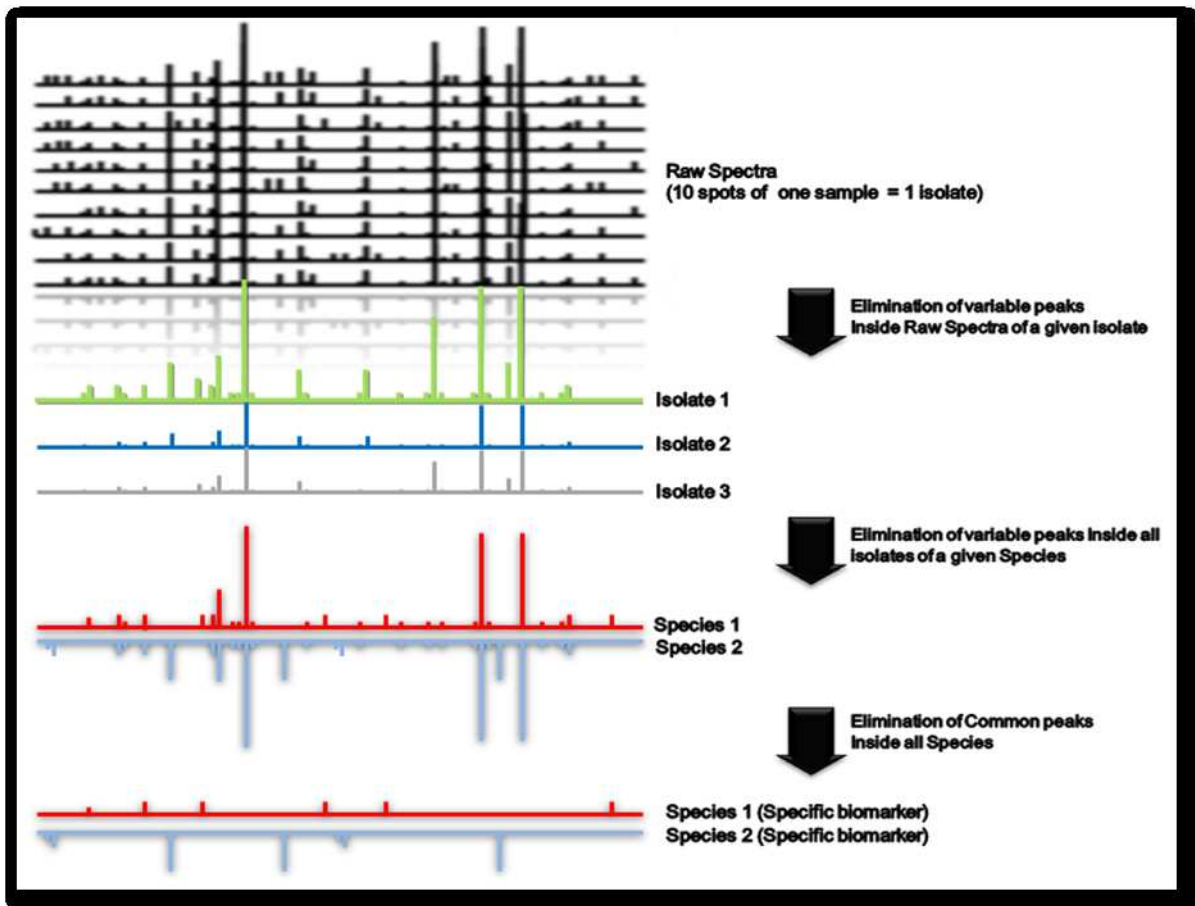


Figure 6: WorkFlow; Database creation & research for specific biomarkers in *E. coli* and pathogenic *Shigella* (Biotyper1.1™).

The frequency of peak's occurrence was visually examined within peak list of the 10 measurements. Consequently, variable peaks were removed from the main spectrum (processed raw spectra). Furthermore, a comparison between main spectrum of each isolate (for a given species) was established. Common peaks resulting from this comparison were

removed from each main spectrum. Remaining peaks were listed in the table 2 and constitute a specific m/z of each group (taxon).

Finally, a library was established using strains cultivated on Drigalski medium at 37°C and applying the protein extraction method for sample preparation. This specific library gathers strains listed in Table 1. The reference spectra in this library only contained peaks with 100% occurrence for the ten replicated MALDI-TOF measurements. The variability of intensities in the remaining peaks was not taken into account. The described procedure resulted in a library of reference spectra (MSP) that are highly representative for each isolate.

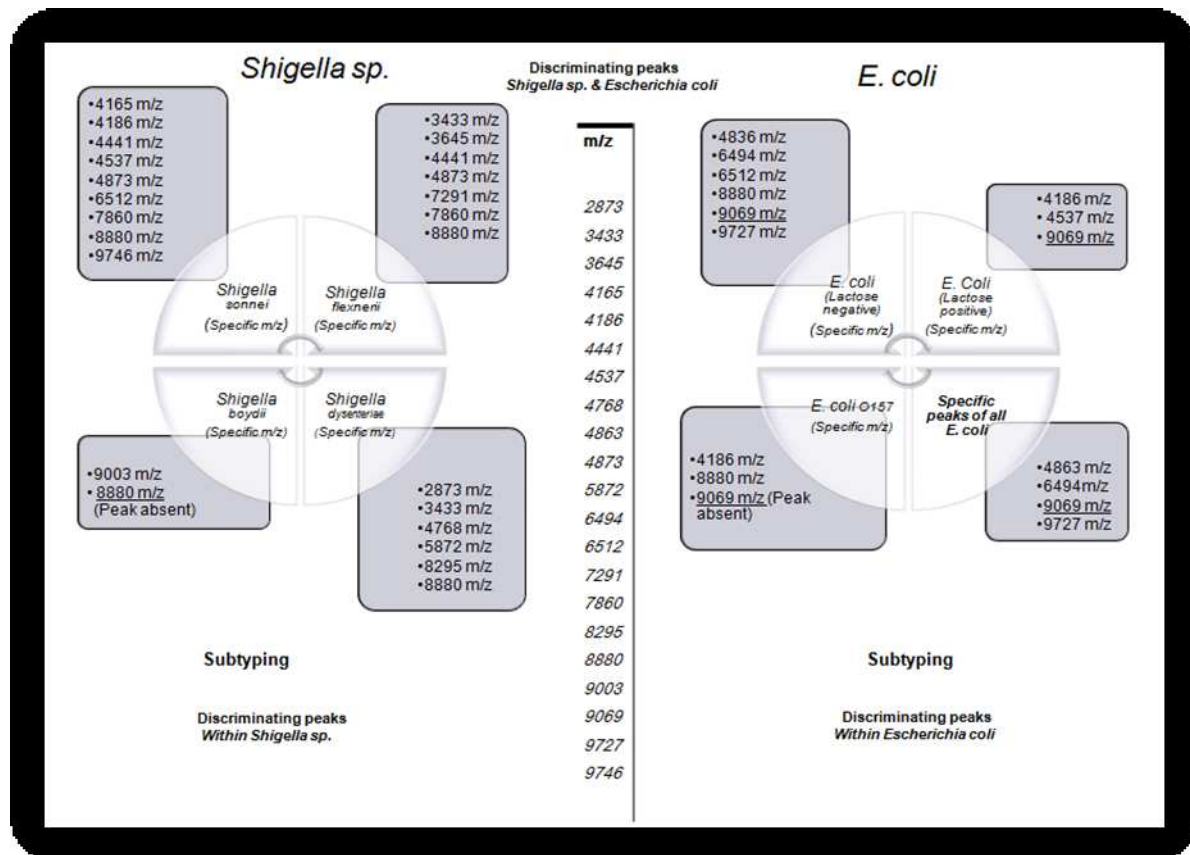
Isolates of the validation set were tested using our created & edited MSP database and/or tested by noting the presence or absence of m/z values (± 6 Da), listed in a dedicated table (Figure 7). The reference spectra (MSP) in this library only contained peaks with 100% occurrence for the ten replicated MALDI-TOF/MS measurements.

Decision Trees

When no singular biomarker for a group is available, the final identification of the group/isolate has to be done by subsequent rejections of group members in a decision tree (Figure 6 & 7).

Figure 7: List of discriminating peaks traced (2500 Da - 11000 Da) in different species of *Shigella* sp. & member of *E. coli*.

NB: these discriminating peaks are only obtained after the elimination of variable peaks within isolates and common peaks within



different species

New Database accuracy and the use of specific biomarkers

Using MALDI Biotyper™ coupled to our dedicated library, identification at the species level for the validation set (66 independent blinded isolates) was achieved. Mixed samples (2 samples), where each one contained (lactose negative *E. coli* & *Shigella flexnerii*) were tested. Dedicated database and log score calculation, allowed a correct identification of only one of them, here, lactose negative *E. coli* bacterium. However, the use of specific *m/z* (biomarkers) listed in the Figure 7 achieved the identification of both of them.

Overall, within monomicrobial sample we observed an identification accuracy of 100% for the 14 *Shigella flexnerii*, 2 *Shigella dysenteriae*, 4 *Shigella boydii*, the 13 lactose positive *E. coli* and the 2 *E. coli* O157 isolates. However, only 13/15 *Shigella sonnei* and 12/14 lactose negative *E. coli*, were correctly identified by using the new database. Using MSP database misidentifications occurred with two lactose negative *Escherichia coli* identified as *Shigella sonnei* and two *Shigella sonnei* as *Escherichia coli* (Table 1). These two groups seemed to be the most similar ones regarding their spectra. Biomarkers listed in the Figure 7 were able to separate the four misidentified strains (Figures 5, 6). Peaks at 4186 and 4537 Da were present in spectra of lactose negative *E. coli* and not in lactose positive *E. coli*. However, these last two peaks were also found in *Shigella sonnei*, and one of them (the peak 4186) was found in *E. coli* O157. As shown in the proposed workflow (Figure 6 & 7), spectra investigation revealed that all lactose positive *E. coli* isolates harbor four combined specific peaks of 4863, 6494, 9069 and 9727 Da, which are neither present in lactose negative *E. coli* nor in other *Shigella* species. The peak 9069 also is present in lactose negative *E. coli*.

In addition, comparison of different spectra of the non-O157 clinical isolates and ten O157 *E. coli* strains (all lactose-positive) revealed a very prominent ion peak at *m/z*~9069 which is absent from spectra of *E. coli* O157 strains (Table 2 & Figure 7). Results of identification by the New Database allowed a good distinction of *E. coli* O157.

Tentative typing of bacteria

Ribosomal proteins represent a significant part of the protein content of bacterial cells; because of their abundance and as they are basic proteins. They can easily be ionized and detected by MALDI-TOF MS (23). Although the amino acid sequences of ribosomal proteins are highly conserved, slight sequence variations occur even at the subspecies and strain level (24). Based on the fact that *E. coli* and the different *Shigella* species, according to various molecular analytic methods, should be fused in one single species (3, 7, 8, 9,10,11), the differentiation of *Shigella* species and *E. coli* could be considered based on variable but reproducible peaks inside a given species.

For a given isolate, more than 50% of the mass peaks showed variability from spots to spots. Peaks common and constant in all investigated strains of a given (sub-) species of the present study (45 *E. coli*, 4 *Shigella dysenteriae*, 22 *Shigella flexneri*, 20 *Shigella sonnei*, and 7

Shigella boydii) are important for bacterial identification, but their elimination inside a given species could serve as a valuable tool for typing bacteria (Figure 7).

We effectively found that between 22 and 35 peaks, according to each species, are highly reproducible for isolates of a single species. Lactose positive *E. coli* isolates beared 22 /34 peaks in common (36% of variable reproducible peaks), *E. coli* lactose negative 29/55 peaks (47% of variable reproducible peaks), *S. flexnerii* 32/57 peaks (44% of variable reproducible peaks), *S. sonnei* 33/53 peaks (38% of variable reproducible peaks), *S. boydii* 34/48 (30% of variable reproducible peaks) and *S. dysenteriae* 35/47 peaks (26% of variable reproducible peaks). These variable peaks for isolates of each species were analyzed by clustering methods, available in the prototype BioTyper 1.1. Clustering parameters for the creation of a dendrogram of classification was as the following: Ward's method (as a linkage method), and similarity scoring methods such as Euclidean (as a distance measure), with score threshold for non related organisms = 1000 and score threshold for a related organism = 0 (Figure 8).

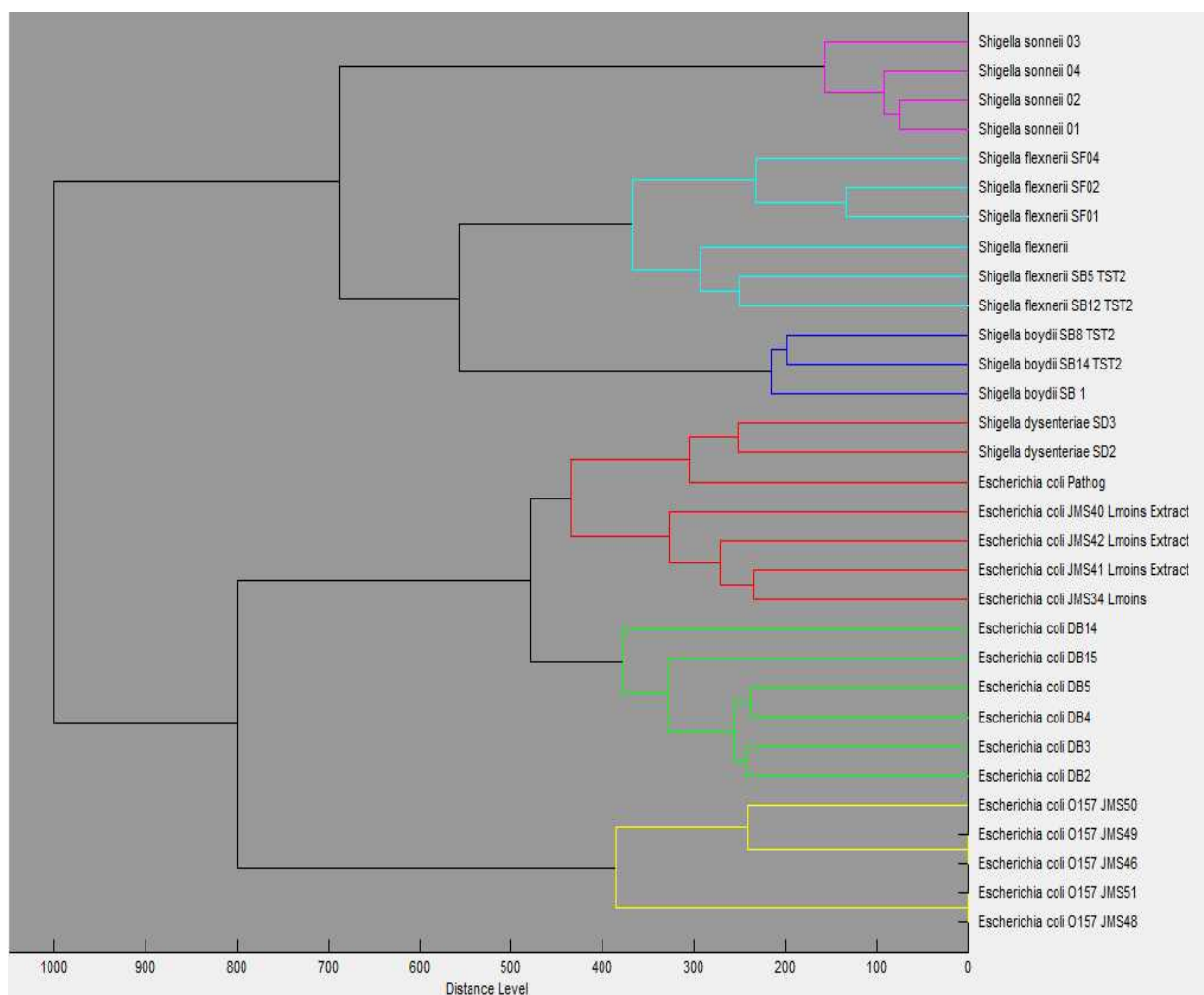


Figure 8: Cluster analysis by MALDI-TOF/MS Biotyper™1.1 facilities spectra of 32 strains used to construct database.

Shigella sp and *E. coli* were not separated into two distinct clusters, one for *E. coli* and the other for *Shigella sp*, but bacterial isolates of a given (sub)-species remained gathered in

distinct clusters having more than 30% dissimilarity. Isolates of given species often showed more than 80% similarity.

Discussion

Differentiation of *Shigella* species from *Escherichia coli* remains fastidious for a number of laboratories. It involves extended biochemical and serotyping methods, and is mostly solved by submitting isolates to specialized laboratories or by specific DNA sequencing. In fact, both enteroinvasive *E. coli* and a large majority of *Shigella* are lactose negative and non motile, low level indole producers and may not be gas producers during fermentation. Despite a set of carbohydrates may be tested for fermentation by *E. coli* vs *Shigella* sp, they cannot firmly determine *E. coli* and do not easily distinguish amongst *Shigella* species. Evidence of *Shigella* is most often obtained by antigen O serotyping or by molecular methods that suppose several subcultures before diagnosis inducing delay of identification while outbreaks may spread. *E. coli* and *Shigella* species can be differentiated by a large plasmid. Thus, a number of metagenomic analyzes can solve such an identification, but with delay (25, 26, 27, 28, 29). Thus, these features deserve a mass spectrometry approach to rapidly distinguish these species. Discreet proteins, provided they are expressed during exponential growth phase may participate to the scoring identification of such bacteria. A previous study tested mass spectrometry for *Shigella* identification through a number of details linked to the procedure (19). The authors revealed that parameters, such as culture broths, number of subcultures, influence the content of mass spectra. Other authors confirmed spectra variations related to environmental and other factors (31, 32). Finally, they were almost able to gather 9/10 *S. boydii* isolates, but did not gather *S. flexneri*, and did not proof any accurate identification for both species. A typing procedure for the differentiation subspecies of *Lactococcus lactis* consisted in the removing of peaks having less than 20% of the maximal intensity (33). However, authors were not able to distinguish *L. lactis subsp lactis* from *L. Lactis subsp cremoris*, but extended examination identified 12 peptides issued from ribosomal proteins that were specific of two subspecies, as it was earlier reported for other bacteria (30). A more recent work efficiently identified *Listeria* species after removing common peaks between considered species before the scoring procedure. In parallel, works that consisted in establishing a rough reproducibility generated the repeat of cultures and/or loads showed some limits in the significance of the results (19, 20).

Nevertheless, mass spectrometry and Biotyper™1.1 offer the advantage of the comparison for various information issued from bacterial genomes, whereas most of actual methods only screen bacteria through a unique or few features.

Our goal was first to consider individual isolates and create a specific database containing a series of mass spectra cleaned from colony to colony variable peaks when originating from a

single isolate. This was achieved through a visual inspection of peaks having more than 0.1% of the larger intensity of peaks.

Prior to such an inspection, and in order to get basic but rich mass spectra that can be the most reproducible, incubation time, temperature, culture media were considered as important in such reproducibility (16, 31, 32, 34, and 35). Common optimal conditions were deduced for both *E. coli* and *Shigella* species that allowed determine constant and variable peaks for each of the 32 isolates considered through the present work. It rapidly appeared that variable (non reproducible) peaks represent from 26% to 47% of the total peaks recorded, according to isolates and species arbitrarily included in the library. Reduced spectra of each isolate compared to another isolate kept heterogeneity at the species level. The percentage of common peaks inside a given species ranged from 10% to 57% according to species.

This study partially matches that of Lukjancenko et al., 2010(25) who compared 61 genomes of different *E. coli* & *Shigella sp* and showed that size and number of genes varies extensively. These size differences mean that about only one million nucleotides (approximately 20% of a genome) can be absent in one *E. coli* or *Shigella* isolate and present in another. Moreover, the core of *E. coli* genomes (slightly less than a thousand genes) represents only a fifth of a typical *E. coli*. Many of the accessible or variable genes, making up more than 90% of the pan-genome and roughly four fifth of a typical genome, are often found co-localized on genomic islands. The diversity within the species represents a broad set of functions for adaptation to many different environments.

After removing variable peaks, the constant, thus, reproducible ones allowed the identification with satisfying scores for 51 isolates distributed in the four pathogenic *Shigella* species from 39 *E. coli* isolates (of various origins), using default parameters of the Biotyper™, except for *Shigella sonnei* and *E. coli* that remained confused at first. Within polymicrobial samples, Biotyper™ is able to identify one bacterium using created database, however the use of specific m/z allows the identification of both bacteria present in the polymicrobial sample. Integration of such a procedure would easily consider colonies grown onto Drigalski medium and might be applied onto lactose-negative *E. coli*. For such colonies, multiple distinct spectra from a single isolate and a mean spectrum should be acquired by using parameters cited above. The resulting spectrum would be automatically cleaned for already recorded variable peaks, before to be compared to the promoted data library or to the list of specific m/z. Therefore, this introduces a secondary procedure parallel to that already available by Biotyper. Actually, albeit a very sensitive method for genus and species differentiation, MALDI-TOF / MS-based methods remains rarely reported for strain characterization (15, 33, and 36). The removing of common peaks inside a given species from reproducible spectra led to tertiary spectra that only contain species-variable peaks. This stuff allowed a specific and robust

comparison between isolates of a given species, and was applied to cluster analysis of isolates (2D, 3D, Dendrogram, Pseudo gel...etc). This allowed differentiation of each species as well as it can be used to determine which peaks should be investigated for further biomarker identification by MALDI-TOF / MS. Such refinements of the spectra allowed cluster pathogenic *Shigella* species and *E. coli*, and inside *E. coli*, the O157:H7 group of isolates was also clustered. Another approach has recently been used to differentiate closely related strains, including twenty-five different strains of *Escherichia coli*. The identities of some of the proteins, which give rise to the ions in the mass spectra from bacterial cells, have been reported (37). Our analysis of different spectra of the clinical isolates non-O157, and nonpathogenic *E. coli* strain shows a very prominent ion peak at m/z ~9069 which is absent from spectra of *E. coli* O157 strains. This result confirmed what previously published by Fagerquist & Mandrell *et al* (37) who identified this peak as the acid stress chaperone-like protein HdeB using MALDI-TOF / MS and bottom-up proteomics or gene sequencing techniques. Furthermore, we observed, that this peak is shared by other *Shigella spp*. This peak could serve as a negative biomarker for the distinction between *E. coli* O157 and non-O157 serotype as reported by Mazzeo et al (38), and *Shigella sp*.

In conclusion, an adapted procedure of MALDI-TOF/MS was developed for the successful and rapid identification and comparison of *Shigella spp* and *E. coli* strains (7, 8, 9, 10). This was only possible by creating an original database where recorded spectra were customized to become highly reproducible and specific of each isolate. Moreover, *Escherichia coli* lactose positive vs lactose negative or pathogenic O157 *E. coli* and *Shigella sp* isolates can be nonetheless identified on the basis of sets reproducible specific peaks. Probably, such an approach developed for Shigella/*E. coli* group can also be applied for other typing applications. Differentiation between isolates of considered species were compared by considering reproducible and only variable peaks of that given species. The latter approach should be proven of interest in other studies concerning clinically related isolates.

Proposed WorkFlow for the Creation and the Use of fine identification / Subtyping Database

First Step (spectra with reproducible peaks)

Creation of MSP (number of spots is important for further investigation of highly specific peaks)

1. Get all spectra of all samples (10 spots /strain/each species)
2. Remove any variable peaks existing from spots to spots that represent a given strain
3. collect and compare all spectra of all strains that represent a given species, then only retain common peaks that definitely represent specific peaks of the given species
4. Compare common peaks from considered species and only retain those that remain peculiar of a given species. See Figure 7 (list of specific m/z).

Second Step

Screening samples for specific peaks and identification

Specific Peaks could be used in two different ways

1. The presence or absence of a peak: if it concerns only one group, this would be a specific biomarker for this group, and any unknown spectrum contains this peak should belong to this group
2. Non unique peak: if it's the case for a given group, it could be used to rule out a group: when this peak doesn't appear in the unknown spectrum, its membership to the concerning group is rejected and so on...
3. Mixed colonies : by the same way using specific biomarkers in the table, screening could shows the presence of two bacteria if both specific m/z are present in unknown spectrum.

Acknowledgments

We wish to thank Catherine Rieder from BIO67 for strains provided and also Patrice Nordmann from Service de bactériologie-virologie de l'hôpital de Bicêtre, Faculté de médecine Paris-Sud, for reference isolates. We thank also bruker Daltonics for strains provided & their collaboration. This work was supported with grants from EA4438, Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales. W. Moussaoui is funded by Région d'Alsace.

REFERENCES

1. Pupo, G. M., R. Lan, and P. R. Reeves. 2000. *Multiple independent origins of Shigella clones of Escherichia coli and convergent evolution of many of their characteristics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10567-10572.
2. Toma C, Nakasone N, Iwanaga M. Sensitive and rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by a loop-mediated isothermal amplification method Tianyan Song *, FEMS Microbiology Letters 243 (2005) 259–263 Lan R, Lumb B, Ryan D, and Reeves P R. *Molecular Evolution of Large Virulence Plasmid in *Shigella* Clones and Enteroinvasive *Escherichia coli* Infect Immun. 2001 October; 69(10): 6303–6309.
3. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. *Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201.
4. Lan, R., and P. R. Reeves. 2002. *Escherichia coli in disguise: molecular origins of Shigella. Microbes Infect.* 4:1125-1132.
5. Shiga, K. 1897. *Sekiri byogen kenkyu hokoku dai-ichi (first report on etiologic research on dysentery). Saikingaku Zasshi* 25:790-810
6. Fukushima, M., K. Kakinuma, and R. Kawaguchi. 2002. *Phylogenetic analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli strains on the basis of the gyrB gene sequence. J. Clin. Microbiol.* 40:2779-2785
7. Ochman, H., T. Whittam, D. A. Caugant, and R. K. Selander. 1983. *Enzyme polymorphism and genetic population structure in Escherichia coli and Shigella. J. Gen. Microbiol.* 129:2715-2726.
8. Pupo, G. M., D. K. Karaolis, R. Lan, and P. R. Reeves. 1997. *Evolutionary relationship among pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. Infect. Immun.* 65:2685-2692.
9. Rolland, K., N. Lambert-Zechovsky, B. Picard, and E. Denamur. 1998. *Shigella and enteroinvasive Escherichia coli strains are derived from distinct ancestral strains of E. coli. Microbiology*
10. Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB., and Reeves PR.. Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. Infect Immun. 2004 September; 72(9): 5080–5088.
11. Kotloff, K. L., J. P. Winickoff, B. Ivanoff, J. D. Clemens, D. L. Swerdlow, P. J. Sansonetti, G. K. Adak, and M. M. Levine. 1999. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull. W. H. O. 77:651-666.
12. Fenselau, C. 1994. Mass spectrometry for the characterization of microorganisms. American Chemical Society, Washington, DC.
13. Shah HN, Keys CJ, Schmid O & Gharbia SE (2002) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. Clin Infect Dis 35: S58–64.
14. Krishnamurthy, T., Ross, P.L., Rajamani, U., 1996. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 10, 883–888.

15. Wunschel SC, Jarman KH, Petersen CE, Valentine NB, Wahl KL, Schauki D, Jackman J, Nelson CP, White ET. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2005b;16:456–462
16. Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay, J.O., 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1227– 1232.
17. Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol.* 2011 Jan;301(1):64-8
18. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M & Shah HN (2004) Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol*4: 221–242
19. Claydon, M.A., Davey, S.N., Edward-Jones, V., Gordon, D.B., 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 14, 1584– 1586.
20. Majcherczyk, P. A., McKenna, T., Moreillon, P. and Vaudaux, P. (2006), The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 255: 233–239.
21. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, Prévost G. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Nov;16(11):1631-8
22. Teramoto, K., H. Sato, L. Sun, M. Torimura, and H. Tao. 2007. A simple intact protein analysis by MALDI-MS for characterization of ribosomal proteins of two genome-sequenced lactic acid bacteria and verification of their amino acid sequences. 2007. *J. Proteome Res.*6:3899-3907.
23. Ilna EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, Svistunova TS, Gazarian AO, Maier T, Kostrzewa M, Govorun VM. 2009. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. *J Mol Diagn.* 2009 Jan;11(1):75-86
24. Lukjancenko O, Wassenaar T M., Ussery DW..2010. Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes. *Microb Eco*60(4) 708.
25. Pupo GM. , Lan R , and Reeves PR. .2000. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics .*PNAS September 12, 2000 vol. 97 no. 19 10567-10572.*
26. Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. 2004. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):5080-8.
27. Hallin PF, Binnewies TT, Ussery DW .2008. The genome BLAST atlas—a GeneWiz extension for visualization of whole-genome homology. *Mol Biosyst* 4:363-71 (2008), 2008.
28. Gregory E. Sims and Sung-Hou Kim.2011. Whole-genome phylogeny of *Escherichia coli*/*Shigella* group by feature frequency profiles (FFPs) .*PNAS May 17, 2011 vol. 108 no. 20 8329-8334*
29. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001;20:157–171.
30. Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:58–64

31. Wunschel DS, Hill EA, McLean JS, Jarman K, Gorby YA, Valentine N, Wahl K. Effects of varied pH, growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on matrix assisted laser desorption/ionization whole cell protein fingerprints. *J Microbiol Methods*. 2005a;62:259–271
32. Tanigawa K, Kawabata H, and Watanabe K. 2010. Identification and Typing of *Lactococcus lactis* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2010 June; 76(12): 4055–4062.
33. Mellmann A, Binet F, Bizet *Cet al*. High interlaboratory reproducibility of MALDI-TOF mass spectrometry based species identification of non-fermenting bacteria. *J Clin Microbiol*2009; 47 : 3732–3734.
34. Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Gantt SL, Jarman KH, Kingsley MT, Wahl KL. Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13:1580–1585.
35. Bright JJ. , Claydon MA., Soufian M, Gordon DB. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-f light mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of Microbiological Methods* 48 (2002) 127–138
36. Fagerquist CK., Garbus BR., Miller WG., Williams KE., Yee E, Bates AH., Boyle S, Harden LA., Cooley MB. and Mandrell RE. Rapid Identification of Protein Biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight-Time-of-Flight Mass Spectrometry and Top-Down Proteomics. *Anal. Chem.*, 2010, 82 (7), pp 2717–2725
37. Mazzeo MF, Sorrentino A, Gaita M, Cacace G, Di Stasio M, Facchiano A, Comi G, Malorni A, Siciliano RA. 2006. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Feb;72(2):1180-9.

3.6.6. Discussion de l'ARTICLE 4 : Discrimination des *E. coli* vs *Shigella* sp

Actuellement, un milieu de culture spécifique tel que le milieu Drigalski peut différencier facilement et phénotypiquement les *E. coli* dites lactose positives, les négatives et les *Shigella*. Cependant, 5 à 10% des *E. coli* rencontrées dans les laboratoires d'analyses ne sont pas lactose positives. Toutes les *Shigella* sont lactose négatives, non mobiles et possèdent un niveau faible de production d'indole. Elles ne produisent pas de gaz (CO₂) pendant la fermentation. Un ensemble de carbohydrates peuvent être testés pour l'étude des fermentations d'*E. coli* vs *Shigella* sp, mais ne peut déterminer fermement *E. coli* et ne peuvent facilement distinguer parmi les espèces de *Shigella*.

L'identification des *Shigella* est maintenant principalement obtenue par le sérotypage de l'antigène O. Alors que les espèces ou le genre *Shigella* peuvent être différenciés par un grand plasmide de 220 kb [152] [153] [154] [155][156] [157] .

L'identification bactérienne par la spectrométrie de masse type MALDI-TOF/MS est principalement soutenue par les protéines abondantes. Les études réalisées sur l'identification des *Shigella* sont rares du fait du profil spectral très proche d'*E. coli*.

Une étude précédente a testé MS pour l'identification de *Shigella* à travers un certain nombre de détails liés à la procédure[142] . Les auteurs ont révélé que les paramètres, tels que les milieux de culture, le nombre de sous-cultures, peuvent influencer le contenu et la qualité des spectres de masse. D'autres auteurs ont confirmé les variations des spectres liés à des facteurs environnementaux et autres facteurs[155][158] .

Le but de notre étude était d'examiner d'abord les isolats individuels et de créer une base de données spécifique contenant une série de spectres de masses nettoyés des pics variables au sein du même extrait protéique, mais aussi au sein de colonies différentes provenant d'un seul isolat. Cela a été réalisé par une inspection visuelle des pics ayant plus de 0,1% d'intensité de pics et à travers des logiciels tels que (Flexanalysis™) et Biotyper™1.1 (Bruker Daltonics). Des conditions optimales communes ont été déduites pour *E. coli* et *Shigella* qui ont permis de déterminer les pics constants et variables pour chacun des isolats considérés à travers le présent travail. Il est rapidement apparu que les pics variables (non-reproductibles) représentent de 26% à 47% des pics enregistrés selon les isolats arbitrairement inclus dans la bibliothèque. La réduction des spectres de chaque isolat par rapport à un autre isolat a montré une hétérogénéité conservée au niveau de l'espèce. Le pourcentage de pics communs constaté entre les isolats est de 10% à 57% selon les isolats et les espèces.

Notre conclusion, corrèle avec l'étude de Lukjancenko *et al.*, 2010[152] . Ces auteurs ont comparé les génomes de 61 *E. coli* et *Shigella sp* différents et ont montré que la taille et le nombre de gènes varie beaucoup. Ces différences de taille signifient que près d'un million de nucléotides (environ 20% d'un génome) peut être absent chez *E. coli* ou des isolats de *Shigella*. En outre, le noyau génique d'*E. coli* (un peu moins d'un millier de gènes) représente environ un cinquième du génome d'une bactérie *E. coli* typique qui contient près de 5000 gènes. Beaucoup des gènes accessibles ou variables, soit plus de 90% du pan-génome (à peu près quatre cinquièmes d'un genome typique), sont souvent co-localisés sur des îlots génomiques. La diversité au sein de l'espèce représente un éventail large de fonctions permettant l'adaptation à de nombreux environnements différents.

La suppression des pics variables pour les spectres d'un isolat généré nous a conduits à les réduire à nouveau de leurs pics communs à l'intérieur d'une espèce donnée. Par conséquent, ces spectres ne contiennent plus que des pics variables trouvés dans les différentes espèces étudiées. Cela a permis une comparaison précise et robuste, qui nous a permis de lister un tableau de différents biomarqueurs également disponibles pour l'identification bactérienne, mais aussi utiles pour les analyses typologiques des isolats (2D, 3D, Dendrogramme, gel de pseudo ... etc.). De plus, un tel raffinement des spectres a permis de classer les *Shigella* et *E. coli*, et, à l'intérieur des *E. coli*, le groupe des isolats *E. coli* O157: H7 a également été regroupé en un cluster séparé.

