



**HAL**  
open science

# Identification, résistance, virulence et typage : une nouvelle application de la spectrométrie de masse pour la microbiologie clinique

Yannick Charretier

## ► To cite this version:

Yannick Charretier. Identification, résistance, virulence et typage : une nouvelle application de la spectrométrie de masse pour la microbiologie clinique. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10040 . tel-02918133

**HAL Id: tel-02918133**

**<https://theses.hal.science/tel-02918133v1>**

Submitted on 20 Aug 2020

**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.

## THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

# Identification, résistance, virulence et typage : une nouvelle application de la spectrométrie de masse pour la microbiologie clinique

par

M. CHARRETIER Yannick

ECOLE DOCTORALE de CHIMIE

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat

Directeur de thèse : M. LEMOINE Jérôme

soutenue le 18 Mars 2013

### JURY :

Mme CHAMOT-ROOKE Julia	Rapporteur
Mme PLOY Marie-Cécile	Rapporteur
M. CHARRIER Jean-Philippe	Examineur
M. SCHRENZEL Jacques	Examineur
M. VANDENESCH François	Examineur
M. SALVADOR Arnaud	Co-directeur
M. LEMOINE Jérôme	Directeur de thèse

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration  
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire  
Vice-président du Conseil Scientifique  
Secrétaire Général

## M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID  
M. le Professeur Philippe LALLE  
M. le Professeur Germain GILLET  
M. Alain HELLEU

## COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard  
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux  
UFR d'Odontologie  
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation  
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE  
Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN  
Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS  
Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.  
Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON  
Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies  
Département Biologie  
Département Chimie Biochimie  
Département GEP  
Département Informatique  
Département Mathématiques  
Département Mécanique  
Département Physique  
Département Sciences de la Terre  
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives  
Observatoire de Lyon  
Polytech Lyon  
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique  
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1  
Institut Universitaire de Formation des Maîtres  
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI  
Directeur : M. le Professeur F. FLEURY  
Directeur : Mme le Professeur H. PARROT  
Directeur : M. N. SIAUVE  
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE  
Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN  
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID  
Directeur : Mme S. FLECK  
Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL  
Directeur : M. C. COLLIGNON  
Directeur : M. B. GUIDERDONI  
Directeur : M. P. FOURNIER  
Directeur : M. G. PIGNAULT  
Directeur : M. C. VITON  
Directeur : M. R. BERNARD  
Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Professeur Jérôme Lemoine qui m'a fait apprécier la spectrométrie de masse pendant le master et aussi pour sa supervision, ses conseils de rédaction ou de présentation.

Je tiens à remercier mon co-encadrant, Professeur Arnaud Salvador notamment pour ses cours de préparation d'échantillon qui m'ont marqués et qui m'ont été utiles au cours de ces travaux.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Jean-Philippe Charrier qui a su (me) convaincre pour que cette thèse se réalise. Je souhaiterai le remercier pour son encadrement, ses encouragements, sa confiance qu'il a su m'accorder et pour tous ses bons conseils ou connaissances qu'il a pris le temps de partager.

C'est avec grand plaisir que je remercie Mesdames Julia Chamot-Rooke et Marie-Cécile Ploy qui ont accepté de prendre le temps de juger ce travail.

C'est aussi avec grand plaisir que je remercie, le Professeur François Vandenesch et le Professeur Jacques Schrenzel de me faire l'honneur d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie les personnes impliquées dans la collaboration aux HCL menée par Géraldine et tout particulièrement François et Olivier pour leur accueil, leur disponibilité et leur dévouement pour collecter les échantillons cliniques.

Ce travail est aussi le fruit du projet, en collaboration avec le CEA, mené par Alain. Mes remerciements s'adressent à tous les membres de ce projet notamment l'équipe CEA-LETI au début de ce projet, l'équipe préparation d'échantillon, l'équipe CEA-LIST, l'équipe mixte à Saclay et bien évidemment l'équipe protéomique.

Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans les connaissances précieuses des microbiologistes notamment Christine qui a toujours pris le temps de répondre à mes questions mais aussi Gilles pour son expertise sur la résistance aux antibiotiques. D'ailleurs,

je tiens à remercier toutes les personnes à la Balme qui m'ont toujours bien accueilli notamment Corinne, Sarah, Dominique, Valérie C, Valérie M, Sonia, Victoria, Sandrine et bien évidemment Nadine.

Je tiens à remercier Jean-Baptiste pour tous les échanges que nous avons pu avoir sur les wikis mais aussi sur les outils de bioinformatique. A cet égard, mes remerciements s'adressent à Nathalie, Bertrand, Malick et Jean-Noël pour toutes les discussions que nous avons pu avoir.

Je ne saurai oublier Tanguy qui m'a formé à la spectrométrie de masse et à la chromatographie et qui m'a surtout appris à me poser les bonnes questions pour résoudre les problèmes instrumentaux.

Je tiens à remercier Xavier qui est pour beaucoup dans la réussite de ce travail (synthèse des peptides) mais aussi pour les discussions intéressantes que nous avons pu avoir notamment lors de la démonstration à Bales et pour ses conseils sur le comportement des peptides en solution.

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire qui ont fait que je garde un très bon souvenir de ces 3 années de thèse. En particulier, le duo de choc Corinne et Elodie (les chanteuses), l'adorable Anne-Sophie, une Christèle de qualité, le trio sportif Blandine, Chloé et Tiphaine. Sans oublier, Maude, Sylvie P, Aurélie, Christelle, Isabelle, Céline, Yasemine, Sarah, Caroline, Sylvie T, Marion, Sophia, Sophie, Fanny, Marie-Hélène, Véronique, Frédérique et Nadine. Bref que des filles ! Pas tout à fait, je tenais à remercier également Hader, Laurent, Thibault, Frédéric, Romain, Thomas M, Thomas J et Benoit.

Je tiens à remercier Carolyn pour avoir partagé son bureau pendant cette dernière année et pour ses corrections dans la langue de Shakespeare.

Enfin une forte pensée est destinée à tous mes proches et en particulier mes parents et mes frères sans oublier mon ami de toujours PJ et mon partenaire d'escalade Alex.

MERCI A TOUS,

Liste des figures .....	8
Liste des tableaux .....	9
Liste des abréviations .....	11
INTRODUCTION .....	13
1. Chapitre 1 : L'identification bactérienne : du microscope au spectromètre de masse.....	15
1.1 Méthodes d'analyse traditionnelles : Un héritage ancien .....	15
1.1.1 Identification bactérienne .....	15
1.1.2 AntibioGramme et techniques associées.....	17
1.1.3 Cas particulier du sang : Hémoculture .....	21
1.2 Essor de nouvelles technologies dans les sciences du vivant : .....	22
1.3 Utilisation clinique de routine du MALDI-TOF .....	25
2. Chapitre 2 : Caractérisation fine des microorganismes.....	28
2.1 Résistance aux antimicrobiens.....	28
2.1.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines.....	29
2.1.2 Résistance aux glycopeptides .....	41
2.1.3 Résistance aux azoles.....	44
2.2 Virulence .....	46
2.2.1 La virulence chez Staphylocoques .....	46
2.2.1.1 La Leucocidine de Pantón-Valentine.....	47
2.2.1.2 Le choc toxique staphylococcique .....	49
2.2.2 Les Shiga-toxines.....	50
2.2.3 La lipase 8 .....	51
2.3 Typage.....	51
3. Chapitre 3 : Alternative technologique pour la microbiologie en spectrométrie de masse.....	55
3.1 Au-delà de l'identification microbienne par MALDI-TOF? .....	55
3.1.1 L'antibioGramme par MALDI-TOF .....	55
3.1.2 Suivi de dégradation d'antimicrobien .....	56
3.1.3 Détection de pics spécifiques par MALDI-TOF, quelques limitations.....	57
3.2 Identification de protéines par spectrométrie de masse .....	61
3.2.1 Identification par empreinte peptidique massique par MALDI-TOF.....	62
3.2.2 Identification par séquençage peptidique par ESI-MS-MS.....	62
3.3 L'approche ciblée : le mode SRM .....	65
3.3.1 Principe.....	66
3.3.2 Mise au point de la méthode de détection .....	67
3.3.3 Extraction des pics et validation de détection sans marquage .....	72
3.3.4 Quantification selon le principe de dilution isotopique.....	73
4 TRAVAUX DE RECHERCHE .....	76
4.1 Méthode de caractérisation d'au moins un micro-organisme au moyen de la spectrométrie de masse. 76	76
4.1.1 Aspect contextuel .....	76
4.1.2 Interprétation des exemples : .....	78
4.1.3 Discussion .....	90
4.2 Mise au point d'un procédé de détection d'au moins un mécanisme de résistance aux céphalosporines par spectrométrie de masse.....	92

	4.2.1 Aspect Contextuel : .....	92
	4.2.2 Interprétation des exemples .....	93
	4.2.3 Discussion .....	116
	4.3 Mise au point d'un procédé de détection d'au moins un mécanisme de résistance aux carbapénèmes par spectrométrie de masse. ....	119
	4.3.1 Aspect conceptuel.....	119
	4.3.2 Interprétation des exemples .....	120
	4.3.3 Discussion .....	133
	4.4 Mise au point d'un procédé de détection d'au moins un mécanisme de résistance aux glycopeptides par spectrométrie de masse. ....	135
	4.4.1 Contexte .....	135
	4.4.2 Interprétation des exemples .....	136
	4.4.3 Discussion .....	150
	4.5 IRVT-MS (Identification, Resistance, Virulence, Typing – Mass Spectrometry): the next revolution in microbiology?.....	151
	4.5.1 Contexte de l'article : .....	151
	4.5.2 Article : .....	152
5	DISCUSSION GENERALE .....	197
	5.1 Atouts majeurs de l'approche : .....	197
	5.2 Applications cliniques : .....	198
	5.2.1 Intérêt clinique de l'ESI-MS .....	198
	5.2.2 Hémocultures : .....	199
	5.2.3 Urines et infections du tractus urinaire .....	200
	5.2.4 Autres infections critiques.....	201
	5.3 Critères de performances :.....	201
	5.3.1 Identification par profil protéique: .....	201
	5.3.2 Confirmation de l'identification par SRM.....	202
	5.3.3 Résistance et virulence par SRM.....	203
	5.3.4 Cadence d'analyse :.....	203
	5.3.5 Capacité de multiplexage : .....	204
	5.3.6 Reproductibilité : .....	204
	5.3.7 Interprétation des résultats.....	205
	5.4 Modalités d'analyse :.....	206
	5.4.1 Flux d'analyse .....	206
	5.4.2 Praticité d'utilisation .....	206
	5.4.3 Accessibilité de l'instrument .....	207
	5.5 Coûts .....	207
	5.6 Compétitivité de l'approche LC-ESI-MS/MS.....	208
	5.7 Evolutions attendues dans les 5 années à venir.....	210
6	MATERIEL ET METHODES.....	213
	6.1 Traitement des échantillons.....	213
	6.1.1 Prétraitement des urines.....	213
	6.1.2 Prétraitement des hémocultures.....	213
	6.1.3 Traitement des culots bactériens ou des colonies.....	213
	6.2 Mise au point de méthode.....	215