Notre analyse des différents spectres des isolats cliniques d'*E. coli* O157 et les isolats non pathogènes montrent un pic très important à m/z 9069, qui est absent chez les *E. coli* O157. Ce résultat confirme ce qui a précédemment été publié par Fagerquist & Mandrell et al.,[159] qui ont identifié ce pic comme étant une protéine de stress (acide chaperon-like HdeB) en utilisant MALDI-TOF/MS et la protéomique bottom-up ou des techniques de séquençage. En outre, nous avons observé, que ce pic est partagé par d'autres *Shigella spp.* Ce pic pourrait servir de biomarqueur négatif pour la distinction entre *Shigella sp*, *E. coli* O157 et le sérotype non O157 tel que rapporté par Mazzeo *et al.*,[160] , mais en combinaison à des pics *E. coli* et *Shigella sp* spécifiques.

En conclusion, nous rapportons ici la première utilisation de MALDI-TOF/MS qui permet d'identifier et analyser les *Shigella spp* et les souches *E. coli*, bien qu'elles constituent un groupe bactérien étroitement lié tel que rapporté par différentes technologies[153] [154] [161] [162] [163] [164] .Cela n'a été possible que par la création de bases de données originales et des biomarqueurs spécifiques à l'espèce, lorsque les spectres enregistrés ont été traités pour devenir hautement reproductibles et spécifiques des isolats.

Les pics communs dans une espèce donnée, sont aussi non significatifs pour les besoins de classement des isolats d'une espèce. Un algorithme qui permet le screening des biomarqueurs listés dans le tableau pourrait donner une identification rapide et correcte sans avoir recours à l'utilisation d'un score de fiabilité (log score).

Une telle approche développée pour *Shigella* /groupe *E. coli* peut certainement être utilisée pour d'autres applications de typage.

3.7. ARTICLE 5 : Typage des *S. aureus*

3.7.1. *Staphylococcus aureus* et application du MALDI-TOF à l'épidémiologie

Cette bactérie est la plus souvent isolée en bactériologie hospitalière. Elle est également responsable de nombreuses infections nosocomiales qui nécessitent une surveillance épidémiologique régulière et efficace. Tenover *et al.*, [165] ont comparé douze techniques de typage phénotypique et génotypique sur un lot de cinquante neuf souches testées par huit équipes. Ils concluent qu'aucune méthode de typage ne prévaut clairement sur les autres et suggèrent que l'emploi de deux méthodes combinées serait plus efficace. Ainsi, la variabilité qu'offre toute méthode de typage a son intérêt.

Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude concernant *Staphylococcus aureus*, avec la collaboration d'une équipe de Bénin (83 souches de *S. aureus*) où une épidémie staphylococcique a été observée dans un village Béninois (Hlagba Ouassa). Ces *Staphylococcus* ont provoqué majoritairement deux maladies (Pyomyosites et Ostéomyélites). Dans cette étude, nous nous concentrons sur les cas de pyomyosites (63 souches), toutes les souches prélevées de différents patients ont été analysées par spectrométrie de masse, et les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus par l'électrophorèse en champ pulsé, qui reste une méthode de référence pour le typage des bactéries. Elles ont aussi été typées par la technique de MLST (multilocus sequencing typing).

Simultanément, le dépistage de SARM ou SASM a été réalisé chez des parents proches, partageant la même habitation que les malades, pendant trois mois avant le début de l'étude. Parmi les 56 malades, 31 malades et 14 de leurs parents proches ont été également dépistés par écouvillonnage des narines pour le portage de SARM ou SASM. La LPV a été recherchée sur toutes les souches de *S. aureus* isolées. Trente-une étaient issues des prélèvements de pus de myosites dont 100%. Onze souches sont en portage nasal des mêmes malades. 15 souches de *S. aureus* toutes SASM ont été isolées dans les prélèvements de dépistage (nasal et lésion cutanées) chez les parents des malades. Les facteurs pouvant faciliter l'acquisition des souches de *S. aureus* étaient la promiscuité, le degré de dépendance des malades, la présence de lésions cutanées, l'insuffisance de l'hygiène liée au faible accès à l'eau et au savon. La LPV chez les cas pyomyosites est produite par 57 isolats/63 soit 90,47% des souches de SASM isolées. La proportion de SASM virulentes parmi les isolats de *S. aureus* issus des pyomyosites, est très élevée et traduit l'insuffisance des mesures de prévention au niveau communautaire.

L'électrophorèse en champ pulsé reclasse ces 63 souches indépendantes (patients et parents associés) en 21 pulsotypes différents. Ces pulsotypes se composent de 8 à 15 fragments d'ADN résolus entre 50 et 650 kb. Selon les critères de Tenover pour la distinction des

souches clonales, il est possible de reclasser les 21 pulsotypes en 20 clones indépendants et donc, 20 groupes de souches homologues à d'autres.

L'analyse des profils de restriction par l'enzyme *SmaI* des souches pyomyosites (31 souches prélevées chez les patients) a révélé une grande diversité clonale avec 11 profils électrophorétiques uniques (Voir Article ci-dessous). Ces pulsotypes ont été classés de S1 à S11. Selon les critères de Tenover, 10 clones peuvent être identifiés (exp: pulsotype S10 et pulsotype S11 ne diffèrent entre eux que par 3 bandes). Le pulsotype S2 était le profil le plus fréquemment rencontré (29,03% des isolats, 9/31 isolats). Parmi tous les isolats appartenant à ce pulsotype S2, une seule souche ne produit pas d'entérotoxine SEB. Parmi les souches de pyomyosites, quatre (15BE, 12BE, S75H & CA1E) des 31 isolats ne sont pas producteurs de LPV et l'un de ces isolats ne produit pas d'entérotoxine SEB (S75H). Seulement 19,35% des isolats produisent les entérotoxines SEA & SEH, et les 58,06% restants étaient SEB positifs.

Tous les isolats appartenant au pulsotype prédominant (S2) ont été sélectionnés pour être typés par MLST, mais aussi un isolat représentant de chaque pulsotype trouvé par ECP. En tout, 25 isolats ont été sous-typés par MLST et 5 clones ont été observés :

- Le clone ST1 (5 souches) avec le *spa* 127
- Le clone ST5 (1 souches) avec le *spa* 311
- Le clone majoritaire ST121 (16 isolats/25) *spa* 314 (14 souches), le *spa* 2304 (1 souche), le *spa* 4198 (1 souche)
- Le clone ST377 (1 souches) avec le *spa* 4690 (1 souche)
- Le clone ST2019 est un nouveau ST décerné par les conservateurs du site MLST et il n'a aucun lien avec les autres clones *spa* 8073.

Une souche reste non typable (S75H) par *spa*. Elle fait partie du faible pourcentage de souches non typables par *spa*.

Au total, nous pouvons conclure qu'environ 2/3 des souches forme un clone majoritaire, le 1/3 restant est réparti entre au moins en quatre génotypes.

1/13 des isolats appartenant au pulsotype (S1) étaient ST121 par MLST, une souche était non typable et l'autre appartient au *spa* ST377. Cette dernière souche en fait provient d'un isolement d'ostéomyélite, qui pourrait expliquer la différence de type *spa*. Toutefois, d'autres isolats appartenant au clone ST121 ont été trouvés dans des pulsotypes ECP différents (S5, S13, S8, S10, S6, S22, S14, S11).

Le Pulsovar S2 par PFGE contient 12 isolats pyomyosites, où 11 ont été considérés comme un clone unique par MLST (ST121) et l'autre représente un clone non typable par MLST. Ici, par MALDI-TOF/MS, les mesures de distance entre les différentes souches (2D,

CCI, Dendrogrammeetc.) montrent que ce pulsotype contient quelques isolats hétérogènes, en fait, 6 groupes ont été retrouvés (6 clones peut-être) (voir article suivant).

3.7.2. ARTICLE 5 (En Préparation): Typage des *S. aureus*

Community-Associated *Staphylococcus aureus* Prevalence, during an outbreak of pyomyositis in a village community (Hlagba Ouassa) in Benin.

Baba Moussa. L*¹, Ahoyo. TA*³, Moussaoui. W*², Keller.D*², Riegel.P*², Vandenesch.F*⁴, Prévost. G*²

1. Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin

2. Faculté de Médecine, EA4438 Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Institut de Bactériologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France.

3. Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, faculté des sciences et techniques, université d'Abomey-Calavi, 04BP0320 Cotonou, Bénin.

4. Centre National de Référence des staphylocoques, INSERM U851, IFRI28, Université Lyon 1, rue Guillaume Paradin, Lyon Cedex 08, France.

* Correspondence: EA-4438 Faculté de Médecine, 3, rue Koeberlé, 67000, Strasbourg. Tel: (33)03 68 85 37 57, Fax: (33) 03 68 85 38 08, Email: prevost@unistra.fr

ABSTRACT

The investigation of community-associated *Staphylococcus aureus* (CA-SA) from 33 patients concerned by pyomyositis infections in Hlagba Ouassa, Benin, during one month from November 21, 2008, to December 24, 2008 revealed swelling, warm muscles / or indurations. The alteration of general condition was observed in all patients. Hematologic and bacteriological examinations revealed 31 methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA). Fifteen isolates of *S. aureus* were obtained from anterior nares and accessory lesions of patients. The nasal and perinea screening among parents or relatives yielded 14 MSSA isolates issued from 19 individuals. Susceptibility to antimicrobials, by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), toxin typing, spa, Multilocus sequence typing and a new MALDI-TOF mass spectrometry process, were applied to characterize these MSSA isolates. Among 63 considered isolates, 57 (90.47%) produce Pantone-Valentine leucocidin, 32/63 (50%) produced Enterotoxin SEB and 10/63 (15.87%) produced Enterotoxins SEA & SEH; others were negative for all tested enterotoxins. All the 57 isolates were MSSA. Overall 63%, 14% and 22% were drug resistant to Penicillin, Tetracyclin, Trimethoprim-sulfamethoxazole, respectively. PFGE evidenced 18 different pulsotypes/clones for 46 pyomyositis-originating isolates. A predominant pulsotype S2 gathered 12 isolates (28%). spa typing analysis, and Multilocus sequence typing performed on a selected number of isolates (n=25) associated with pyomyositis revealed ST121-MSSA as a frequent form of CA-MSSA causing pyomyositis, while harboring S2, S6, S8, S10, S11, S13 and S18 pulsotypes. The most common spa types were t314 (14 isolates), and t127 (9 isolates), but t2304, t4198, t4690 and t8073 were represented once. MALDI-TOF of variable and reproducible peptide masses was able to discriminate amongst both pulsotypes and MLST clones. Pyomyositis is an endemic in Benin was, at evidence, caused by several clones of Pantone-Valentine Leucocidin producing - Community Acquired-MSSA. The acquisition of such *S. aureus* isolates were due to skin lesions, lack of privacy, dependency of the patients, poor hygiene.

Keywords: Pyomyositis, Pantone-Valentine leucocidin, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MALDI-TOF

INTRODUCTION

A broad variety of infections, ranging from minor skin infections to post-operative wound infections can be caused by *Staphylococcus aureus* (Lowy et al., 1998 & 2003; Martinez et al., 2004). *S. aureus* exerts virulence through a series of factors, among which production of Panton and Valentine leukocidin (PVL) and Enterotoxins SEs (Lina et al, 1999; Vandenesch et al., 2003; Gonzalez et al., 2005, Baba-Moussa et al., 2011, Hennekinne et al., 2011; Kim et al., 2011) remain most regarded features. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), *S. aureus* protein A (spa), multilocus sequence typing (MLST) (Enright et al., 2000; Harmsen et al., 2003; and Murchan et al., 2003), and SCCmec typing are frequently used for isolates characterization (Aires de Sousa & De Lencastre, 2004). At early 1960s dissemination of MRSA clones were hospital-associated (HA-MRSA) (Jevons 1964; Ito et al., 2001). However, from the late 1990s, community-associated MRSA (CA-MRSA) clones emerged worldwide, especially SCCmec type IV, V or VII (Vandenesch et al, 2003; Grundmann et al., 2006, Milheirico et al., 2007b). CA-MRSA isolates are often associated with the presence of PVL (Wisplinghoff et al., 2003; Miragaia et al., 2007). MRSA probably originated through the transfer of SCCmec into a limited number of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) lineages (Wu et al., 2001; Kreiswirth et al., 1993; Lim et al, 2003; Martinez et al, 2004).

Bacterial infection of skeletal muscles with localized abscess formation known as pyomyositis is an endemic pathology in tropical countries accounting for 2.2% - 4% of infections requiring surgery (Grose, 2004; Horn et al, 1968). It is usually caused by *Staphylococcus aureus* with 75% of cases in temperate zones; it amounts to 90% in the tropics (Ameh et al, 1999).

In 2002, 13% of deaths in a Nigerian emergency unit were attributed to pyomyositis (Adesunkanmi et al., 2002). Although this pathology is a disease relatively common in sub-saharian Africa, Pannaraj et al., 2000 reported an emergence of pyomyositis in a Texas hospital. The observed increase of cases seemed to correlate with that of community MRSA strains. The authors estimate that production of PVL by strains of *Staphylococcus aureus* is an aggravating factor feature for pyomyositis-linked morbidity.

Whatever their origin, patients with pyomyositis usually present fever, muscle pain, tenderness, and swelling. Progression of the disease starts with local inflammation before manifesting as a local abscess and a further systemic illness. Flier et al., 2003 describe a case of sternocleidomastoid pyomyositis. Laboratory results and imaging techniques are mostly combined to confirm the diagnosis of bacterial pyomyositis.

Because the genetic analysis of indigenous *S. aureus* strains is limited in Benin, we aimed to study the genetics, prevalence, and dissemination of such strains, knowing to an upsurge of furunculosis in rural Benin (personal data). An outbreak of pyomyositis in Hlagba Ouassa village motivated us to undertake further investigation.

The aim of this work was (i) to determine antibiotic susceptibility profiles, genotypes, toxin profiles of MSSA among patients with pyomyositis collected from patients and their relatives, (ii) to determine

the prevalence of MSSA strains, (iii) to characterize the genetic determinant of CA-MSSA strains upon investigation period, and (iv) moreover, to describes demographic, clinical, and microbiological characteristics of patients with pyomyositis during 6 month period.

PATIENTS AND METHODS

Patients and environnement

The study was carried out in Hlagba Ouassa village (Zooet collines Departement, Benin) where an outbreak of pyomyositis appeared in November 2008. The population of this community was estimated to 5350 inhabitants during the period of investigation. The village has a health center that can accommodate fifteen patients overnight under controlled of a nursing framework. Approximately, 700 patients are admitted to the center per year. Diseases such as staphylococcal furunculosis are known recurrent.

This study was conducted from November 21 to December 24, 2007. Identified cases and their environment have been collected by direct observation (at their home) and by interview. Overall, five (5) patients already died at the beginning of the study, eleven (11) refused to be collected and nine (9) parents were not available at time of sampling. Thus, our study, has finally settled on 50 individuals (31 patients and 19 parents sharing the same habitat).

The information about included cases was collected using a fact sheet (questionnaire) and an interview. The questionnaire included demographic data, clinical, para-clinical diagnosis, and the degree of dependence. A particular attention was paid to the following factors: diabetes, skin lesions, HIV status, hospital stays and antimicrobial therapy for six (6) months. The interview was designed to confirm a number of data on the state of hygiene at home of our respondents.

Pyoculture, blood cultures & *S. aureus* carriages

The muscle biopsy of the abscess was performed for 33 patients with a needle 70mm long and 16g.

Two blood cultures at a week intervals were sampled. A total of 100 samples were analyzed including 38 (19x2) from parents and 62 (31x2) from patients. A total of 104 blood samples were analyzed including 38 (19 x 2) from parents and 66 (33 x 2) from patients. Thirty-one swab samples were collected from lesions smears in patients.

Microbial analysis & antimicrobial susceptibility testing

Standard microbiological methods for identification of microorganisms were applied.

All swabs were inoculated onto mannitol salt agar, incubated at 37C° and inspected visually for three days. Any suspected colony was subcultured on tryptic soy agar (bioMérieux) and identified by subsequent Gram staining, catalase test and Slidex Staph Plus (bioMérieux).

Bacterial identification was performed by colony isolation on sheep blood agar plates and the automated Vitek 2 system, and antimicrobial susceptibility was determined by the disc diffusion method of Kirby-Bauer on agar Mueller-Hinton (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Antibiotic

susceptibility was investigated at the following doses: 30 µg Moxalactam/Latamoxef, 30 µg Cefoxitin, 10 µg Penicillin G, 30 µg Amoxicillin, 30 µg Kanamycin, 5 µg Ciprofloxacin, 10 µg Gentamicin, 15 µg Erythromycin, 30 µg Tetracycline, Vancomycin 30 µg, 30 µg Chloramphenicol, 30 µg Teicoplanin, 1.25 µg/ 23.75 µg Trimethoprim-Sulfamethoxazole. Heterogeneous resistance of *S. aureus* to Oxacillin was checked by the test of Cefoxitin 30 µg and 30 µg Moxalactam/Latamoxef on Mueller-Hinton agar at 37°C (CA-SFM 2010).

Panton and Valentine Leucocidine identification

A fresh colony of each strain was incubated in a 24-well cell culture plate filled with 550 µl of YCP medium, for 16 h at 37°C under a 10% CO₂ and humid atmosphere with 180 rpm rotary shaking. PVL was detected from culture *S. aureus* isolates supernatants of by immunoprecipitation radial gel test achieved with rabbit affinity-purified polyclonal anti-LukS-PV and anti-LukF-PV antibodies, as previously described by Gravet et al [13]. To enhance the detection, immunoprecipitation plates were capillary dried. Proteins were precipitated for 5 min in 5% (w/v) trichloroacetic acid, and stained with 0.1% (w/v) Coomassie blue for 15 min, then washed five times with a 10% (v/v) acetic acid / 30% (v/v) methanol solution, and fixed with a bath in 10% (v/v) acetic acid / 5% (v/v) glycerol.

Staphylococcal enterotoxins detection (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI) by Bio-Plex Assay (xMAP Multiplex assay)

The centrifuged supernatant (3ml) of *S. aureus* grown on BHI at 37°C (night) was recovered and diluted ½ in (TBS-Tween20-IgG rabbit nonspecific at 100µg/mL). (40mM Tris-HCl 40mM, 140 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20, pH 7.5), and incubated for 30 min at room. The Bio-Plex assays consisted of three incubation steps that were performed into flat-bottom Multiscreen microplates (pores diameter= 1.2 µm, Millipore): i) mixing 50 µL of TBS buffer diluted sample with 50 µL of a microsphere cocktail containing 5 × 10³ beads of each capture antibody-fluorophore-encoded bead (1h30 min). ii) mixing 50 µL of biotinylated detector antibody cocktail containing 0.25-0.5 µg/mL of each detector antibody (Patent PCT/IB2012/050909) with the analyte-capture antibody-bead complex (1H min), and iii) mixing 50 µL of 0.5 µg/mL Streptavidin-phycoerythrin (Molecular Probes) with the biotinylated detector antibody-analyte-capture antibody-bead complex (15 min). Any steps were separated by three washes. The bead complexes were suspended in 125 µL of TBS-Tween 20 0.05% and transferred into polypropylene microtiter plates and the median fluorescence intensity (MFI) of the beads was determined using a Bio-Plex 100 array reader. The assay was performed at room temperature (21-23 °C) with the plate shielded from light and shaken at 750 rpm during each incubation step. Assays involving the use of MicroPlex microsphere polystyrene beads were performed using MultiScreen-BV filter plates (Millipore Corp.) and included three washes with TBS after each incubation step.

xMAP multiplex assays were run on a Bio-Plex 100 array reader with Bio-Plex Manager 4.0 software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The Bio-Plex was configured to count each sample for a maximum of 45 s with gates of 4335-10000 for the MicroPlex polystyrene beads. The Bio-Plex 100 was calibrated using calibration and validation microspheres supplied by Bio-Rad Laboratories.

Molecular analysis

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

All *S. aureus* isolates were characterized by PFGE with SmaI restriction enzyme digestion as previously described [Bbaba Mmoussa et al., 2011]. SA strains at mid-exponential growth in 25 mL of TY (1.6% [w/v] BioTrypcase, 1% [w/v] yeast extract, 0.5% [w/v] NaCl) were embedded in agarose plugs as described previously [25]. After lysis of plugs by proteinase K (Sigma) for 18 h at 56°C, plugs were washed and stored at 4°C in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0). Plugs (agarose plugs, 2.5 by 5.0 by 1 mm) were equilibrated in 300 µL of restriction enzyme buffer for 30 min at 4°C. DNA macro-restriction was then accomplished in 60 µL with 10 U of Sma I (New England Biolabs, Beverly, Mass.) for 4 h at room temperature. Electrophoresis was performed at 12°C with a Beckman Geneline™ Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE) system at 150 mA in 0.56 TAFE system buffer (TAFE buffer is 0.2 M Tris, 10 mM free acid EDTA, and 87 mM CH₃COOH [pH 8.2]) in a 1% (w/v) agarose gel. Electrophoresis of SmaI-fragmented DNA was carried out with 2-s pulses for 1 h, followed by 14-s pulses for 1 h, 12-s pulses for 1.5 h, 10-s pulses for 2.5 h, 8-s pulses for 6 h, and 6-s pulses for 6 h. Bacteriophage lambda PFG Marker (New England Biolabs) was used as a molecular marker. The gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV trans-illumination. Pulsotypes were compared and classified in a dendrogram using the Dice coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering provided by Molecular Analyst™ (version 1.5) and Fingerprinting™ (version 1.12) softwares (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). Isolates that differed by no more than three fragments were considered to be subtypes of a given clonal type.

spa gene typing

The polymorphic X region of the protein A gene (*spa*) was amplified from 25 *S. aureus* isolates as described previously by Harmsen et al. (12). All sequencing reactions were carried out with an ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The *spa* type was assigned by using Ridom StaphType software (version 1.4; Ridom GmbH, Würzburg, Germany).

MultiLocus Sequence Typing (MLST)

Multilocus sequence typing (MLST) for characterizing isolates use the sequences of internal fragments of seven house-keeping genes. It assigns alleles at multiple house-keeping loci directly by DNA sequencing, rather than indirectly via the electrophoretic mobility of their gene products. Approximately. 450-500 bp internal fragments of each gene are used; as these can be accurately sequenced on both strands using DNA sequencing automate. For each house-keeping gene, the different sequences present within a bacterial species are assigned as distinct alleles and, for each isolate, the alleles at each of the seven loci define the allelic profile or sequence type (ST). The allelic profile of a *S. aureus* strain is obtained by sequencing internal fragments of the following seven house-keeping genes: - *arc* (Carbamate kinase), *aro* (Shikimate dehydrogenase), *glp* (Glycerol kinase), *gmk*

(Guanylate kinase), pta (Phosphate acetyltransferase), tpi (Triosephosphate isomerase), yqi (Acetyl coenzyme A acetyltransferase). In this study, standard DNA amplification and sequencing of the seven housekeeping genes were performed on 25/65 *S. aureus* selected isolates (From each pulsotype (group) a representative strain was selected, except the predominant group (pulsotype), where all isolates were selected to sequencing). PCR amplification is carried out on chromosomal DNA using an extension time of 30 s, and an annealing temperature of 55°C, with Qiagen Taq polymerase. As the same primers are used for amplification and sequencing, it is important that only a single DNA fragment is amplified in the initial PCR. This may involve some optimization of the annealing temperature. Nucleotide sequences were determined for both strands by using published primers and were compared to existing sequences in the MLST database (<http://www.mlst.net>) for the assignment of allelic numbers. The isolates were assigned sequence type (ST) numbers according to their allelic profiles. Clonal complexes (CC) were defined as isolates that were identical at five or more alleles.

Proteomic analysis

MALDI-TOF (Protein extraction & acquiring mass spectra)

S. aureus strains were grown overnight at 37°C on Columbia agar plate. Three colonies were transferred from the plate to a 2.0-ml tube (Eppendorf tube, Germany) mixed thoroughly in 300 µL water to resuspend the bacterial cells. Later thereafter, 900 µL of absolute ethanol was added and mixed with the cell suspension, the mixture was centrifuged at 10,000 x g for 2 min, and the supernatant was discarded. Subsequently, 50 µL of formic acid (70%) was added to the pellet and mixed thoroughly by pipetting before the addition of 50 µL acetonitrile to the mixture. The mixture was centrifuged again at maximum speed for 2 min. One microliter of the supernatant was placed onto a spot of a steel target plate (Bruker Daltonics, GmbH, Leipzig, Germany) and air dried at room temperature. Each sample was overlaid with 1.5 µL of matrix solution (saturated solution of 10mg/ml of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile–2.5% trifluoroacetic acid) and air dried at room temperature. MALDI-TOF/MS was performed on a BiflexIII instrument mass spectrometer (Bruker Daltonics, GmbH, Leipzig/Bremen, Germany). The spectra were recorded in the linear, positive mode at a laser frequency of 10 Hz within a mass range from 2,000 to 20,000 Da. The acceleration voltage was 19 kV, the IS2 voltage was maintained at 18 kV, and the extraction delay time was 250 ns. For each spectrum, 400 laser shots were collected and analyzed (10 times 40 laser shots from different positions of the target spot). The spectra were externally calibrated using the standard calibrant mixture (*Escherichia coli* extract including the additional proteins RNase A and myoglobin). Calibration masses were as follows: RL36, 4,364.3 Da; RS22, 5,095.8 Da;

RL34, 5,380.4 Da; RL33meth, 6,254.4 Da; RL32, 6,315.2 Da; RL29, 7,273.5 Da; RS19, 10,299.1 Da; and RNase A, 13,682.2 Da; myoglobin, 16,952.5 Da).

Typing by MALDI Biotyper™

To type different isolates of *S. aureus* in this study, we used Biotyper 1.1 facilities that allow handling of each peak of mass composing mass spectra. The frequency of peak's occurrence was visually examined within peak lists obtained from the 10 measurements of each sample "isolate". Consequently, non reproducible peaks were removed from the main spectrum (processed raw spectra) to obtain a frequency of 100% occurrence for each peak in the chosen conditions. Furthermore, a comparison between main spectrum of each considered isolate (i.e. *S. aureus* species) was established. The species representative and common peaks resulting from this comparison were removed from each main spectrum isolate. The remaining peaks constitute a specific list of reproducible, but m/z for each isolate. Thereafter, comparison between the so-called specific spectra was achieved.

Step2: Clustering

Retained peaks in each reference spectrum could be used in different ways:

* Hierarchical clustering: Generation of dendrogram, or the different clustering facilities functions integrated in the Biotyper like 2D Map, 3D Map, CCI Map...etc

RESULTS

Demographics data

Overall clinical cases, 11 refused to be collected and were excluded from the study. Two patients died at the beginning of the study and 3 (9%) died for osteomyelitis during December 2008

Nine of the susceptible relatives or parents refused or were not available at the time of sampling and, thus, could not be enrolled in the study. Finally, this study settled on 52 individuals: 33 patients and 19 healthy relatives sharing the same habitat.

The thirty-one patients concerned by pyomyositis represent an attack rate of 6/1000 inhabitants. Twenty five (25) of the concerned patients were men and eight (8) were women, for a sex ratio of 3/1. Patient's ages were comprised between 4 to 41 years old with a mean age of about 17 years old. Moreover, 93.5% of cases occurred in patients younger than 30 years and 19.3% among children less than 10 years old.

The fatality rate is 15%. The eleven patients who refused to be sampled for pus of myositis were treated and survived.

Consultation deadline

The average period of consultation was 15 days after onset of symptoms most often at the stage of fistulisation; however, 12 of 31 patients visited the health center only at the septicemic phase.

The Clinical data

Clinical observations of patients can be mainly classified into pyomyositis of the lower third of the thigh for 16 patients (48%), 4 lumbar (12%) and 11 (33%) were located at buttocks.

Muscle pain was permanent, acute, sometimes poorly systematized and disabling in 22 patients. A fever $> 38^{\circ}\text{C}$ in 100% of the patients was present. It has not been observed nor Dyspnea or paralysis. Physical examination revealed swelling warm muscle in 21 patients and / or induration in the other patients. Table 1 summarizes all these data.

The alteration of general condition includes severe malnutrition with weight/height $< 70\%$, in all our patients including 5 of them whom suffered shock and died along the investigation.

Clinical dehydration (language Roast skinfold) to varying degrees was observed in 30 patients (9%). The clinical anemia (paleness) is evident in 20 patients (61%). The questioning led to the concept of trauma and anemia as serious history has favored the onset of muscle soreness.

Underlying pathology

Patients present multiple pathologies, since 29/31 patients had at least two diagnostics, such as malaria, parasitic diarrhea, respiratory infection, other parasitic infection; only one patient was HIV positive and one patient was diabetic. These underlying conditions rendered 11/31 of these patients dependent on another person for personal hygiene, cooking, nutrition and mobility of patients (33, 3%). Patients present multiple pathologies, 29 patients had at least two diagnostic, only one patient was HIV positive and one patient was diabetic. These underlying conditions have rendered these patients quite dependent on another person for personal hygiene, nutrition, cooking, mobility and 11/31 of patients (35.48%) were concerned.

Paraclinical results

Biology.

Blood numeration showed hyper leukocytosis $> 22,000$ neutrophils/ mm^3 in 38 patients, normal leukocytosis in 12 cases and 6 cases were leukopenia $< 3,000$ neutrophils/ mm^3 ; also inflammatory anemia with erythrocytes $< 4.10^6$ cells/ μL , a hemoglobin $< 10^3$ g/dL, a mean corpuscular volume (MCV) $< 75.10^{-15}\text{L}$ was observed in 31 patients (66%). In the two remaining patients it was noted a microcytic hypochromic anemia associated with neutropenia (neutrophils $< 35\%$) and thrombocytopenia (thrombocytes $< 1.1.10^5$ Giga/mL), erythrocyte sedimentation rate (SR) exceeding 66 mm is accelerated in the first hour in all patients.

C-reactive protein (CRP) was positive in 48/56 patients (86%) with values between 256 and 4.10^5 mg/L, only one patient has glucose = 2 g/L, creatinine and blood urea nitrogen did not reveal any major abnormalities. The electrolytes and pH were not achieved.

Microbiological Results (Blood culture & Pus).

Blood cultures performed for 31 patients were positive only in two occasions that represents 3 patients. The identified microorganism was *S. aureus* or about 8% (blood culture cases) and all strains were MSSA.

Bacteriological examination of myositis pus revealed 29 cases of *S. aureus* (29/31) including 27 MSSA (27/31) and 2 cases of *Pseudomonas aeruginosa*. In 10 patients the pus was polymicrobial; in 6 cases *S. aureus* was associated with a coagulase negative *Staphylococci* and in 4 cases *S. aureus* was isolated with *Candida albicans*.

Proportion of sensitive *S. aureus*.

The nasal and perineal screening among parents yielded 30 strains of *S. aureus* isolated from 19 individuals, 10 of them have a multiple port. The proportion of MSSA was 100%. Over 54% of patients relatives are carriers for *S. aureus*. This port is found in the nostrils for 10 people, including nine present simultaneously skin lesions.

Eleven strains of *S. aureus* isolated from patients were nasal carriage; all were MSSA, about 69% (Table I).

We found a highly significant association between virulent MSSA and the presence of skin lesions among both parents and patients $p < 0.002$, and $p < 0.009$ for parents assisted patients in their personal hygiene. All parents with virulent MSSA were those who had skin lesions and / or have a contact with patients.

Among the 31 patients, None of the patients with pyomyositis had been hospitalized during the 6 months preceding this survey and 20 patients had taken Chloramphenicol and Cloxacillin three months before the start of the study.

Antibiotics Susceptibility of *S. aureus*.

Overall patterns of susceptibility of *S. aureus* isolated during the study period (pyomyositis, Furuncles & Nasal) to antibiotics were as following: 100% were susceptible to Vancomycin, Moxalactam/Latamoxef and Cefoxitin. Most strains were BZP-TET-R phenotype (Benzylpenicillin and Tetracycline Resistant), 30, 15% of *S. aureus* strains isolated were resistant to Trimethoprim-Sulfamethoxazole and 50,79% were resistant to Benzylpenicillin Overall, antibiotic show heterogeneity of isolated strains.

PVL & Enterotoxins Production.

27/31 strains of *S. aureus* isolated from pus muscle in patients were PVL producing (all of them were MSSA). 72.72% (8/11) of isolates issued from nasal carriage, 2/2 from furuncles and 2/2 from abscess were also PVL producers. Within parents 66% (6/9) of nasal carriage *S. aureus* and 7/10 (70%) issued from furuncles, were PVL producing.

A total of 52/65 (80%) isolates of *S. aureus* were PVL producing.

The major part of strains (46 isolates) tested for enterotoxins produced SEB as Enterotoxin 26/46 (56.52%); 8/46 were SEA & SEH positive (17.39%) and 10/46 strains were not enterotoxins-producing (21.73%). (See TABLE 1).

Risk factors related to the environment.

Sixty two (62) houses were identified as harboring persons affected by pyomyositis or/and furunculosis; 41/62 (66%) did not have a single toilet while the 21 others had not. The ratio toilet/population was 15 inhabitants/per toilet.

The average amount of body soap consumed by a household of five members was 0.75 kg / month. It sounds a lot, but it depends of its use frequency.

The housing is constructed of earth bar (laterite) without plastering walls and floors are often sensitive moisture. Promiscuity is the rule of people (5-9 people sleep in rooms of about 9 and 10m²).

Molecular Results

Molecular typing of *S. aureus* isolates.

PFGE

All pyomyositis *S. aureus* isolates were typed by PFGE technique. The results are shown in Figure 1.

Analysis of *Sma*I macrorestriction profiles revealed a high clonal diversity with 18 unique PFGE patterns (patient's isolates) according to Tenover criteria (Figure 1). These patterns were classified from S1 to S18. The pulsotype S2 was the most frequently encountered pattern (26.08% of isolates, 12/46 isolates).

PFGE Typing of *S. aureus* isolated (14 isolates) issued from parents showed associated pulsotypes to that found in patient's isolates, except three isolates that were unique "S49H (nasal), S52H (furuncle) & S54H (furuncle)" (Table 2) and were not enterotoxin producing. S54H isolate doesn't produce PVL.

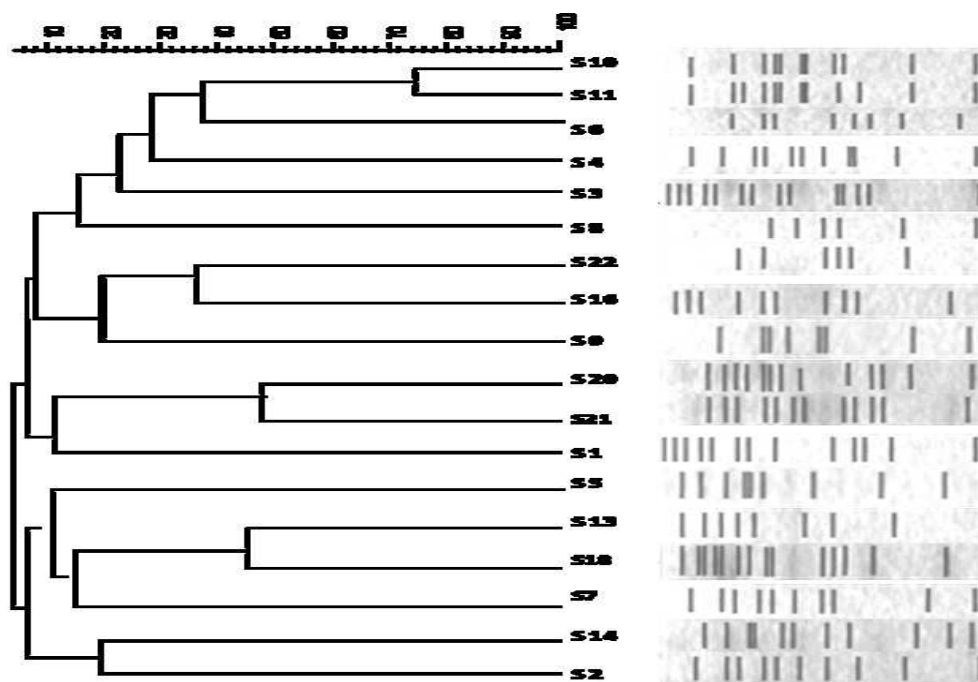
Within isolates belonging to predominant pulsotype S2 (16 isolates: parent's isolates included), four were not toxin (SEB) producing. Three (*S. aureus* S75H, S72H, S71H) of the 16 isolates belonged to pulsotype S2 were not PVL-producing and not SEB-producing too. The PVL-producing *S. aureus* isolates were ascribed to major pulsotypes.