6.3	Analyse LC-ESI-SRM .....	217
6.4	Traitement de l'information.....	217
6.4.1	Méthode 1 .....	218
6.4.2	Méthode 2 .....	219
6.4.3	Méthode 3 .....	219
6.4.4	Méthode 4 .....	220
6.4.5	Méthode 5 .....	220



## Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématisée de la paroi des bactéries à Gram+ et des bactéries à Gram- : .....	16
Figure 2 : Distribution des CMI de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis de l'association amoxicilline et acide clavulanique d'après 15603 observations.....	19
Figure 3 : spectre de masse MALDI-TOF de cellules entières de : en haut, <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; au milieu, <i>Escherichia coli</i> ; en bas, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
Figure 4 : Représentation du noyau $\beta$ -lactame .....	29
Figure 5 : Evolution de la résistance aux $\beta$ -lactamines chez <i>E coli</i> en Europe. ....	30
Figure 6 : suivi de l'évolution de la proportion des souches SARM en Europe. ....	39
Figure 7 : représentation schématique de la liaison entre la vancomycine et les différentes formes de dipeptide terminal des précurseurs pentapeptidiques. ....	42
Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation de l'opéron VanA. ....	43
Figure 9 : Relation phylogénétique des sous-unités lukF-PV et lukS-PV de la toxine LPV avec d'autres exotoxines homologues. ....	49
Figure 10 : Analyse de 912 souches de <i>S. aureus</i> avec BUSRT. ....	59
Figure 11 : Nomenclature répertoriant les différents types de fragments observés dans des spectres de fragmentation.....	63
Figure 12 : Spectre de fragmentation représentant l'intensité relative des ions analysés dans la gamme de masse 200-1000 Th.....	64
Figure 13 : Schéma représentant l'analyse en mode SRM.....	67
Figure 14 : représentation des aires de lipase 8 normalisées des souches testées. ....	87
Figure 15 : Chromatogramme représentant le courant ionique extrait de trois transitions du peptide LPGILELSR. ....	91
Figure 16 : Diagramme des espèces bactériennes testées produisant des $\beta$ -lactamases de type TEM.....	94
Figure 17 : Histogramme représentant le nombre de peptides protéotypiques des enzymes de type TEM détectés dans les souches testées .....	96
Figure 19 : graphe représentant la quantité relative d'enzyme PER-1 détectée dans les souches bactériennes.....	106
Figure 20 : Comparaison des aires des transitions de la protéine de type CMY-2 de <i>S. senftenberg</i> #0105103 et <i>P. mirabilis</i> #9809046 .....	111
Figure 21 : Graphe représentant la quantité relative d'enzyme détectée de type CMY-2 dans les souches testées. ....	112
Figure 22 : comparaison des aires des transitions de la protéine de type GES de <i>P. aeruginosa</i> #0804057 et de <i>E. coli</i> #0607054 à échelle logarithmique .....	124

Figure 23 : Comparaison des proportions des transitions Q au sein des peptides supposés représentés la quantité de bactéries traitée dit Q aux proportions moyennes. ....	141
Figure 24 : Comparaison des proportions des transitions Q au sein des peptides supposés représentés la quantité de bactéries traitée aux proportions moyennes.....	142
Figure 25 : Comparaison des proportions des transitions VanA au sein des peptides VanA aux proportions moyennes.....	144
Figure 26 : Evaluation du niveau d'expression de la ligase VanA avec ou sans induction. ....	145
Figure 27 : Taux d'induction de la ligase VanA des souches <i>E. faecalis</i> #0702053 et <i>E. faecium</i> #0807061 pour les expériences A et B.....	146
Figure 28 : Comparaison des proportions des peptides supposés représentés la quantité de bactéries traitée : nouvelle sélection de peptides Q. ....	147
Figure 29 : Comparaison des ratios moyens des aires des transitions I aux ratios des aires des transitions I de l'échantillon <i>S. aureus</i> #7509008.....	220
Figure 30 : Comparaison des aires des transitions protéotypiques de la PLP2a au sein de l'échantillon <i>S. aureus</i> #9801012 aux aires moyennes des transitions des échantillons.....	221

## Liste des tableaux

Tableau 1 : $\beta$ -lactamases de la classe 1, céphalosporinases acquises de type AmpC. ....	33
Tableau 2 : $\beta$ -lactamases de la classe 2 : $\beta$ -lactamase à spectre étroit, BLSE ou carbapénémase composent cette classe très variée. ....	36
Tableau 3 : Métallo- $\beta$ -lactamases de la classe 3 : elles confèrent toutes une activité sur les carbapénèmes. ....	37
Tableau 4 : L'alphabet Van : Caractéristiques de la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques.....	42
Tableau 5 : Caractérisation des staphylocoques dorés .....	79
Tableau 6 : Score de typage des staphylocoques dorés pour chaque couple de souche comparé .....	80
Tableau 7 : Caractérisation d' <i>E. coli</i> .....	82
Tableau 8 : Score de typage des différentes souches <i>E. coli</i> testées pour chaque couple de souche comparé .....	83
Tableau 9 : Caractérisation de <i>Candida albicans</i> . ....	85
Tableau 10 : Détection des peptides caractéristiques de la lanostérol 14- $\alpha$ déméthylase. ....	86
Tableau 11 : Score de typage des différentes souches de <i>Candida albicans</i> testées pour chaque couple de souche comparé .....	88
Tableau 12 : Caractérisation des urines cliniques. ....	89

Tableau 13 : Score de typage des urines cliniques infectées par E. coli .....	90
Tableau 14 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type TEM. ....	95
Tableau 15 : Tableau croisée du phénotype des souches testées au phénotype attendu. ....	96
Tableau 16 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type SHV. ....	98
Tableau 17 : Liste des résultats inattendus observés dans les données associés à la présence de mutation isobarique. ....	100
Tableau 18 : Résumé des résultats invalides observés dans les données SHV .....	100
Tableau 19 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type CTX-M. ....	102
Tableau 20 : récapitulatif des peptides détectés des enzymes de type PER. ....	103
Tableau 21 : Proportion de chaque transition au sein de la somme des transitions par souche bactérienne .....	104
Tableau 22 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type VEB. ....	107
Tableau 23 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type ACC. ....	108
Tableau 24 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type CMY. ....	110
Tableau 25 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type DHA. ....	113
Tableau 26 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type FOX. ....	115
Tableau 27 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type MOX. ....	116
Tableau 28 : Récapitulatif des modèles de résistance de type BLSE. ....	117
Tableau 29 : Récapitulatif des modèles de résistance acquis de type AmpC. ....	118
Tableau 30 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type KPC. ....	121
Tableau 31 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type KPC. ....	122
Tableau 32 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type GES. ....	124
Tableau 33 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type SME. ....	125
Tableau 34 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type IMP. ....	127
Tableau 35 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type VIM. ....	129
Tableau 36 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type OXA-48. ....	131
Tableau 37 : Récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type IND. ....	132
Tableau 38 : Récapitulatif des modèles de résistance de type carbapénèmase. ....	134
Tableau 39 : Récapitulatif des peptides détectés des enzymes de type Van dans les différentes souches bactériennes. ....	138
Tableau 40 : Récapitulatif du nombre de peptide détectés par souche avant optimisation de la méthode pour l'expérience A et après optimisation de la méthode pour l'expérience B. ....	140
Tableau 41 : Comparaison de deux protocoles de lyse-digestion. ....	149

## Liste des abréviations

AmpC : céphalosporinase plasmidique de type AmpC  
BGN : Bacilles Gram Négatif  
BLSE : Bêta-Lactamase à Spectre Etendu  
CC : Complexe clonal  
CE : Energie de collision  
CID : Collision Induisant Dissociation  
CLSI : «Clinical and Laboratory Standards Institute»  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
DDA : « Data dependent Acquisition »  
ERV : Entérocoques résistants à la vancomycine  
ESI : « Electrospray Ionization »  
HPLC : «High-Performance Liquid Chromatography»  
I : Identité  
LC-MS : spectrométrie de masse associée à la chromatographie liquide  
LPV : Leucocidine de Panton-Valentine  
MALDI : « Matrix Assisted Laser Desorption Ionization »  
MALDI-QQQ : source MALDI associée à un triple quadripôle  
MLST : «Multi-Locus Sequence Typing »  
MS/MS : spectrométrie de masse en tandem  
PCR : « Polymerase Chain Reaction »  
PFGE : «Pulse Field Gel Electrophoresis »  
PLP : Protéines de Liaison aux Pénicillines  
R : Résistance  
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline  
SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline  
*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*  
SCCmec : cassette staphylococcique *mec*  
SIS : Standard interne marqué aux isotopes stables et lourds  
SRM : « Selected Reaction Monitoring »  
ST : Séquence Type

STEC : «Shiga Toxin producing *Escherichia coli* »

T : Typage

TOF : « Time Of Flight »

TSST-1 : « Toxic Shock Syndrom Toxin 1»

UFC : Unité Formant Colonie

V : Virulence

## INTRODUCTION

---

La santé et le bien-être des populations humaines reposent, dans une large mesure, sur le contrôle des maladies infectieuses contagieuses. Au cours de l'histoire, l'Humanité a fait face à une suite d'épidémies dévastatrices. Jusqu'aux premières années du vingtième siècle, les maladies infectieuses représentaient la principale cause de mortalité dans l'ensemble du monde. Les mesures de Santé Publique, la découverte de la vaccination et l'arrivée des antibiotiques ont limité conjointement la mortalité liées aux maladies infectieuses notamment dans les pays développés. Les maladies infectieuses représentent actuellement 8% de la mortalité dans les pays développés et sont la cause de 50% des morts dans les pays en développement. Les conditions de vie et d'hygiène, le manque de soins médicaux et de programmes de vaccination contribuent au taux élevé de mortalité dans ces nations. Malgré l'amélioration des conditions de vie et d'hygiène, les pays développés ne sont pas épargnés par les maladies infectieuses. Certes de nombreuses maladies contagieuses sont contrôlées mais le contrôle est variable selon les modes de transmission et la possibilité de vacciner. Ainsi, les maladies transmises par l'eau, les aliments, le sol ou par les animaux sont plus facilement contrôlables par des traitements et des mesures appropriées sur les réservoirs. Au contraire, les maladies transmises par contact humain ou par voie respiratoire sont plus difficiles à contrôler. Une identification précoce de l'agent responsable d'une maladie infectieuse chez les individus et la population dans son ensemble est de la plus grande importance. Les épidémies ne peuvent être traquées de manière efficace que si l'agent étiologique a été correctement identifié.