Malades	Pyomyosite Localisation musculaire	<i>S. aureus</i> isolé dans pyomyosite(Beni)	Age	Sexe	Souches nasales	Furuncle	Abcès	MLST	ST	spa Type	SEs	PFGE	Luk FPV	Luk SPV
1	dorsolombaire	SH97	20 ans	M							SEB	S4	1	1
2	dorsolombaire	SH90	25 ans	M							SEB	S5	1	1
3	dorsolombaire	SH99	18 ans	M	S75H			CC1	852	127	SEA&SEH	S16	1	1
4	dorsolombaire	SH100	21ans	M				CC121	121	2304		S2	1	1
5	fessier	SH92	24 ans	F	4BE	S20HFu		CC5	5	311		S1	0	0
6	cuisse	SH91	22ans	M				CC121	121	314	SEB	S11	1	1
7	cuisse	S9HAb	15ans	M	BK4E							S5	1	1
8	cuisse	S14HAb	19 ans	M	5BE						SEB	S9	1	1
9	cuisse	SH13Fu	22 ans	M				CC121	121	314	SEB	S2	1	1
10	cuisse	S10H	14 ans	M				CC1	1	127	SEA & SEH	S3	1	1
11	cuisse	S25HFu	27ans	F							SEB	S7	1	1
12	cuisse	S24HFu	16ans	F				CC121	121	314	SEB	S2	1	1
13	cuisse	S21HAb	23 ans	M			S6HFur				SEA & SEH	S3	1	1
14	cuisse	S47HAb	09ans	M	SH85HAb			CC377	377	4690		S5	1	1

15	cuisse	S58HAb	41 ans	M					S5	1	1		
16	cuisse	6BE	16 ans	M		CC121	121	314	SEB	S22	1	1	
17	cuisse	11BE	8 ans	M						S4	1	1	
18	cuisse	16BE	4 ans	M	S5H				SEA & SE H	S3	1	1	
19	cuisse	24BE	16 ans	M	XBE	CC121	121	314	SEB	S2	1	1	
20	cuisse	CA1E	13ans	M	SH86Ab	CC121	121	314	SEB	S2	0	0	
21	cuisse	AB1E	18 ans	M		CC121	121	314	SEB	S2	1	1	
22	fessier	SH98	10 ans	M					SEA & SEH	S6	1	1	
23	fessier	SH93	17 ans	M	S69HFu					S5	1	1	
24	fessier	S16HAb	21 ans	M	S40HFu				SEB	S3	1	1	
25	fessier	S28Fu	19ans	M		CC121	121	314	SEB	S2	1	1	
26	fessier	S43HAb	11 ans	M	S12HFu	CC121	121	314	SEB	S2	1	1	
27	fessier	8BE	32 ans	F		CC121	121	314	SEA & SEH	S6	1	1	
28	fessier	10BE	12 ans	F					S22HFu	SEB	S4	1	1
29	fessier	12BE	8 ans	M		CC121	121	4198	SEB	S8	0	0	
30	fessier	15BE	6 ans	F	S80Fu				SEB	S4	0	0	
31	fessier	CA2E	12 ans	M		CC121	121	314	SEB	S2	1	1	
13	abces	S6HFur								S5	1	1	
28	abces	S22HFur							SEB	S10	1	1	
5	Furoncle	S20HFur							SEB	S3	1	1	
30	furoncle	S80HFu				CC1	1	127	SEA & SEH	S18	1	1	
26	nasal	S12HFur				CC121	121	314	SEB	S2	1	1	
14	Nasal	S85HAb				CC1	1	127	SEA & SEH	S21	1	1	
8	Nasale	5BE				CC121	121	314	SEB	S14	1	1	
18	Nasal	S5H				CC2019	2019	8073		S13	1	1	
19	Nasale	XBE				CC121	121	314	SEB	S2	1	1	
24	Nasal	S40HFu								S6	0	0	
20	Nasal	SH86Ab							SEB	S9	1	1	
3	Nasal	S75H				Not typed				S2	0	0	
23	Nasal	S69HFu							SEB	S3	1	1	
7	Nasale	BK4E							SEH	S16	1	1	
5	Nasale	4BE				CC1	1	127	SEB	S9	0	0	

TABLE 1: Différent results (PFGE, MLST, *spa*, Toxinology) obtained throughout survey realised on isolats (pyomyositis & associated) issued from patients with pyomyositis Hlagba ouassa village (Benin).

Figure 1: Digitized PFGE analysis of *Sma*I-digested profiles obtained from genomic DNA of *S. aureus* isolates. The dendrogram construction used the Molecular Fingerprinting II™ (Bio-Rad) software. PFGE band similarity exceeding 80% was used as the criterion for cluster formation, and the isolates were distinctly different



Parents	Isolates	Localisation	SEs	PFGE	Luk FPV	Luk SPV
1	S37Hfu	Nasal	SEA&SEH	S16	1	1
2*	S49HAb	Nasal	/	S12*	1	1
3	S72HAb	Nasal	/	S2		
4	S73HAb	Nasal	0	S6	1	1
5	S79HAb	Nasal	0	S6	1	1
6	25BE	Nasal	SEB	S16		
7	S11HAb	Furunculosis	SEB	S2		
8	S57HAb	Furunculosis	SEB	S2	1	1
9	S55HAb	Furunculosis	SEA&SEH	S6	1	1
10*	S54Hpl	Furunculosis	0	S15*		
11	S53HAb	Furunculosis	0	S6	1	1
12*	S52HAb	Furunculosis	0	S17*	1	1
13	S71Hfu	Furunculosis	0	S2	1	1
14	S74Hfu	Furunculosis	SEB	S6	1	1

TABLE 2:the different results (PFGE, SEs, PVL) of the survey realised on isolates issued from parents of patient in Hlagba ouassa village (Benin). Isolates marked by asterix had unique pulsotypes (not associated to any pulsotype's patient isolates).

MultiLocus Sequencing Typing (MLST) and spa gene sequencing

All pyomyositis isolates belonging to the predominant pulsotype (S2) and one representative isolate *S. aureus* of each pulsotype was selected to be typed by MLST.

Overall, 25 isolates were subtyped by MLST, and 5 clones were observed:

- TheCC1(5strains)withthespa127
- TheCC5(1 strains)withthespa311
- ThemajorityCC121(16strains/25) *spa*withthe314(14 strains), the *spa* 2304&4198*spa*(1 strain),
- TheCC377(1 strains)withthe *spa*4690
- TheST2019isa newST awarded by thecurator of theMLSTwebsiteand isconnected to anyclonepresents the*spa* 8073

At least one strain remains *spa* NT (non-typeable). Otherwise, it is part of the small percentage of strains *spa* non-typeable.

In total we can conclude that roughly the 2/3 strains is a clone majority, the remaining 1/3 is distributed among at least four genotypes.

11/12 isolates belong to the pulsotype 1 (P1) were CC121 by MLST, the remaining isolate was not typeable. However, other isolates typed as CC121 belonging to different pulsotype (P5, P13, P8, P10, P6, P22, P14, P11). (See Table 3)

TABLE 3: *spa* typing & MLST Résultats

Isolates	<i>spa</i> type	<i>spa</i> repeats	ST potentiellement associé d'après le <i>spa</i>	arc	aro	glp	gmk	pta	tpi	yqi	ST	CC
4218	127	07-23-21-16-34-33-13	ST1	1	1	1	1	1	1	1	1	CC1
4263	127	07-23-21-16-34-33-13	ST1	1	1	1	1	1	1	1	1	CC1
4264	127	07-23-21-16-34-33-13	ST1	1	1	1	1	1	1	1	1	CC1
4373	127	07-23-21-16-34-33-13	ST1	1	1	1	1	1	1	1	1	CC1
4400	127	07-23-21-16-34-33-13	ST1	1	1	1	1	1	1	1	1	CC1
4178	311	26-23-17-34-20-17-12-17-16	ST5	1	4	1	4	12	1	10	5	CC5
4179	314	08-17-23-18-17	ST121	6	5	6	2	7	14	5	121	CC121
4203	314	08-17-23-18-17	ST121									
4215	314	08-17-23-18-17	ST121									
4216	314	08-17-23-18-17	ST121									
4220	314	08-17-23-18-17	ST121	6	5	6	2	7	14	5	121	CC121
4222	314	08-17-23-18-17	ST121									
4238	314	08-17-23-18-17	ST121									
4374	314	08-17-23-18-17	ST121									
4375	314	08-17-23-18-17	ST121									
4377	314	08-17-23-18-17	ST121									
4385	314	08-17-23-18-17	ST121									
4388	314	08-17-23-18-17	ST121									
4390	314	08-17-23-18-17	ST121									
4398	314	08-17-23-18-17	ST121									
4399	314	08-17-23-18-17	ST121									
4402	314	08-17-23-18-17	ST121									
4407	314	08-17-23-18-17	ST121									
4184	2304	08-17-23-24		6	5	6	2	7	14	5	121	CC121
4380	4198	08-23-18-17										
4237	4690	07-56-12-22-31-57-12		46	75	49	50	13	68	60	377	CC377
4208	8073	449-23-23-17-17		3	292	267	66	221	82	226	2019	
4256	Unread <i>spa</i>											

Proteomic Results

MALDI Biotyper™ MS

All isolates were cultivated under the same conditions. Under blood agar plate, mass spectra contain more peaks. Reproducibility of MALDI-TOF-MS spectra is an important factor that has been addressed

in a number of studies (Holland et al., 1996; Wang et al., 1998; Arnold et al., 1999). Selected parameters for the discrimination of different strains of *S. aureus* were based on recent investigation study for the identification of *Shigella ssp* and *E. coli* by MALDI-TOF/MS were used here (see paper).

Acquired spectra of replicate (10 replicates) had 100% of peak reproducibility, after elimination of variable peaks by Biotyper1.1™ (Bruker). Biotyper1.1™ allows different clustering facilities (Pseudogel, 2D or 3D, CCI & Dendrogram of classification ...etc), a distance or matching percentage of any sample against other samples in the database. (Figure 2, 3, 4). Figure 2 for example showed MALDI typing using unique m/z signature for clustering isolates belonging to predominant pulsotype S2. CCI map (Figure 2 A) shows a real heterogeneity among these isolates and based on their respective spectrum they could not be similar. Data of these isolates were analyzed by principal component analysis (PCA) and based on main spectra calculated by the Biotyper™ software, a dendrogram was generated. The dendrogram shows the percentage spectrum identity for investigated isolates belonging to S2. Isolates with distance levels over 300 (30% of similarity) had completely different mass signal patterns. Strains clustering with distance levels lower than 300 could be classified up to the species and at strains level. The limit of resolution was set by the distances derived from measurement variability. PCA (Figure 2 C) and Dendrogram clustering (Figure 2 B) delineated 6 distinct groups. It has to be noted that the peak intensity (arbitrary units), and the relative intensity of each peak for each strain is different, this can be related to concentration and location of proteins in the bacterial cell and biophysical properties of proteins such as solubility, hydrophobicity, basicity, and compatibility with MALDI. As consequent, intensity was not used as criteria for clustering.

Pseudogel (Figure 2 D) shows repective spectra of isolates belonged to S2 pulsotype and their dissimilarity.

All isolates implicated in pyomyositis were classified by MALDI Biotyper™ and clustering results were compared to those found by PFGE, spa typing and MLST. Figure 3 shows a real divergency between molecular methods and proteomic (MALDI-TOF/MS). When MALDI Data (mass spectra) were classified as identique if the limit of similarity was established on 85%, Biotyper™ was able to identify 15 distinct groups (Figure 3). Isolates issued from parents were classified into 3 groups distinct (Figure 4) within a distinct cluster distinguishable from isolates issued from patients.

Figure 2: -A: CCI MaP of isolates belong to pulsotype S2. -B: MALDI-TOF Clustering Dendrogram of isolates belonging to pulsotype S2, compared to MLST clones and MALDI CCI percentage results. -C: distribution in D2 of isolates belonging to Pulsotype 2. -D: PseudoGel of pulsotype 2 isolates

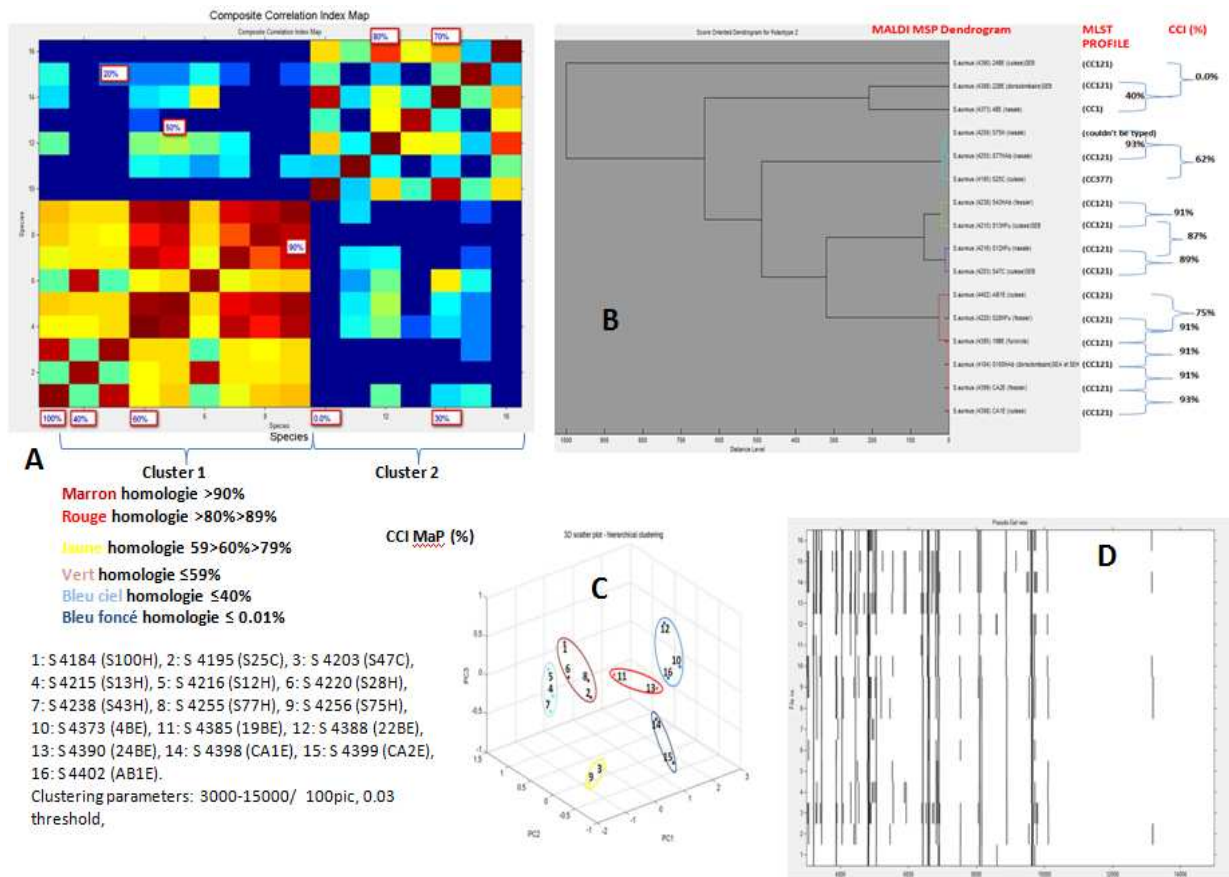


Figure 3:Based on the protein mass patterns, bacterial strains can be clustered hierarchically by Biotyper™. A dendrogram generated by this approach including different *S. aureus* isolates. Corresponding MLST profile and PFGE pulsotype of each isolate are mentioned on the picture.

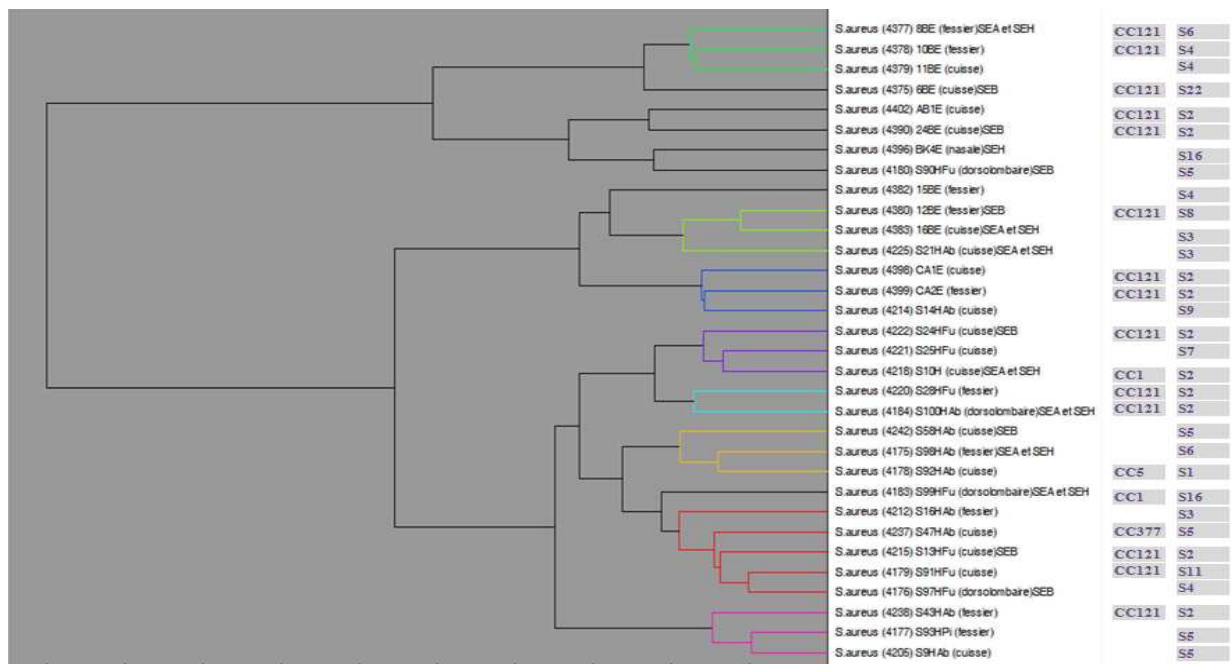
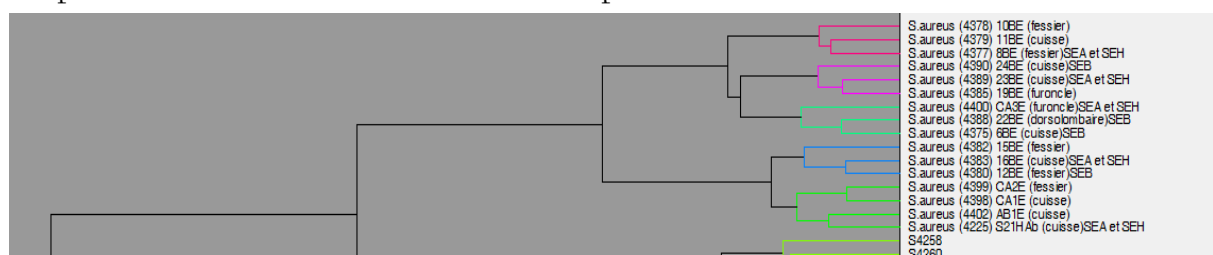
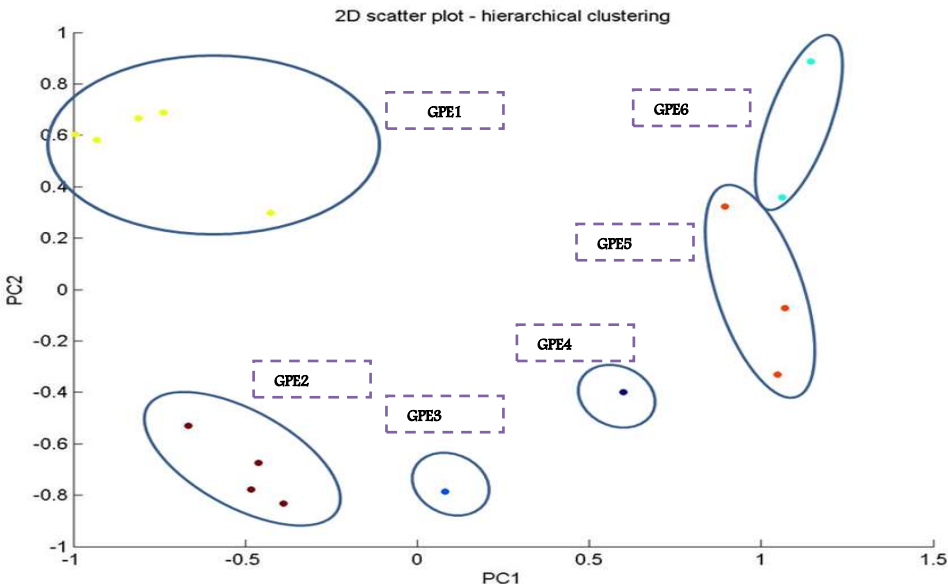


Figure 4:A dendrogram generated by Biotyper™ including *S. aureus* isolates issued from pyomyositis and parents. Arrow indicates isolated issued from parents.



Pulsotype S2 by PFGE contains 16 isolates, where 13 were considered as one clone by MLST and remained isolates as two distinct clones. Here, by our approach all measure of distance between different strains (2D, CCI, Dendrogram...etc) show that this pulsotype contains a heterogeneous isolates, in fact 6 groups were traced (6 clones maybe) (see Figure 5).

Figure 5: Clustering and distribution 2D of isolates belong to pulsotype S2.by Biotyper1.1™



DISCUSSION

Pyomyositis is an infection disease less much common in temperate climates, where it seems to affect mainly immune-compromised patients and sometimes individuals with a recent stay in the tropics

(25% of cases; reported Chiedozi *et al.*, 1979). Historically, this disease appears common in Sub-Saharan Africa and the South Pacific affecting preferentially malnourished children and adolescents (Ref). The reason for this geographic distribution is unclear, but possible explanations described in past literature suggested that poor nutrition or parasitic infection might be predisposing factors (Ref). A more recent article suggests that hemoglobinopathy may play a role in predisposing African children to the disease process.

Epidemiologically, Benin is located in tropical where pyomyositis has a reputation endemic [1, 6.14], but its impact is difficult to assess because only patients with serious complications come in the surgical visit health centers. According to the beliefs and culture of this population, pyomyositis has no medication and is hereditary, and the patient does not go to the hospital, it is incised with a blade at home. The patient then presented to the church for prayer for healing. Once the pus drained, abscesses heal. The treatment would have a mystical aspect in these populations.

The identification of a group of six adolescents with pyomyositis phase fistulization through the center of the village health November 18, 2008, led to undertake this study. The active search for cases through home visits enabled not only to determine the attack rate of the disease, but also to identify environmental factors that facilitated the outbreak.

The impact of tropical pyomyositis is estimated at 1 / 1000 inhabitants in the literature [5.15]. Our study revealed an attack rate of 6/1000 habitants in December 2008, which is significantly higher than any previously observed frequencies, eg 102 cases were recorded in 3 years at the hospital in Cameroon [7] 188 cases recorded in 15 years in Mexico [8]. Beyond the fact that our study was prospective with the ability to track and record all patients, progress has been made since then in the identification of pyomyositis which could explain the difference between our result and that of Cameroon. The fatality rate recorded was 9% for all cases because even those who have refused to make the puncture could have been revised several times and were still alive at the end of the study. This rate seems low compared to the virulence of community MSSA producing PVL that are the majority among strains of this study. This low mortality rate is the result of a very good management of cases and effective management of the epidemic under control through the application of hygiene measures and early treatment with proper antibiotics. This rate approximates 10% mortality often observed in tropical pyomyositis in hospitals [1, 6].

As in most studies, male dominance (3/1) was the rule. ; In fact, the population identified by our study is composed mainly of peasants that explain why the proportion of male patients is more important. This population is responsible for cleaning and preparing the fields. Moreover, the period from October to January is the dry season when water is scarce and the granaries are empty, which is one of the causes of malnutrition observed. Our observations during this season, the work of clearing weeds and plowing cause injuries and muscle damage to the lower and upper limbs.

Pyomyositis is common in young adults and young child as documented in several studies [9, need 2nd reference], the child seems more affected than adults, children under 10 years represent 19.35% of our series. Involvement of skeletal muscle is common in our study but is not the only location.

Worldwide, numerous observations linked the infection with HIV or diabetes with myositis [Ref]. In Africa this disease association has been reported in Bangui and in Dar Esalaam [10] but this association is not evident in our study because of our 31 patients only 1 was HIV-positive AIDS and another diabetic. However, malnutrition and low muscle trauma hygiene compliance are closely linked to the onset of signs. The same observation was made by Hull *et al.*, 2008[11].

In this survey, *S. aureus* account for 95% of pyomyositis bacteria isolated which corroborates the work of Christin *et al.*,1992[12].

In Benin, the Swiss socio health program (PSS) in its activity reports for 2004 and 2007, found an increase of 3 to 8% of community MRSA. No case of MRSA was recorded in this investigation.

MSSA recorded here in this study with particular profiles antibiotic. No one of the patients attended a clinic at least six months before the beginning of this investigation. However, *et al.*, shown that more than 90% of community-acquired MRSA isolates and 25% of community-acquired methicillin susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates have PFGE patterns identical or closely related to the USA300 clone.

We found a prevalence of MSSA 100% among patients with pyomyositis and are cared for at home and carrying a prevalence of 31% among their relatives not sick. These frequencies are higher than average figures found in the port community in a meta-analysis reported by Slagado *et al.*, 2003[16].

There are currently no specific recommendations regarding the management of patients with multi-resistant bacteria to antibiotics in the context of home care in our context. So that, health workers caring for these patients; visiting many different patients and could be a source of spread in the community.

Here, all strains of *S. aureus* involved in pyomyositis diagnosed often carry Panton-Valentine leukocidin (PVL), a virulence factor that is a marker of severity associated with severe pneumonia, skin and soft tissue infections, bones and joints infections described there is more than a century in the skin infections [16, 17].

We found a statistically significant association between virulent MSSA and the presence of skin lesions and cases of pyomyositis. This association is known as recurrent furunculosis is associated with production of PVL by strains of *S. aureus* [REF?].

No significant association between MSSA and the presence of diabetes too, as well as cases of pyomyositis which would be linked to diabetes and HIV seropositivity in contrast to AIDS data in the literature [17].

Clinically fistulization occurred on average 15 days after the onset of the disease which is consistent with results from other studies [1]. The average time between the onset of fistula and assumed the management is too high in our study, this factor was not mentioned in other studies despite its

influence prognosis. The delay observed in our study is related to the strong socio-cultural influence on the behavior of the patient.

The prescription of antibiotics is systematic and depends on the evolution of pyomyositis, in the best case it oscillates between 14 and 21 days. Aspiration of pus was done at the single needle repeatedly to all cases. The prognosis was better for 31 patients supported. Our results show that pyomyositis can be resolved with antibiotic treatment if patients are cared for in time.

If the diagnosis of pyomyositis is relatively easy in a patient hospitalized in an endemic area for fever, muscle pain, and anemia is the case in our study, in African environment the delay of diagnosis is usually associated with the frequency argument: malaria, parasitosis, acute lymphangitis or Buruli ulcer disease is often suspected and treated. Only in the event of failure is believed to pyomyositis.

The socio cultural and economic factor delaying the care of patients: illiteracy, superstition and fatalism still impose the practice of traditional medicine (prayers, drinks and cuts) all lost precious time in the prompt management of the condition.

Poverty maintains a lack of education making it difficult to improve life in rural areas. The pyomyositis and furunculosis that appear in many people after a period of intense activity are examples of this lack of education and maintains ignorance is going to perpetuate the beliefs and superstitions sometimes without real basis.

Regarding the factors related to housing for people with pyomyositis, it was observed that the management of excreta and fecal hygiene in general and particularly hand hygiene poses real problems, which reflect a poor hygiene at household level, concerned. Mismanagement of hospital waste are dumped unconscious on landfills unfortunately attracts more and more poor which is a factor in the acquisition and spread of hospital-acquired microorganisms.

Early detection of outbreaks of virulent *Staphylococcus aureus* (MSSA) and initiation of adequate infection control measures are important objectives in hospital hygiene. To reach these goals, prompt determination of epidemiologic relatedness of clinical MSSA isolates is essential.

Genetic typing methods like pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), *spa* typing, or Multilocus sequence typing (MLST) have a high discriminatory power, however, these methods are time consuming and cost intensive. We investigate the potential of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) for discrimination of major MSSA lineages. By analysis of mass spectra of the 5 major clonal complexes (CC121, CC1, CC5, CC377, CC2019) deduced from *spa* typing (that represent 18 Pulsovars by PFGE), reproducible spectra differences were observed within m/z values allowing robust discrimination of the clonal complexes. Hierarchical clustering of the MALDI types showed some divergence with the clonal complexes.

Reproducibility of MALDI-TOF/MS spectra is an important factor that has been addressed in a number of studies (Holland et al., 1996; Wang et al., 1998; Arnold et al., 1999). In this study, (processing realized as mentioned by Moussaoui et al., 2012) the spectra of replicate (10 replicates) samples were the same, with 100% of peak reproducibility, after elimination of variable peaks by BiotyperTM1.1 (Bruker

Daltonics), before their inclusion into the database. Biotyper™1.1 allows different clustering facilities (Pseudogel, 2D, 3D, CCI, Dendrogram of classification ...etc), a distance or matching percentage is calculated. Using this method we were able to separate different isolates into different clusters, overall, 21 clones or groups.

Strains discrimination by molecular typing showed a real heterogeneity, and some discordance of typing results between both techniques used here in this study (PFGE & MLST). Five clones were found by MLST and 20 clones by PFGE for whole isolates investigated in this study. Proteomic profiles by MALDI-TOF MS were much more discriminating, however, we cannot determine a universal basis for example the limit number of peak difference that should be considered to decide if two isolates represent two clones different?! Tenover established a rule concerning PFGE profiles that consider two clones different if they have more than three bands of difference. Using our method of spectra processing and elimination of variable peaks from replicates in a first approach and then the elimination of common peaks between isolates, could help us to establish a rule like Tenover criteria but for MALDI-TOF/MS profiles.

CONCLUSION

The pyomyositis and myositis by their frequency, microbiological identification is often difficult for the bacteria involved and the problems of management are a real public health problem in third world countries where the disease is so endemic and epidemic. It is important to include specific instructions for screening, early management of patients to avoid surgical drainage and especially the spread of MRSA in the community. All this underlines the importance of campaigns to prevent disease through awareness and information-populations.

Acknowledgements

We thank the patients and their relatives who agreed to participate in the survey. Dr. Edward Comlanvi Comlan Agossou and Mr Francis are also thanked for useful discussions. This work was supported by the WHO regional office in Cotonou, Benin.

Références

1. Sissolak k., Weir R.C. Tropical pyomyositis. *Journal of Infection*, 1994, 29: 121-127.
2. Scriba J. Beitrag zur aetiologie der myositis acuta. *Dtsch Ztschr Chir* 1885 ; 22 :497-502.
3. Chiedozi LC: Pyomyositis. Review of 205 cases in 112 patients. *Am J surg* 1979; 137: 255- 259.

4. Levin MJ, Gardner P, Waldvogel FA: Tropical pyomyosites a usual infection due to *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 1971; 284: 196.
5. Adesunkanmi A R, Akinkuolie AA, Badru OS. A five years analysis of death in accident and emergency room of semi – urban hospital. West Afr J Med 2002; 21:99-104.
6. Ajao O.G., Ajao A.O. Tropical pyomyositis. Int. Surg. 1987, 67 : 414-416.
7. Masso-Misse P., Essomba A., Monny-Lobe M, Fowo S.N, S e al: Les Pyomyosites Tropicales A propos de 102 cas. Médecine d'Afrique Noire : 1998, 45 (10)
8. Hull R, Gav H., Giles H, Nowicki M :*Streptococcus agalactiae* myositis in a child .with perinatally acquired human immunodeficiency virus. South Med J, 2008 mars; 101 (3); 317-9
9. Christian L, Sarosi GA. Pyomyositis in North America: cases reports and review. Clin infect Dis. 1992; 15: 668-667.
10. Gomez-Reino J.J., Aznar J.J., Pablo J.L., Diaz-Gonzalez F., Laffon A. Non tropical pyomyositis in adults. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1994, 23: 396-405.
11. Pannaraj PS, Hulten KG, Gonzalez BE et al: infective pyomyosites and myositis in children in the area of community acquired, méthicilline-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin infect Dis. 2006; 43 (8): 953-60
12. Baba Moussa L, Sanni A, Dagnira AY, et al. Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. Med Mal Infect 1999; 29:689-96.
13. Ahoyo TA, Baba-Moussa .L, Makoutode M. et al. : Incidence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline dans le service de néonatalogie du centre hospitalier départemental du Zou et des Collines au Bénin. Archives de pédiatrie 13 (2006) 1391-1396.
14. Gravet A, Colin DA, Keller D, et al. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component Staphylococcal leucotoxins family. FEBS Lett 1998; 436:202-8.
15. Bassom L. Contribution à l'étude des myosites tropicales. Thèse de Médecine, 1977, CUSS Yaoundé.
16. Durupt F, Tristan A, Bes M, et al. : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline d'origine communautaire. Med Mal Infect 2005; 35:538-40.
17. Slagado C, Farr B, Calfee D: Community- acquired MRSA: A meta-analysis of prevalence and risk factors CID 2003 86: 131-9.
18. Belec L., DI Costanzo B. Pyomyosite et infection par le VIH : 4 cas africains et revue de la littérature. Méd. Mal. infect., 1992, 22: 712-717.
19. Pallangyo K., Hakansson A., Lema L., Minjas J.HIV infection and its influence on outcome among adult patients with Malaria meningitis, pneumonia, pyomyositis or tuberculosis in Dar Es Salaam, Tanzania. Fifth International Conference on AIDS in Africa, 1990, Kinshasa, abstract F.P.B.
20. Uribe-Flores J.D., Hernandez-Jacome M.: Tropical pyomyosites a report of 188 cases. Gac Med Mex, 2004 nov-dec; 140 (6): 607-610.
21. Villamil-Cajoto I, Maceiras-Pan F., Villaciàn-Vicedo MJ.: Pyomyositis : report of seventeen cases. Rev Med Chil. 2006 janv; 134 (1)! 31-8.
22. Lorenz U, Abele-Horn M, Bussen D, Thiede A: Severe Pyomyositis caused by Pantón-Valentine leucocidin- positive méthicilline- sensitive *Staphylococcus aureus* complicating a pilonidal cyst.
23. Lowy, 1998 F.D. Lowy *Staphylococcus aureus* infections N Engl J Med, 339 (1998), pp. 520-532
24. Pannaraj PS, Hulten KG, Gonzalez BE, et al. Infective pyomyositis and myositis in children in the era of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis. 2006;43:953-60
25. Fox LP, Geyer AS, Grossman ME. Pyomyositis. J Am Acad Dermatol. 2004;51:308-314
26. Ruiz ME, Yohannes S, Wladyka CG. Pyomyositis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med. 2005;352:1488-9
27. Konnur N, Boris JD, Nield LS, et al. Non-tropical pyomyositis in pediatric and adult patients. W V Med J. 2007;103:22-3

28. Akman I, Ostrov B, Varma BK, et al. Pyomyositis: report of three patients and review of the literature. *Clin Pediatr*. 1996;35:397–401.
29. Millar C, Page T, Paterson P. MRSA pyomyositis complicating sickle cell anaemia. *Clin Lab Haematol*. 2001;23:329–32.
30. Crum NF. Bacterial pyomyositis in the United States. *Am J Med*. 2004;117:420–28.
31. Gonzalez BE, Hulten KG, Dishop MK, et al . Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*2005;41:583-90.
32. LinaG, Piemont Y, Godail –Gamot F, et al Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999;29:1128-32.
33. Grose C . Pyomyositis and bacterial myositis, i Feigin RD, Cherry JD, DemmlerGJ, Kaplan SL, editors. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 5th ed.Philadelphia: Saunders; 2004. p. 737-41
34. Horn CV, Master S. Pyomyositis tropicans in Uganda. *East Afr Med J*1968;45:463-71.
35. Ameh EA . Pyomyositis in children: analysis of 31 cases. *Ann Trop Paediatr*1999;19:263-5.
36. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003, 98:978-984. Demonstrates high frequency of PVL carriage by CA-MRSA.
37. Martinez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hulten K, et al.: Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2004, 23:701-706.
38. Buckingham SC, McDougal LK, Cathey LD, et al.: Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children’s Hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2004, 23:619-624
39. Mongkolrattanothai K, Boyle S, Kahana MD, et al.: Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally-related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. *Clin Infect Dis* 2003, 37:1050-1058.
40. Lim TT, Chong FN, O’Brien FG, et al.: Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus* related? A comparison of their mec regions. *Pathology* 2003, 35:336-343.
41. Adesunkanmi AR, Akinkuolie AA, Badru OS. A five year analysis of death in accident and emergency room of a semi-urban hospital. *West Afr J Med* 2002;21:99-104
42. Flier S, Dolgin SE, Saphir RL, et al: A case confirming the progressive stages of pyomyositis. *J Pediatr Surg* 2003; 38:1551. 90
43. Kim DW, Khalmuratova R, Hur DG, Jeon SY, Kim SW, Shin HW, Lee CH, Rhee CS, *Staphylococcus aureus* enterotoxin B contributes to induction of nasal polypoid lesions in an allergic rhinosinusitis murine model. *Am J Rhinol Allergy*. 2011 ;25(6):e255-61.
44. Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L. and Dragacci, S. (2011), *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x

3.7.3. Discussion de l'ARTICLE 5 (Typage *S. aureus*).

Discussion de l'ARTICLE 5 : Typage des *S. aureus*

Sur le plan épidémiologique, le Bénin est situé en zone tropicale où la pyomyosite a une réputation endémique[166] [167] [168] ; mais son incidence est difficile à évaluer parce que seuls les malades graves ayant des complications chirurgicales se rendent dans les centres de santé.

L'incidence des pyomyosites tropicales est estimée à 1/1000 habitants dans la littérature[169] [170] . Notre étude a révélé un taux d'attaque de 10/1000habitants pour la seule période des deux mois fin 2008, qui est nettement supérieur à toutes les fréquences observées jusque là ; par exemple 102 cas ont été enregistré en 3 ans à l'hôpital au Cameroun[171] et 188 cas enregistrés en 15 ans au Mexique [172] . Le taux de létalité enregistré est de 9% pour l'ensemble des cas car même ceux qui ont refusé de se faire ponctionner le pus ont été revu plusieurs fois et étaient toujours vivants à la fin de l'étude. Ce taux se rapproche de 10% de mortalité souvent observée dans les pyomyosites tropicales en milieu hospitalier[169] [170] .

Selon nos observations, durant cette saison, les travaux de défrichages des herbes sauvages et de labour occasionnent des traumatismes musculaires et des lésions aux membres inférieurs et supérieurs.

Dans cette enquête, *S. aureus* représente 95% des bactéries isolées des pyomyosites ce qui corroborent les travaux de Christian *et al* en 1992.,[173] .

Un fort taux de SASM virulentes a été enregistré avec des profils antibiotypes particuliers; ces SASM sont communautaires, car aucun des patients n'a fréquenté un centre de santé six mois au moins avant le début de cette enquête.

Nous avons trouvé une prévalence de portage de SASM de 100% chez les patients atteints de pyomyosites et qui sont soignés à domicile, ainsi que chez leurs proches parents non malades. Ces fréquences sont plus élevées que les chiffres moyens de portage retrouvés dans la communauté dans une méta -analyse rapporté par Slagado *et al.*,[174] .

Toutes les souches de *S. aureus* impliquées dans les pyomyosites diagnostiquées sont souvent porteuses de la LPV, un facteur de virulence qui constitue un marqueur de sévérité décrit il y a plus d'un siècle dans les infections cutanées[175] .

Nous avons retrouvé une association statistiquement significative entre le portage de SASM virulentes et la présence de lésions cutanées et les cas de pyomyosites. Cette association est bien connue de même que la furonculose à répétition est associée à la production de la LPV par les souches de *S. aureus*.

La prescription d'une antibiothérapie est systématique et est fonction de l'évolution des pyomyosites ; dans le meilleur des cas elle oscille entre 14 et 21 jours. La ponction du pus

s'est faite à l'aiguille simple de façon répétée pour l'ensemble des cas. Le pronostic a été meilleur pour les 31 malades prises en charge. Nos résultats montrent que la pyomyosite peut également être résolutive sous traitement antibiotique si les malades sont pris en charge à temps.

Le contexte socio culturel et économique est un facteur retardant la prise en charge des patients : l'illettrisme, les superstitions et le fatalisme imposent encore la pratique de la médecine traditionnelle (prières, breuvages et incisions) tout cela fait perdre un temps précieux dans la prise en charge rapide de l'affection.

Pour ce qui concerne les facteurs liés à l'habitat des personnes atteintes de pyomyosites, il a été observé que la gestion des excréta fécaux et l'hygiène en générale et particulièrement l'hygiène des mains posent un véritable problème et témoignent d'une mauvaise hygiène au niveau des habitations concernées. La mauvaise gestion des déchets hospitaliers qui sont inconsciemment déversés sur les décharges publiques attire malheureusement de plus en plus de pauvres ce qui constitue un facteur d'acquisition et de propagation de microorganismes d'origine hospitalière.

Tous les résultats de cette enquête figurent dans L'ANNEXE III

Dans cette étude, nous avons essayé de typer les différents isolats bactérien par trois approches différentes. PFGE, *spa*, MLST et l'émergente technique de MALDI-TOF/MS.

Tous les isolats ont été cultivés dans les mêmes conditions. Sur gélose au sang, les spectres de masse contiennent plus de pics. La reproductibilité des spectres MALDI-TOF/MS est un facteur important qui a été abordé dans un certain nombre d'études[4] [119] [176] [177] [178]. Dans cette étude (traitement réalisé tel que mentionné dans le document de *Shigella*) les répétitions spectrales (10 répétitions) des échantillons ont été réalisées et la reproductibilité des pics est amenée à 100%, après une élimination des pics variables avant d'utiliser une base de données pour la classification des souches. En premier lieu, les paramètres choisis pour la discrimination et la classification de différentes souches de *S. aureus* sont fondés sur l'étude récente concernant l'identification de la bactérie *Shigella sp* et *E. coli*. Une seconde approche a été réalisée. Elle est basée sur la transformation des spectres de masse en pseudogel qui représente le profil spectral d'une souche donnée par des bandes dont chacune représente un pic ou m/z. Le pseudogel de différentes souches a été utilisé pour générer un dendrogramme en utilisant le logiciel moléculaire II™ (Bio-Rad). Cette approche permet une véritable comparaison entre la PFGE et MALDI-TOF/MS, car le "clustering" est réalisé par le même logiciel.

Le Pulsovar S2 par PFGE contient 16 isolats, où 13 ont été considérés comme un clone identique par MLST (CC121) et les deux autres représentent deux clones différents. Ici, par la première approche, les mesures de distance entre les différentes souches (2D, CCI, etc ...Dendrogramme) montrent que ce pulsotype contient, en fait, 6 groupes (6 clones peut-être).

Les pyomyosites et les myosites de par leur fréquence, et leur identification microbiologique est souvent difficile de la bactérie en cause. Il est important d'introduire des instructions spécifiques pour le dépistage, la prise en charge précoce des malades pour éviter le drainage chirurgical et surtout la dispersion des SARM dans la communauté. Tout cela souligne l'importance des campagnes de prévention de la maladie par la sensibilisation et l'information des populations.



Pour comprendre une époque, il faut formuler une idée générale, une hypothèse de travail, proposer des cadres de compréhension, et d'interprétation.

Jacques le GOFF.

V. DISCUSSION

1. Discussion globale des travaux

Le principal objectif dans les études conventionnelles protéomiques, est la recherche d'un ou de quelques biomarqueurs spécifiques, de différences dans les modes d'expression de protéines dans des cellules semblables, dans des tissus particuliers d'un organisme, dans les cellules clonales cultivées dans des conditions différentes, des organismes étroitement liés[176] . En revanche, pour l'identification microbienne basée sur le protéome, l'analyse du profil protéique doit être stable et influencée seulement par les conditions de croissance à un degré limité.

La stabilité des empreintes de masse est dépendante de la gamme de masse choisie. En effet, pour l'identification microbienne par MALDI-TOF/MS, une gamme de masses de 2 000 à 20 000 Da est généralement sélectionnée[178] . Les algorithmes et les procédures informatiques, s'ils fonctionnent correctement pour des données limitées bien définies, ne fonctionnent pas nécessairement dans un contexte clinique, où les isolats peuvent appartenir à plusieurs centaines d'espèces, chacune avec une diversité intra-spécifique plus ou moins prononcée.

Dans ce contexte et pour aborder l'évaluation de MALDI Biotyper™ (Bruker Daltonics®) dans l'identification bactérienne par la spectrométrie de masse des protéines les plus abondantes, nous avons bénéficié dès 2008, de la part de Bruker Daltonics®, d'un logiciel Biotyper™1.1 ouvert, de paramètres d'identification bactérienne par spectrométrie de masse qui ont été constamment appliqués, et d'une banque de spectres (1600 spectres) assez faiblement représentative du monde bactérien et des espèces isolées en clinique hospitalière (> 1500 espèces). Cette banque restait cependant suffisamment riche par rapport à d'autres banques et à d'autres systèmes commercialisés dans cette période (par exemple Saramis® Anagnostec qui comptait 1051 espèces).

Nous avons d'abord évalué des paramètres comme la répétabilité, la reproductibilité, la conservation des échantillons pour des bactéries à croissance rapide et aux caractéristiques ultra-structurales simples. Nous avons alors pu observer que les spectres obtenus à partir d'extraits de souches de bactéries à Gram négatif comme à Gram positif déposés de 3 à 20 fois représentent quelques variations entre les répliqués pour des pics aux intensités et aux masses différentes. Les mêmes observations ont été rapportées dans d'autres études[122] [157] [158] [177] [178] [179] [180] . Il faut préciser que dans sa version actuelle, le logiciel n'attribue pas de pondération numérique directement accessible par l'utilisateur, ce qui lui

permet de n'avoir qu'une évaluation visuelle sur ce paramètre. Cependant des applications de "clustering" restent ouvertes.

Les protéines qui peuvent être identifiées sans ambiguïté, car abondantes dans les spectres de masse des cellules intactes sont généralement des protéines structurales, c'est-à-dire des protéines qui agissent comme des éléments structurants dans la cellule plutôt que comme des catalyseurs de réactions biochimiques. Les protéines comme les protéines ribosomales et les protéines chaperonnes sont très abondantes dans les bactéries, en particulier lorsque ces dernières ont un temps de division court. En conséquence, et via les résultats que nous avons obtenus, nous renforçons les études qui suggèrent que les spectres de masse de micro-organismes en phase exponentielle de croissance sont remarquablement stables et largement indépendants de facteurs tels que les milieux de croissance, la température et la sensibilité ou non à l'oxygène[157] [158] . Les conditions d'analyses telles que l'instrumentation, la quantité de biomasse par échantillon et la matrice appliquée ont également une certaine flexibilité[179] [180] . C'est le cas pour la plupart des procaryotes et des levures, alors que pour les champignons filamenteux, la variabilité des empreintes de masse en réponse aux changements de conditions de culture est plus prononcée[181] . Il convient de souligner que les pics ayant les mêmes valeurs m/z dans des spectres de masse inconnus ne représentent pas nécessairement la même protéine, et par conséquent, dans la plupart des cas, un seul pic n'est ni utile ni suffisant pour la différenciation.

De petites fluctuations ont été observées sur des peptides de faible masse qui n'entrent pas dans le champ d'observation de notre application (3 à 15 kDa). Dans des gammes de masse inférieures, à savoir 500-2500 Da, la variabilité des spectres de masse entre différentes espèces est très faible et presque identique pour les isolats étroitement liés " et donc indissemblables", bien que cette gamme de masse a été proposée pour l'identification dans les premières études[2] . Cela dépend principalement du groupe de micro-organismes étudié. Par exemple, on peut observer des masses spécifiques à la souche, pour les micro-organismes capables de produire une grande diversité de métabolites secondaires[182] [183] , alors que pour celles qui manquent généralement de caractéristiques génétiques prononcées semblent être dissemblables.

La reproductibilité de la méthode est intéressante[122] [177] [178] [179] [180] . Cependant, il semble qu'une évolution des spectres dans le temps soit prévisible : due à l'évolution génétique naturelle des bactéries. Toute banque de données devra donc tenir compte de ce paramètre et toutes les approches d'identification bactérienne méritent d'être confrontées à ce paramètre. Pour une meilleure reproductibilité des spectres, il nous semble qu'un certain nombre d'aspects matériels doivent être pris en considération :

- le contenant des échantillons devra permettre une évaporation minimale des échantillons

- le système de conservation des extraits : au minimum – 20°C (la suspension bactérienne dans la solution alcoolique au début de préparation serait préférable)
- la manière de déposer les échantillons, et la matrice (concernant son homogénéité et sa titration régulière) pouvaient être d'autres facteurs à maîtriser, par une automatisation de ces étapes.

Williams *et al.*, 2003[180] ont démontré différents paramètres influençant la qualité des spectres, comme la méthode de nettoyage des plaques MALDI, le type de matrice utilisée, les solvants de la matrice, la concentration des cellules en contact avec la matrice, mais aussi les paramètres de l'instrument utilisés pour la génération des spectres de masse.

En ce qui concerne les conditions de culture, il est assez clair qu'il est préférable de travailler avec des bactéries en phase active de développement. Toute rupture de celle-ci, induit des perturbations métaboliques de la bactérie pouvant être préjudiciables à la qualité des spectres.

La composition en nutriments du milieu peut modifier l'expression protéique et les peptides contenus dans le milieu de culture eux même peuvent se retrouver dans le spectre. Nos résultats montrent des variations selon le milieu de culture utilisé et l'espèce testée. Cependant, ces variations n'affectent pas l'identification au niveau même de l'espèce, sauf cas particuliers où les bactéries en question ont des préférences de croissance sur un milieu de culture spécifique. Dans la littérature, il est établi que selon le milieu de culture, le profil du spectre varie au niveau du nombre et de l'intensité des pics[122] [158] [184] [185] . Les auteurs, ont démontré qu'en utilisant la gélose au sang, les spectres de masse sont plus riches en terme de pics, mais aussi présentent plus de variations entre les réplicats par rapport la gélose Columbia (sans sang). Les spectres y sont plus reproductibles, mais moins riches. La plupart des pics associés à la matrice et aux milieux de culture se trouvent dans la gamme de masse < 1 000 Da, par contre ceux associés au sang se retrouvent dans la gamme >2 000 et >20 000 Da.

Walker *et al.*, 2002[122] ont trouvé une reproductibilité spectrale au sein des 4 réplicats de >75%, et des variations des intensités enregistrées. Néanmoins, des pics similaires persistent, quelque soit le milieu utilisé, suffisants à une bonne identification selon la performance de l'algorithme utilisée. La présence de protéines communes à toutes les conditions de culture n'est pas étonnante, car certains gènes sont constitutivement exprimés pour le maintien des fonctions cellulaires.

A ce titre, la culture d'un grand nombre de bactéries sur gélose au sang représente un bon compromis. Ceci n'exclut pas des cultures en milieu gélosé différent ou en milieu liquide pour des bactéries exigeantes ou spécifiques (*Haemophilus, gonocoque, Borrelia, ...*). Cela rejoint les résultats de Bizzini et al., 2010[184] ont montré que sur 108 souches d'*E. coli* cultivées sur

milieu Mc Conkey, seulement 56% étaient correctement identifiées alors que sur gélose chocolat ou gélose au sang, le pourcentage d'identification s'élevait à 87%. Il s'agira alors d'établir des recommandations précises répondant aux éventualités cliniques. Dans tous les cas, des quantités assez minimes de bactéries bien isolées sont suffisantes pour obtenir un spectre de bonne qualité, soit 1 à 2 colonies (environ $5 \cdot 10^8$ UFC) à condition qu'elles soient prélevées sans résidus sur le milieu de culture.

Walker *et al.*, 2002[122] ont démontré >60% de reproductibilité inter-laboratoire utilisant deux machines différentes, mais cela concernait la reproductibilité spectrale et non pas l'identification validée par une gamme de log score calculée. Nous avons démontré une reproductibilité inter-laboratoire de 98% où 5 machines différentes ont été utilisées avec la participation de 8 laboratoires différents[5]. Cette reproductibilité concernait l'identification des bactéries non-fermentantes validée par le log score dédiée: >2, et non pas une reproductibilité spectrale entre les réplicats.

Le logiciel BioTyper™ a été testé dans notre travail pour différents genres bactériens, souvent très courants en routine hospitalière et démontrer son potentiel à l'identification des espèces bactériennes vis-à-vis d'une banque qui était restreinte (2008, 1600 espèces) et qu'il était nécessaire d'enrichir encore :

- elle était loin de couvrir un nombre satisfaisant d'espèces
- avec un seul représentant le plus souvent par espèce, les identifications peuvent être de qualité plus faible, alors que si la biodiversité de l'espèce est significativement représentée par cinq à dix souches, bien sélectionnées, celle-ci devient meilleure. Cela peut être le rôle de laboratoires hospitaliers de participer à cet enrichissement, puis au fournisseur de trouver des caractéristiques informatiques plus efficaces dans les identifications de façon à ne pas la ralentir. En effet, les lacunes d'identification recensées dans la base de données testée en 2008, ont été rectifiées et corrigées par des mises-à-jour ultérieures. Beaucoup d'espèces et alinéas ont été introduits mais beaucoup d'autres ont été supprimés et remplacés par des alinéas plus sûrs. La base de données actuelle MALDI Biotyper DB (Bruker Daltonics™) comprend plus de 2000 espèces et 4100 alinéas, alors que celle de Vitek MS-Myla/bioMérieux ne compte qu'environ 600 taxons.

Lors de notre expérience, les entérobactéries sont très majoritairement identifiées. Avec la base de données (2008) certaines espèces comme *Escherichia hermanni*, l'identification répondait *Klebsiella pneumoniae* avec un score > 2, il s'agit d'une erreur corrigée lors des mises à jours effectuées en 2010, car cette souche n'était pas incluse dans la base de données utilisée. Néanmoins, pour la même période, Gravet *et al.*, rapportent[186] [187] des lacunes d'identification concernant les entérobactéries avec la base de données de Saramis AnagnosTec®, où des espèces identifiées sans difficulté par MALDI Biotyper™, nécessitaient

d'après l'auteur, quelques tests supplémentaires (Api 20) (ex: l'identification des *Serratia*, *Proteus* et *Providencia*). Les techniques conventionnelles et le séquençage de l'ARN16S ne permettent pas toujours d'aboutir à une identification précise que la spectrométrie de masse. Cette dernière, appliquée en routine hospitalière, permet une identification rapide des bactéries fastidieuses comme *Bordetella*, *Aggregatibacter*, *Haemophilus*, et *Capnocytophaga* et même des *Nocardia* même si cette dernière n'était pas identifiée avec un bon score. L'identification des anaérobies est aussi facilitée, comme pour *Clostridium difficile*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*. Cependant, nous avons rencontré quelques difficultés pour l'identification de bactéries comme *Propionibacterium sp* (seulement 18% identifiées) étaient identifiées comme étant *Eubacterium brachy* avec un score portant satisfaisant. Même constat rapporté par Bizzini *et al.*, 2010[184] . Cette erreur d'identification, en effet, était due à un inversement d'espèces lors de leur introduction dans la base de données de Bruker; cette erreur a été corrigée depuis. Des analyses suivantes sur les *Propionibacterium* ont toujours donné des résultats corrects à 100%. Cette erreur n'est pas la première, car nous avons enregistré un inversement pour les espèces de *Streptococcus anginosus* et *Streptococcus constellatus* corrigé aussi grâce à notre intervention.

La construction d'une base de données dédiée à l'identification des Corynébactéries par MALDI-TOF/MS fut simple et rapide. Nous avons pu identifier toutes les souches même si certaines l'ont été qu'avec des scores entre 1.6 et 1.9 (*C. urealyticum* et *C. pseudotuberculosis*) ; ce qui peut poser des questions autant sur la diversité de certaines espèces que sur l'efficacité d'extraction pour certaines d'entre elles. Alatom et al., 2011[188] ont pu identifier 87% des Corynébactéries (non diphtériques) utilisant la banque de Bruker 2010, une seule erreur d'identification était enregistrée (*C. aurimucossum* identifiée comme *C. minutissimum*). Même constat démontré par Vila et al., 2012[189] où la concordance d'identification entre API et MALDI-TOF/MS était de 89%.

La préparation des échantillons utilisant une extraction protéique nécessite quelques étapes de centrifugation ainsi que des solvants comme l'acide formique, l'acétonitrile ou dans d'autres protocoles le TFA. Tous ces éléments, même s'ils demeurent rapides par rapport aux méthodes conventionnelles, demandent tout de même un temps de pré-analyse important, pour cela nous avons essayé de procéder autrement, en déposant directement les bactéries intactes sur la plaque cible pour évaluer cette technique.

Un premier test de la méthode du dépôt direct de l'échantillon (smear) a été réalisé d'abord sur une cinquantaine de souches rencontrées en routine hospitalière. Le test a permis une identification plus rapide et tout aussi performante que l'utilisation du protocole d'extraction protéique, sur les bactéries à Gram négatif (94,7%), mais moins sur les bactéries à Gram positif (75%). Ces premiers résultats sont dus principalement au manque d'expérience du

personnel en effectuant cette technique, en effet, pour qu'un dépôt direct donne une bonne identification, la quantité déposée ne doit pas dépasser certaines valeurs (10^9 ufc), car cela nuit à l'ionisation de l'échantillon et la richesse du spectre. Ainsi une fine quantité bien étalée d'une manière homogène est assez suffisante pour donner un spectre riche. Effectivement, cela a été corrigé lors d'un test secondaire qui a montré qu'une telle technique pourrait facilement être applicable dans la routine hospitalière. Le laboratoire de bactériologie de Strasbourg utilise la technique de dépôt direct pour l'analyse des bactéries courantes sauf les Mycobactéries qui ont un protocole spécifique. Certaines bactéries comme les *Nocardia*, les *Bacillus*, principalement des bactéries à Gram positif...etc. nécessitent le recours à une extraction protéique. En utilisant cette technique, Bizzini *et al.*, 2010[184] rapporte 25,6% des isolats identifiés après un recours à l'utilisation d'un protocole d'extraction protéique. Sur les 1278 isolats analysés 93,2% ont été identifiés avec un bon score au niveau de l'espèce, 5,3% au niveau du genre, et 1,5% sans résultat. Concernant les mycobactéries, la difficulté d'étudier ces bactéries au niveau protéique réside dans la structure particulièrement riche en lipides complexes de la paroi des mycobactéries qui constitue une barrière physique à l'extraction des protéines. En pratique courante, l'identification des espèces du complexe *M. tuberculosis*, qui repose sur l'étude des caractères cultureux et biochimiques, se révèle souvent très longue et peu discriminante. Ces méthodes conventionnelles tendent à être supplantées par des tests de biologie moléculaire plus rapides et plus fiables tels que les kits commerciaux d'hybridation moléculaire sur bandelette. Cependant, le coût de ces kits moléculaires étant très élevé, et leurs identifications par MALDI-TOF/MS semble prometteur en raison des différents avantages et résultats enregistrés récemment dans la littérature. Lotz *et al.*, 2010[190] ont analysé des souches cliniques sur MicroFlex® avec la base Adromas®. Les cultures de mycobactéries étaient inactivées dans de l'éthanol à 70 % (v/v), puis déposées sur les cibles en 5 fois. Un microlitre (μ L) de matrice acide sinapinique (matrice contenant de l'acétonitrile et du TFA) a été déposé, puis, après séchage, 1 μ L de phosphate d'ammonium 10 mM a été ajouté. Un panel de 31 souches incluant 31 espèces différentes dont 2 complexes a été testé, l'identification était correcte pour 97 % des souches à partir d'une culture sur milieu de Lowenstein et 77 % à partir d'une culture sur milieu liquide (MGIT, BD). Lors de l'expérience faite sur l'identification des mycobactéries, nous avons utilisé le protocole d'extraction protéique habituel précédé par un chauffage à 90°C pendant 10 min et un écrasement des cellules bactériennes à l'aide d'un outil dédié. Les résultats n'étaient pas satisfaisants. Shitikov *et al.*, 2011[191] ont développé un nouveau protocole dédié à l'identification des mycobactéries et rapporte la possibilité de l'identification à l'échelle de l'espèce. El Khichine *et al.*, 2011[192], démontre qu'après avoir chauffé l'échantillon suivie par une séparation sur Tween-20, et procédé par une extraction habituelle des protéine, 87 *M. tuberculosis*, 25 *M.*

avium et 12 non tuberculeuses ont pu être identifiées au niveau de l'espèce. Les auteurs ont créée leur propre base de données. Cependant, Pignone *et al.*, 2006[193] ont rapporté l'identification des Mycobactéries sans avoir utilisé un protocole d'extraction protéique, ce qui ne nous semble peu évident. Bouakaze *et al.*, 2011[194] ont utilisé la technologie IPLEX, MALDI-TOF-based-SNP, pour obtenir 99,9% de performance d'identification au niveau de l'espèce et ont constaté une différenciation des souches. Cependant, cette dernière technologie, d'ailleurs comme toutes les techniques de biologie moléculaire, est lourde et nécessite des consommables onéreux. Un temps important dans la réalisation du protocole est nécessaire, peu pratique dans un laboratoire de routine.

Même si une grande similitude intra-spécifique des spectres de masse est généralement remarquée pour les isolats de la plupart des espèces, une généralisation doit être faite avec prudence, car pour des espèces particulières, une variabilité prononcée de masse de références spectrales peut être observée. Les principales raisons de cela sont les différences dans les limites de définition des espèces telles qu'elles sont exprimées, par exemple, par des similitudes dans les séquences d'ADNr 16S. Pour certaines espèces cliniquement très importantes et bien étudiées (les Streptocoques), la fréquence de coupure dans un dendrogramme de classification correspond à une similarité de séquence supérieure à 99% tandis que pour la majorité des autres genres, elle est à > 97%[195]. L'identification du groupe des Streptocoques oraux (*mitis*, *oralis*,...) et les pneumocoques par MALDI-TOF/MS est délicate, pour cela la sensibilité à l'optochine doit être déterminée pour confirmer la présence ou l'absence d'un pneumocoque. Cela pourrait, par exemple, être observé pour les coques anaérobies à Gram négatif, un groupe de bactéries qui a traditionnellement été beaucoup moins étudié que les autres groupes pour des raisons pratiques. Une comparaison des spectres de masse à des données de séquences a révélé que la variabilité intra-spécifique a été plus prononcée dans la même espèce, voir le cas des *Clostridium sp.*[196]. Nous avons pu identifier que 38,7% des *Clostridium sp.* utilisant la banque de Bruker de 2008. Une haute variabilité intra-spécifique des spectres de masse peut être aussi observée pour certains champignons filamenteux[197].

Les conditions d'identification par MALDI-TOF/MS, ne sont remplies que dans la gamme de masse allant de 3000 à 20 000 Da où une haute variabilité intra-spécifique et une haute similitude intra-spécifique se retrouve en même temps pour la plupart des espèces de micro-organismes. Dans la gamme de masse supérieure à 20 000 Da, en général seul un nombre limité de pics est enregistré malgré la présence d'une diversité de protéines de masses importantes dans les cellules vivantes. Cette diminution du nombre de pics dans cette gamme s'explique par la suppression du signal, causée par des interactions protéiques. Ainsi le protocole d'extraction non adéquat favorise les protéines de faible masse. Toutefois, les

protéines de masses moléculaires supérieures à 30 ou 40 kDa sont plutôt directement détectables quand elles sont purifiées sauf quelques exceptions.

A titre d'exercice, puisque la banque de données ne contenait que peu d'espèces et que notre laboratoire est l'un des spécialistes mondiaux du genre *Corynebacterium*, nous avons créé une banque propre de 17 espèces incluant chaque fois une souche type et deux isolats représentatifs. Puis, nous avons pu obtenir une identification pour souches différentes dans 100% des cas. Pour des espèces tierces, où trop peu de représentants étaient disponibles, les identifications étaient effectivement non satisfaisantes. Par ailleurs, le logiciel Biotyper™ est capable d'effectuer une distinction des souches au-delà de l'espèce, c'est le cas de *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. diphtheriae*. Pour *Corynebacterium jeikeium*, quatre groupes génomiques ont été décrits par Riegel *et al.*, 1994[198] et les 10 souches représentatives étudiées ont été bien classées dans chacun de ces groupes. Ainsi, la MALDI-TOF/MS a pu séparer trois espèces génétiquement très proches: *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis* qui peuvent produire une toxine similaire à la toxine diphtérique.

Cependant, pour effectuer un diagnostic de biovars d'une même espèce à l'aide de cette technique, il sera néanmoins nécessaire de pouvoir identifier tel ou tel peptide, ou protéine spécifique et d'inclure ce type de reconnaissance en annexe du procédé général. Gravet *et al.*, 2010[186] [187] indiquent que l'identification des Corynébactéries utilisant la base de Saramis® n'est pas satisfaisante et que cette dernière n'en contient que 21 espèces (1 à 3 spectres par espèce parfois).

Quelques études ont été menées qui visent la détection de biomarqueurs spécifiques. Par exemple, les β -lactamase qui sont responsables de la résistance aux antibiotiques[177] . Cependant la détection ne s'effectue pas dans la plage de masse dédiée à l'identification bactérienne, mais plutôt dans les gammes inférieures à 1000 Da, en s'appuyant sur la dégradation des β -lactamines via la reconnaissance des pics pré-définis. Hrabàk *et al.*, 2011[199] ont permis aussi la détection de la résistance à la carbapénèmase des Entérobactéries et les *Pseudomonas aeruginosa*. L'absence du m/z 383 Da ou m/z 405 Da indique la dégradation de l'antibiotique par l'enzyme. La sensibilité du test était de 96,7% et la spécificité était à l'ordre de 98%. Kempf *et al.* 2012[200] ont démontré aussi que l'absence d'un m/z à 300 Da chez les *A. baumannii* révèle la résistance de la souche à l'imipénème avec une spécificité de 100%.

Le logiciel Biotyper™ peut autant s'appliquer à la définition par MALDI-TOF/MS de biovars, que de résistances à des antibiotiques, voire à l'inventaire de facteurs responsables de la pathogénie des bactéries. Néanmoins, il a été suggéré de combiner la MALDI-TOF/MS à des bases de données de recherche de protéines pour l'identification des micro-organismes[201] . Avec la croissance rapide du nombre de génomes disponibles cela pourrait devenir possible

pour une large gamme d'espèces microbiennes[202] , même si cela peut être freiné par les incertitudes dans la prédiction des modifications post-traductionnelles qui modifient la masse d'une protéine. Il est important de noter que pour la procédure d'identification de l'identité des protéines détectées est d'une importance relativement mineure dans l'application à l'identification bactérienne. D'autre part, une plus grande importance est attribuée à la reproductibilité de la détection de protéines individuelles ou des pics correspondants, respectivement, dans une souche microbienne particulière.

De plus, la différenciation entre les souches de genres estimés très proches l'un de l'autre est difficile. Les empreintes de masse de plusieurs représentants d'une seule espèce doivent être semblables pour permettre d'établir une empreinte de masse spécifique à l'espèce, constituées de multiples pics. Néanmoins les empreintes de masse, de sous-espèces spécifiques ne sont pas identiques, ce qui pourrait permettre une discrimination infra-espèce, généralement dénommé typage sub-spécifique[203] [204] . C'est le cas d'*Escherichia coli* et des membres du genre *Shigella* où certaines publications de la littérature ont tenté de les regrouper sous un même genre, malgré quelques essais, aucun système dédié à l'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS ne permettait la différenciation de ces deux bactéries. Bizzini et al., 2010[184] rapportent deux *Shigella sonnei* et une *Shigella flexnerii* identifiées comme *E. coli* par MALDI Biotyper™. Il faut préciser que les alinéas de *Shigella sp* ne sont pas inclus dans cette base de données. Cela est dû principalement à la proximité génétique des deux bactéries. Effectivement, l'hybridation ADN/ADN et le Multilocus Enzyme Electrophoresis et le séquençage des gènes de ménages tous indiquent que les deux bactéries appartiennent à la même espèce[153] [154] [156] .

Les systèmes d'identification MALDI-TOF/MS disponibles dans le commerce, appliquent des procédures de calcul simple pour obtenir des résultats d'identification rapides, avec une couverture taxonomique très large, cependant tous ces systèmes trouvent des difficultés pour l'identification d'espèces proches l'une de l'autre. Nous allons détailler comment sont construites leurs bases de données puis nous focaliser sur l'apport de notre nouvelle approche et son introduction pour résoudre une telle lacune.