Les agents thérapeutiques et notamment l'usage d'antibiotique à bon escient ne peuvent être choisis que lorsque l'agent infectieux en cause et la sensibilité ou la résistance aux antibiotiques ont été convenablement déterminés. Plus l'identification de l'agent étiologique et son profil de résistance sont déterminés tôt, plus la sévérité de la maladie peut être diminuée et plus la durée de la guérison peut être réduite. Le contrôle, le diagnostic et le traitement des maladies infectieuses sont complexifiés par l'émergence de résistance aux antimicrobiens. Ce

phénomène est tout aussi vrai pour les infections nosocomiales que pour les infections communautaires. La résistance aux antimicrobiens est un enjeu de santé publique. Ce phénomène contribue à l'augmentation de la mortalité et de la morbidité. La résistance aux antimicrobiens contribue aussi au prolongement de la durée d'hospitalisation et accroît les coûts de santé publique. La surveillance de la résistance, les mesures de contrôles de l'infection et les stratégies pour prévenir l'occurrence des infections sont centrales pour combattre la propagation d'agents pathogènes résistants aux antimicrobiens.

La microbiologie est en train de changer à un rythme sans équivalence excepté dans les premières ères de découvertes de la discipline. Ces changements et l'explosion des connaissances qui en découle ont de nombreuses origines mais l'évolution des technologies est à n'en pas douter le fondement de notre compréhension de la microbiologie d'aujourd'hui. Dans ce contexte, le laboratoire de microbiologie clinique, qu'il soit de ville ou hospitalier, tient un rôle essentiel. Le laboratoire de microbiologie doit permettre d'identifier l'agent étiologique et de connaître le traitement adéquat le plus tôt possible. La caractérisation du micro-organisme doit aussi parfois être conduite plus loin que l'espèce, jusqu'à la souche incriminée pour prendre toutes les mesures nécessaires dans le cas d'épidémies notamment. Cette marche en avant ne peut se faire qu'avec des méthodes de plus en plus rapides, des processus automatisés tout en ayant un coût limité.

Nous verrons dans un premier chapitre comment l'identification bactérienne a évolué de l'étude microscopique à l'étude par spectrométrie de masse. Dans un second chapitre, nous nous intéresserons aux propriétés intrinsèques des micro-organismes étudiés. Enfin, dans un troisième chapitre, nous verrons comment et pourquoi une méthode alternative de spectrométrie de masse est possible. Le quatrième chapitre sera consacré aux travaux de recherche et mettra en avant l'approche développée pour caractériser des micro-organismes au moyen de la spectrométrie de masse. Quatre brevets déposés et un article soumis seront présentés dans ce chapitre. Dans le cinquième chapitre, le concept proposé sera discuté. Enfin, le sixième chapitre, présentera les techniques utilisées pour mener ces travaux de recherche.

# 1. Chapitre 1 : L'identification bactérienne : du microscope au spectromètre de masse

---

## 1.1 Méthodes d'analyse traditionnelles : Un héritage ancien

---

### 1.1.1 Identification bactérienne

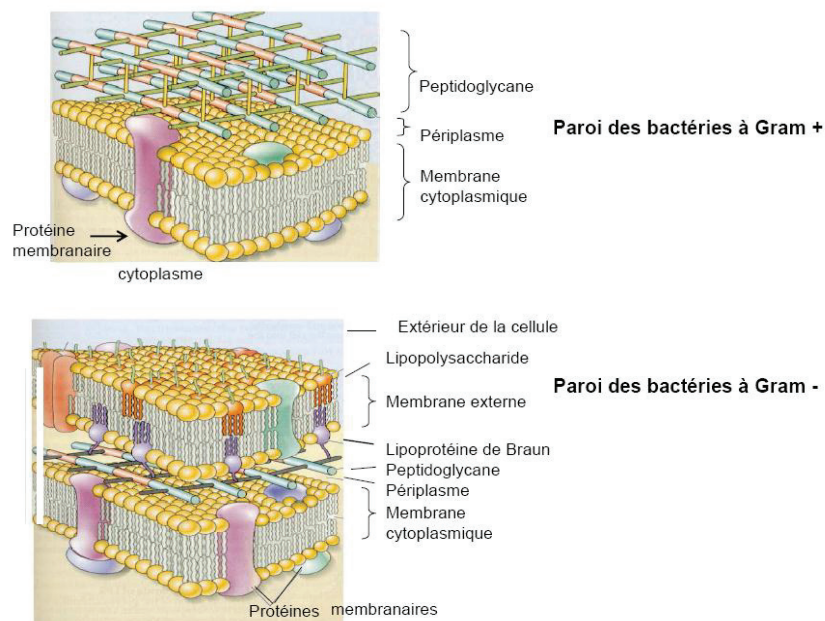
---

En 1683, les premières descriptions de bactéries ont été réalisées par Antony van Leeuwenhoek à l'aide d'un microscope qu'il développa lui-même. Il décrivit certaines des formes majeures bactériennes connues, des sphères, des bâtonnets et des spirales. Ce fut deux siècles plus tard, au XIXe siècle, que la bactériologie fut révolutionnée par les travaux de Louis Pasteur et de Robert Koch. Pasteur démontra le rôle des micro-organismes dans les processus de fermentation mais surtout le rôle des micro-organismes comme agent infectieux. Sa capacité à expérimenter le conduisit à la découverte des propriétés immunisantes de souches cultivées en laboratoire. Il reconnut que l'immunité contre des maladies était possible et développa un vaccin efficace contre la rage. Il développa également de nombreux procédés tels que les milieux de culture, l'autoclave ou la pasteurisation. Koch fut le premier à démontrer explicitement qu'une bactérie était l'agent responsable d'une maladie infectieuse, il proposa une série de postulats pour démontrer qu'un organisme cultivable est l'agent responsable des symptômes d'une maladie. De nombreux agents infectieux responsables de maladies ont été découverts par Koch et ses collaborateurs tels que la tuberculose, la diphtérie ou les infections à staphylocoques.

La première étape du laboratoire de microbiologie est l'isolement et l'identification du micro-organisme impliqué dans l'infection par toute technique permettant de définir l'espèce microbienne incriminée. L'origine des méthodes de cultures « pures » remonte aux travaux de Koch qui a montré que des colonies bactériennes individuelles se développant sur des tranches de pomme de terre ont souvent des morphologies différentes et que les organismes au sein d'une même colonie sont similaires. Plus tard, en 1882, un de ses collaborateurs suggéra l'utilisation de l'agar comme agent solidifiant et, en 1887, un assistant de Koch, R. J. Petri développa une boîte pour la culture bactérienne. Elle fut dénommée en son honneur la boîte de Pétri. La bactériologie médicale telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui est imprégnée de leurs



travaux. En 1884, un bactériologiste danois, Hans Christian Gram, mis au point une technique de coloration et donna également son nom à la technique. La coloration Gram permet de différencier morphologiquement les bactéries selon le type de paroi bactérienne (figure 1). Succinctement, après fixation des bactéries sur lame, la première étape est la coloration du cytoplasme au violet de gentiane, la seconde étape est une décoloration à l'alcool et la dernière étape est une recoloration à la safranine. La safranine est une coloration rose moins intense que le violet de gentiane. Une coloration violette met en évidence une paroi épaisse insensible à la décoloration à l'alcool, la bactérie est Gram positive. Une coloration rose met en évidence une paroi plus fine sensible à la décoloration à l'alcool, la bactérie est Gram négative.



**Figure 1 : Représentation schématisée de la paroi des bactéries à Gram+ et des bactéries à Gram- :** de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, la paroi des bactéries à gram + est principalement constituée d'un peptidoglycane épais contenant des acides téichoïques et téichuroniques qui interviennent dans le métabolisme bactérien en assurant l'adsorption des ions  $Mg^{2+}$ , d'un espace périplasmique restreint et d'une membrane cytoplasmique phospholipidique incluant des protéines membranaires. La paroi des bactéries à Gram- est constituée d'une membrane externe composée de phospholipides, de lipopolysaccharides assurant la stabilité par liaison aux ions  $Mg^{2+}$  et de protéines de structure (lipoprotéine de Braun) ou de transport (porine), d'un espace périplasmique contenant un peptidoglycane plus fin et d'une membrane cytoplasmique constituée de phospholipides et de protéines membranaires.

Au XXe siècle, l'identification microbiologique reposait sur l'étude des caractères morphologiques, des propriétés biochimiques et physico-chimiques. Les propriétés furent mises en évidence par l'élaboration de milieux de culture spécifiques. En 1923, la première édition de « Bergey's Manual of Determinative bacteriology » rapporta un inventaire des propriétés des espèces bactériennes [1]. Cet ouvrage fit consensus pour identifier et définir les espèces bactériennes. Le rôle du laboratoire de microbiologie est d'isoler et d'identifier les micro-organismes. Le processus standard est l'isolement et l'enrichissement du ou des pathogènes sur un milieu gélosé contenant tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance bactérienne et contenu dans une boîte de Pétri. Pour parvenir à une identification rapide, un premier test sous forme de kit fut décrit et breveté [2] par Pierre Janin, la galerie API (pour Analytical Profile Index). Ce système est composé de 20 cupules réactionnelles contenant des substrats déshydratés. Il permet de tester une large gamme de propriétés métaboliques et physico-chimiques des bactéries. L'objectif était de faciliter l'identification microbienne en standardisant les pratiques. La galerie fut rapidement adoptée par les microbiologistes. Peu de temps après, en 1977, des systèmes semi-automatisés ont été conçus de manière à réduire le temps d'obtention du résultat, à standardiser les pratiques et de manière à faciliter le flux du laboratoire [3].