(I) MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), un spectre consensus (moyenné) est calculé à partir de multiples spectres (20 spectres) obtenus à partir d'une seule souche. Chaque espèce est représentée par une à plusieurs souches. Le résultat de l'identification (espèces microbiennes) est lié à un score calculé par le comptage des signaux du spectre de masse de l'échantillon liés aux pics de masse des spectres de masse de référence, et inversement, et corréler les intensités des signaux appariés du spectre de masse. Les trois scores obtenus à partir d'une telle procédure sont multipliés et normalisés à une valeur maximale de 1000 u.a. et transformés en log score[205] . En général, un log score > 2,0 est considéré comme une

identification fiable d'une espèce bactérienne. Dans certaines études, cependant, le seuil de log score est considéré comme fiable pour l'identification d'espèces est réglée différemment, par exemple à $> 1,7$ [206] ou $> 1,9$ [207]. Dans nos différentes études, nous avons même pu valider des identifications avec un log score >1.4 , pourvu que trois propositions identiques d'identification fut successives dans le rapport d'analyse de Biotyper™

(II) SARAMIS (AnagnosTec/Biomerieux), La base de données est composée de deux types de spectres: a) Les Super Spectres, ce sont des spectres moyens obtenus à partir d'au moins 15 souches différentes, toutes testées dans conditions de culture différentes (milieu de culture, température d'incubation). Ainsi, les super-spectres contiennent les pics les plus fréquents et les plus intenses présents au sein d'une même espèce et permettant une identification rapide tout en minimisant l'influence des conditions de culture. B) les Spectres, il s'agit de spectres correspondant à une souche d'une espèce cultivée dans des conditions particulières. Le spectre de la souche à identifier est comparé dans un premier temps aux super-spectres. Si le résultat est compris entre 75 et 99.9%, selon les recommandations du fabricant I2A, l'identification est validée. Si la concordance est inférieure à 75%, ce spectre est comparé automatiquement à l'ensemble des spectres présents dans la base de données. Un résultat ne peut être rendu lorsque le nombre de pics d'un spectre échantillon est inférieur à 50[208]. Le logiciel teste s'il y a un conflit des résultats significatifs, à savoir si deux ou plusieurs unités taxonomiques différentes ont donné une valeur de confiance importante[209].

(III) VITEK MS (bioMérieux), utilise une matrice d'identification qui a été calculée par Advanced Spectrum Classifier, un algorithme basé sur l'apprentissage supervisé des procédures, dans laquelle un ensemble de données de $>25\ 000$ (Cellules/fractions) spectres de référence a été soumis. Pour chaque espèce, un identifiant est calculé où chaque cellule reçoit un poids en fonction de sa fréquence dans l'espèce et sa fréquence chez toutes les autres espèces dans la base de données. Dans l'étape suivante, les fonctions de probabilité sont calculées pour chaque espèce reliant la somme du poids des cellules produit à partir du spectre correspondant à la matrice d'identification et à une probabilité. Pour l'identification d'un échantillon, le spectre est comparé à la matrice d'identification et la somme des poids des cellules est calculée pour chaque espèce représentée, qui à son tour est transformée en une probabilité délivrée dans le rapport d'identification. (voir Tableau ci-dessous)

Tableau 12 : Les différents systèmes MALDI-TOF/MS commercialisés utilisés dans l'identification bactérienne

	SYSTÈMES ACTUELLEMENT COMMERCIALISES		ANCIEN SYSTÈME
	Bruker Daltonics™ "Microflex (ou BiflexIII) & MALDI Biotyper™"	bioMérieux "Vitek MS-Myla"	Shimadzu-Anagnostec "Axima-Saramis"
Type de cible	Cible en acier 96 puits (Microflex), Cible en acier 384 puits (BiflexIII), cibles réutilisables	Cible en plastique de 48 puits non réutilisable	cible en acier de 48 puits réutilisable
Contrôle et/ou Calibration	Extrait protéique d' <i>Escherichia coli</i> DH5α + 2 protéines additionnées, calibration hebdomadaire, et/ou Protein Standard II	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8793 Réajustement calibration + contrôle en début de plaque, contrôle en fin de groupe de 16 plaques (analyses)	<i>Escherichia coli</i> CGU 10979 Réajustement calibration + contrôle en début de plaque, contrôle en fin de plaque
Dépôt de l'échantillon	dépôt direct (smear), petite quantité + séchage+ 1µL de matrice HCCA + séchage, (Bactéries et levures) Extraction protéique : Mise en suspension dans eau distillée, ajout alcool absolu (70 % final), centrifugation, remise en suspension dans acide formique 70 % et acétonitrile, centrifugation, dépôt 1 µL, ajout 1 µL de matrice	dépôt direct (smear), petite quantité + 1µL de matrice HCCA+homogénéisation+ séchage (levure exclusivement) Extraction protéique dans 20 µL d'acide formique 25 % (v/v), contact quelques seconde, dépôt 1 µL, séchage, ajout d'1 µL de matrice	dépôt direct (smear), petite quantité + 1µL de matrice HCCA + mélange + séchage (Levures + bactéries) Dépôt direct d'une faible quantité de levure, ajout 0,5 µL d'acide formique 25 % (v/v), séchage, ajout 1 µL de matrice
Logiciel & Contenu	MALDI Biotyper™ V3.02, avec CE-IVD Différentes bases commercialisées (1 pour les bactéries rencontrées généralement dans la routine et l'autre pour les bactéries de classe 3 = bioterrorismes) Alinéas (spectre moyen = 20 spectres d'une souche donnée = 1 entrée). Mars 2011: 3 995 spectres permettant l'identification de 2 000 espèces. Création de base de données supplémentaire par l'utilisateur possible, mais pas dans les bases commercialisées.	Saramis® Superspectres: spectres moyens obtenus à partir de 15 souches différentes Spectres octobre 2009: 35 000 spectres, 2 800 spectres (500 genres, 2 000 espèces), ajout de superspectres possible par l'utilisateur.	Vitek MS-Myla® Environ 600 taxons référencés Pas de possibilité d'ajout de bases par l'utilisateur
Résultats	Log score de 0 à 3 Log score ≥ 2: identification à l'espèce 1,7 ≤ Log score < 2: identification au genre Log score < 1,7: absence d'identification	Degré de confiance en % ID parfaite: degré de confiance 99,9 % ID bonne: choix unique entre 60 et 99 % Faible discrimination: 2 choix possibles avec degré > 60 % (nécessite autres tests) Non identifié: si < 60	Pourcentage de similarité Superspectres 70 à 99 % : identification 5 à 10 spectres de la même espèce et % > 40: identification Sinon: absence d'identification

Dans notre laboratoire, pour améliorer la discrimination d'espèces très proches, nous avons pu établir une approche qui prend en compte deux éléments non significatifs, le premier élément s'appuie sur une reproductibilité spectrale égale à 100% des pics composant le spectre moyen. Cette reproductibilité est obtenue par le nettoyage du spectre moyen de tous les pics variables résultant des différents spectres issus de différents dépôts du même échantillon avec la déduction d'un bruit de fond égal à $1/10^4$. Cet élément n'est pas considéré, par exemple, dans la construction de la base de données de MALDI Biotyper (Bruker Daltonics™), ni SARAMIS AnagnosTec (bioMérieux). Ce spectre moyen représente une souche donnée d'une espèce donnée. Le deuxième élément non significatif concerne les pics communs dans une espèce donnée, ces pics sont éliminés à leur tour après avoir comparé les différents spectres moyens des différentes souches appartenant à cette espèce. Les pics résultant de cette suppression des pics communs au sein de chaque espèce, sont comparés entre eux par la suite, pour en déduire les pics spécifiques à l'espèce. Les pics spécifiques ont été listés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 13:List of discriminating peaks traced in different species of *Shigella* sp & *E. coli* (presence of peaks is marked (+))

Peaks m/z	<i>E. coli</i> Isolates			<i>Shigella</i> sp Isolates			
	Lactose+	Lactose -	O157	<i>sonnei</i>	<i>boydii</i>	<i>flexnerii</i>	<i>dysenteriae</i>
2873							+/
3433						+III	+
3645						+III	
4165				+IIII			
4186		+	+	+IIII			
4441				+		+	
4537		+		+IIII			
4768							+/
4863	+		*				
4873				+		+	
5872							+/
6494	+		*				
6512	+		*	+IIII			
7291						+III	
7860				+		+	
8295							+/
8330							
8880	+		+	+	//	+	+
9003					+II		
9069	+	+	*				
9459							
9544				+	+		
9727	+						
9746				+		+	

PS: these discriminating peaks of course are results of the elimination of variable peaks from the ten spectra analyzed of each species"

- In red : specific peaks that differentiate between lactose positive and Lactose negative
- In yellow: specific peaks that differentiate between *E. coli* lactose negative and *Shigella* sp
- * specific peaks that differentiate between pathogenic and non pathogenic *E. coli*
- / specific peaks of *S. dysenteriae* within *Shigella* species
- // specific peaks of *S. boydii* within *Shigella* species
- III specific peaks of *S. flexnerii* within *Shigella* species
- IIII specific peaks of *S. sonnei* within *Shigella* species

Nous avons établi une base de données selon ces critères et nous avons pu identifier 100% des *Shigella flexnerii*, les *Shigella dysenteriae*, et les *Shigella boydii* de l'étude. Cependant, seulement 13/15 des *Shigella sonnei* et 12/14 des *E. coli* lactose négatif ont été correctement identifiés via la base de données dédiée. Deux cas polymicrobiens ont été recensés dans cette étude, où un seul micro-organisme est correctement identifié. Néanmoins, il faut souligner qu'une approche basée sur la reconnaissance des m/z spécifiques à l'espèce nous a permis d'identifier la présence des deux bactéries dans le mélange polymicrobien, mais aussi de confirmer une erreur d'isolement des deux *S. sonnei* et *E. coli* lactose négatif non identifiées correctement par la base de données créée. Par conséquent, Un algorithme de reconnaissance de ces pics spécifiques sera annexé dans le logiciel MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) pour l'identification des deux bactéries. Probablement, cette approche que nous avons développée pour le groupe *Shigella/E. coli* peut également être appliquée à d'autres bactéries non différentiable par les systèmes MALDI-TOF/MS actuels. Cela suggère des enquêtes futures sur des bactéries comme le groupe *Streptococcus mitis/oralis* et *S. pneumoniae*.

La discrimination de ces deux bactéries appartenant génétiquement à la même espèce nous a ouvert la porte vers d'éventuelles capacités de la technique dans la discrimination des souches. Cela permet également d'approfondir les travaux de typage par MALDI-TOF/MS réalisés auparavant et publiés dans certains papiers, par exemple, l'étude portée sur la discrimination des souches environnementales de *Vibrio sp*[7]. Par conséquent, une nouvelle investigation basée sur cette nouvelle approche pourrait donner des précisions plus claires concernant l'agrégation des différentes souches de *Vibrio sp* recensées dans cette étude.

Toujours dans ce contexte de typage, nous avons cherché à évaluer cette capacité de distinction des souches pour la surveillance épidémiologique, et nous avons choisi de comparer le pouvoir discriminant d'une technique de référence comme l'électrophorèse en champ pulsé pour 103 souches de *S. aureus*. Une autre technique de référence qui est le "MultiLocus Sequencing Typing" (MLST) a aussi été employée et comparée. Au cours d'une étude transversale réalisée en un mois (21 novembre au 24 décembre 2007), plusieurs cas d'ostéomyélites et de pyomyosites ont été recensés dans la communauté villageoise Hlagba Ouassa au Bénin. Cinquante-neuf patients atteints de pyomyosites porteurs de SARM étaient identifiés et les facteurs de virulence associés à ce portage étaient recherchés en parallèle.

Dans un premier temps, nous avons considéré seulement les cas de pyomyosites où à partir de 59 souches, l'ECP distingue 21 profils pour des souches qui, parfois seulement peuvent être considérées comme clonales suivant les critères de Tenover (- de 3 fragments différents)[111]. Le profil prédominant S2 représente 18 souches/59 où seulement une souche ne produit pas l'entérotoxine SEB et deux ne produisent pas de PVL. Grâce aux profils MLST,

16/18 souches du pulsotype S2 représentent un seul clone "CC121", pour les deux restantes, une souche n'était pas typable par MLST et l'autre représente un autre clone MLST différent "spa CC377". Cependant, par la spectrométrie de masse et en se basant sur l'élimination des pics variables au sein des différents spectres de souches acquis et ayant servi à définir la création d'un profil spectral d'une souche donnée, l'utilisation d'un dendrogramme de classification basé sur la méthode d'agrégation Leucidean et Ward, le pulsotype S2 apparaît plus hétérogène avec 6 groupes distincts. En conséquence, parmi les trois méthodes utilisées, la spectrométrie de masse serait plus discriminante. Cette observation mérite une expertise sur la manière de considérer un "Clone" qui reste vaguement définie en se basant sur de tels résultats. Néanmoins, l'une comme l'autre technique peut distinguer des souches apparemment comparables dans la technique opposée. Il s'agit donc de méthodes complémentaires. Le MALDI-TOF pourrait aussi avoir un intérêt et un impact plus important dans ce domaine de typage, car l'information, directement ou rapidement acquise par la réalisation des spectres pour l'identification, en fait, un outil rapide et peu onéreux d'application. De plus la biologie moléculaire présente quelques désavantages comme la présence d'éventuels inhibiteurs bloquant la réaction de PCR, le risque de contamination des réactions. L'autre possibilité est la nécessité d'avoir un séquençage complet et une haute qualification du personnel. Le délai de rendu des résultats est long et n'est pas adapté aux grandes séries d'échantillons donc mal adapté à la routine hospitalière. Enfin, MALDI-TOF/MS s'avère plus discriminante que la biologie moléculaire pour certaines bactéries comme par exemple les espèces du complexe *Burkholderia*[210]. Le protocole adapté pour le typage des souches s'appuie sur le nettoyage de pics non reproductibles à partir de réplicats qui vont former le spectre moyen d'une souche donnée utilisant un bruit de fond égal à $1/10^4$ u.a. Dans l'étape suivante et après comparaison de deux souches, par exemple, les pics communs sont éliminés à leur tour pour ne garder que les pics variables reproductibles entre les deux souches d'une espèce. Un dendrogramme de classification pourrait être alors établi par la suite. Nous suggérons de délimiter la notion du clone en fonction du nombre de ces pics variables entre les souches. Walker *et al.*,2002[122] ont pu montrer le potentiel de la technique dans la discrimination des SARM et des SASM, en augmentant la valeur du bruit de fond (1%), cela conduit à l'exclusion de certains pics (m/z) qui sont cependant reproductibles, mais ayant une faible intensité. De plus, le nombre de réplicats joue un rôle important dans la déduction de ces pics variables, ils ont utilisé 4 réplicats seulement, dans notre cas 10 réplicats ont été pris en compte. Les pics en commun résultant de l'élimination de ces pics variables ne sont pas les mêmes selon le nombre de réplicats utilisés. Nous pensons que, pour qu'un spectre soit reproductible il faut un minimum de 10 réplicats mesurés. Pour que le

typage ait son efficacité une deuxième élimination des spectres en commun de l'espèce considérée résultant de la comparaison de plusieurs souches données.

L'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS à partir d'échantillons directs, par exemple, à partir des hémocultures positives présente un intérêt crucial dans la prise en charge des patients permettant ainsi une antibiothérapie rapide et adéquate. L'identification directe des micro-organismes par MALDI-TOF/MS à partir des hémocultures positives montre un bon pourcentage d'identifications correctes (>90%). Ce pourcentage en général est différent d'une étude à l'autre et cette variation est due principalement aux protocoles d'extraction utilisés et la nature des microorganismes rencontrés dans les échantillons d'hémoculture positive[211] . Le protocole, ainsi que la considération des 5 propositions d'identifications successives pour la validation d'une identification, utilisés dans notre expérience semble avoir une bonne efficacité concernant les bactéries à Gram positif, surtout les *Streptococcus* (89%) et les *Staphylococcus* (95%) par rapport à l'ensemble des études faites sur ce sujet[6] . Concernant l'utilisation d'un protocole d'extraction protéique et la méthode dite "Smear", la première reste de loin la meilleure, en évitant ainsi des pics contaminant provenant des éléments sanguins qui se répercutent sur les termes de richesse en pics et du coup des mauvais résultats d'identification. Ferreira *et al.*, 2010c[128] ont montré une performance de plus de 76% utilisant le protocole d'extraction protéique alors que la méthode "smear" a montré 46% d'identifications correctes. Dans notre investigation et après avoir eu des résultats primaires négatifs par la méthode de "Smear", nous nous sommes basés sur le protocole d'extraction sans poursuivre une évaluation complète de la méthode du dépôt direct.

Bruker Daltonics a récemment fourni un protocole spécifique concernant l'usage de la MALDI-TOF/MS pour l'identification des bactéries présentes dans les hémocultures positives. Cependant, ce dernier en le comparant à notre protocole utilisé dans l'article publié [6], présente quelques inconvénients vis-vis de son utilisation. D'abord sa complexité puis les différentes étapes qui le rendent plus lourd en terme de rapidité mais aussi de consommable, car il utilise un kit conçu pour la séparation des bactéries et des éléments sanguins en deux étapes.

De nombreuses publications ont été réalisées sur l'identification microbienne directe à partir des échantillons d'urine et ont montré 94% d'identifications correctes.

Beaucoup de publications ont été réalisées sur ce sujet[128] [132] [212] [213] [214] . Différents protocoles ont été envisagés cependant, seuls les protocoles utilisant deux étapes de centrifugations sont retenus comme performante au niveau de l'identification à l'espèce; ils se basent sur l'élimination des leucocytes en récoltant à la suite des bactéries pures. Les échantillons d'urine non traités et déposés directement sur la plaque cible MALDI n'ont pas donné de résultat performant. Ferreira *et al.*, 2010c[132] a montré plus de 94%

d'identifications correctes. Cependant, selon Bizzini et Greub., 2010[185] , ce taux d'identification correcte n'est respecté qu'à partir d'un seuil de bactéries viables présentes dans l'échantillon de 10⁷ bactéries/mL. Toujours selon Bizzini et Greub.,2010[185] l'utilisation du système MALDI dans ce secteur de prélèvement (Urine) n'est ni efficace ni rentable du fait d'abord de la valeur d'une réponse rapide et du nombre d'échantillons traités négatifs dans ce service qui est très important. Mais aussi la nécessité d'un isolement pur des bactéries pour un éventuel antibiogramme. De plus, dans ce secteur la majeure partie (> 80%) des bactéries identifiées représente *E. coli* où l'identification est simple. Pour les 20% restant l'utilisation du MALDI est appréciable pour l'identification des bactéries bien isolées.

Les lacunes de l'identification par MALDI-TOF/MS existent, mais ne sont pas dénombrables comme c'est le cas pour les méthodes conventionnelles. Bizzini et Greub., 2010[185] ont rapporté les différents problèmes d'identification liés à l'usage de MALDI-TOF/MS dans la routine hospitalière.

Tableau 14 : Lacunes trouvées dans l'identification de routine par MALDI-TOF MS selon Greub *et al.* 2010

Problemes	Examples
Limit of resolution of the MALDI-TOF MS method	<i>Shigella spp.</i> identified as <i>E. coli</i>
Database discordances	<i>Propionibacterium acnes</i> wrongly identified as <i>Eubacterium brachy</i>
Errors in the reference spectra	due to incorrect reference spectra in the database
Similarities of spectra present in the database*	Incomplete reference libraries for <i>viridans streptococci</i> and <i>pneumococci</i>
Absence or insufficient reference spectra in the database*	Insufficient number of reference spectra of <i>Streptococcus pneumoniae</i> & <i>Streptococcus parasanguinis</i> in the database to differentiate accurately these two closely related species.
No reference of non-Clostridium anaerobes in the database	In the database is not enough to be representative of the true diversity of <i>P. acnes</i> and <i>B. cereus</i> profiles
Taxonomical discordances	<i>Stenotrophomonas maltophila</i> misidentified as <i>Pseudomonas hibiscicola</i> , which is an invalid name for <i>S. maltophila</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> is synonymous of <i>Rhizobium rhizogenes</i>
Insufficient protein signal	Yeasts require a protein extraction procedure to be correctly identified
Difficult to lyse cell wall structures	Pneumococci as well as most strains of <i>Haemophilus influenzae</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> possess a capsule which prevents efficient lysis & results to poor spectral quality
Small amount of material sample	<i>Actinomyces</i> , <i>Gemella</i> , <i>Nocardia</i> , and <i>Streptomyces</i> species usually display weak protein signals. Better signal for <i>Enterobacteriaceae</i> grown on blood agar vs. MacConkey Agar

*A higher number of reference spectra in the database are usually required to accurately identify closely related microorganisms that display a high degree of spectrum similarities. Thus, these two parameters are interdependent.

Tous les utilisateurs ainsi que les différents travaux concernant l'usage de MALDI-TOF/MS comme outil d'identification bactérienne sont unanimes à propos de la confusion d'identification liée au groupe de *Streptococcus viridans* et les *Streptococcus pneumoniae*. Malgré la présence de différentes souches représentatives de ces espèces, la différenciation reste aléatoire et le problème réside à priori dans l'algorithme d'identification et/ou les spectres de références et non comme disent certains auteurs à la pauvreté de la banque de données. Par ailleurs, la plupart des bactéries non identifiées en routine par MALDI-TOF/MS sont des bactéries anaérobies et généralement leur non identification est liée dans 99% des cas rencontrés à leur absence dans les bases de données utilisées. Par exemple, des espèces non identifiées auparavant par ce système telles que plusieurs espèces appartenant aux genres *Clostridium* et *Fusobacterium* sont désormais référencées et identifiables avec un bon score de fiabilité.

Les différents prélèvements sont généralement confrontés aux problèmes de contaminations. Ceci conduit à la réalisation de différents isollements et donc un consommable très important et une réponse assez tardive. Cela nous a amené à tester la capacité du MALDI-TOF/MS à identifier les espèces présentes dans plusieurs associations microbiennes. Dans tout les cas, MALDI Biotyper™ a pu identifier l'une des deux espèces présentes. Nous avons démontré aussi le potentiel de la technique à analyser des mélanges polymicrobiens de 3 ou plus de bactéries soit dans des cas cliniques (des hémocultures)[6] . La proportion des espèces présentes dans un mélange polymicrobien joue, cependant, un rôle très important dans leur identification. La présence de deux germes l'un à Gram positif et l'autre à Gram négatif favorise un log score très important pour ce dernier. Des études réalisées sur ce genre d'association ont également révélé cet aspect, Wahl *et al.*, [215] ont confirmé le potentiel d'analyse d'associations de 2 ou 3 espèces de bactéries créées artificiellement par informatique.

2. Conclusion Bibliographique

1. Identification des micro-organismes par MALDI-TOF/MS (WorkFlow)

Les modalités pratiques de l'identification des micro-organismes basée sur la MALDI-TOF/MS sont simple et robustes[205][205] . A partir d'une colonie sur un milieu gélosé, l'identification peut être effectuée sans aucune connaissance préalable en microbiologie ou en spectrométrie de masse. Simplement, une quantité suffisante de cellules fraîches prélevées à partir d'une colonie est transférée à l'aide d'un outil approprié[26] [216] . Des procédures de préparation d'échantillon élaborées peuvent être appliquées à des bactéries spécifiques[217] , par exemple, des micro-organismes hautement pathogènes[218] , ou des bactéries possédant des membranes externes particulières[192] .

Pour l'identification de routine, généralement une solution d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), des solvants organiques et de l'eau est utilisée. Pour assurer la solubilité du CHCA et, aussi, assurer l'extraction des protéines à partir des cellules entières, des solvants (Acétonitrile, éthanol, méthanol) et un acide organique tel que l'acide trifluoroacétique (TFA) sont utilisés. D'autres matrices peuvent également être utilisées, telles que l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)[209] ou l'acide sinapique/Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique[219] entraînent une légère différence des spectres de masse, principalement sur les intensités relatives des pics individuels, mais généralement avec des performances égales en terme d'identification. L'acquisition des données réelles avec MALDI-TOF/MS est aujourd'hui généralement effectuée de manière automatisée (FlexControl™, Bruker Daltonics). Autrement dit, la focalisation du laser balaye l'échantillon dans un motif prédéfini et accumule un spectre de masse moyen à partir d'un nombre, généralement issu de plusieurs centaines de cycles d'impulsions laser. Un spectre brut est généralement traité pour donner une empreinte de masse qui contient l'information des valeurs m/z des pics, réduisant ainsi considérablement la taille des fichiers individuels. En comparaison avec l'utilisation de l'information spectrale complète, l'information essentielle n'est pas perdue, comme l'ont montré les études appliquant différentes méthodes de comparaison des spectres de masse[220] . L'étape essentielle pour l'identification des espèces est la comparaison de l'empreinte de masse de l'échantillon à identifier à une base de données contenant les spectres de masse de référence. De manière uniforme, l'exhaustivité et la qualité d'une telle base sont cruciales pour une bonne performance. Cela nécessite, en premier lieu, des empreintes de masse de plusieurs souches par espèce pour représenter leur biodiversité[221] . Ce dernier est également évident d'après les postulats des taxonomistes stipulant qu'une

espèce doit être décrite par l'étude d'au moins 10 individus (souches) différents[222] [223] . Comme résultat de la comparaison, une liste d'espèces proposées est distribuée sur la base de la similitude des empreintes de masse de l'échantillon par rapport aux spectres de référence où la valeur d'une bonne correspondance spectrale est donnée à partir de laquelle l'utilisateur peut en déduire l'identité la plus probable des échantillons.

Différentes approches ont été suivies pour calculer la similitude entre les spectres de masse d'un échantillon à identifier et ceux de référence pour permettre une identification qualifiée:

- ✓ Arnold et Reilly[4] ont appliqué une analyse de corrélation croisée pour comparer les spectres de masse obtenus à partir de 25 souches d'*E. coli* permettant, ainsi une discrimination visuelle des spectres très semblables.
- ✓ Jarman *et al.*,[224] ont développé un algorithme pour l'extraction de "empreintes de masse" représentatives par une analyse répétée de souches individuelles, prenant en considération les erreurs analytiques dans les mesures et la variabilité des intensités des pics. Cette procédure a été appliquée pour des spectres de masse de six espèces bactérienne, afin qu'elle soit ensuite utilisée pour l'identification des échantillons en aveugle de la même espèce isolée ou mélangé avec d'autres espèces[225] .
- ✓ Bright *et al.*,[141] ont utilisé un algorithme de reconnaissance de formes basée sur la transformation des spectres individuels en une valeur d'un seul point dans un espace à n dimensions. A partir des analyses multiples d'une souche individuelle, "un échantillon représentatif de la population" a été calculé pour qu'il soit utilisé comme un identificateur pour les échantillons à identifier en aveugle.
- ✓ Tao *et al.*,[226] ont proposé une procédure de cartographie des masses protéiques où chaque pic dans un spectre de masse d'une souche donnée est pondéré en fonction de sa fréquence de détection dans les multiples spectres de masse. La base de données du test contenait 10 souches représentant neuf espèces bactériennes.
- ✓ Hettick *et al.*,[227] ont utilisé une analyse discriminante linéaire et une approche dite "Random Forest" pour discriminer des souches appartenant à quatre espèces de mycobactéries. Des procédures similaires ont été appliquées à des souches d'*Aspergillus ssp.*[228] et *Penicillium ssp.*[229][229] .
- ✓ Chen *et al.*,[230] ont appliqué une analyse PCA (Principal Component Analysis) pour discriminer des souches individuelles au sein d'un petit ensemble d'*E. coli* après une discrète ondelette transformant les données des spectres de masse bruts[231] .
- ✓ Hsieh *et al.*,[232] ont soumis un ensemble de spectres de masse de bactéries appartenant à six espèces différentes à une analyse de regroupement hiérarchique pour classer les spectres conformément à l'affiliation taxonomique des souches analysées.

Ces approches et d'autres encore n'ont pas été adoptées pour l'utilisation dans les diagnostics de routine. Les raisons sont en partie dues au fait que les études pilotes ont été effectuées uniquement sur un ensemble limité d'espèces et de souches- quand elles n'étaient pas entièrement limitées à un groupe particulier de micro-organismes dès le début. Les algorithmes et les procédures informatiques s'ils fonctionnent sur un certain nombre de bactéries, ne fonctionnent pas nécessairement correctement dans un contexte clinique, où les isolats rencontrés appartiennent à plusieurs centaines d'espèces, chacune avec une diversité intra-spécifique plus ou moins prononcée. Pour certaines approches le temps de calcul peut aussi devenir critique lorsque le nombre d'entrées dans une base de données de référence est augmenté de plusieurs ordres de grandeur. Par conséquent, il n'est pas tout à fait surprenant que les systèmes d'identification MALDI-TOF/MS disponibles dans le commerce, appliquent des procédures de calcul simples pour obtenir des résultats d'identification rapides, d'une part, et que leurs bases de données et leur couverture taxonomique sont beaucoup plus larges que dans les études mentionnées ci-dessus. Les systèmes disponibles actuellement dans le marché sont partagés par deux sociétés (Bruker Daltonics qui détient la plus grande part du marché) et bioMérieux (VITEK MS).

Les bases de données spectrales sont comparables à celles des séquences nucléotidiques, en particulier, la base de données de l'ADNr 16S pour lesquelles le nombre d'entrées (Jan 12, 2012 : 2,110,258 16S rRNAs selon <http://rdp.cme.msu.edu/>) a été considérablement augmentée au cours de la dernière décennie. Et similairement aux bases de données de séquences, l'utilité d'une base de données dépend fortement de la qualité des entrées individuelles, qui ne sont pas toujours satisfaisantes [205] [233] . Les bases de données disponibles seront constamment élargies pour couvrir non seulement les micro-organismes d'importance clinique, mais aussi les micro-organismes d'origine vétérinaire, industrielle, agricole ou d'origine environnementale [234] [235] [236] .

2. Quelques lacunes

Bien qu'aujourd'hui, les applications de MALDI-TOF/MS ne soient pas encore pleinement explorées, certaines limites sont déjà évidentes. Ces limites sont d'une nature technique et peuvent disparaître avec des améliorations futures des instruments. Par exemple, la quantité de matériel cellulaire nécessaire pour une analyse réussie est actuellement –selon l'espèce– de 10^4 – 10^5 cellules pour les dépôts manuels de l'échantillon. Cela risque de diminuer sensiblement avec l'introduction de techniques de microspotting [225] . En outre, une certaine variabilité entre les mesures répétées du même échantillon est intrinsèque à la MALDI-TOF/MS et peut être évitée par l'élimination de ces pics variables sans perdre l'information spectrale comme nous l'avons démontré dans l'approche de discrimination des *Shigella* et *E.*

coli. D'autres limites sont d'une nature biologique, c'est le cas des Mycobactéries. Il s'agit notamment de l'analyse de micro-organismes non-cultivables, et la différenciation de taxons très étroitement liés.

Avec de nouvelles avancées dans la technologie, ainsi que des méthodes plus affinées de préparation des échantillons, certains de ces contraintes actuelles probablement seront surmontés.

1. La détection de la résistance aux antibiotiques

Un certain nombre d'études propose désormais la possibilité d'utiliser le MALDI-TOF/MS pour différencier des souches résistantes aux antibiotiques de celles qui sont sensibles, par exemple les SARM vs et les SASM[237] [238] [239] . Comme la plupart des gènes responsables de la résistance aux antibiotiques sont codés par des éléments génétiques mobiles avec un potentiel élevé de transfert horizontal de gènes, les facteurs de résistance ne sont pas nécessairement liés à des relations phylogénétiques[162] [240] . Cependant, des approches axées sur la détection des produits de dégradation des antibiotiques dans des masses basses 600-1000 Da ont été rapportées, par exemple, pour l'activité des carbapénemase[199] [200] . Même si la présence ou l'absence de ces produits (pics issus de la dégradation de l'antibiotique en question) n'a pas encore été validée comme étant la preuve absolue de la sensibilité ou la résistance de la souche à l'antibiotique, car des facteurs comme une faible ou forte expression de l'enzyme responsable de la résistance, peut engendrer des résultats similaires. Un autre problème confronté à ce genre d'approche est la difficulté de tester un antibiogramme sur 12-20 antibiotiques qui devient très lourd à mettre en œuvre, cependant son utilisation dans des cas particuliers pour des confirmations claires semble être son avenir.

2. Le cas des échantillons polymicrobiens et l'identification directe

Plusieurs études ont évalué la possibilité d'utiliser la MALDI-TOF/MS pour l'analyse des échantillons mixtes et d'identifier correctement les composants de l'échantillon[215] [241] . Bien que deux ou trois espèces bactériennes puissent généralement être séparées et identifiées lorsqu'elles sont présentes à égal niveau dans l'échantillon, la limite de la MALDI-TOF/MS est évidente lorsqu'une espèce dans un mélange prédomine fortement. Cela peut être le cas, par exemple, des infections des voies urinaires, dans lequel une seule espèce prédomine généralement au sein d'un échantillon d'urine[132] [242] . Puisque cette technique avant tout, est une analyse chimique, l'abondance des analytes particuliers, ou de marqueurs dans un échantillon, détermine directement la capacité de les détecter. Par conséquent, les signaux protéiques d'un micro-organisme, qui présentent seulement un partage mineur, par exemple, moins de 10% de la biomasse totale (Données non publiées), dans un échantillon

mixte seront pratiquement indiscernables du bruit de fond. Dans d'autres échantillons cliniques, ex: les voies respiratoires et les échantillons issus des selles par exemple, l'arrière-plan des bactéries commensales et la dégradation de produits entravent la détection des agents pathogènes potentiels qui peuvent être présents avec des abondances relativement faibles. L'avis du biologiste après une première culture est d'importance. Ce problème des cultures polymicrobiennes est rencontré aussi dans les prélèvements d'hémoculture. Alors que l'identification des agents pathogènes directement à partir des échantillons de sang des patients est problématique, l'identification des agents pathogènes à partir d'hémocultures positives a récemment été mise en place, réduisant considérablement le temps de réponse pour l'identification bactérienne[242] . Dans les cas de bactériémies avérées, l'application d'une thérapie rapide et efficace est d'une haute importance. Plus complexe encore, les mélanges polymicrobiens naturels, tels que les biofilms, qui généralement contiennent des dizaines ou des centaines d'espèces différentes et pour lesquels une simple identification d'espèce par spectrométrie de masse est improbable. Toutefois, les spectres de masse pourraient, en théorie, être utiles pour identifier les modifications dans les communautés bactériennes en réponse à l'évolution des conditions environnementales.

3. MALDI-TOF MS Applications en Microbiologie

Environnementale?!

La MALDI-TOF/MS montre un potentiel particulier pour des applications dans la microbiologie environnementale[243] [244] Munoz *et al.*,[235] par exemple, révèlent des espèces cryptiques dans une flore environnementale de plusieurs isolats liés de procaryotes halophiles. Le problème généralement rencontré lors de l'identification des bactéries environnementales réside principalement dans les bases de données commerciales, où seulement une fraction mineure ou un nombre relativement très faible (centaines) est contenu dans ces bases de données par rapport aux estimations d'espèces procaryotes qui peuplent la terre (quelques millions à plusieurs centaines de millions). Le nombre d'espèces procaryotes isolées, caractérisées, décrites et publiées est d'environ 10.500[245] . Pour les micro-organismes eucaryotes environ 70.000 espèces décrites alors que les estimations des espèces potentielles est près de 1.5 million (quoique, la mycologie n'a pas mis en place un système de validation systématique à l'instar de la bactériologie). Par conséquent, la probabilité qu'un isolat environnemental non identifié par MALDI-TOF/MS, représente une "nouvelle" espèce est relativement élevée. Toutefois, MALDI-TOF/MS représente un outil efficace pour caractériser et comparer rapidement des isolats de l'environnement provenant d'écosystèmes donnés. C'est un grand nombre d'isolats qui peut être analysé et discriminé rapidement et relativement avec un faible coût[246] [247] [248] . Les analyses des spectres de masse

permettent des regroupements d'isolats individuels, par conséquent, ils offrent la possibilité de réduire la redondance dans le nombre d'isolats traités vers une analyse plus poussée pour l'identification (Ex: séquençage d'ADN).