### 1.1.2 AntibioGramme et techniques associées

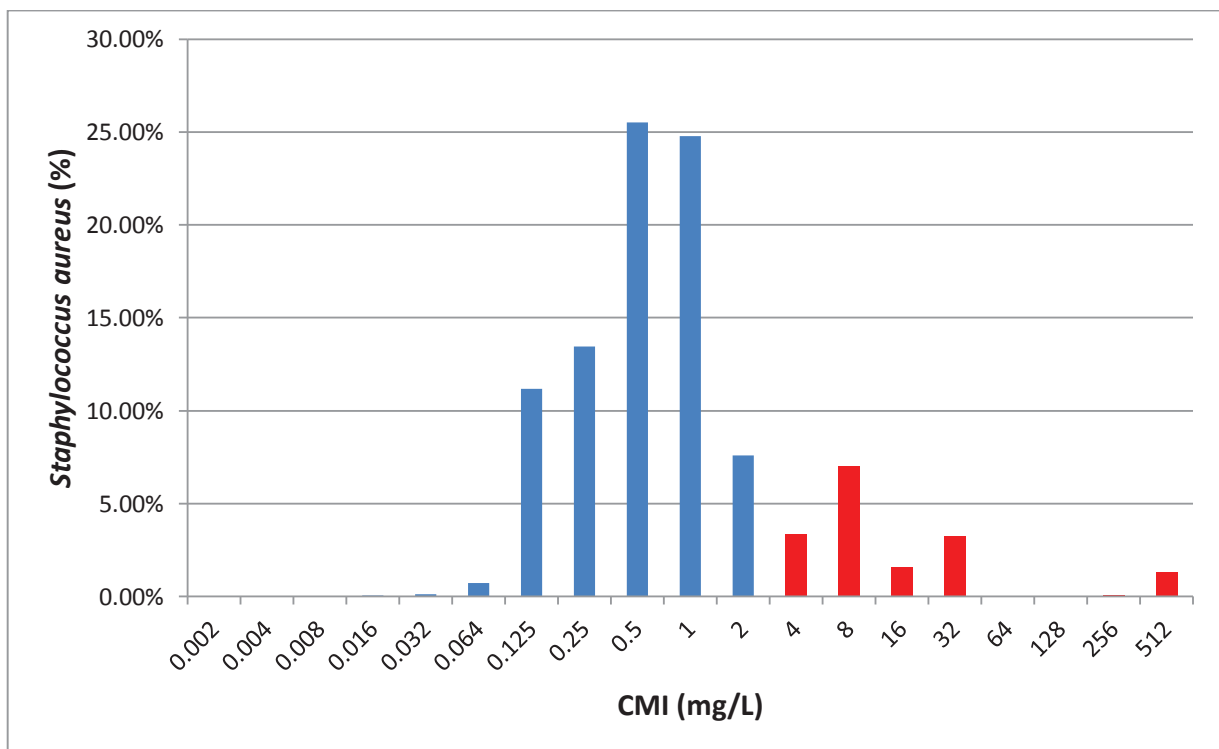
---

La seconde étape importante du laboratoire de microbiologie après l'isolement et l'identification du micro-organisme est l'antibiogramme. Il vise à sélectionner l'antibiotique le plus adapté pour orienter le traitement de l'infection affectant le patient ou dans des cas d'échecs thérapeutiques. L'objectif de l'antibiogramme est de mesurer, *in vitro*, l'activité des antibiotiques. Le principe est de tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) permet d'évaluer la sensibilité à l'antibiotique. Il s'agit de la plus faible concentration d'antibiotique capable, *in vitro*, d'inhiber totalement la croissance bactérienne. Il est nécessaire de s'assurer que la concentration d'antibiotique atteigne un taux thérapeutique au sein du foyer infectieux pour éliminer le germe pathogène. Il semblerait que cette concentration critique ait une valeur très proche de la CMI au foyer de l'infection [4]. Plusieurs méthodes phénotypiques d'évaluation de la CMI ont été

mises en œuvre. Des efforts considérables ont été nécessaires pour aboutir à des méthodes standardisées et à des protocoles de référence établis par les comités. En 1966, la diffusion en gélose fut proposée puis standardisée [5]. La méthode consiste à placer un disque de 150mm de diamètre imbibé d'un antibiotique sur un milieu gélosé Mueller-Hinton. Après 16 à 24h d'incubation à 35°C, il est possible de mesurer le diamètre de zone d'inhibition. Le diamètre de zone d'inhibition est inversement proportionnel à la CMI. La méthode de micro-dilution en bouillon de Mueller-Hinton fut également proposée puis standardisée [6]. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2 dans des puits. Après incubation, la CMI est indiquée par le puits qui contient la plus faible concentration d'antibiotique et où aucune croissance n'est visible. Récemment, un consensus s'est dégagé pour que la microdilution en bouillon de Mueller-Hinton soit le standard de référence internationale (ISO) pour les bactéries aérobies non exigeantes [7]. Toute technique d'étude de sensibilité des bactéries aux antibiotiques doit être comparée à ce standard [8]. Heureusement, le standard ISO faisait partie des méthodes de référence adoptées par les comités nationaux.

La catégorisation clinique, à savoir le classement des souches bactériennes en sensibles, intermédiaires et résistantes vis-à-vis d'un antibiotique est basée sur le choix des valeurs critiques qui sont des CMI ou des diamètres de zone d'inhibition [4]. Lorsque la CMI est inférieure ou égale à la valeur critique basse, le micro-organisme est dit « sensible » à l'antimicrobien donné, lorsque la CMI est supérieure à la valeur critique haute, le micro-organisme est dit « résistant » à l'antimicrobien donné. Lorsque la CMI est supérieure à la valeur critique basse et inférieure à la valeur critique haute, le micro-organisme est dit « intermédiaire » à l'antimicrobien en question. Ces valeurs critiques sont proposées par des comités nationaux tels le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) en France, la « British Society for Antimicrobial Chemotherapy » (BSAC) au Royaume-Uni ou le « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI) aux Etats-Unis. Ces valeurs sont établies sur trois types de critères qui sont des critères bactériologiques, pharmacologiques et cliniques.

Les critères bactériologiques sont les distributions de CMI d'une population microbienne donnée vis-à-vis d'un antimicrobien. Dans les cas les plus simples, la distribution est bimodale. Deux sous-populations de l'espèce se dégagent, les souches à CMI basse de répartition homogène et les souches à CMI haute de répartition hétérogène du fait de l'acquisition de mécanisme de résistance (Figure 2). Cependant, la distribution de ces deux populations est souvent multimodale en raison d'une diversité de mécanisme de résistance.



**Figure 2 : Distribution des CMI de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de l'association amoxicilline et acide clavulanique d'après 15603 observations.** (base de données EUCAST version 2012-09-28) La valeur critique épidémiologique est fixée à 2 mg/L. En bleu, les souches ont une CMI inférieure ou égale à la valeur critique et sont dites « sensibles ». En rouge, les souches ont une CMI au-dessus de la valeur critique et sont dites « résistantes ».

Les critères pharmacologiques sont les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques observés avec les doses usuelles et les doses maximales possibles en tenant compte des différentes voies d'administration. Les critères précédents sont complétés par des critères cliniques qui sont la notion d'échec ou de réussite thérapeutique en fonction des concentrations critiques proposées. Les trois catégories de souches sont alors

classiquement définies de la façon suivante. Les souches sensibles sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est acceptable dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée. Les souches résistantes sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement. Les souches intermédiaires sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. La valeur de la CMI n'est pas prédictive du succès thérapeutique [9].

Pour faciliter l'analyse de routine, des systèmes semi-automatisés ont été développés en comparaison aux méthodes de référence. Ces systèmes sont basés sur la croissance des bactéries en milieu liquide. Chaque système repose sur une lecture de turbidité itérative ou continue permettant de détecter une croissance bactérienne dans des puits contenant des antibiotiques à des concentrations choisies pour encadrer les concentrations critiques et en comparaison avec la croissance d'un contrôle. Pour permettre la conformité avec la méthode de référence, les fabricants ont conçus des logiciels qui corrèlent les résultats de croissance ou d'absence de croissance avec les CMI obtenues par la méthode de référence.

Les instruments semi-automatisés offrent un certain nombre d'avantages en comparaison aux méthodes de dilution en bouillon ou en gélose. Les réactifs sont fournis dans un format prêt à l'emploi dont le stockage est facilité. L'informatisation de la lecture et de l'interprétation des résultats par les logiciels embarqués permet une lecture objective et permet surtout d'alerter automatiquement sur des résultats inhabituels ou qui nécessitent des tests complémentaires. Enfin, le résultat est usuellement délivré en 4 à 8 heures. Cela peut faciliter la prise en charge du patient à condition que le clinicien soit disponible pour recevoir les résultats. Cependant, deux inconvénients majeurs sont à souligner. Le premier est que les instruments semi-automatisés permettent uniquement de déterminer une CMI bornée par l'étendue de la gamme de concentration testée qui est limitée. Le second est le temps nécessaire pour s'adapter aux révisions de concentrations critiques ou aux concentrations critiques des nouveaux antibiotiques. Cela demande un temps technique pour développer les nouvelles cartes et un temps nécessaire avant l'accord des autorités de régulation dans certains pays. C'est pourquoi certains laboratoires préfèrent utiliser la méthode de diffusion sur gélose qui offre l'avantage du coût et de la simplicité d'implantation. Par ailleurs, les laboratoires ont

recours à des techniques complémentaires pour couvrir la diversité des micro-organismes isolés et valider les résultats douteux. En effet, des tests supplémentaires et spécifiques sont, parfois, nécessaires pour détecter des mécanismes de résistance inhabituels ou difficiles à identifier par les méthodes habituelles de diffusion ou de dilution.

### 1.1.3 Cas particulier du sang : Hémoculture

---

Le sang est, dans son état normal, un fluide stérile. Une bactériémie est définie par la présence de bactérie dans la circulation sanguine, une fongémie est définie par la présence de champignons dans la circulation sanguine. L'hémoculture qui consiste à incuber du sang en présence d'un milieu de culture favorisant la croissance des micro-organismes est le procédé utilisé pour diagnostiquer la bactériémie ou la fongémie. L'isolement et l'identification du ou des micro-organismes confirment le diagnostic. La bactériémie et la fongémie sont le résultat de la dissémination de micro-organismes d'un foyer infectieux et peuvent être classées comme transitoire, intermittente ou persistante [10]. Les bactériémies transitoires durent de quelques minutes à quelques heures, elles sont les plus courantes et peuvent résulter du brossage des dents ou apparaître suite à la manipulation de tissus infectés. Les bactériémies intermittentes sont dues au même micro-organisme qui est détecté par intermittence chez le même patient à cause d'un cycle de clairance et de récurrence. Les bactériémies intermittentes sont souvent associées à des infections non drainées dans des espaces confinés telles que les abcès des tissus mous ou intra-abdominales mais aussi des infections focales telles que les pneumonies ou les ostéomyélites. Les infections persistantes sont caractéristiques des infections intravasculaires telles que les endocardites infectieuses. Le sepsis est l'association d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique et d'une infection. Le sepsis est classé selon sa gravité. Il peut être sans complication, être qualifiée de sepsis sévère lorsqu'il y a défaillance de un à plusieurs organes ou être qualifiée de choc septique en cas de sepsis sévère associée à une hypotension artérielle. Autrefois, le sepsis fut fatale. De nos jours, l'emploi à bon escient d'antibiotique permet de limiter sa mortalité mais la mortalité reste très élevée dans les sepsis sévères et les chocs septiques [11]. Une antibiothérapie précoce adaptée maximise les chances de survie.

La densité de bactéries dans la circulation sanguine est généralement très faible de l'ordre de 1 à 10 micro-organismes par millilitre de sang dans les épisodes de bactériémies. Ainsi, le sang est inoculé dans une bouteille contenant un milieu de culture approprié. Chez l'adulte, la procédure recommande un volume de 20mL minimum pour inoculer deux bouteilles, l'une en aérobiose et l'autre en aérobiose avec 10mL de sang chacune. La détection de la croissance bactérienne est favorisée par l'utilisation d'incubateur automatique. Ils permettent d'incuber les bouteilles à 35°C sous agitation constante. Cela assure une détection plus sensible et plus rapide des infections du sang en procédant à la lecture des bouteilles toutes les 10 minutes. Toutefois, certaines espèces poussent lentement ou sont non cultivables. Elles nécessitent des procédures alternatives telles que la détection des anticorps, ou les méthodes de biologie moléculaire pour détecter directement dans les échantillons sanguins, l'ADN bactérien ou fongique de ces micro-organismes. La détection des bouteilles positives est réalisée à l'aide d'un capteur à CO<sub>2</sub> contenant un indicateur de pH. Le capteur, positionné à la base de la bouteille, est isolé du liquide par une membrane semi-perméable ne laissant passer que le CO<sub>2</sub>. Le CO<sub>2</sub> produit réduit le pH et le capteur devient fluorescent. La bouteille est signalée positive par le logiciel. Si les bouteilles sont positives après enrichissement. Une coloration de Gram et une sous-culture sur un milieu appropriée sont réalisées. L'antibiogramme est réalisé à partir d'une colonie isolée selon la procédure standard. Dans les cas urgents où la vie du patient est menacée, le clinicien doit traiter au plus vite avec l'antibiothérapie adaptée. Dans ce cas, l'identification et l'antibiogramme peuvent être réalisés directement à partir de l'hémoculture positive en suivant une procédure adaptée de manière à réduire le temps d'analyse. Chaque résultat bactériologique en plus du contexte clinique est une information cruciale pour le clinicien. Le Gram puis l'identité de l'espèce peuvent orienter sur l'étiologie de la maladie et sur son traitement. Enfin, l'antibiogramme vient conforter ou modifier le choix de l'antibiothérapie.

## 1.2 Essor de nouvelles technologies dans les sciences du vivant :

---

La seconde partie du XXe siècle a permis l'essor de nouvelles technologies analytiques dans les sciences du vivant incluant le spectrophotomètre, la chromatographie liquide-gaz et les premiers spectromètres de masse. Ainsi, en 1965, l'identification des bactéries est proposée en

couplant la pyrolyse à la chromatographie liquide-gaz [12]. En 1975, la première analyse microbiologique par spectrométrie de masse fut décrite par Anhalt et Fenselau [13]. Ces derniers combinèrent la pyrolyse à la spectrométrie de masse à partir de bactéries lyophilisées. Ils ont démontré que des biomolécules issues de bactéries intactes introduites dans un spectromètre de masse pouvaient être vaporisées et ionisées par impact électronique et générer des spectres caractéristiques résultant de produits de pyrolyse de phospholipides et d'ubiquinones. En 1987, ils appliquèrent une autre source d'ionisation, le bombardement d'atomes rapides pour différencier les bactéries [14]. Cette technique permet de désorber les lipides des membranes pour différencier les bactéries sur la base du contenu en phospholipides et en glycolipides. Cependant les technologies proposées n'ont jamais suscité une large adhésion comme outil d'identification car la technologie est encombrante, la reproductibilité inter-laboratoire est faible et les résultats ne sont pas comparables aux données d'hybridation ADN-ADN.

Pendant ce temps, une alternative pour analyser les acides gras de la paroi des micro-organismes a été proposée pour identifier les bactéries. Les acides gras sont extraits des bactéries, dérivatisés suivant une procédure standardisée et analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La préparation d'échantillon dure plusieurs heures. La technique prend le nom anglo-saxon de FAME pour « Fatty Acid Methyl Esters ». Le profil des acides gras est considéré comme une méthode de référence pour les études taxonomiques et a notablement été automatisé [15]. Cependant, la durée de la préparation d'échantillon pour l'analyse des acides gras et les compétences nécessaires pour la dérivatisation chimique ont limités son utilisation.

Introduites dans les années 80, l'émergence de techniques d'ionisation douce a bouleversé l'analyse des biomolécules. Dans un premier temps, trois techniques pionnières de désorption ont permis l'analyse de biomolécules : la désorption plasma [16], la désorption laser et le bombardement d'atomes rapides [17]. Dans un second temps, les analyses ont largement été améliorées par l'introduction de la source de désorption et ionisation laser assistée d'une matrice (MALDI pour « Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization ») [18,19] et par l'introduction de la source électrospray (ESI pour « ElectroSpray Ionization ») [20]. Ces deux



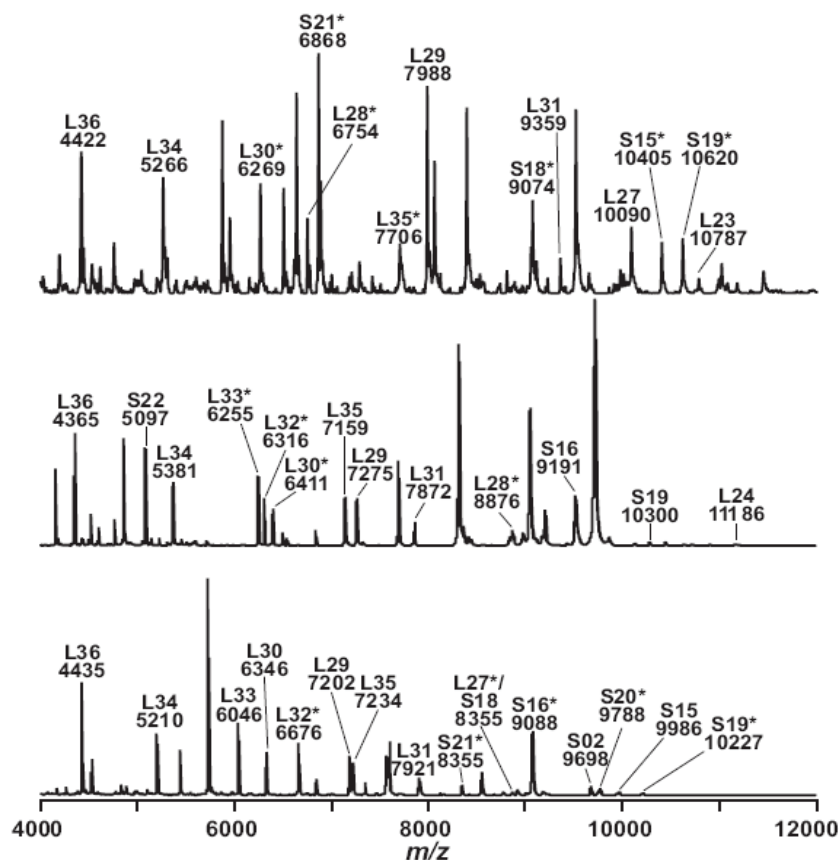
sources permettent l'analyse directe de biomolécules telles que les protéines sans traitement chimique. La source MALDI permet théoriquement l'analyse de biomolécules sans limite haute en masse. Brièvement, une matrice est mélangée avec un échantillon biologique puis irradiée par un laser, la sublimation de la matrice entraîne la désorption et l'ionisation des molécules de l'échantillon formant un panache d'ions à chaque série de pulses du laser. L'analyseur de type temps de vol (TOF pour « Time Of flight ») est particulièrement adapté pour séparer et détecter ce train d'ions néoformés. La durée du vol des molécules est inversement proportionnel à leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Il en résulte un profil spectral représentant les masses moléculaires des ions présents dans l'échantillon. La matrice MALDI remplit de nombreux rôles pour favoriser l'ionisation des analytes. Elle absorbe l'énergie du pulse de rayon laser limitant la détérioration des analytes. Elle isole les molécules d'échantillon limitant la formation d'adduits. Elle fournit des sites acides ou basiques photo-excités favorisant l'ionisation des molécules de l'échantillon [21]. Les ions sont majoritairement monochargés. La technique se nomme MALDI-TOF en raison de l'association de la source MALDI à l'analyseur TOF. De nombreuses études ont montrés que les profils spectraux obtenus par MALDI-TOF pouvaient être utiles pour la caractérisation rapide des microorganismes. En effet, contrairement aux techniques précédentes, cette technique permet de visualiser un profil protéique. Cela offre deux avantages principaux, les biomarqueurs donnent une information indirecte du génome et ils sont d'une grande abondance. En 1996, trois équipes de recherche ont caractérisés des microorganismes par MALDI-TOF à partir de bactéries intactes [22-24]. La méthode est simple et rapide. Des bactéries intactes sont déposées sur une cible métallique, mélangées à la matrice, séchées et analysées dans le spectromètre de masse. Les molécules ionisées sont généralement des protéines associées à la surface bactérienne. Les empreintes protéiques sont spécifiques d'une espèce à une autre. Néanmoins, ces résultats sont majoritairement basés sur des espèces relativement éloigné les unes des autres. La précision et la reproductibilité de ces résultats sont à démontrer pour une utilisation clinique de routine.

### 1.3 Utilisation clinique de routine du MALDI-TOF

---

La première mission du laboratoire de microbiologie clinique est d'aider les cliniciens dans le diagnostic et le traitement des maladies infectieuses. Cependant, le délai entre le prélèvement de l'échantillon et le résultat rend parfois ce dernier inutile pour le clinicien. Le besoin d'une caractérisation rapide et fiable du pathogène incriminé pour améliorer la prise en charge des patients est essentiel. Très tôt, des applications biomédicales sont envisagées avec l'utilisation du MALDI-TOF pour la caractérisation rapide des micro-organismes mais quelques limitations ont dû être levées pour une utilisation en diagnostic de routine. L'argument majeur à l'encontre de cette approche fut que le protéome d'un micro-organisme est dynamique. De ce fait, le profil protéique pouvait potentiellement être fluctuant en réponse aux conditions de culture [25]. D'autres réticences furent évoquées : un doute sur l'accord entre la taxonomie et le spectre ou le fait qu'il manquait une base suffisamment exhaustive pour couvrir tous les micro-organismes pertinents cliniquement [25]. En 2004, la première base de données complète pour l'identification bactérienne fut établie par Keys *et al* [26]. La matrice et la gamme de masse utilisées favorisaient la détection de molécules associées à la surface de la bactérie. Mais en raison des variations d'expression des protéines de surface, l'approche nécessitait une standardisation rigoureuse incompatible avec un diagnostic de routine.

Après modification de la matrice, il est maintenant reconnu qu'une majorité des ions présents dans la gamme de masse 2000-20000 Thomson (Th) sont caractéristiques de protéines ribosomales [25,27,28] Bien que l'ensemble des ions présents ne puissent être associés sans ambiguïté à une protéine, la majorité des ions semblent correspondre à des protéines structurales telles que les protéines ribosomales, capables de caractériser une espèce (figure 3).