4. Les taxons étroitement liés

La résolution taxonomique par MALDI-TOF/MS est actuellement considérée comme comparable ou supérieure à l'analyse comparative de la séquence du gène ARNr 16S. En général, les espèces bactériennes peuvent être bien discriminées, mais pour des taxons étroitement liés, la méthode atteint ses limites. Même si pour certaines d'entre elles, nous avons pu la résoudre, comme la discrimination entre les *E. coli* et *Shigella sp.*, mais d'autres difficultés persistent, comme, la discrimination des espèces du complexe de Streptocoques (*mitis/oralis*)[249]. La délimitation de *Streptococcus pneumoniae/pseudopneumoniae* et *Streptococcus mitis/oralis* est en partie entravée par la relation étroite entre ces deux espèces[250] en particulier dans la zone de transition des clones, comprise entre les deux espèces[251]. Des stratégies ont été décrites pour surmonter une telle faiblesse d'identification de ces taxons particuliers, comme, l'extension de la gamme de masse, le seuil limité du bruit de fond, et l'amélioration des algorithmes dédiés à la comparaison des spectres de masse. Quelques pistes ont été rapportées dans quelques études sur l'utilisation d'une digestion brute à la trypsine des échantillons, où des fractions protéiques bactériennes donnent des spectres de masse plus informatifs par exemple:

- Pour identifier les spores de *Bacillus sp.*: par l'analyse de petites protéines solubles en milieu acide[251].
- Pour différencier *Enterobacteriaceae* en analysant des protéines de la membrane externe[93] ou pour discriminer *Lactobacillus spp.* par Shotgun Mass Mapping[252].
- Des procédures similaires ont été appliquées à des virus, où le protéome est généralement beaucoup moins complexe par rapport aux bactéries[253] [254].
- Une autre stratégie est la recherche de biomarqueurs individuels ayant une grande spécificité dans les masses spectrales des cellules intactes, après une classification des isolats. Cela permet potentiellement la discrimination des espèces étroitement liées telles que *Yersinia pestis* et *Y. pseudotuberculosis*[255], le complexe *Streptococcus bovis / Streptococcus equi*[256], et *Erwinia spp.*[205] ou les types de résistance aux antibiotiques de *Pantoea*[203] [257].

Comme nous l'avons décrit, une reproductibilité irréprochable au niveau des spectres de référence, mais aussi des biomarqueurs spécifiques est très importante pour la différenciation de telles espèces hautement liées. En effet, parmi les perspectives proches et les travaux futurs de notre laboratoire, se trouve l'application de cette procédure pour la recherche de biomarqueurs spécifiques pour des espèces hautement liées ou très proches.

Ces exemples soulignent le fait que l'expertise microbiologique sera toujours d'une importance primordiale pour bien exploiter les avantages de la MALDI-TOF/MS, surtout à la lumière des automatisations possibles dans l'avenir.

3. Applications futures

Les applications futures de la MALDI-TOF/MS en microbiologie dépendront de l'expansion des bases de données dans des domaines tels que la médecine vétérinaire, la phytopathologie, la sécurité alimentaire, la microbiologie industrielle, la production d'eau potable et la pharmacologie, etc.

Pour obtenir des identifications fiables de micro-organismes dans ces domaines d'études, les espèces et les souches de référence pertinentes doivent être analysées et incluses dans les bases de données. Outre l'expansion de la base de données, les progrès technologiques devraient permettre une automatisation accrue et un débit d'analyse plus important encore. La minimisation de la quantité d'échantillon requise est encore un autre aspect, permettant d'élargir le champ des applications[258] [259] . Les progrès de la technologie MALDI-TOF/MS, elle-même, permettra d'améliorer non seulement la vitesse d'acquisition des données, mais, vraisemblablement plus, la qualité des spectres de masse et, ainsi, l'amélioration des algorithmes avec des annexes supplémentaires pour l'identification d'espèces spécifiques et d'autres dédiés au typage bactérien ou des résistances à certains antibiotiques. Cela permettra d'explorer de plus en plus les capacités épidémiologiques. Quels que soient les applications futures de la MALDI-TOF/MS en microbiologie qui émergent, il est très probable que cette technologie occupera une grande place pour les analyses dans divers domaines de la microbiologie et de la biologie.

Au-delà du monde microbien, quelques études indiquent que MALDI-TOF/MS peut même être utilisée pour identifier des eucaryotes supérieurs, comme les algues[260], les insectes[261] et les nématodes[262] .

4. La spectrométrie de masse en bactériologie, et si nous parlons économie?!

Une nouvelle technologie devant être introduite en laboratoire doit être évaluée sur son coût. La bactériologie médicale n'a pas donné lieu à beaucoup d'études économiques. Si elles ont été faites dans un cadre interne elles ne sont pas forcément publiées.

Généralement, l'investissement d'un MALDI-TOF/MS est très important (120 000 euro), mais le consommable revient à quelques centimes d'euros. Cherkaoui *et al.* 2010[206] , estime le coût des réactifs à 0,50 dollars contre 10 dollars par identification phénotypique. Selon Seng

et *al.* 2009[207], le consommable, le coût du personnel et la dépréciation de l'appareil sur 5 ans est évalué à 1.43 euros, soit 22 à 32% moins cher que les tests phénotypiques. De plus, l'analyse peut être centralisée sur un plateau technique où différents services peuvent y effectuer leurs identifications et récupérer leurs résultats via un système informatique. L'étude conduite aux Hôpitaux Universitaire de Strasbourg en 2008 selon Prévost *et al.*, en 2009 a estimé le temps passé en identification bactérienne toutes techniques confondues: temps technicien 22H30 soit 3.2 ETP, pour 140 identifications par jour sur une moyenne de 280 jours par an. Les techniques utilisées à l'époque dans le laboratoire étaient VITEK2, galerie API, milieux chromogènes et identifications traditionnelles. L'amortissement calculé comprend l'instrument, la suite informatique, la banque de données avec ses mises à jour, les logiciels, les formations et la certification IVD, une instrumentation globalisée à 160 000 € (prix catalogue), une maintenance 129 500 € sur 7 ans (dont la durée de vie est estimée à 10 ans). Le coût est variable selon la méthodologie utilisée: -0,12 € par test en extraction protéique, -0,03 € par test en dépôt direct, (1 tip), -0,68 € par test pour hémoculture positives. Généralement le coût total de l'identification hors ensemencement et réisolement par MALDI-TOF/MS est de l'ordre de la moitié au moins du coût d'une méthode phénotypique. En conclusion, les coûts des examens bactériologiques sont différents selon les prélèvements et les techniques utilisées. Toutefois, ces coûts restent faibles néanmoins quand on les compare au coût de la maladie.

5. Ouverture de la technique aux pays en voie de développement

Les maladies infectieuses sont responsables dans le monde d'au moins 17 millions de décès par an, soit un tiers de la mortalité et 43 % des décès dans les pays en voie de développement (contre 1 % dans les pays industrialisés). La détection précoce d'une infection permet de démarrer son traitement plus tôt et donc de réduire la mortalité. Malheureusement, l'analyse bactériologique classique est complexe, avec une série d'interventions humaines, des réactifs, puis des automates pour certaines tâches, qui rendent l'analyse coûteuse pour les pays en voie de développement. La majorité de ces pays ne peuvent pas en acquérir la plupart des réactifs nécessaires au bon déroulement d'une vraie analyse classique. Par conséquent, et par manque de moyens ces laboratoires microbiologiques souvent ne respectent pas les dates de péremption des produits et sont obligés, dans la plupart des cas, de réduire des étapes nécessaires à la bonne détection du pathogène en question. La qualification du personnel est un autre obstacle, qui peut induire des erreurs, parfois graves, et l'utilisation intensive des antibiotiques, amplifie l'émergence de pathogènes multi-résistants.

Une nouvelle technologie comme la MALDI-TOF/MS et malgré son coût de départ très élevé (160 000 euro) pour ces pays, présente une alternative intéressante. D'abord, par le fait qu'elle engendre un consommable à quelques centimes d'euros, sans réelle difficulté induite par les approvisionnements et péremptions, mais aussi un personnel formé réduit en nombre. De plus, l'analyse peut être centralisée sur un plateau technique où différents services peuvent y renvoyer leur plaque de dépôts et récupérer leurs résultats via un système informatique.

3. Réflexion et conclusion

La chimiotaxonomie, c'est-à-dire l'étude des composés biochimiques de la bactérie, a beaucoup évolué ces dernières années. La recherche des composés de structure connue, a laissé la place aux techniques plus modernes de la chimie analytique. L'exemple de l'analyse par la spectrométrie de masse qui a été testée avec succès sur les bactéries entières est très significatif sur quelques années. Cette méthode analytique a montré lorsqu'on l'applique à des souches bactériennes préalablement identifiées, qu'elle permet de dresser des arbres regroupant les souches selon leur position taxonomique. Le corpus actuel de ce travail et toutes les études publiées, soutiennent la thèse selon laquelle MALDI-TOF/MS est un outil puissant et très important pour l'identification et la classification d'un large spectre de micro-organismes, procaryotes ou eucaryotes, Gram positif ou Gram négatif, coques ou bacilles, à l'échelle de l'espèce ou de sous-espèces.

L'identification bactérienne par spectrométrie de masse est possible à partir d'une banque de données relativement peu complexe par rapport au monde bactérien, et nous n'avons observé, à travers nos essais, aucune identification erronée via ce système. A l'heure actuelle, cette bibliothèque est incrémentée par les fournisseurs. Nous y participons, par l'addition de nouvelles espèces et de souches représentant des espèces déjà existantes. La possibilité d'une automatisation pour le dépôt direct des colonies ou la préparation des extraits protéiques est certainement envisageable pour un grand nombre d'identifications, et leur conditionnement plus simple que celui des souches elles mêmes. Il s'agit probablement d'une technique, qui, sans la supplanter totalement, réforme profondément l'identification classique. Elle permet une unicité méthodologique. Enfin, à partir des mêmes extraits, l'identification de certains de biomarqueurs que la technique développera, ouvrira alors et encore d'autres portes d'investigations, car cet outil représente un accès à une source vaste d'informations, dépendant de la question posée.

Les travaux de cette thèse ont consisté à valider et développer des applications de la spectrométrie de masse dans le laboratoire de bactériologie concernant en particulier l'identification et le typage bactérien.

Différents objectifs ont été envisagés, d'abord la validation de la technique MALDI-TOF/MS comme outil d'identification bactérienne puis son éventuelle utilisation comme outil épidémiologique "typage bactérien".

Pour cela, nous avons préalablement évalué les effets des conditions de culture, tels que les incidences du vieillissement de souches en culture, les différents milieux de culture utilisés en routine, mais aussi les deux protocoles (extraction protéique et dépôt direct) dédiés à l'analyse par MALDI-TOF/MS.

Nous avons observé et conclu que des effets des conditions de culture sont minimes voire négligeables pour l'identification des germes fréquemment rencontrés en routine et que le dépôt direct est adapté à l'analyse de routine.

D'autres paramètres ont été aussi nécessaires pour la validation de la technique:

L'applicabilité de la technique: (inoculum "quantité et précision", milieux d'isolement), la durée de réponse (analyse) antérieure à l'antibiogramme, et le coût (appareil, consommable, personnel).

Mis à part le coût de départ très élevé de l'appareil, Nous avons pu observer des performances meilleures de MALDI-TOF/MS par rapport tous les systèmes conventionnels utilisés en routine en terme de consommable ou rapidité de réponse. La technique dispense la possibilité d'utiliser plusieurs milieux de culture, l'âge et la conservation de la culture sont peu critique, mais aussi l'inoculum et le temps d'analyse sont réduits, c'est le constat obtenu à travers les différents tests menés durant cette thèse.

Les performances scientifiques de la technique : cela concerne le pourcentage d'identifications correctes et/ou incorrectes et l'éventuelle utilisation de tests additionnels le cas échéant. Selon le neuvième manuel de la microbiologie clinique, une bonne technique doit identifier avec une fiabilité plus de 90% toutes bactéries isolées au laboratoire et avec plus de 95% les bactéries fréquemment isolées. Nos investigations et différentes études ont démontré une capacité semblable voire même supérieure aux critères établis par le manuel de la microbiologie clinique.

La base de données : celle-ci doit être riche et représentative du monde bactérien rencontré en routine. Nous avons abordé nos tests d'évaluation avec une base de données contenant 1600 alinéats, qui depuis 2008 a largement évolué, où nous comptons plus de 4100 alinéats en fin 2011. Nous avons contribué à l'enrichissement de toutes les bases de données DB de Bruker (Plus de 125 espèces actuellement incluses grâce à notre laboratoire), et nous continuons cette incrémentation avec plusieurs fournisseurs.

Après la validation de la technique, nous nous sommes intéressés à l'identification directe des bactéries à partir des échantillons "Hémocultures". Nous avons élaboré un protocole spécifique qui permet la séparation des cellules sanguines des cellules bactériennes, dans lequel 95% des échantillons testés (polymicrobiens exclus) ont été correctement identifiés.

Le développement d'un outil épidémiologique rapide, efficace et applicable en routine hospitalière est important en bactériologie. C'est l'autre thème abordé dans cette thèse "le typage bactérien et l'identification de bactéries étroitement liées". Des tentatives de typage par MALDI Biotyper™, sur des Corynébactéries, des Staphylocoques, et des *Escherichia coli* BLSE, et/ou des *Vibrio spp* ont été menées en 2008 et 2009, en variant principalement le bruit de fond des différents spectres de masse, tout en utilisant les outils de classification disposés dans l'algorithme Biotyper™1.1, tels que le dendrogramme, le PseudoGel, la distribution en 2 ou 3 dimensions, etc. Courant 2010 et 2011, nous avons développée une nouvelle approche plus reproductible et spécifique. Elle a permis la différenciation des *Shigella spp* et le groupe d'*Escherichia coli*. Se basant sur cette nouvelle approche de traitement de spectres, nous avons pu typer un ensemble de souches *S. aureus* MSSA responsables d'infections pyomyosites. Les résultats ont montré une grande capacité de typage, cependant ceux –ci étaient discordants par rapport aux méthodes dites "Golden Standard" PFGE et MLST. Cela nous amène à une réflexion concernant la détermination de notion de clone.

Parmi les perspectives de la nouvelle approche développée, une éventuelle distinction rapide entre le groupe *Streptococcus mitis/oralis* et *S. pneumoniae*, *Raoultella ornithinolytica* vs *R. planticola* et d'autres groupes qui semblent être indistinguables par les algorithmes actuels.

ANNEXES

ANNEXE I

Tableaux des différents groupes bactérien rencontrés lors de l'étude menée en 2008 et leur pourcentage d'identification par MALDI Biotyper™:

Enterobacteriaceae

Concordance en espèce	98.5%
Concordance en Genre	99%
– <i>E. coli</i> : 100 % (106 strains)	
– <i>Enterobacter cloacae</i> : 84% (species), 96% (genus) (25 strains)	
– <i>Enterobacter aerogenes</i> : 100 % (6 strains)	
– <i>Serratia marcescens</i> : 100 % (13 strains)	
– <i>Klebsiella oxytoca</i> : 80 % (5 strains)	
– <i>Klebsiella pneumoniae</i> : 100 % (28 strains)	
– <i>Citrobacter koseri</i> : 100 % (4 strains)	
– <i>Citrobacter braakii</i> : 75%(species), 100 % (genus) (4 strains)	
– <i>Citrobacter freundii</i> (1), <i>Morganella morgani</i> (4), <i>Pantoea agglomerans</i> (1), <i>Proteus vulgaris</i> (1) et <i>Proteus mirabilis</i> (4): 100 %	

Streptococci & Parents

Concordance en espèce	82.5%
Concordance en Genre	90%
– <i>S. agalactiae</i> : 89% (9 strains)	
– <i>S. thermophilus</i> : wrong identification (1 strain)	
– <i>S. pyogenes</i> : 100 % (1 strain)	
– <i>S. salivarius</i> : 100 % (1 strain)	
– <i>S. mitis</i> : 100 % for genus (1 strain)	
– <i>S. oralis</i> : 100 % for genus (1 strain)	
– <i>S. anginosus</i> : 86 % (species), 100 % (genus) (7 strains)	
– <i>S. constellatus</i> : 50% (species), 100 % (genus) (2 strains)	
– <i>S. dysgalactiae</i> : 100 % (6 strains)	
– <i>S. gallolyticus (bovis)</i> : 100 % (3 strains)	
– <i>Vagococcus fluvialis</i> (1) et <i>Alloiococcus otitis</i> (1) (wrong id.)	
– <i>Lactococcus graviera</i> (1) : 100% (only one strain)	

Enterococci

Concordance en espèce	96.2%
-----------------------	-------

Concordance en Genre	98.1%
----------------------	-------

– <i>E. faecalis</i> : 87 % (species), 97.4 % (genus) (39 strains)
--

– <i>E. faecium</i> : 82% (species), 100 % (genus) (16)

– <i>E. avium</i> : 100 % (3)

– <i>E. casseliflavus</i> : 100 % (1)

– <i>E. raffinosus</i> : 100 % (1)

Staphylococcus

S. aureus

Concordance en espèce	97.4%
-----------------------	-------

Concordance en Genre	98.1%
----------------------	-------

<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative	100%
--	------

– Represented species : <i>S. epidermidis</i> (26), <i>S. saprophyticus</i> (1), <i>S. cohnii</i> (1), <i>S. intermedius</i> (1), <i>S. haemolyticus</i> (1), <i>S. hominis</i> (3), <i>S. capitis</i> (3), <i>S. simulans</i> (1), <i>S. ludgunensis</i> (1)

***Pseudomonas* & Parents**

Concordance en espèce	86.5%
-----------------------	-------

Concordance en Genre	87.8%
----------------------	-------

– <i>P. aeruginosa</i> (44): 95.5 %

– <i>P. stutzeri</i> (1): no identification correcte (one strain)

– <i>P. putida</i> (2): 100 % (2 strains)

– <i>P. luteola</i> (1): No identification correcte (one strain)
--

– <i>Acinetobacter Iwoffii</i> (1): No identification correcte (1 strain)

– <i>Acinetobacter baumannii</i> (14) : 100%
--

– <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (7): 57% confusion between <i>Pseudomonas</i> (<i>P. geniculata</i> et <i>P. beteli</i>)
--

– <i>Delftia acidovorans</i> (1): 100 % (one strain)
--

– <i>Myroides odoratus</i> (1) : 100 % for genus (1 strain)

– <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (3): 33% (species), 66% (genus)

– <i>Moraxella osloensis</i> (1) : No identification correcte.
--

Bactéries dites difficiles

Concordance en espèce	88.9%
-----------------------	-------

Concordance en Genre	88.9%
----------------------	-------

– <i>Haemophilus influenzae</i> (7) : 71.5 %
--

– <i>Aggregatibacter aphrophilus</i> (1) : 100% (1 strain)
--

– <i>Capnocytophaga ochracea</i> (1) : 100 % (1 strain)

Autres Bactéries

Concordance en espèce	30.8%
-----------------------	-------

Concordance en Genre	69.2%
----------------------	-------

- Species well identified: *Aeromonas hydrophila* (2), *Corynebacterium amycolatum* (2), *Campylobacter coli* (1) et *jejuni* (1), *Pantoea agglomerans* (1), *Oligella uretralis* (1), *Dermabacter hominis* (2), *Bacillus cereus* (1),
 - Species or genus with problems : *Brevibacterium sp.* (4) confusion systématique avec *Arthrobacter sp.* (25% of good identification for genus), *Alloiococcus otitis* (1) confusion avec *S. equorum* (1 strain), *Neisseria sp.* (1) confusion avec *Moraxella osloensis* ...
-

Anaérobies

Concordance en espèce	43.4%
-----------------------	-------

Concordance en Genre	59.4%
----------------------	-------

– Species or genus well identified :

» *Bacteroides fragilis* (9): 88,9 %

» *Bacteroides thetaotaomicron* (6) et *vulgatus* (1) : 100 %

» Genus *Fusobacterium* (4): 100 % for genus et 50% for species. (*F. necrophorum* well identified others species were confused with the last one).

» *Veillonella* (4): 100 % for genus

» *Prevotella bivia* : 100 % (species)

– Species or Genus bad identified :

» *Propionibacterium sp.* : 18 % of concordance (2/11).

From 9 not concordance, 6 « confusions » with *Eubacterium brachy* (where 5 log score > 2)

» *Clostridium sp.* : 38,46% good identifications for Genus. (5/13)

» *Eubacterium* (2) Not identified

» *Lactobacillus* (2) (50 % for genus)

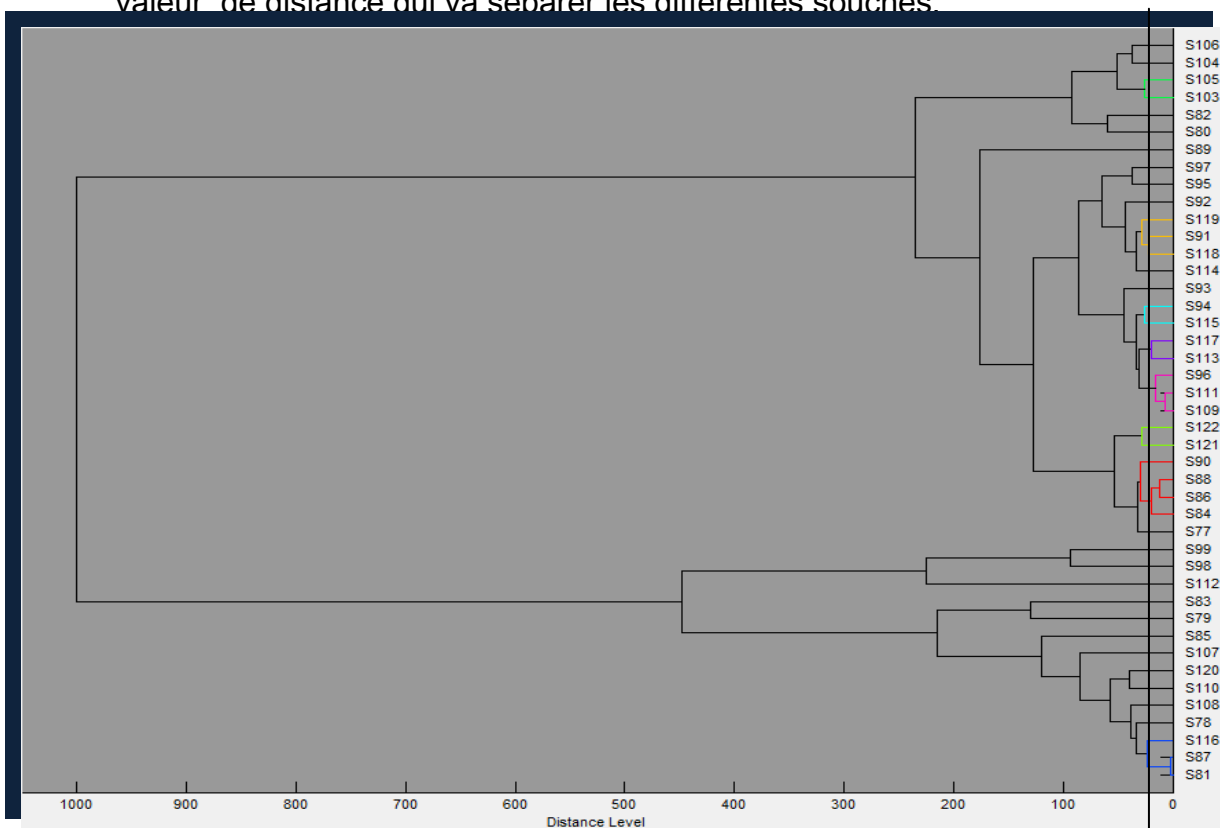
» *Peptostreptococcus sp.* (4) : 25 % d'identifications correctes pour le genre.

» *Sutarella wadsworthensis* (2) à pas d'identification correcte

ANNEXE II

Génération des Dendrogrammes: conditions et paramètres

- ✓ Extraction protéique et non pas le smear (dépôt direct)
- ✓ Combiner 2 ou + de milieux de culture (extraction à partir de chaque milieu de culture)
- ✓ Dépôt multiple sur la plaque cible (5 voir 10 / extraction/MC)
- ✓ Matrice fraîche (vortex après chaque dépôt)
- ✓ Repérage de pics spécifiques ou communs par Flexanalysis
- ✓ Création d'une banque à l'aide du logiciel Biotyper (en éliminant les pics en communs) pour augmenter la qualité de discrimination)
- ✓ Dans la banque chaque souche sera représentée par 20 spectres différents
- ✓ Les paramètres utilisés pour la génération du dendrogramme les plus adaptés (Exp: mesure de distance: Euclidean et linkage : Ward) ainsi le choix de la valeur de distance qui va séparer les différentes souches.



Exemple: Ici aussi la valeur choisie est de 20 pour indiquer les souches identiques

ANNEXE III

TABLEAU I: Groupement des isolats selon le phénotype de résistance aux antibiotiques.

Souches/Isolats	Benzyl penicillin	Rifampicin	triméthoprim/ sulfaméthoxazole	Tétracycline
S99HFu	R	S	R	R
S91HFu	R	S	R	R
S10H	R	S	R	R
S24HFu	R	S	R	R
S98HAb	R	S	R	R
S47C	R	S	S	S
S9HAb	R	S	S	S
24BE	R	S	S	S
S97HFu	R	S	I	R
S90HFu	R	S	I	R
S58HAb	R	S	I	R
S14HAb	R	S	R	S
S13HFur	R	S	R	S
S21HAb	R	S	R	S
S16HAb	R	S	R	S
S28HFu	R	S	R	S
AB1E	R	S	S	R
S100HAb	R	I	R	R
S92HAb	R	I	R	R
6BE	R	I	R	R
16BE	R	I	R	R
8BE	R	I	R	R
15BE	R	I	R	R
22BE	R	I	R	S
11BE	R	I	R	S
12BE	R	I	R	S
S14C	R	I	S	R
23BE	R	I	S	R
CA1E	R	I	S	R
S93HPI	R	I	S	R
S43HAb	R	I	S	R
CA2E	R	I	S	R
S25C	R	I	S	S
S47HAb	R	I	I	R
10BE	R	I	I	R

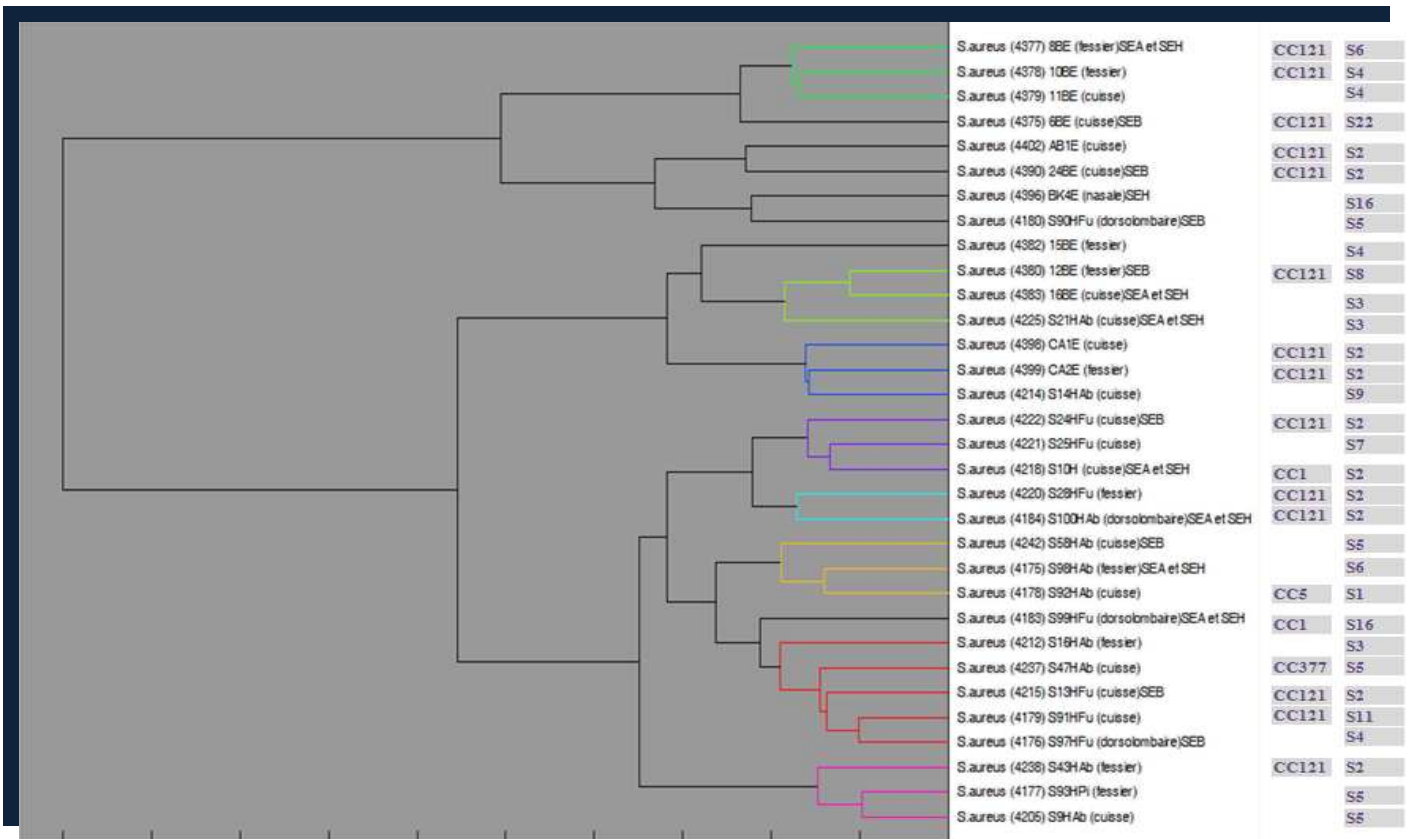


FIGURE A : Dendrogramme de classification des profils MS généré par Biotyper™1.1 issues des différents isolats (sans les isolats associés) prélevés chez les patients atteints de pyomyosites. Les résultats correspondants par MLST et PFGE paraissent à droite du dendrogramme.

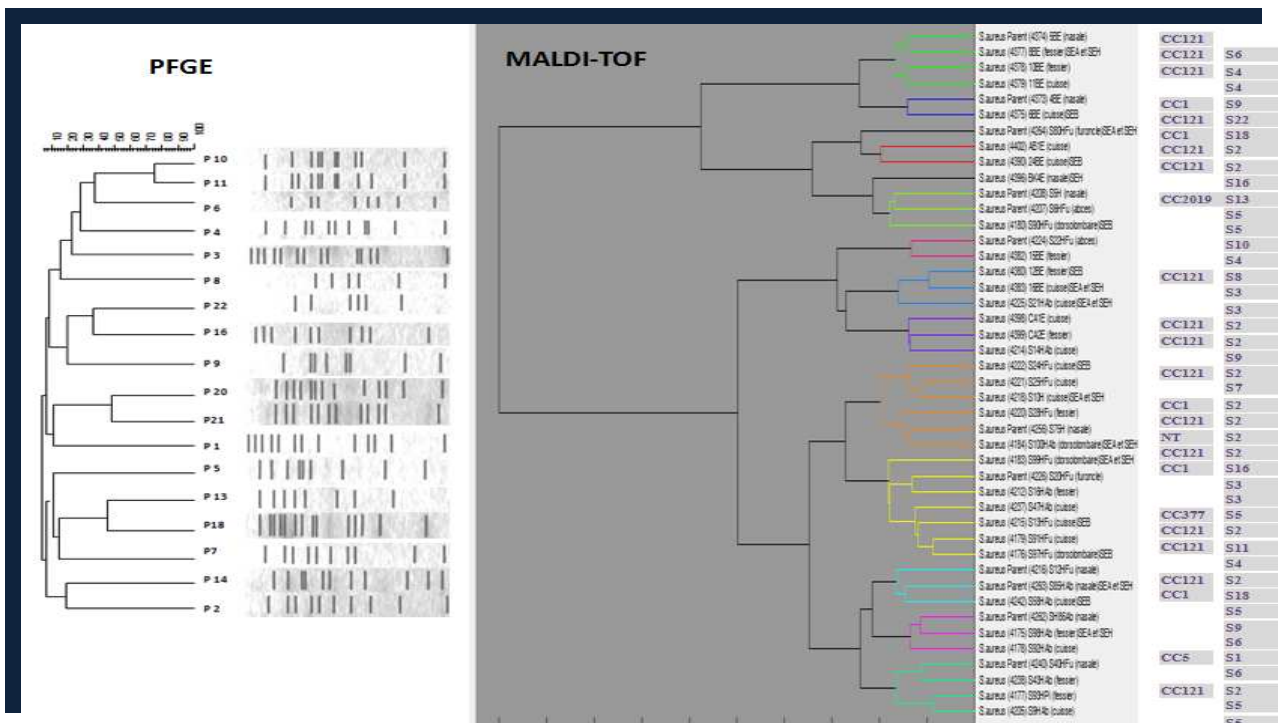


FIGURE B : Dendrogrammes de classification des profils MS généré par Biotyper™1.1 issues des différents isolats (les isolats associés inclus) prélevés chez les patients atteints de pyomyosites. Les résultats correspondants par MLST et PFGE paraissent à droite du dendrogramme.