**Figure 3 : spectre de masse MALDI-TOF de cellules entières de : en haut, *Streptococcus pneumoniae* ; au milieu, *Escherichia coli* ; en bas, *Pseudomonas aeruginosa*. Les pics correspondent aux formes ionisées des protéines des grandes (L) et petites (S) sous-unités ribosomales basés sur les valeurs annotées et théoriques de m/z. Les données des masses de protéines théoriques ont été obtenues en cherchant les protéines de la gamme de masse 3000-20000Da de plusieurs génomes (site EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/>). L'astérisque fait référence au clivage probable de la méthionine des protéines respectives. L'image est reproduite d'après [25].**

Les questions de reproductibilité et de précision ont été adressées par de nombreuses études. Ces études ont démontré que les spectres de masse sont reproductibles entre différents laboratoires et même en variant les conditions de culture [29-31]. L'identification des pics présents chez *S. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* renforce cette hypothèse [25].

La variabilité entre les espèces et la similarité au sein des espèces ont été étudiées pour tous les micro-organismes cliniquement pertinents et, jusqu'à présent, la technique est applicable pour l'ensemble des groupes étudiés. Néanmoins, il est devenu évident qu'un système d'identification fonctionnel et fiable basé sur des spectres de masse nécessite

l'acquisition de spectres de référence de dizaine de milliers de souches et le développement d'outils logiciels appropriés pour manipuler les données. Ainsi bioMérieux a intégré dans son instrument une base de plus de 25 000 spectres [32].

Plus d'une décade après la preuve de concept dans les laboratoires de recherche [22-24], l'introduction de solutions commerciales dans les laboratoires de microbiologie médicale a permis de vaincre les réticences et de mettre en avant les avantages de l'approche. En 2009, Seng *et al* ont titré sur la révolution à venir dans le monde de la bactériologie [33]. Ils ont démontré sur 1660 isolats cliniques la fiabilité de l'approche par MALDI-TOF. 95.3% des isolats cliniques furent identifiés dont 84.1% au niveau espèce et 11.3% au niveau genre. Ils ont également apporté des arguments économiques. Ils ont estimé que le coût de cette technique représentait 22 à 32% du coût actuel des méthodes d'identification. Un nombre important d'études ont confirmé les résultats et les avantages cités par Seng *et al* [34-36].

La préparation d'identification est simple et robuste. A partir d'une colonie isolée sur boîte de Pétri, l'identification peut être réalisée sans connaissance antérieure en spectrométrie de masse ou en microbiologie. Une petite quantité de cellules fraîches est étalée sur la cible MALDI à l'aide d'une oese en plastique. Une goutte de solution de matrice est ajoutée et dès que le solvant est évaporé, l'échantillon est prêt à être analysé. L'acquisition des données est faite de manière automatique à l'aide du logiciel présent sur les instruments. Ainsi, le personnel de laboratoire peut être formé rapidement à la technique de dépôt et se familiariser à l'environnement logiciel simplifié.

L'engouement actuel pour l'utilisation du MALDI-TOF en routine tient au fait que ce dernier est facile de prise en main, qu'il est autant voir plus précis que les techniques phénotypiques classiques, que le coût unitaire est moindre et qu'il est très rapide [37]. L'ensemble de ses avantages fait que la technologie MALDI-TOF se diffuse largement dans les laboratoires microbiologiques et remplace les méthodes traditionnelles d'identification microbienne.

## 2. Chapitre 2 : Caractérisation fine des microorganismes

---

### 2.1 Résistance aux antimicrobiens

---

Les antimicrobiens sont les médicaments des maladies infectieuses. Cette classe thérapeutique a pour particularité d'avoir sa cible pharmacologique localisée, non pas dans un tissu de l'organisme humain, mais dans le pathogène hébergé accidentellement ou en permanence par cet hôte. La molécule antimicrobienne devra satisfaire à la double exigence d'être la plus toxique possible pour le microbe visé et la moins toxique possible pour l'organisme hôte. Nous nous limiterons aux antibiotiques agissant sur les bactéries et aux antifongiques agissant sur les champignons et seront donc exclus les antiviraux et les antiparasitaires.

L'infection met en jeu la relation entre deux êtres vivants doués d'une autonomie et d'une vie propre : l'hôte et l'agent pathogène. L'un et l'autre peuvent évoluer, se défendre contre les agressions, acquérir de l'information venant de ses voisins et donc s'adapter à un environnement. L'évolution de bactéries vers la résistance aux antibiotiques, l'évolution de levures vers la résistance aux antifongiques ne sont que le résultat de cette adaptation. La résistance est dite naturelle lorsque les propriétés intrinsèques de l'espèce lui permettent de résister à un antimicrobien. Le support de la résistance est alors chromosomique. L'identification de l'espèce permet de connaître les résistances naturelles et suffit au diagnostic. Au contraire, la résistance est dite acquise lorsque le capital génétique de l'espèce est modifié et que cela lui permet de tolérer une concentration en antibiotique plus élevée que celles qui inhibent les souches sensibles de la même espèce. Le support de la résistance acquise peut être chromosomique ou extra-chromosomique lorsque le pathogène bénéficie de plasmides, d'éléments transposables ou d'intégrons.

Le chapitre est orienté sur les résistances acquises, cliniquement pertinentes, qui expliquent à elles-seules en grande partie le phénotype de résistance du micro-organisme.

## 2.1.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines

### 2.1.1.1 Les $\beta$ -lactamines

Les antibiotiques de la classe des  $\beta$ -lactamines constituent une vaste famille de molécules qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases. Ces antibiotiques, caractérisés par la présence d'un noyau  $\beta$ -lactame (figure 4), sont actuellement les plus utilisés en thérapeutique en raison de leur large spectre d'activité, de leur action bactéricide rapide sur les bactéries sensibles et de leur faible toxicité.

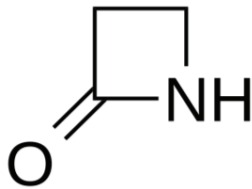


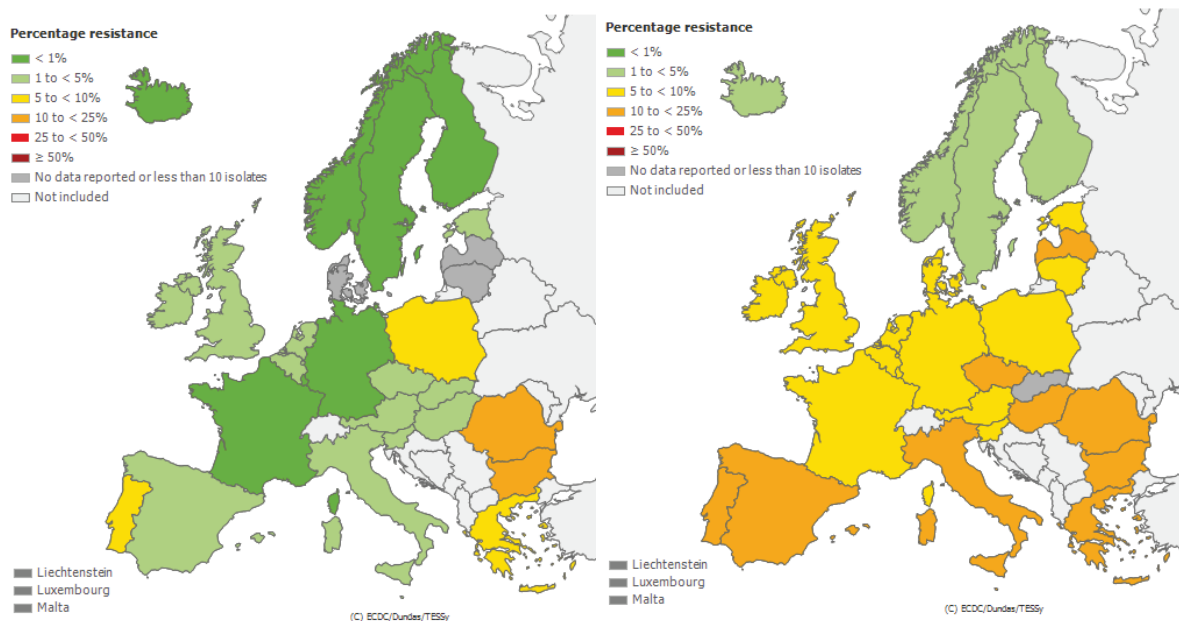
Figure 4 : Représentation du noyau  $\beta$ -lactame

Les  $\beta$ -lactamines sont des antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne. Ils se fixent sur des protéines membranaires nommées les Protéines de Liaison aux Pénicillines (PLP). Les principales PLP catalysent les réactions de transpeptidation et de transglycolysation. Les  $\beta$ -lactamines jouent le rôle du substrat en formant une liaison stable avec la PLP et bloquent ainsi les enzymes associées à la synthèse du peptidoglycane. Ces antibiotiques agissent en se fixant sur les PLP de l'extérieur de la cellule bactérienne pour les bactéries Gram positive et au niveau de l'espace périplasmique pour les bactéries Gram négative. La résistance aux  $\beta$ -lactamines peut impliquer des phénomènes d'imperméabilité et d'efflux actif (pour les bacilles Gram négatif), une faible affinité des  $\beta$ -lactamines pour leur cible PLP ou une dégradation enzymatique par l'intermédiaire de  $\beta$ -lactamases qui vont hydrolyser les  $\beta$ -lactamines. Ces dernières sont nommées pénicillinases lorsqu'elles hydrolysent les pénicillines, céphalosporinases lorsqu'elles hydrolysent les céphalosporines et carbapénémases lorsqu'elles ont une activité d'hydrolyse sur les carbapénèmes. Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle dite intrinsèque à l'espèce, soit d'une résistance acquise par certaines souches faisant suite à l'apparition de mutations ou à l'acquisition de matériel exogène. Pour

chaque espèce, il convient de distinguer le phénotype dit sauvage, propre à l'espèce du phénotype dit résistant propres aux souches qui ont acquis la résistance.

### 2.1.1.2 Cas des bacilles Gram négatif :

La résistance aux  $\beta$ -lactamines s'installent chez les bacilles Gram négatif (BGN) et touchent de nombreuses espèces. La résistance est devenue alarmante avec l'émergence de souches multi-résistantes. Les carbapénèmes, antibiotiques à utiliser en dernier recours, sont de plus en plus nécessaires dans de nombreuses infections hospitalières et communautaires. Ce phénomène touche le bacille pyocyanique *P. aeruginosa*, les *Acinetobacter spp* et de nombreuses entérobactéries incluant notamment *E. coli*, *Enterobacter spp* ou *K. pneumoniae*. Comme la figure 5 l'illustre, la tendance à la hausse de la résistance aux céphalosporines de troisième génération est vraie, à des degrés divers, pour toute l'Europe.