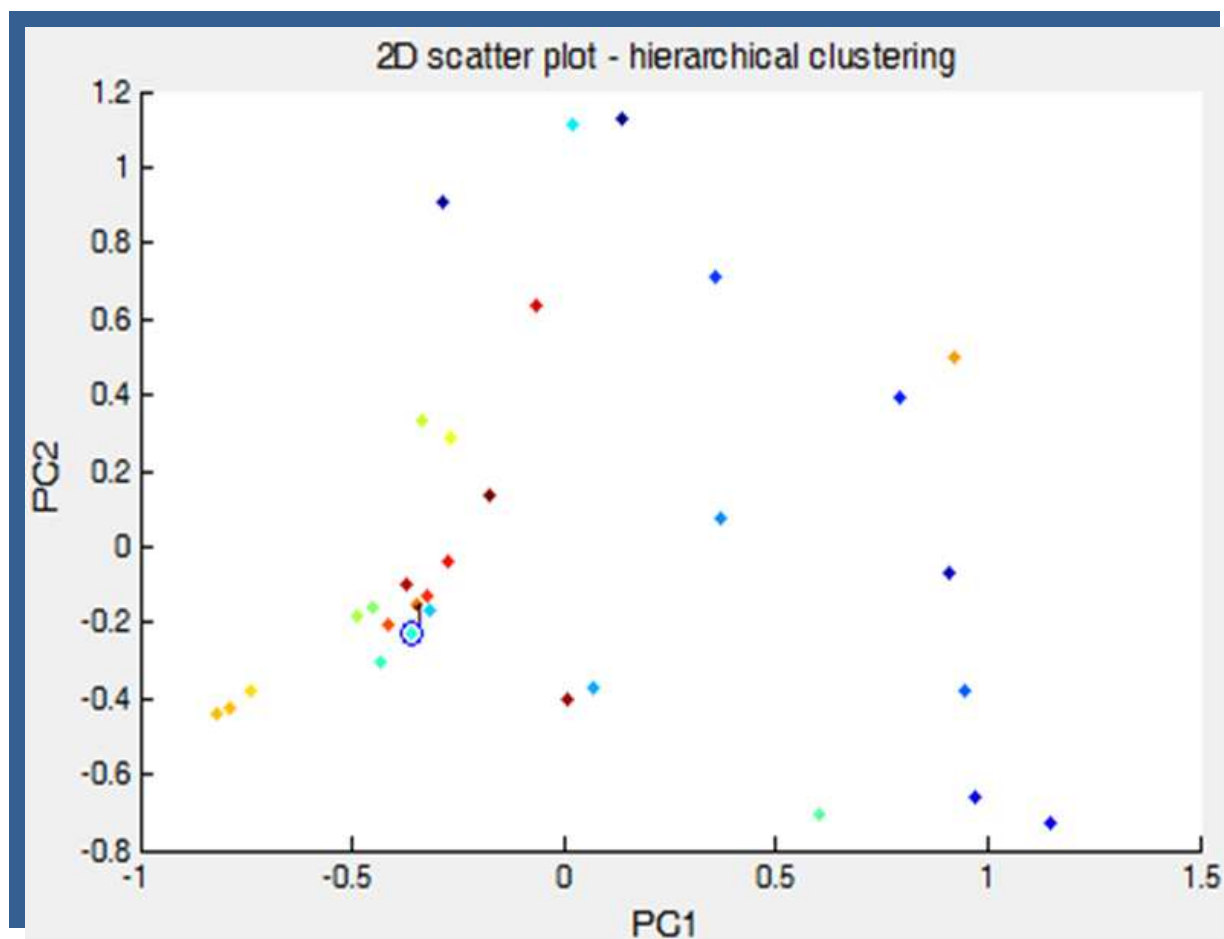


FIGURE C: Distribution en 2D des profils MS générés par Biotyper™1.1, des différents isolats non associés prélevés chez les patients atteints de pyomyosites.

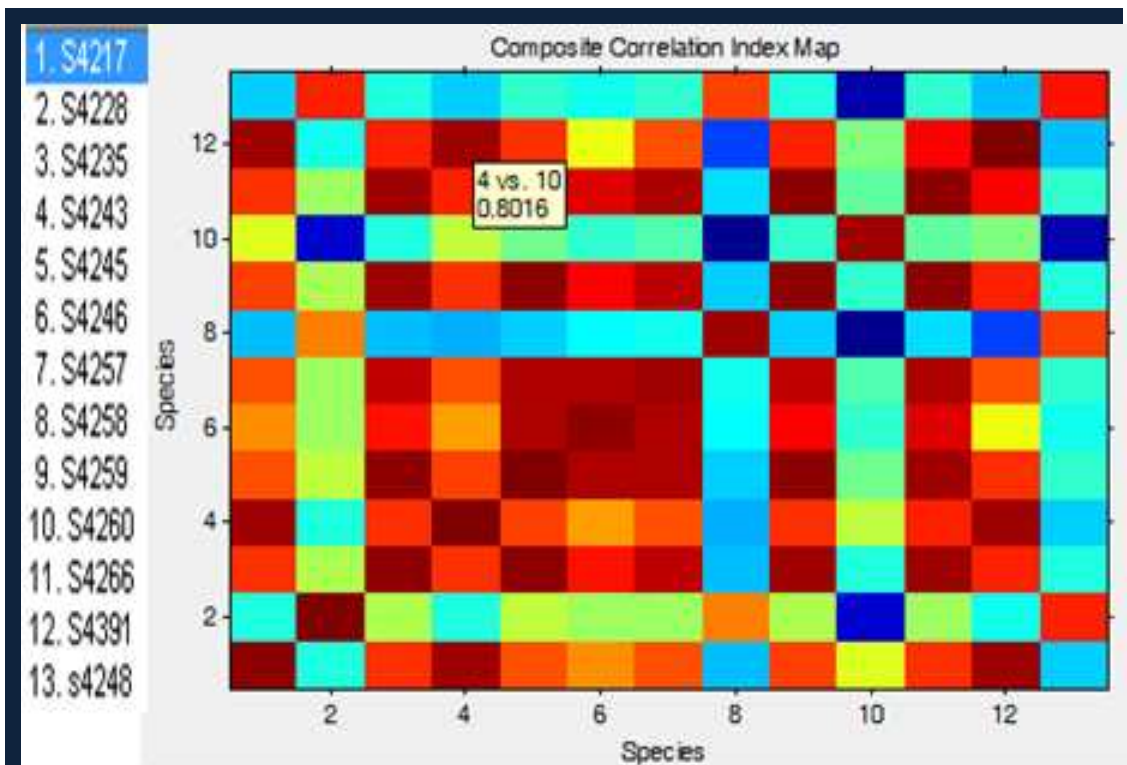


FIGURE D: CCI des différents isolats prélevés chez les parents. Les couleurs froides (Bleu, vert) représentent une ressemblance en dessous de 50% et les couleurs chaudes (Jaune, orange, Marron) une ressemblance au dessus de 50%.

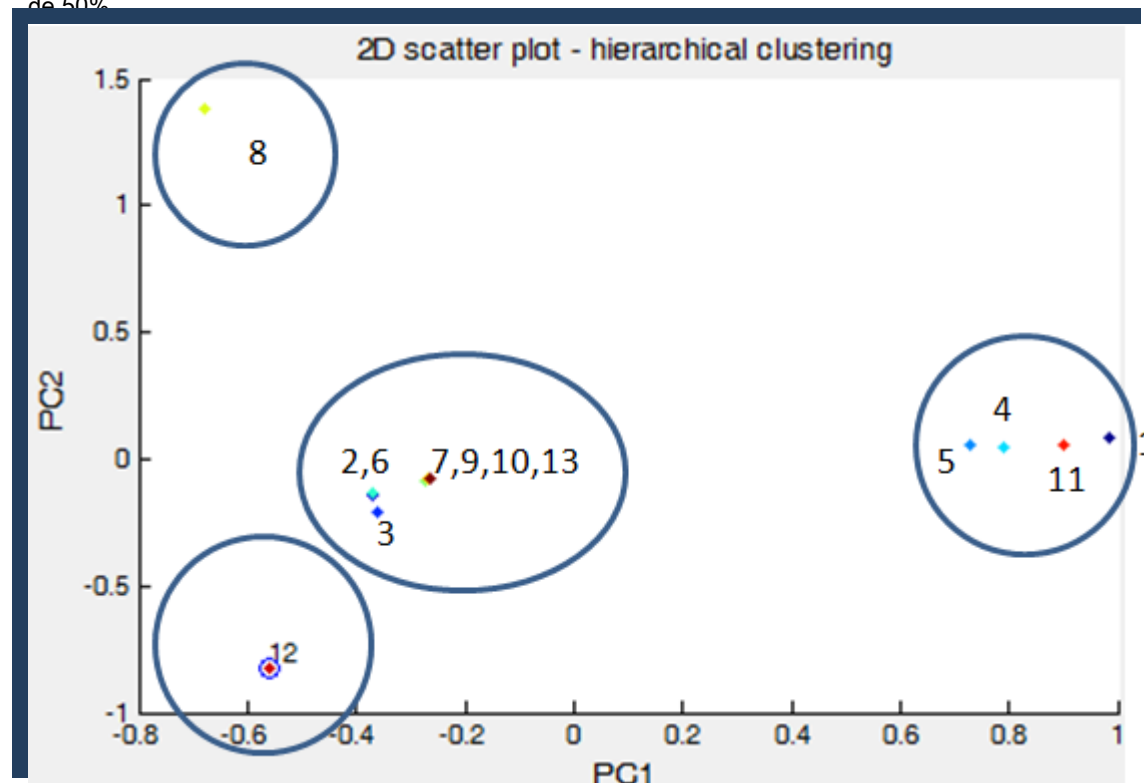


FIGURE E: La distribution en 2D des profils MALDI-TOF/MS des différents isolats prélevés chez les parents.

- [1] Baranton, G., E. Carniel, D. Guiso, et I. Postic. «Méthodes de typage moléculaire des bactéries. Applications à l'épidémiologie Molecular fingerprinting of bacteria.» *Epidemiological interest Saint Girons Médecine et Maladies Infectieuses*, 1995, 25: 1240-1242.
- [2] Claydon, M. A., S. N. Davey, V. Edwards-Jones, et D. B. Gordon. «The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry.» *Nat. Biotechnol.*, 1996, 14(11):1584-6.
- [3] Demirev, P.A., Y.P. Ho, V. Ryzhov, et C. Fenselau. «Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches.» *Anal Chem*, 1999, 71(14):2732-8.
- [4] Arnold, R.J., et J.P. Reilly. «Fingerprint matching of E. coli strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach.» *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, 12(10):630-6.
- [5] Mellmann, A., F. Binet, et C. Bizet. «High interlaboratory reproducibility of MALDI-TOF mass spectrometry based species identification of non-fermenting bacteria.» *J. Clin. Microbiol.*, 2009, 47(11):3732-4.
- [6] Moussaoui, W., et al. «Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials.» *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(11):1631-8.
- [7] Eddabra R, Moussaoui W, Prévost G, Delalande F, Van Dorsselaer A, Meunier O, Scheffel J-M and Mimouni R. «Occurrence of Vibrio cholerae non-O1 in three wastewater treatment plants in Agadir (Morocco).» *World J MicroBiot*, 2011, 27(5):1099-1108.
- [8] M. Morange, Histoire de la biologie moléculaire, vol1 Paris. éd : La découverte, 1994.
- [9] Whitman, W.B., D.C. Coleman, et W.J. Wiebe. «Prokaryotes: The unseen majority.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(12):6578-83.
- [10] Brossard, H. *Bactériologie systématique*. vol2. Lyon: éd. C.R.D.P. 1989.
- [11] Doolittle, W.F. «Phylogenetic classification and the universal tree.» *Science*, 1999, 284(5423):2124-9.
- [12] Woese, C.R., O. Kandler, et M.L. Wheelis. «Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87(12):4576-9.
- [13] Gray, M.W., G. Burger, et B.F. Lang. «Mitochondrial evolution.» *Science*, 1999, 283(5407):1476-81.
- [14] Esser, C., W. Martin, et T. Dagan. «The origin of mitochondria in light of a fluid prokaryotic chromosome model.» *Biol Lett.*, 2007, 3(2):180-4.
- [15] Prangishvili, D., P. Forterre, et R.A. Garrett. «Viruses of the Archaea: a unifying view.» *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006, 4(11):837-48.
- [16] Raoult, D., et al. «The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus.» *Science*, 2004, 117(1):156-84.
- [17] Textbook of Bacteriology: Flore bactérienne de l'Homme. S.Net (www.textbookofbacteriology.net).
- [18] Wu, M., J. Roberts, S. Kim, D. Koch, et M. DeLisa. «Collective bacterial dynamics revealed using a three-dimensional population-scale defocused particle tracking technique.» *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(7):4987-94.
- [19] O'Hara, A., et F. Shanahan. «The gut flora as a forgotten organ.» *EMBO J*, 2006, 7(7):688-93.
- [20] E. Duclaux, Pasteur, histoire d'un esprit, Sceaux, Ed Charaire, 1896, p. 130.
- [21] P. Berche, Une histoire des microbes, John Libbey. Ed Eurotext, 2007, pp. 38-39.
- [22] C. Nicolle, Le destin des maladies infectieuses, Librairie Félix Alcan, Paris, 1933, p.19-20, 132-144.

- [23] A. Flahaut et P. Zylberman, *Des épidémies et des hommes*, Edition de laMartiniere, 2008.
- [24] R. M. Gascoigne, *A Chronology of the History of Science*, Garland (New York), 1987, pp. 1450-1900.
- [25] J. Heran et H. Monteil, «Léon Coze (1819-1896) et Victor-Timothée Feltz (1835-1893) ou l'aurore de la bactériologie,» chez *Histoire de la Médecine à Strasbourg*, 2ème éd., Strasbourg, La nuée Bleue, 1997.
- [26] J. Connor et J. Connor, «Ethos and Victorian medical discouse,» *Med. Humanities*, 2008, 34:3-10
- [27] «Pasteur's Papers on the Gem Theory». *Historic Public Health Articles*,
<http://biotech.law.lsu.edu/cphl/history/articles/pasteur.htm>
- [28] S. Legout, «La famille pasteurienne en observation : histoire et mémoire,» *Histoire, économie et société*, 2001, vol. 20, 3rd Ed, pp. 339-354.
- [29] P. Debré, Louis Pasteur, Flammarion, 1994, 2nd Ed, pp. 42-43.
- [30] khov, E., J. Blancou, et E. Rubinstein. «Les vaccins contre la fièvre charbonneuse des animaux, de Louis Pasteur à nos jours.» *Revue scientifique et technique de l'Office international des épizooties*, 1996,15(3):853-62.
- [31] S. Kaufmann, «Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of Tuberculosis,» *N Engl J Med*, 2005, p. 353.
- [32] Kruger, D.H., P. Schneck, et H.R. Gelderblom. «Helmut Ruska and the visualisation of viruses.» *The Lancet*, 2000, : 355(9216):1713-7.
- [33] M. von Ardenne et D. Beischer, «Untersuchung von metalloxud-rauchen mit dem universalelektronenmikroskop,» *Zeitschrift Electrochemie*, 1940, vol. 46, pp. 270-277.
- [34] O. Avery, C. McLeod et M. McCarthy, «Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated fro, Pneumococcus Type III,» *J.Exp.Med.*, 1944, 79:137-158.
- [35] J. Lederberg et E. Tatum, «Gene recombination in E. coli,» *Nature*, 1946, 158(4016):558.
- [36] F. Jacob, *Evolution et Bricolage*, *Science*, 1977, Volume 196, n° 4295, p.1161 et ss
- [37] A. Komberg Dies, «Nobel Laureate,» *New York Times*, 2007.
- [38] K. Harper, P. Ocampo, B. Steiner, R. George et M. Silverman, «On the Origin of the Treponematoses: A Phylogenetic Approach,» *PLoS Negl Trop Dis*, 2008,2(1):e148.
- [39] D. Sharp, *Leprosy lessons from old bones*, vol. 369, *Lancet*, 2007, 369(9564):808-9.
- [40] S. Bardy, S. Ng et K. Jarrell, «Prokaryotic motility structures,» *Microbiology*, 2003,149(Pt 2):295-304.
- [41] Lecointre, G., Le Guyader, H., *Classification Phylogénétique du Vivant*, Editions Belin, 2001, Paris. 543 p.
- [42] Cavalier-Smith, «The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa,» *J Syst Evol Microbiol.*, 2002,52(Pt 2):297-354.
- [43] P. Murray, E. Baron, M. Pfaller, F. Tenover et R. Tenover, editors, «Manual of clinical microbiology,» *ASM*, 1999, pp. 370-398.
- [44] B. Eisenstein, «New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases,» *J. Infect.Dis.*,1990,161(4):595-602.
- [45] F. Denis, M.-C. Poly, C. Martin, E. Bingen et R. Quentin, *Bactériologie médicale, technique usuelles*, Elsevier Masson, 2007, pp. 14-20.
- [46] B. Grenier, A. Audurier et D. Jamet, «Corrélation entre lysotype et réaction au tween chez *Staphylococcus aureus*,» *Medecine et maladies infectieuses*, 1971, 79(24):1125.
- [47] A. Brisabois, «Interet et limites des techniques de caractérisation des *Salmonella*,» *Epidemiol et santé anim.*, 2001, 39 : 31-42.
- [48] C. O'Hara, M. Weinstein et J. Miller, «Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms,»

- chez *Manual of clinical microbiology*, American society for microbiology, Washington, D.C. 8th éd, 2003, pp 185-207.
- [49] J. Washington, P. Yu et W. Martin, «Evaluation of accuracy of multitest micromethod system for identification of Enterobacteriaceae,» *Appl. Microbiol.*, 1971, 22(3):267-9.
- [50] C. O'Hara, D. Rhoden et J. Miller, «Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of members of the family Enterobacteriaceae: a new look at an old product,» *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30(1):123-5.
- [51] H. Neubauer, T. Sauer, H. Becker, S. Aleksic et H. Meyer, «Comparison of systems for identification and differentiation of species within the genus *Yersinia*,» *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36(11):3366-8.
- [52] C. O'Hara, E. Sowers, C. Bopp, S. Duba et N. Strockbine, «Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family Vibrionaceae,» *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41(12):5654-9.
- [53] A. Leclercq, B. Lambert, D. Picard et J. Mahillon, «Particular biochemical profiles for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates on the ID32E system,» *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39(3):1161-4.
- [54] H. Isenberg, T. Gavan, P. Smith, A. Sonnenwirth, W. Taylor, W. Martin, D. Rhoden et A. Balows, «Collaborative investigation of the AutoMicrobic system Enterobacteriaceae biochemical card,» *J. Clin. Microbiol.*, 1980, 11(6):694-702.
- [55] G. Funke et P. Funke-Kissling, «Evaluation of the new Vitek 2GN card for identification of clinically relevant gram-negative rods,» *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42(9):4067-71.
- [56] A. Endimiani, F. Luzzaro, A. Tamborini, G. Lombardi, V. Elia, R. Belloni et A. Toniolo, «Identification and antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of nonfermenting gram-negative bacteria by the Phoenix automated microbiology system,» *Microbiologica*, 2002, 25(3):323-9.
- [57] S. Brisse, S. Stefani, J. Verhoef, A. Van Belkum, P. Vandamme et A. Goessens, «Comparative evaluation of the BD Phoenix and Vitek 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex,» *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40(5):1743-8.
- [58] C. Ronsin, *L'histoire de la biologie moléculaire (Pionniers & héros)*, De Boeck university, 1^{er} Ed, 2005.
- [59] F. Sanger, G. Air, B. Barrell, N. Brown, A. Coulson, C. Fiddes, C. Hutchison, P. Slocombe et M. Smith, «Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA,» *Nature*, 1977, 265(5596):687-95.
- [60] P. Thomas, «Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980 77(9):5201-5.
- [61] L. Smith, J. Sanders, R. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. Connell, C. Heiner, S. Kent et L. Hood, «Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis,» *Nature*, 1986, 321(6071):674-9.
- [62] H. Swerdlow, J. Zhang, D. Chen, H. Harke, R. Grey, S. Wu, N. Dovichi et C. Fuller, «Three DNA sequencing methods using capillary gel electrophoresis and laser-induced fluorescence,» *Anal. Chem.*, 1991, 63(24):2835-41.
- [63] J.-H. Zhang, L.-Y. Wu et X.-S. Zhang, «Reconstruction of DNA sequencing by hybridization,» *Bioinformatics*, 2003, 19(1):14-21.
- [64] R. Staden, «A strategy of DNA sequencing employing computer programs,» *Nucleic Acids Res*, 1979, 6(7):2601-10.
- [65] C. Arnold, A. Barrett, L. Cross et J. Magee, «The use of *rpoB* sequence analysis in the differentiation of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*: a critical judgement in cystic fibrosis?,» *Clin Microbiol Infect.*, 2012, 18(5):E131-3.
- [66] G. Prévost, B. Pottecher, M. Dahlet, M. Bientz, J. Mantz et Y. Piémont, «Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit,» *J Hosp Infect.*, 1991, 17(4):255-69.
- [67] M. Tanaka, «VNTR mutation in *Mycobacterium tuberculosis*: Lower rates for less variable loci,» *Infect Genet Evol*, 11, 2011, 11(6):1189-90.
- [68] K. Faksri, F. Drobniowski, V. Nikolayevskyy, T. Brown, T. Prammananan, P. Palittapongpim, N. Prayoonwiwat et A. Hairprasert, «Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family based on IS6110, SNP, LSP and VNTR

- profiles from Thailand,» *Infect GenetEvol*, 2011, 11(5):1142-9.
- [69] A. J. Vogler, C. E. Keys, C. Allender, I. Bailey, J. Girard, T. Pearson, K. L. Smith, D. M. Wagner et P. Keim, «Mutations, mutation rates, and evolution at the hypervariable VNTR loci of *Yersinia pestis*,» *Mutat Res-Fund Mol M*, 2007, 616(1-2):145-58
- [70] K. Laroucau, S. Thierry, F. Vorimore, K. Blanco, E. Kaleta, R. Hoop, S. Magnino, D. Vanrompay, K. Sachse, G. Myers, P. Bayoil, G. Vergnaud et C. Pourcel, «High resolution typing of *Chlamydomyces psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA),» *Infect Genet Evol*, 2008,8(2):171-81.
- [71] F. Andrade, J. Shelley, W. Wetzel, M. Webb, G. Gamez, S. Ray et G. Hieftje, «Atmospheric pressure chemical ionization source. 2. Desorption-ionization for the direct analysis of solid compounds,» *Anal Chem*, 2008, 80(8):2654-63.
- [72] C. Cayrou, C. Turenne, M. Behr et M. Drancourt, «Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing,» *Microbiology*, 2010, 156(Pt 3):687-94.
- [73] H. Homstra, R. Priestley, S. Georgia, S. Kachur, D. Birdsell, R. Hilsabeck, L. Gates, J. Samuel, R. Heinzen, G. Kersh, P. Keim, R. Massung et T. Pearson, «Rapid typing of *Coxiella burnetii*,» *PLoS One*, 2011, 6(11):e26201.
- [74] A. Schürch, K. Kremer, A. Hendriks, B. Freyee, C. McEvoy, R. van Crevel, M. Boeree, P. van Helden, R. Warren, R. Siezen et D. van Soolingen, «SNP/RD typing of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains reveals local and worldwide disseminated clonal complexes,» *PLoS One*, 2011,6(12):e28365.
- [75] F. Fenollar et D. Raoult, «Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms,» *APMIS*, 2004, 112(11-12):785-807.
- [76] M. Yanagihara, H. Tsuneoka, M. Sugasaki, J. Nojima et K. Ichihara, «Multispacer typing of *Bartonella henselae* isolates from humans and cats,» *Emerg. infect Dis*, 2010, 16(12):1983-5.
- [77] C. Giraud-Morin et T. Fosse, «Recent evolution and characterization of extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in the CHU of Nice (2005–2007),» *Patholo Biol*, 2008, 56(7-8):417-23.
- [78] B. Hellmark, M. Unemo, A. Nilsson-Augustinsson et B. Söderquist, «72. Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections with special focus on rifampicin and variability of the *rpoB* gene,» *Clin Microbiol Infect*, 2009, 15(3):238-244
- [79] M. Ngwamidiba, D. Raoult et P. Fournier, «Microbiologic characteristics of *Rickettsia*: laboratory identification, relations with arthropods, pathogenesis of infections,» *J Antibiot*, 2006, 8(3):166-174
- [80] J. Jores, L. Rumer et L. Wieler, «Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*,» *Int J Med Microbiol*, 2004, 294(2-3):103-13.
- [81] P. Majcherczyk, T. McKenna, P. Moreillon et P. Vaudoux, «The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,» *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 255(2):233-9.
- [82] M. Arcellana-Panlilio et G. Schultz, «Analysis of messenger RNA,» *Methods Enzymol*, vol. 225, pp. 303-328, 1993.
- [83] J. Colle, P. Falanga, M. Singer et B. Hevin, «Geneviève Milona Quantitation of messengerRNA by competitive RT-PCR: a simplified read out assay,» *Journal of Immunological Methods*, 1997, 210(2):175-84.
- [84] L. Tompkins, «The Use of molecular methods in infections diseases,» *NEngl J Med*, 1992, 327(18):1290-7.
- [85] P. Hemmersbach, «Special feature: Historical - History of mass spectrometry at the Olympic Games,» *J. Mass Spectrom*, 2008, 43(7):839-53.
- [86] T. Toyooka, «Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: Application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabonomics, and metabolomics,» *J Chromatogr Sc*, 2008, 43: 1291-1300.
- [87] W. Bienvenut, C. Deon, C. Pasquarello, J. Campbell, J. Sanchez, M. Vestal et D. Hochstrasser, «Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins,» *Proteomics*, 2002, 2(7):868-76.

- [88] S. Watt, T. Patschkowski, J. Kalinowski et K. Niehaus, «Qualitative and quantitative proteomics by two-dimensional gel electrophoresis, peptide mass fingerprint and a chemically-coded affinity tag (CCAT),» *J Biotechnol*, 2003, 106(2-3):287-300.
- [89] J. Lay, «MALDI TOF mass spectrometry of bacteria,» *Mass Spectrom Rev*, 2001, 20(4):172-94.
- [90] C. Fenselau et P. Demirev, «Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry,» *Mass Spectrom Rev*, 2001, 20(4):157-71.
- [91] F. Pineda, J. Lin, C. Fenselau et P. Demirev, «Testing the significance of microorganism identification by mass spectrometry and proteome database search,» *Anal Chem*, 2000, 72(16):3739-44.
- [92] F. Pineda, M. Antoine, P. Demirev, A. Feldman, J. Jackman, M. Longenecker et J. Lin, «Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers,» *Anal Chem*, 2003, 75(15):3817-22.
- [93] F. C. Pribil PA, "Characterization of Enterobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry," *Anal. Chem.*, 2005, 77(18):6092-5.
- [94] P. Pribil, E. Patton, G. Black, V. Doroshenko et C. Fenselau, «Rapid characterization of Bacillus spores targeting species-unique peptides produced with an atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization source,» *J Mass Spectrom*, 2005, 40(4):464-74.
- [95] J. Schiller, J. Arnhold, S. Benard, M. Müller, S. Reichl et K. Arnold, «Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach,» *Anal Biochem*, 1999, 267(1):46-56.
- [96] F. Laval, M. Laneelle, C. Deon, B. Monsarrat et M. Daffé, «Accurate molecular mass determination of mycolic acids by MALDI-TOF mass spectrometry,» *Anal Chem*, 2001, 73(18):4537-44.
- [97] K. Voorhees, F. Basile, M. Beverly, C. Abbas-Hawks, A. Hendricker, R. Cody et T. Hadfield, «The use of biomarker compounds for the identification of bacteria by pyrolysis-mass spectrometry,» *J Anal Appl pyrolysis*, 1997, 40(41):111-134.
- [98] D. De Lara, M. Ejmaes, A. Casaburi, M. Lisitskiy, R. Cristiano, S. Pagano, A. Gaggero, R. Leoni, G. Golt'sman et B. Voronoy, «Feasibility investigation of NbN nanowires as detector in time-of-flight mass spectrometers for macromolecules of interest in biology (proteins),» *J Low Temp Phys*, 2008, 151:771-76.
- [99] E. Hoffmann (de), J. Charette et V. Stroobant, *Spectrometrie de masse*, Paris: Masson, 1994.
- [100] E. Constantin, *Spectrometrie de masse, principes et applications*, Paris: Tec & Doc, 1996.
- [101] R. Wang et B. Chait, «High-accuracy mass measurement as a tool for studying proteins,» *Curr Opin Biotechnol*, 1994, 5(1):77-84.
- [102] M. Karas et U. Bahr, «Laser desorption ionization mass spectrometry of bioorganic molecules,» *Methods Mol Biol*, 1993, 17:215-28.
- [103] J. Anderson, B. Svensson et P. Roepstroff, «Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry,» *Nat Biotechnol*, 1996, 14(4):449-57.
- [104] J. Castro, K. C. et C. Wilkins, «Matrix-assisted laser desorption/ionization of high-mass molecules by Fourier-transform mass spectrometry,» *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1992, 6(4):239-41.
- [105] L. Yang, Z. Mester, R. Sturgeon et J. Meija, «Determination of the atomic weight of ²⁸Si-enriched silicon for a revised estimate of the Avogadro constant,» *Anal Chem*, 2012, 84(5):2321-7.
- [106] S. Rainville, J. Thompson et D. Pritchard, «Anion balance for ultra-high-precision atomic mass measurements,» *Science*, 2004, 303(5656):334-8.
- [107] D. Weston et L. Weidolf, «Conference Report: High-resolution MS in drug discovery and development: current applications and future perspectives,» *Bioanalysis*, 2012, 4(5):481-6.
- [108] V. Viette, M. Fathi, S. Rudaz, D. Hochstrasser et J. Veuthey, «Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods,» *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49(7):1091-103.
- [109] T. Mikami, M. Aoki et T. Kimura, «The application of mass spectrometry to proteomics and metabolomics in biomarker

- discovery and drug development,» *Curr Mol Pharmacol*, 2011, 5(2):301-16.
- [110] A. Croxatto, G. Prod'hom et G. Greub, «Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology,» *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36(2):380-407.
- [111] F. Tenover, R. Arbeit, R. Goering, P. Mickelsen, B. Murray, D. Persing et B. Swaminatham, «Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing,» *J Clin Microbiol.*, 1995, 33(9):2233-9.
- [112] J. Cooper et E. Feil, «Multilocus sequence typing--what is resolved?,» *Trends Microbiol.*, 2004,12(8):373-7.
- [113] M. Enright et B. Spratt, «Multilocus sequence typing,» *Trends Microbiol.*, 1999, 7(12):482-7.
- [114] E. Feil, B. Li, D. Aanensen, W. Hanage et B. Spratt, «eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data.,» *J Bacteriol.*, 2004,186(5):1518-30.
- [115] J. Jordens et T. Pennington, «Characterization of *Neisseria meningitidis* isolated by ribosomal RNA gene restriction patterns and restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA,» *Epidemiol Infect.*, 1991,107(2):253-62.
- [116] I. Jolliffe, «Principal Component Analysis,» *Springer*, 2nd edition, 2002.
- [117] P. Sneath et R. Sokal, «Numerical taxonomy,» *Nature*, 1962, (193):855-60.
- [118] N. Saitou et M. Nei, «The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.,» *Mol Biol Evol.*, 1987, 4(4):406-25.
- [119] Z. Wang, L. Russon, L. Li, D. Roser et S. Long, «Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry,» *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1996, 12(8):456-64.
- [120] A. Grosse-Herrenthey, T. Maier, F. Gessler, R. Schaumann, H. Bohnel, M. Kostrzewa et M. Kruger, «Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS),» *Anaerobe*, 2008, 14(4):242-9.
- [121] A. Mellmann, J. Cloud, T. Maier, U. Keckevoet, I. Ramminger, P. Iwen, J. Dunn, G. Hall, D. Wilson, P. Lasala, M. Kostrzewa et D. Harmsen, «Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria,» *J Clin Microbiol*, 2008, 46(6):1946-54.
- [122] J. Walker, A. J. Fox, V. Edwards-Jones et D. B. Gordon, «Gordona Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility,» *J Microbiol Meth*, 2002, 48(2-3):117-26.
- [123] M. Aires de Sousa, K. Boye, H. Lencastre (de) et A. Deplano, «High Interlaboratory Reproducibility of DNA sequence qsed typing of bacteria in a multicenter study,» *J. Clin. Microbiol*, 2006, 44(2):619-21.
- [124] D. Marko, R. Saffert, S. Cunningham, H. J., J. Walsh, S. Arbefeville, W. Howard, J. Pruessner, N. Safwat, F. Cockerill, A. Bossler, R. Patel et S. Richter, «Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK(R) MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight- Mass Spectrometry System for the Identification of Nonfermenting Gram Negative Bacilli Isolated From Cystic Fibrosis Patient Cultures,» *J Clin Microbiol*, 2012, 50(6):2034-9.
- [125] D. Martiny, L. Busson, I. Wybo, R. El Haj, A. Dediste et O. Vandenberg, «Comparison of the Microflex LT and Vitek MS Systems for Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry,» *J Clin Microbiol*, 2012, (50(4):1313-25.
- [126] G. Prod'hom, A. Bizzini, C. Durussel, J. Bille et G. Greub, «Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets,» *J Clin Microbiol*, 2010,48(4):1481-3.
- [127] L. Stevenson, S. Drake et P. Murray, «Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry,» *J Clin Microbiol*, 2010, 48(2):444-7.
- [128] L. Ferreira, F. Sanchez-Juanes, J. Munoz-Bellido et J. Gonzalez-Buitrago, «Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laserdesorption ionization time-of-flight mass spectrometry:

- intact cell vs. extraction method,» *Clin Microbiol Infect.*, 2011, 17(7):1007-12.
- [129] B. La Scola et D. Raoult, «Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry,» *PLoS ONE*, 2009, 4(11):e8041.
- [130] A. Ferroni, S. Suarez et J. Beretti, «Real time identification of bacteria and yeast in positive blood 1 culture broths by MALDI-TOF-mass spectrometry,» *J Clin Microbiol*, 2010, 48(5):1542-8.
- [131] M. Christner, H. Rohde, M. Wolters, I. Sobotka, K. Wegscheider et M. Aepfelbacher, «Rapid identification of bacteria from positive 1 blood culture bottles using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting,» *J Clin Microbiol*, 2010, 48(5):1584-91.
- [132] L. Ferreira, F. Sanchez-Juanes, M. Gonzalez-Avila, D. Cembrero-Fucinos, A. Herrero-Hernandez, J. Gonzalez-Buitrago et J. Munoz-Bellido, «Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry,» *J Clin Microbiol.*, 2010, 48(6):2110-5.
- [133] C. Marinach-Patrice, A. Fekkar, R. Atanasova, J. Gomes, L. Djamdjian, J. Brossas, I. Meyer, P. Buffet, G. Snounou, A. Datry, C. Hennequin, J. Golmard et D. Mazier, «Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry.,» *PLoS One*, 2010, 5(1):e886.
- [134] R. Dieckmann, R. Helmuth, M. Erhard et B. Malorny, «Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry,» *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(24):7767-78,.
- [135] P. Murray, «Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology.,» *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(11):1626-30,.
- [136] S. Rupf, K. Breitung, W. Schellenberger, K. Merte, S. Kneist et K. Eschrich, «Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.,» *Oral Microbiol Immunol.*, 2005, 20(5): 267-73,.
- [137] M. Vargha, Z. Takáts, A. Konopka et C. Nakatsu, «Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates.,» *J Microbiol Methods*, 2006, 66(3):399-409,.
- [138] R. Colwell et W. Spira, «The ecology of *Vibrio cholerae*,» chez *Cholera*, New York, Plenum Medical Book Co, 1992, pp. 107-127.
- [139] E. Filetici, L. Bonadonna, M. Ciccozzi, M. Anastasio, M. Fantasia et T. Shimada, «Phenotypic and genotypic biotyping of environmental strains of *Vibrio cholerae* non-O1 isolated in Italy.,» *Appl Environ Microbiol*, 1997,63(10): 4102-6.
- [140] D. Sur, S. Dutta, B. Sarkar, B. Manna, M. Bhattacharya, K. Datta, A. Saha, B. Dutta, G. Pazhani, A. Choudhuri et S. Bhattacharya, «Occurrence, significance & molecular epidemiology of cholera outbreaks in West Bengal.,» *Indian J Med Res*, 2007, 125(6):772-776.
- [141] J. Bright, M. Claydon, M. Soufian et D. Gordon, «Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software,» *J. Microbiol. Methods*, 2002, 48(2-3):127-38.
- [142] C. Keys, D. Dare et H. Sutton, «Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases,» *Infect Genet Evol*, 2004, 4(3):221-42.
- [143] R. Dieckmann, E. Strauch et T. Alter, «Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry,» *J Appl Microbiol*, 2010, 109(1):199-211.
- [144] T. Hazen, R. Martinez, Y. Chen, P. Lafon, N. Garrett, M. Parsons, C. Bopp, M. Sullards et P. Sobecky, « Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.,» *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(21):6745-56.
- [145] V. Ryzhov et C. Fenselau, «Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells.,» *Anal Chem*, 2001, 73(4):746-50.
- [146] C. Honisch, Y. Chen et C. Mortimer, «Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing,» *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(25):10649-54.
- [147] S. Xydas, C. Lange, D. Phil et H. Neimark, «Effect of methylation on the electrophoretic mobility of chromosomal DNA in pulsed-field agarose gels.,» *Appl Theor Electrophor*, 1996, 6(1):43-7.

- [148] H. Wong, S. Chen, M. Chen, J. Oliver, L. Hor et W. Tsai, «Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Vibrio vulnificus* strains isolated from Taiwan and the United States.,» *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(9):5153-8.
- [149] M. Suh et P. Limbach, « Investigation of methods suitable for the matrix- assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes.,» *Eur J Mass Spectrom*, 2004, 10(1):89-99.
- [150] J. J. Lay, « MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria.,» *Mass Spectrom Rev*, 2001, 20(4):172-94.
- [151] J. Chun, A. Huq et R. Colwell, «Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*.,» *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(5):2202-8.
- [152] Lukjancenko.O., Wassenaar.T.M. et Ussery.D.W., «Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes.,» *Microb Ecol*, 2010, 60(4) 708.
- [153] G. Pupo, R. Lan et P. Reeves, «Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics.,» *PNAS*, 2000, 97(19):10567-72.
- [154] R. Lan, M. Alles, K. Donohoe, M. Martinez et P. Reeves, «Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp.,» *Infect Immun.*, 2004, 72(9):5080-8.
- [155] P. Hallin, T. Binnewies et D. Ussery, «The genome BLASTatlas-a GeneWiz extension for visualization of whole-genome homology.,» *Mol Biosyst*, 2008, 4(5):363-71.
- [156] E. Gregory et K. and Sung-Hou, «Whole-genome phylogeny of *Escherichia coli*/*Shigella* group by feature frequency profiles (FFPs),» *PNAS*, 2011, 108(20):8329-34.
- [157] N. B. Valentine, S. C. Wunschel, D. S. Wunschel, C. E. Petersen et K. L. Wahl, «Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry,» *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(1):58-64.
- [158] D. S. Wunschel, E. A. Hill, J. S. McLean et K. H. Jarma, «Effects of varied pH, growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on matrix assisted laser desorption/ionization whole cell protein fingerprints,» *J. Microbiol. Meth*, 2005, 62(3):259-71.
- [159] C. Fagerquist, B. Garbus, W. Miller, K. Williams, E. Yee, A. Bates, S. Boyle, L. Harden, M. Cooley et R. and Mandrell, «Rapid Identification of Protein Biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry and Top-Down Proteomics,» *Anal. Chem*, 2010, 82(7):2717-25.
- [160] M. Mazzeo, A. Sorrentino, M. Gaita, G. Cacace, M. Di Stasio, A. Facchiano, G. Comi, A. Malorni et R. Siciliano, «Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms.,» *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(2):1180-9.
- [161] R. Lan, B. Lumb, D. Ryan et P. Reeves, «Molecular Evolution of Large Virulence Plasmid in *Shigella* Clones and Enteroinvasive *Escherichia coli*,» *Infect Immun*, 2001, 69(10):6303-9.
- [162] M. Fukushima, K. Kakinuma et R. Kawaguchi, «Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence,» *J. Clin. Microbiol*, 2002, 40(8):2779-85.
- [163] H. Ochman, WhittamT., D. Caugant et R. Selander, «Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*,» *J. Gen. Microbiol*, 1983, 129(9):2715-26.
- [164] K. Rolland, N. Lambert-Zechovsky, B. Picard et E. Denamur, «*Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains of *E. coli*,» *Microbiology*, 1998, 144 (Pt 9):2667-72.
- [165] F. Tenover, R. Arbeit, G. Archer, J. Biddle, S. Byrne, R. Goering, G. Hancock, G. Hébert, B. Hil, R. Hollis et e. al., «Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*,» *J Clin Microbiol*, 1994, 32(2):407-15.
- [166] k. Sissolak et R. and Weir, «Tropical pyomyositis,» *Journal of Infection*, 1994, 29(2):121-7.
- [167] O. Ajao et A. Ajao, «Tropical pyomyositis,» *Int. Surg*, 1987, 67(4 Suppl):414-6.
- [168] L. Bassom, «Contribution à l'étude des myosites tropicales,» *Thèse de médecine*, p. CUSS Yaoundé, 1977.

- [169] A. Adesunkanmi, A. Akinkuolie et O. Badru, «A five years analysis of death in accident and emergency room of semi – urban hospita,» *West Afr J Med*, 2002, 21:99-104.
- [170] F. Durupt, A. Tristan, M. Bes et e. al., «Staphylococcus aureus résistant à la méticilline d'origine communautaire.,» *Med Mal Infect*, 2005, 35:538–40.
- [171] P. Masso-Misse, A. Essomba, M. Monny-Lobe, S. Fowo et S. e. al, «Les Pyomyosites Tropicales A propos de 102 cas,» *Médecine d'Afrique Noire*, 1998, 45 (10).
- [172] J. Uribe-Flores et M. Hernandez-Jacome, «Tropical pyomyosites a report of 188 cases.,» *Gac Med Mex*, 2004, 140 (6): 607-610.
- [173] L. Christian et G. Sarosi, «Pyomyositis in North America: cases reports and review.,» *Clin infect Dis*, 1992,15: 668-667.
- [174] C. Slagado, B. Farr et D. Calfee, «Community- acquired MRSA: A meta-analysis of prevalence and risk factors,» *CID*, 2003, 86: 131-9.
- [175] Baba-Moussa L, Anani L, Scheffel JM, Couturier M, Riegel P, Haïkou N, Hounsou F, Monteil H, Sanni A, Prévost G. Virulence factors produced by strains of staphylococcus aureus isolated from urinary tract infections, *J Hosp Infect*. 2008 Jan;68(1):32-8.
- [176] R. Holland, J. Wilkes, F. Rafii, J. Sutherland, C. Persons, K. Voorhees et J. Lay, «Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry,» *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 1996, 10(10):1227-32.
- [177] J. E. Camara et F. A. Hays, «Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant Escherichia coli by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry,» *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 389(5):1633-8.
- [178] A. J. Saenz, C. E. Petersen, N. B. Valentine, S. L. Gantt, K. H. Jarman, M. T. Kinsley et K. L. Wahl, «Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis,» *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 1999, 13 (15):1580-85.
- [179] S. C. Wunschel, K. H. Jarman, C. E. Petersen et N. B. Valentine, «Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison,» *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, 16(4):456-62.
- [180] T. L. Williams, D. Andrzejewki, J. O. Lay et S. M. Musser, «. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells,» *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, 14(4):342-51.
- [181] M. Erhard, U. C. Hipler, A. Burmester, A. A. Brakhage et J. Wöstemeyer, «Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry,» *Exp. Dermatol*, 2008, 17(4):356-61.
- [182] M. Welker, B. Marsalek, L. Sejnohova et H. von Döhren, «Detection and identification of oligopeptides in Microcystis (cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity,» *Peptides*, 2006, 27(9):2090-103.
- [183] T. Neuhofer, R. Dieckmann, I. S. Druzhinina et C. P. Kubicek, «Direct identification of hydrophobins and their processing in Trichoderma using intact-cell MALDI-TOF MS,» *FEBS J.*, 2007, 274(3):841-52.
- [184] A. Bizzini, C. Durussel, J. Bille, G. Greub et G. Prod'hom, «. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight massspectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory,» *J Clin Microbiol.*, 2010, 48(5):1549-54.
- [185] A. Bizzini et G. Greub, «Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification,» *Clin Microbiol Infect.*, 2010, 16(11):1614-9.
- [186] A. Gravet, G. Camdessourcens-Miehe, M. Gessier, A. R. Peluso, B. Vogelsperger-Fuchs et C. Lohmann, «Bilan de l'utilisation en routine de la spectrométrie de masse dans un laboratoire hospitalier de microbiologie,» *Pathol Biol*, 2010, 59(1):19-25.
- [187] A. Gravet, «Spectrométrie de masse et identification bactérienne, l'expérience du laboratoire de microbiologie du CH de Mulhouse,» *Spectra Biol*, 2010, 80(1):45-50.
- [188] A. Alatoom, C. J. Cazanave, S. A. Cunnigham, S. M. Ihde et R. Patel, «Identification of non-diphtheriae corynebacterium by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry,» *J Clin Microbiol.*, 2012, 50(1):160-3.
- [189] J. Vila, P. Juiz, C. Salas, M. Almela, C. G. de la Fuente, Y. Zboromyrska, J. Navas, J. Bosch, J. Agüero, J. P. de la

- Bellacasa et L. Martinez-Martinez, «Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium* haemolyticum and *Rhodococcus equi* by MALDI-TOF MS,» *J Clin Microbiol.*, 2012, 50(5):1745-7.
- [190] Lotz, A. Ferroni, J. L. Beretti, B. Dauphin, E. Carbonnelle et H. Guet-Revillet, «Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry,» *J Clin Microbiol*, 2010, 48(12):4481-6.
- [191] E. Shitikov, E. Ilina, L. Chernousova, A. Borovskaya, I. Rukin, M. Afanas'ev, T. Smirnova, A. Vorobyeva, E. Larionova, S. Andreevskaya, M. Kostrzewa et V. Govorun, «Mass spectrometry based methods for the discrimination and typing of mycobacteria,» *Infect Genet Evol.*, 2011, 12(4):838-45.
- [192] A. EL Khechine, C. Couderc, C. Flaudrops, D. Raoult et M. Drancourt, «Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice,» *PLoS One*, 2011, 6(9):e24720.
- [193] M. Pignone, K. Greth, J. Cooper, D. Emerson et J. Tang, «. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry,» *J Clin Microbiol.*, 2006, 44(6):1963-70.
- [194] C. Bouakaze, C. Keyser, A. Gonzalez, W. Sougakoff, N. Veziris, H. Dabernat, B. Jaulhac et B. Ludes, «.Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based single nucleotide polymorphism genotyping assay using iPLEX gold technology for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species and lineages,» *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9):3292-9.
- [195] E. Stackebrandt et J. Ebers, «Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards,» *Microbiol. Today*, 2006, 33 :152-155.
- [196] A. Veloo, M. Erhard, M. Welker, G. Welling et J. Degener, «Identification of Gram-positive anaerobic cocci by AXIMA@SARAMIS MALDI-TOF mass spectrometry,» *Syst. Appl. Microbiol.*, 2011, 34(1):58-62.
- [197] F. Seyfarth, M. Ziemer, M. Kaatz et H. Sayer, «Case report: the use of ITS DNA sequence analysis and MALDITOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*,» *Exp. Dermatol.*, 2008, 17(11):965-71.
- [198] P. Riegel, D. de Briel, G. Prevost, F. Jehl et H. Monteil, «Genomic diversity among *Corynebacterium jeikeium* strains and comparaison with biochemical characteristics and antimicrobial susceptibilities,» *J. Clin. Microbiol.*, 1994, 32(8):1860-5.
- [199] J. Hrabak, R. Walkova, V. Studentova, E. Chudackova et T. Bergerova, «Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flightmass spectrometry,» *J Clin Microbiol.*, 2011, 49(9):3222-7.
- [200] M. Kempf, S. Bakour, C. Flaudrops, M. Berrazeg, J. Brunel, M. Drissi, E. Mesli, A. Touati et J. Rolain, «Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry,» *PLoS One*, 2012, 7(2):e31676.
- [201] P. Demirev, A. Feldman, P. Kowalski et J. Lin, «Topdown proteomics for rapid identification of intact microorganisms,» *Anal. Chem.*, 2005, 77(22):7455-61.
- [202] C. Wyne, C. Fenselau, P. Demirev et N. Edwards, «Topdown identification of protein biomarkers in bacteria with unsequenced genomes,» *Anal. Chem.*, 2009, 81(23):9633-42.
- [203] F. Rezzonica, G. Vogel, B. Duffy et M. Tonolla, «Whole cell MALDI-TOF mass spectrometry application for rapid identification and clustering analysis of *Pantoea* species,» *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(13):4497-509.
- [204] M. Welker et E. Moore, «Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology,» *Syst. Appl. Microbiol.*, 2011, 34(1):: 2-11.
- [205] A. Freiwald et S. Sauer, «Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry,» *Nat.Protoc.*, 2009, 4(5):732-42.
- [206] A. Cherkaoui, J. Hibbs, S. Emonet et M. Tangomo, «Comparison of two 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.*, 2010, 48(4):1169-75.
- [207] P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet et B. La Scola, «Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry,» *Clin. Infect. Dis.*, 2009, 49(4):543-51.
- [208] W. Kallow, R. Dieckmann, N. Kleinkauf, M. Erhard et T. Neuhof, *European Patent EP 1 253 655 B1*, 2007.

- [209] C. Benagli, V. Rossi, M. Dolina, M. Tonolla et O. Petrini, «Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria,» *PLoS One*, 2011, 6(1):e16424.
- [210] A. Minan, A. Bosch, P. Lasch, M. Stämmler, D. Serra, J. Degrossi, B. Gatti, C. Vay, M. D'aquino, O. Yantorno et D. Naumann, «Rapid identification of Burkholderia cepacia complex species including strains of the novel Taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cell MALDI-ToF mass spectrometry,» *Analyst*, 2009, 134(6):1138-48.
- [211] A. Gravet, G. Camdessoucs-Miehé, M. Gessier, A. Peluso, B. Vogelsperger-Fuchs, C. Lohmann, F. Schmitt et J. Delarbre, «The use in routine of mass spectrometry in a hospital microbiology laboratory.,» *Pathol Biol (Paris)*, 2011, 59(1):19-25.
- [212] H. Köhling, A. Bittner, K. Müller, J. Buer, M. Becker, H. Rübber, A. Rettenmeier et F. Mosel, «Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors,» *J Med Microbiol.*, 2012, 61(Pt 3):339-44.
- [213] P. Seng, J. Rolain, P. Fournier, B. La Scola, M. Drancourt et D. Raoult, «MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology,» *Future Microbiol.*, 2010, 5(11):1733-54.
- [214] A. Wiesner, L. Schneider, J. Jung et S. Schubert, «MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review),» *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2012, 93(3):965-74.
- [215] K. Wahl, S. Wunschel, K. Jarman, N. Valentine, C. Petersen, M. Kingsley, K. Zartolas et A. Saenz, «Analysis of microbial mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry,» *Anal Chem.*, 2002 74(24):6191-9.
- [216] S. Sauer et M. Kliem, «Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria,» *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, 8(1):74-82.
- [217] C. Friedrichs, A. Rodloff, G. Chhatwal, W. Schellenberger et K. Eschrich, «Rapid identification of viridians streptococci by mass spectrometric discrimination,» *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45(8):2392-7.
- [218] P. Lasch, W. Beyer, H. Nattermann et M. Stämmler, «Identification of Bacillus anthracis by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks,» *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75(22):7229-42.
- [219] H. Huber, D. Ziegler, V. Pfluger et G. Vogel, «Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons,» *BMC Vet. Res.*, 2011, 7:6.
- [220] E. Vanlaere, K. Sergeant, P. Dawyndt et W. Kallow, «Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of Burkholderia cepacia complex species,» *J. Microbiol. Methods*, 2008, 75(2):279-86
- [221] R. Rossello-Moera et R. Amann, «The species concept for prokaryotes,» *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, 25(1):39-67.
- [222] M. Lartigue, G. Hery-Arnaud, E. Haguenoer et A. Dornelie, «Identification of Streptococcus agalactiae isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry,» *J. Clin. Microbiol.*, 2009, 47(7):2284-7.
- [223] P. Sneath, «The maintenance of large numbers of strains of microorganisms, and the implications for culture collections,» *FEMS Microbiol. Lett.*, 1977, 1 : 333-334.
- [224] K. Jarman, S. Cebula, A. Saenz et C. Petersen, «An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry,» *Anal. Chem.*, 2000, 72(6):1217-23.
- [225] K. Jarman, D. Daly, C. Peterson et A. Saenz, «Extracting and visualizing matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectral fingerprints,» *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1999, 13(15):1586-94.
- [226] L. Tao, X. YU, A. Snyder et L. Li, «Bacterial identification by protein mass mapping combined with an experimentally derived protein mass database,» *Anal. Chem.*, 2004, 76(22):6609-17.
- [227] J. Hettick, M. Kashon, J. Slaven et Y. Ma, «Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: A combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis,» *Proteomics*, 2006, 6(24):6416-25.
- [228] J. Hettick, B. Green, A. Buskirk et M. Kashon, «Discrimination of Aspergillus isolates at the species and strain level by

- matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting,» *Anal. Biochem.*, 2008.; 380(2):276-81.
- [229] J. Hettick, B. Green, A. Buskirk et M. Kashon, «Discrimination of Penicillium isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting,» *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008 22(16):2555-60.
- [230] P. Chen, Y. Lu et P. Harrington, «Biomarker profiling and reproducibility study of MALDI-MS measurements of Escherichia coli by analysis of variance – principal component analysis,» *Anal. Chem.*, 2008 , 80(5):1474-81.
- [231] P. Chen, Y. Lu et P. Harrington, «Application of linear and nonlinear discrete wavelet transforms to MALDI-MS measurements of bacteria for classification,» *Anal. Chem.*, 2008 , 80(19):7218-25.
- [232] S. Hsieh, C. Tseng, Y. Lee et A. Kuo, «Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS,» *Mol. Cell. Proteomics*, 2008, 7(2):448-56.
- [233] J. R. Cole, Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. Farris, A. Kulam-Syed-Mohideen, D. McGarrell, T. Marsh, G. Garrity et J. Tiedje, «The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis,» *Nucl Acids Res*, 2009, 37(suppl 1): 141-145.
- [234] K. Tanigawa, H. Kawabata et K. Watanabe, «Identification and typing of Lactococcus lactis by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry,» *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010 ,76(12):4055-62
- [235] R. Munoz, A. Lopez-Lopez, M. Urdiain et J. Anton, «Evaluation of MALDI-TOF whole cell profiles to assess the culturable diversity of aerobic and moderately halophilic prokaryotes thriving in solar saltern sediments,» *Syst. Appl. Microbiol.*, 2011, 34(1):69-75
- [236] Z. Du, R. Yang, Z. Guo, Y. Song et J. Wang, «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(21):5487-91.
- [237] V. Edwards-Jones, M. Claydon, D. Evason, J. Walker, A. Fox et D. Gordon, «Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry,» *J. Med. Microbiol.*, 2000, : 49(3):295-300.
- [238] H. Shah, L. Rajakaruna, G. Ball, R. Misra, A. Al-Shahib, M. Fang et S. Gharbia, «Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of Staphylococcus aureus, using SELDI-TOF mass spectrometry and artificial neural network analysis». *Syst. Appl. Microbiol.*. 2011, 34(1) :81-6.
- [239] J. Davies et D. Davies, «Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol,» *Mol. Biol. Rev.*, 2010, 74(3):417-33.
- [240] M. Enright, D. Robinson, G. Randle, E. Feil, H. Grundmann et B. Spratt, «The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA),» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, 99(11):7687-92.
- [241] B. Warscheid et C. Fenselau, «A targeted proteomics approach to the rapid identification of bacterial cell mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry,» *Proteomics* 4, 2004, 4(10):2877-92.
- [242] M. Drancourt, «Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review,» *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, 16(11):1620-5.
- [243] D. Clermont, S. Diard, L. Motreff, C. Vivier, F. Bimet, C. Bouchier, M. Welker, W. Kallow et C. Bizet, «Description of Microbacterium binotii sp. nov., isolated from human blood,» *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, 59(Pt 5):1016-22.
- [244] R. Kroppenstedt, S. Mayilraj, J. Wink, W. Kallow, P. Schumann, C. Secondini et E. Stackebrandt, «Eight new species of the genus Micromonospora,» *Syst. Appl. Microbiol.*, 2005, 28(4):328-39.
- [245] J. Euzéby, «List of prokaryotic names with standing in nomenclature,» *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47(2):590-2.
- [246] R. Dieckmann, I. Graeber, I. Kaesler, U. Szewzyk et H. von Dohren, «Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS),» *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 67(4):539-48.
- [247] Y. Ichiki, N. Ishizawa, H. Tamura, K. Teramoto, H. Sato et H. Yoshikawa, «Environmental distribution and novel high-throughput screening of APEO-degrading bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass

- spectrometry (MALDI-MS),» *J. Pestic. Sci.*, 2008, 33(2) :122-127.
- [248] K. De Bruyne, B. Slabbinck, W. Waegemann, P. Vauterin, B. De Baets et P. Vandamme, «Bacterial species identification from MALDI-TOFMS spectra through data analysis and machine learning», *Syst. Appl. Microbiol.*, 2011, 34(1):20-9.
- [249] M. Kiliai, K. Poulsen, T. Blomqvist et L. Havarstein, «Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives», *PLoS One*, 2008, 3(7):e2683.
- [250] D. Denapaité, R. Bruckner, M. Nuhn et P. Reichmann, «The genome of *Streptococcus mitis* B6 -- what is a commensal?», *PLoS One*, 2010, 5(2):e9426.
- [251] B. Warscheid et C. Fenselau, «Characterization of *Bacillus* spore species and their mixtures using postsource decay with a curved-field reflectron», *Anal. Chem.*, 2003, 75(20):5618-27.
- [252] F. Schmidt, T. Fiege, H. Hustoft, S. Kneist et B. Thiede, «Shotgun mass mapping of *Lactobacillus* species and subspecies from caries related isolates by MALDI-MS», *Proteomics*, 2009, 9(7):1994-2003.
- [253] Z. Yao, P. Demirev et C. Fenselau, «Mass spectrometrybased proteolytic mapping for rapid virus identification», *Anal. Chem.*, 2002, 74(11):2529-34.
- [254] S. Swatkoski, S. Russell, N. Edwards et C. Fenselau, «Analysis of a model virus using residue-specific chemical cleavage and MALDI-TOF mass spectrometry», *Anal. Chem.*, 2007, 79(2):654-8.
- [255] M. Wittwer, J. Heim, M. Schar, G. Dewarrat et N. Schurch, «Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach», *Syst. Appl. Microbiol.*, 2011, 34(1):12-9.
- [256] D. Hinse, T. Vollmer, M. Erhard et M. Welker, «Differentiation of *Streptococcus bovis/equinus*-complex isolates by MALDI TOF Mass Spectrometry in comparison to sequencing methods», *Syst. Appl. Microbiol.*, 2011, 34(1):52-7.
- [257] S. Sauer, A. Freiwald, T. Maier et M. Kube, «Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis», *PLoS One*, 2008, 3(7):e2843.
- [258] M. Stowers, A. van Wuijckhuijse, J. Marijnissen, B. Scarlett, B. van Baar et C. Kientz, «Application of matrix-assisted laser desorption/ionization to on-line aerosol time-of-flight mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000, 14(10):829-33.
- [259] A. Van Wuijckhuijse, M. Stowers, W. Kleefsman, B. van Baar, C. Kientz et J. Marijnissen, «Matrix-assisted laser desorption/ionization aerosol time-of-flight mass spectrometry for the analysis of bioaerosols: development of a fast detector for airborne biological pathogens», *J. Aerosol Sci.*, 2005, 36: 677-87.
- [260] M. Von Bergen, A. Eidner, F. Schmidt et J. Murugaiyan, «Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS», *Proteomics Clin. Appl.*, 2009, 3(7):774-84.
- [261] R. Feltens, R. Gerner, S. Kalkhof, H. Groger-Arndt et M. von Bergen, «Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry», *BMC Evol. Biol.*, 2010, 10:95.
- [262] M. Perera, V. Vanstone et M. Jones, «A novel approach to identify plant parasitic nematodes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, 19(11):1454-60.

ARTICLES PUBLIES

PUBLICATIONS NATIONALES& INTERNATIONALES

1. **Moussaoui W**, C. Bouakaze, and G. Prévost. **Applications de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à l'identification bactérienne**. 2009. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 24:293-302.
2. **Moussaoui W**, Jaulhac B, Hoffmann AM, Kostrzewa M, Riegel P, Prévost G. **MALDI-TOF Mass Spectrometry identifies 90% of bacteria directly from Blood Culture vials**. *Clinical Microbiology and Infection* 2010; **16**: 1631–1638
3. Eddabra R, **Moussaoui W**, Prévost G, Delalande F, Dorsselaer A-V, Meunier O, Scheftel J-M, Mimouni R. **Occurrence of *Vibrio cholerae* non-O1 in three wastewater treatment plants in Agadir (Morocco)**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2011, 27(5):1099-1108.
4. Mellmann A, Bimet F, Bizet C, Borovskaya AD, Drake RR, Eigner U, Fahr AM, He Y, Ilina EN, Kostrzewa M, Maier T, Mancinelli L, **Moussaoui W**, Prévost G, Putignani L, Seachord CL, Tang YW, Harmsen D. **High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria**. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009 Nov;47(11):3732-4.
5. Mason AJ, **Moussaoui W**, Abdelrahman T, Boukhari A, Bertani P, Marquette A, Shooshtarizaheh P, Moulay G, Boehm N, Guérold B, Sawers RJ, Kichler A, Metz-Boutigue MH, Candolfi E, Prévost G, Bechinger B. **Structural determinants of antimicrobial and antiplasmodial activity and selectivity in histidine-rich amphipathic cationic peptides**. *Journal of Biological Chemistry* 2009 Jan 2;284(1):119-33.

Article en préparation

1. **Moussaoui W**, Jean-Michel Scheftel, Thierry Naas, Philippe Riegel, Benoît Jaulhac, Markus Kostrzewa, Gilles Prévost. **Discrimination of *Shigella spp* and *Escherichia coli* O157, non-O157 and lactose negative *E. coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry and MALDI Biotyper™**. 2012.
2. **Moussaoui W**, Baba Moussa L, Ahoyo TA, Riegel P, G. Prévost. **Community-Associated *Staphylococcus aureus* Prevalence, during an outbreak of pyomyositis in a village community (Hlagba Ouassa) in Benin**.
3. Sidi Malainine Malainine, **Wardi Moussaoui**, Gilles Prévost, Jean-Michel Scheftel, Rachida Mimouni. **Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish, seawater and sediments of the Khnifiss lagoon, Morocco, by MALDI-TOF mass spectrometry**.
4. Caroline Lohmann, Marcela Sabou, **Wardi Moussaoui**, Gilles Prévost, Jean-Marie Delarbre, Ermanno Candolfi, Alain Gravet, Valérie Letscher-Bru. **Comparison between the Biflex III-Biotyper (Bruker) and the Axima-Saramis (Shimadzu) systems for yeast identification by MALDI-TOF mass spectrometry**.

LISTE DES COMMUNICATIONS

LISTE CHRONOLOGIQUE DES COMMUNICATIONS REALISEES

1. G. Prévost*, **W. Moussaoui**, P. Riegel, J.M. Scheftel, F. Delalande, S. Sanglier, A. VanDorsselaer. Mass spectrometry and microorganisms identification. Communication orale invitée aux 8èmes Journées Nationales d'Infectiologie, Dijon, (France). 13-15.06.2007.
2. P. Riegel*, **W. Moussaoui**, F. Delalande, A.S. Hoffbeck, S. Sanglier, A. Van Dorsselaer G. Prévost. Identification des corynébactéries par spectrométrie de masse (SM-MALDI-TOF). Communication orale invitée à la 27^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse 2007) 07.12.2007. Paris (France).
3. **W. Moussaoui***, A. Birgy, G. Prévost, P. Riegel, J.M. Scheftel, M. Kostzreva, K. Messaoud Y. Piémont. MALDI-TOF mass spectrometry, a novel method of routine for bacterial identification on hospital? Communication orale aux 5^{ème} Rencontres des Ecoles Doctorales Vie et Santé de l'Université Charles de Prague et de l'Université de Strasbourg, (France), (12-14 novembre 2008).
4. **W. Moussaoui**, P. Riegel, A. Birgy, A. Gonzalez, F. Delalande, S. Sanglier, J.M. Scheftel, M. Kostzreva, Y. Piémont. Spectrométrie de masse appliquée l'identification en bactériologie. G. Prévost*. Communication orale à la 28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, 04-05.12.2008, Paris (France)
5. **W. Moussaoui**, A. Birgy, G. Prévost, P. Riegel*, J.M. Scheftel, M. Kostzreva, Y. Piémont. Peut-on utiliser la spectrométrie MALDI-TOF pour l'identification en bactériologie clinique ? Communication orale à la 28^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse 2008) 04.12.2008. Paris (France).
6. G. Prévost*, **W. Moussaoui**, P. Riegel, T. Maier*, R Eddabra, J.M. Scheftel, B. Jaulhac, M. Kostzreva, Y. Piémont. Application de la spectrométrie de masse en bactériologie, Communication orale à la Réunion de la Section de Microbiologie Médicale de la Société Française de Microbiologie, Institut Pasteur, 10.03.2009, Paris (France)
7. **W. Moussaoui**, A. Birgy, G. Prévost, Y. Piémont, J.M. Scheftel, M. Kostzreva, P. Riegel*. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of bacteria under routine conditions in a clinical laboratory, Communication orale au 19th Congress of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 16-19.05.2009, Helsinki (Finlande).
8. T.A. Ahoyo, L. Baba-Moussa, **W. Moussaoui**, M. Atindehou, K. Dramane, A. Sanni, G. Prévost. Potential association of PVL-positive *s. aureus* with pyomyositis. Communication affichée au 14th European Workshop on Bacterial Protein Toxins - ETOX14, 27.06 – 02.07.2009, Obernai (France).

9. R. Eddabra, R. Mimouni, O. Meunier, **W. Moussaoui**, G. Prévost, J.M. Scheftel. MALDI-TOF MS analysis and molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of environmental *Vibrio* isolates. Communication affichée au 14 th European Workshop on Bacterial Protein Toxins - ETOX14, 27.06 – 02.07.2009, Obernai (France)
10. **W. Moussaoui***, B. Jaulhac, A.M. Hoffmann, B. Ludes, M. Kostrzewa, P. Riegel, G. Prévost. Utilisation de tubes munis de gel séparateur pour l'identification bactérienne en MALDI-TOF des hémocultures positives. Communication orale à la 29^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, 3-4 décembre 2009. Paris (France).
11. R. Eddabra, R. Mimouni, **W. Moussaoui**, G. Prévost and J.M. Scheftel*. Comparative analysis of *Vibrio* spp isolated from two wastewater treatment plants of agadir (Morocco). Communication affichées au 3rd World Congress on *Vibrio* 2009, Rio de Janeiro city.(Brésil). (4-6 Nov 2009).
12. G Prévost*, **WMoussaoui**, B Jaulhac, A-M Hoffmann, M Kostrzewa, P Riegel. Progressive insertion of MALDIBioTyper microorganism's identification facilities in a hospital routine. Communication orale au 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2010, 10-13.04.2010. Vienne, (Autriche).
13. Use of tubes equipped of separating gels for MALDI-TOF assisted bacterial identification in blood culture. **W. Moussaoui**, B. Jaulhac, A.M. Hoffmann, B. Ludes, M. Kostrzewa, P. Riegel, G. Prévost*. Communication affichée au 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2010, 10-13.04.2010. Vienne, (Autriche).
14. R. Eddabra*, R. Mimouni, O. Meunier, **W. Moussaoui**, G. Prevost, J.M. Scheftel. MALDI-TOF MS analysis and molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of environmental *Vibrio* isolates Communication affichée au 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2010, Vienne, (Autriche). 10-13.04..2010
15. **W. Moussaoui***, P. Riegel, J.M. Scheftel, B. Jaulhac, S. De Martino, F. Schramm, A.M. Hoffmann, A. Gonzales, B. Ludes, Gilles Prévost. The application of mass spectrometry to bacteriology and to the distinction between genetics variants. Communication orale à la 1^{ère} Journée des doctorants du campus Médecine, Université de Strasbourg, (France). 09.06. 2010.
16. T.A. Ahoyo, L. Baba-Moussa, **W. Moussaoui***, M. Atindehou, K. Dramane, A. Sanni, G. Prévost. Potential association of PVL-positive *S. aureus* with pyomyositis, Communication affichée à la 1^{ère} Journée des doctorants du campus Médecine, Université de Strasbourg, (France). 09.06. 2010.

Applications de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF à la bactériologie et à la distinction de variants génétiques

Résumé

L'objectif de mon travail fut de valider et d'optimiser la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification et la classification d'un ensemble de bactéries pathogènes ou opportunistes chez l'homme, en enrichissant une base de données et en testant la robustesse de la méthode, afin d'obtenir une méthode rapide fixe et fiable d'acquisition de résultats.

Les différents résultats obtenus ont permis la validation de la technique comme outil d'identification bactérienne fiable en routine. Elle permet désormais de caractériser les mélanges de deux bactéries et la différentiation d'espèces proches comme les *Shigella spp* et *E. coli*.

Nous avons montré que la technique sera encore améliorée par un outil supplémentaire de comparaison des souches pour une veille épidémiologique "en temps réel", sans investissement supplémentaire, en permettant plusieurs types d'économie. Elle apporte un gain réel dans la prise en charge du patient et le choix éclairé des antibiotiques testés pour l'antibiogramme. La technique peut aussi constituer un outil alternatif de sérotypage.

Mots Clés : Spectrométrie de masse, MALDI-TOF, Bactériologie, Hémocultures, Typage bactérien, Identification bactérienne, Epidémiologie, MALDIBiotyper™, Microorganismes.

Résumé en anglais

The aim of this work was to validate and optimize MALDI-TOF mass spectrometry for the identification and classification of a set of pathogens or opportunistic bacteria, by enriching a database and testing the robustness of the method, in order to obtain a quick and reliable fixed acquisition results. The different results obtained allowed the validation of the technique as reliable tool for bacterial identification in hospital routine. In addition, we have shown that it can characterize mixtures of two bacteria or even differentiate closely related species such as *Shigella spp* and *E.coli*. We have demonstrated that MALDI-TOF/MS will be further enhanced by an additional tool for comparison of strains for epidemiological monitoring in "real time". The technique can also be an alternative tool for serotyping.

MALDI-TOF/MS identification provides a real benefit in terms of patient care and the choice of antibiotics tested for sensitivity, without additional investment, which allows different types of economy.

Key words: Mass spectrometry, MALDI-TOF, Bacteriology, Blood cultures, Bacterial typing, Bacterial identification, Epidemiology, MALDIBiotyper™, Microorganisms.