**Figure 5 : Evolution de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *E. coli* en Europe.** A gauche, proportion d'isolats d'*E. coli* résistants aux céphalosporines de troisième génération dans les pays participants en 2002, à droite, proportion d'isolats d'*E. coli* résistants aux céphalosporines de troisième génération dans les pays participants en 2010. Consultable sur le site du centre européen de prévention et de contrôle des maladies: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/>

Les cibles des  $\beta$ -lactamines, les PLPs, sont situées sur la face externe de la membrane cytoplasmique. La pénétration des  $\beta$ -lactamines est limitée par la membrane externe, la seule barrière de perméabilité importante. En effet, les  $\beta$ -lactamines qui sont pour la plupart hydrophiles ne peuvent pas diffuser de façon significative au travers de la membrane externe qui est riche en acides gras saturés. Les  $\beta$ -lactamines empruntent principalement les porines pour franchir la membrane externe. Ces protéines sont des canaux aqueux permettant une diffusion passive des molécules hydrophiles de masse inférieure à 600 Da. La résistance peut faire intervenir l'altération ou la baisse du nombre de porines membranaires empêchant la diffusion de l'antibiotique ou encore la surexpression de pompe à efflux. Ces systèmes sont constitués de trois protéines. Une, insérée dans la membrane cytoplasmique assurant le rôle de pompe, une seconde insérée dans la membrane externe assurant le passage par diffusion (c'est une porine) et la troisième située dans l'espace périplasmique assurant le lien entre les deux protéines. La résistance peut aussi faire intervenir la modification des PLP mais ce phénomène est très rare chez les BGN. Le mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines principal des BGN est enzymatique. L'altération de la perméabilité de la membrane externe, la modification des PLP et la surexpression des pompes à efflux ne jouent qu'un rôle secondaire souvent additionnel.

L'étude des  $\beta$ -lactamases est au cœur de la résistance aux  $\beta$ -lactamines. Les  $\beta$ -lactamases présentent dans l'espace périplasmique hydrolysent les  $\beta$ -lactamines qui ont pu traverser avant qu'elles n'atteignent leur cible. Elles sont d'ailleurs très diversifiées. Leur diffusion planétaire est la conséquence de nombreux facteurs favorables. Les bactéries sont présentes dans des environnements variés sous une pression de sélection variable. Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes fortement adaptables, capables d'élargir leur spectre d'activité et bénéficient de nombreux mécanismes de transfert horizontal de gènes. Le support génétique est majoritairement plasmidique. En plus des plasmides, la présence de transposons et d'intégrons favorisent la dissémination des mécanismes de résistance à des espèces éloignées phylogénétiquement. L'apparition de la résistance aux  $\beta$ -lactamines démarra même avant que le premier antibiotique de cette famille, la pénicilline, ne soit introduit. La première  $\beta$ -lactamase fut identifiée chez *Escherichia coli* avant le lancement de la pénicilline en pratique médicale



[38]. Suite à l'introduction de céphalosporines de troisième génération, céphalosporine stable aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, le nombre et la diversité des enzymes ne cessa d'augmenter.

Deux classifications raisonnées des  $\beta$ -lactamases ont émergé : la classification d'Ambler et la classification de Bush-Jacoby-Medeiros pour comprendre le rôle de ces enzymes dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines.

La classification d'Ambler :

La première classification basée sur des critères moléculaires a été proposée en 1980 par Ambler [39]. Une classe de sérine-enzymes (classe A) et une classe de métallo-enzymes (classe B) furent décrites à cette époque. Deux nouvelles classes de sérine-enzymes ont été décrites, la classe C de céphalosporinases et la classe D regroupant les oxacillinases selon l'antibiotique favorablement hydrolysé. Les classes A, C et D incluent des enzymes qui hydrolysent leur substrat en formant un acyle-enzyme au site actif sérine alors que les enzymes de la classe B sont des métallo-enzymes qui utilisent au moins un ion zinc dans le site actif pour faciliter l'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame. Cette classification basée sur la structure primaire des protéines est la plus utilisée en pratique médicale.

La classification de Bush-Jacoby-Medeiros :

La classification a été proposée en 1989 par Bush [40], élargie en 1995 [41] et mise à jour en 2010 [42]. Cette classification est fonctionnelle, elle regroupe diverses enzymes selon leurs propriétés d'hydrolyse et d'inhibition.

Brièvement, le groupe 1 (tableau 1) regroupe des céphalosporinases chromosomiques de type AmpC peu inhibées par l'acide clavulanique et des céphalosporinases plasmidiques résistantes à l'inhibition par l'acide clavulanique. L'antibiotique induit dans certaines espèces l'expression des céphalosporinases chromosomiques mais l'expression est généralement de bas niveau sauf lorsque des mutations interviennent dans la zone de régulation induisant un haut niveau de céphalosporinase de type AmpC. L'identification du micro-organisme peut suffire au diagnostic dans le premier cas alors que la mise en évidence des enzymes plasmidiques est nécessaire dans le second cas. L'expression des céphalosporinases plasmidiques est toujours de haut niveau. Ce groupe 1 correspond à la classe C d'Ambler. ACC, ACT, MIR, MOX, DHA, CMY et FOX sont les familles d'enzymes plasmidiques les plus fréquemment rencontrées.

Classe d'Ambler	Classe de Bush-Jacoby-Medeiros	Nom de l'enzyme	Origine du nom	Date de découverte	Nombre de variants	Longueur	Masse (kDa)	Référence
C	1	MIR	MIRiam Hospital	1990	5	367	40	[43]
C	1	LAT	LATamoxef	1993	1	381	42	[44]
C	1	MOX	MOXalactam	1993	8	382-383	41	[45]
C	1	FOX	ceFOXitin	1994	10	382	42	[46]
C	1	CMY	CephaMYcinase	1996	93	381	41-42	[47]
C	1	ACT	AmpC Type	1997	19	381	42	[48]
C	1	DHA	Dharan Hospital Saudi Arabia	1997	8	379	41	[49]
C	1	ACC	Ambler Class C-1	1999	5	386-390	42	[50]
C	1	CFE	<i>Citrobacter freundii</i> encoded	2004	1	381	41,7	[51]

**Tableau 1 :  $\beta$ -lactamases de la classe 1, céphalosporinases acquises de type AmpC.**

Le groupe 2 (tableau 2) est composé de pénicillinases, de céphalosporinases, d'oxacillinases et de carbapénèmases chromosomiques ou codées par des plasmides. Le groupe 2 englobe 12 sous-groupes et correspond aux classes A et D d'Ambler.

Le sous-groupe 2a inclut des pénicillinases qui hydrolysent uniquement les dérivés de la pénicilline.

Le sous-groupe 2b a été fortement subdivisé puisque les membres des familles TEM et SHV de ce groupe ont muté modifiant fortement leur spectre d'activité. Le sous-groupe 2b inclut les premiers variants de TEM et SHV qui sont des enzymes ayant une activité hydrolytique sur les pénicillines et les premières générations de céphalosporines mais restent fortement inhibées par l'acide clavulanique.

Le sous-groupe 2be correspond au phénotype BLSE pour  $\beta$ -Lactamases à Spectre Étendu. Le spectre d'activité est celui du sous-groupe 2b et en addition les enzymes hydrolysent au moins un oxyimino- $\beta$ -lactame tel que le cefotaxime ou ceftazidime et les monobactames. Ce sous-groupe 2be inclut certains variants de TEM et SHV, la famille CTX-M, les familles PER et VEB et quelques autres membres moins communs, BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1 et TLA-2.

Le sous-groupe 2br correspond aux enzymes TEM et SHV qui ont acquises une résistance aux inhibiteurs tel que l'acide clavulanique tout en conservant le spectre d'activité du sous-groupe 2b.

Le sous-groupe 2ber correspond aux enzymes TEM qui ont acquises une résistance aux inhibiteurs tel que l'acide clavulanique tout en conservant le spectre d'activité du sous-groupe 2be.

Le sous-groupe 2c fait référence aux pénicillinases capables d'hydrolyser préférentiellement la carbénicilline ou la ticarcilline.

Le sous-groupe 2ce correspond à l'activité du sous-groupe 2c et en addition une activité sur céfépime et ceftiprome.

Le sous-groupe 2d a été fortement subdivisé puisque les membres de la famille OXA de ce groupe ont muté modifiant fortement leur spectre d'activité. Ce sous-groupe correspond à la classe D d'Amblar tandis que les sous-groupes 2a, 2b, 2c et dérivés correspondent à la classe A d'Amblar. Le sous-groupe 2d fait référence aux pénicillinases capables d'hydrolyser préférentiellement la cloxacilline ou l'oxacilline.

Le sous-groupe 2de correspond à l'activité du sous-groupe 2d et en addition les enzymes hydrolysent au moins un oxyimino- $\beta$ -lactame tel que le cefotaxime ou ceftazidime, les monobactames mais pas les carbapénèmes.

Le sous-groupe 2df correspond à l'activité du sous-groupe 2de et en addition les enzymes hydrolysent les carbapénèmes. La majorité des enzymes de la famille OXA est présente dans *Acinetobacter baumannii*. Hormis un groupe qui a largement diffusé dans les entérobactéries. Il s'agit du groupe OXA-48 constitué de six variants. Ces enzymes hydrolysent les pénicillines à haut niveau et les carbapénèmes à faible niveau, épargnant les céphalosporines large spectre et non sensibles aux inhibiteurs. Difficile à suspecter, ce groupe de phénotype carbapénémase

dissémine largement à l'aide de plasmide et représente une source potentielle d'échec clinique pour de nombreux  $\beta$ -lactames [52].

Le sous-groupe 2e correspond à des céphalosporinases à spectre étendu, inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactame.

Le sous-groupe 2f correspond à des carbapénèmases telles que SME, KPC ou certains variants de GES. La première  $\beta$ -lactamase de type GES a été isolée en 1998 en Guyane française [53]. Cette enzyme (GES-1) conférait une résistance de type BLSE (sous-groupe 2be). Le deuxième isolat d'une bactérie portant une  $\beta$ -lactamase de type GES a été identifié en 2000 en Afrique du Sud [54]. Cette enzyme (GES-2) conférait une résistance aux céphalosporines et aux carbapénèmes tels que l'imipénème (sous-groupe 2f).

Identifiée chez *Klebsiella pneumoniae*, l'enzyme KPC confère une diminution de sensibilité ou une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines. De loin, les enzymes de type KPC sont les carbapénèmases les plus fréquentes de la classe A. De support plasmidique, elles sont majoritairement présentes chez *K. pneumoniae* mais elles disséminent aussi chez d'autres membres des entérobactéries ou chez *P. aeruginosa* [55]. A noter que des isolats producteurs de KPC de *K.pneumoniae* ayant des niveaux variés de résistance aux carbapénèmes ont été étudiés. Un nombre de copie plus élevé du gène  $bla_{KPC}$  ou des délétions dans la zone amont au gène suggère la forte expression de KPC comme responsable d'un niveau de résistance plus élevé dans une majorité de ces souches. Une contribution additionnelle à la production d'enzyme de type KPC semble venir de la perte de porine OmpK36 [56]

Classe d'Ambler	Classe de Bush-Jacoby-Medeiros	Nom de l'enzyme	Origine du nom	Date de publication	Nombre de variants	Longueur	Masse (kDa)	Référence
A	2b 2br 2be 2ber	TEM	TEMonieira patient	1965	201	286	31	[57]
A	2b 2br 2be	SHV	SulfHydryl Variable	1979	167	286	31	[58]
A	2be	CTX-M	CefoTaXimase-Munich	1990	131	291	31	[59]
A	2be	PER	<i>Pseudomonas</i> Extended Resistance	1993	7	308	33	[60]
A	2be	VEB	Vietnam Extended-spectrum $\beta$ -lactamase	1999	8	299	33,7	[61]
A	2c	CARB	CARBenicillin	1981	14	288	31	[62]
D	2d 2de 2df	OXA	OXAillin-hydrolysing $\beta$ -lactamase	1983	247	262-280	29-32	[63]
A	2f	SME	<i>Serratia marcescens</i> Encoded	1994	3	294	32	[64]
A	2f (GES-1: 2be)	GES	Guyana Extended Spectrum $\beta$ -lactamase	2000	22	287	31	[53]
A	2f	KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase	2001	11	293	31	[65]

**Tableau 2 :  $\beta$ -lactamases de la classe 2 :  $\beta$ -lactamase à spectre étroit, BLSE ou carbapénèmase composent cette classe très variée.**

La classe 3 (tableau 3) correspond aux métallob $\beta$ -lactamases. Elles sont connues pour hydrolyser les antibiotiques de la classe des carbapénèmes, être résistantes aux inhibiteurs tel que l'acide clavulanique. Le groupe 3 correspond à la classe B d'Ambler. Dans les années 60, les premières métallob $\beta$ -lactamases furent découvertes dans des espèces de faible pathogénicité. Dans les années 90, plusieurs métallob $\beta$ -lactamases encodés par des éléments génétiques mobiles ont émergé dans des BGN cliniquement relevant. (Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et

*Acinetobacter baumannii*) [66]. Aujourd'hui, ce groupe inclut au moins 10 types différents d'enzymes de métallob- $\beta$ -lactamases acquises : IMP, VIM, NDM, GIM, SIM, DIM, SPM, KHM, AIM, SMB [67,68] et la dernière mise en évidence FIM-1 [69].

Classe d'Ambler	Classe de Bush-Jacoby-Medeiros	Nom de l'enzyme	Origine du nom	Date de publication	Nombre de variants	Longueur	Masse (kDa)	Référence
B	3a	IMP	IMiPenemase	1994	38	246	27	[70]
B	3a	IND	<i>Chryseobacterium INDologenes</i>	1999	7	239	27	[71]
B	3a	VIM	Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase	1999	34	266	28	[72]
B	3a	SPM	Sao Paulo Metallo-beta-lactamase	2002	1	276	30,5	[73]
B	3a	GIM	Germany IMipenemase	2004	1	250	27	[74]
B	3a	SIM	Seoul IMipenemase	2005	1	246	27,4	[75]
B	3a	AIM	Adelaide IMipenemase	2007	1	303	32	[76]
B	3a	KHM	Kyorin Health science MBL	2008	1	241	26	[77]
B	3a	NDM	New Delhi Metallo-beta-lactamase	2009	7	270	28	[78]
B	3a	DIM	Dutch IMipenemase	2010	1	251	27,7	[79]
B	3a	SMB	<i>Serratia</i> Metallo-Beta-lactamase	2011	1	280	29,5	[68]
B	3a	FIM	Florence Italy Metallo-beta-lactamase	2012	1	280	29,5	[69]

**Tableau 3 : Métallo- $\beta$ -lactamases de la classe 3 : elles confèrent toutes une activité sur les carbapénèmes.**

A noter que le nom de ces enzymes est très variable. Il peut prendre le nom de l'espèce incriminée, du patient, de l'hôpital ou le nom de la localisation géographique du premier isolat clinique. Le nom peut aussi faire référence au substrat préférentiellement hydrolysé, à la

structure de la protéine au niveau du site actif de l'enzyme ou à la classe à laquelle appartient l'enzyme. Le nom peut également être une association de plusieurs de ces caractéristiques.

Trois groupes majeurs de  $\beta$ -lactamases sont généralement distingués, les céphalosporinases plasmidiques de la Classe C (AmpC), les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et les carbapénémases du fait de leur importance clinique, de leur prévalence et de la difficulté à les distinguer.

Le diagnostic est généralement fait par inférence d'après les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques et aux inhibiteurs en connaissant les phénotypes sauvages de l'espèce et le phénotype de l'espèce ayant acquis une  $\beta$ -lactamase. Parfois, des tests phénotypiques complémentaires sont nécessaires. La résistance peut s'exprimer à bas niveau *in vitro* pour certaines molécules mais être responsables d'échecs thérapeutiques. La connaissance des phénotypes de résistance aux divers antibiotiques de la classe est importante. Pour pallier les imperfections des tests de sensibilité *in vitro*, des règles de lecture interprétative ont été établies. Cependant, l'association de mécanismes de résistance enzymatiques ou non enzymatiques peut limiter la lecture interprétative.

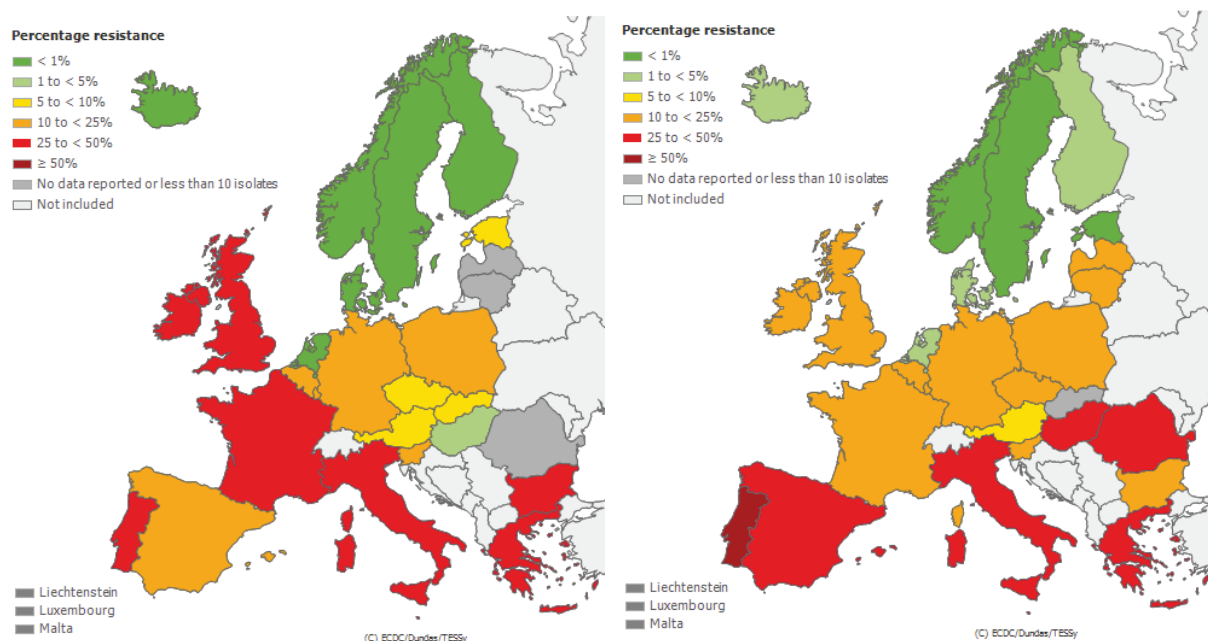
Dans le cadre d'étude épidémiologique, les différentes souches responsables de ces phénotypes sont amplifiées par réaction en chaîne par polymérisation (de l'anglais « Polymerase Chain Reaction », communément nommé PCR) puis séquencer.

#### 2.1.1.3 Cas de *Staphylococcus aureus* :

---

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a su faire face à chaque nouvel antibiotique introduit depuis un demi-siècle. Dès 1941, quelque temps après l'introduction de la pénicilline, des staphylocoques résistants à la pénicilline sont apparus grâce à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique. La résistance à la pénicilline, initialement restreinte en milieu hospitalier, a rapidement diffusé en milieu communautaire et concerne actuellement plus de 90% des souches de *S. aureus*. En 1959, un dérivé semi-synthétique de la pénicilline, la méticilline, fut introduite pour traiter les infections staphylococciques. Moins de deux ans après son

introduction, des souches hospitalières de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) sont apparues dans un hôpital de Grande Bretagne [80]. Dans le milieu des années 80, la proportion de souches SARM à l'hôpital est devenue alarmante. L'utilisation et l'usage excessif des antibiotiques ont probablement favorisé l'émergence de la résistance. Un programme de surveillance des infections sanguines d'origine nosocomiale aux Etats-Unis a montré que parmi les isolats de *S. aureus*, le pourcentage d'isolats SARM a augmenté de 22% en 1995 à 57% en 2001 [81]. La même tendance dans une moindre mesure a été observée en Europe. Pour illustrer le niveau de résistance des isolats de *S. aureus* en Europe, un réseau de surveillance des résistances aux antibiotiques s'est fortement déployé ses dernières années (figure 6). En 2010, 28 pays européens ont rapporté 31854 isolats de *S. aureus* parmi lesquels 5555 soit 17.4% sont des SARM avec des proportions allant de 0.5 à 52.2%. La proportion de souches SARM se stabilisent ou diminuent dans la plupart des pays. Cependant, le taux de SARM est toujours supérieur à 25% dans 8 des 28 pays et la proportion de souches SARM a même augmenté dans quatre de ces pays (Rapport de surveillance EARS-net 2010).



**Figure 6 : suivi de l'évolution de la proportion des souches SARM en Europe.** A gauche : proportion d'isolats de SARM dans les pays participants en 2001 A droite : proportion d'isolats de SARM dans les pays participants en 2010. Consultable sur le site du centre européen de prévention et de contrôle des maladies: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/>



Le mécanisme de résistance impliqué dans la résistance à la pénicilline est la conséquence de l'acquisition d'une PLP additionnelle, PLP2a [82]. Les souches SARM produisent cette PLP additionnelle codée par le gène *mecA*. L'affinité de la PLP2a vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines est remarquablement faible. La PLP2a confère toutes les activités enzymatiques nécessaires à la synthèse du peptidoglycane. Par conséquent, la bactérie conserve sa capacité à produire la paroi bactérienne par l'intermédiaire de cette protéine additionnelle autonome.

L'environnement génétique de *mec* est nommé cassette staphylococcique chromosomique *mec* (SCC*mec*). La cassette SCC*mec* comporte deux éléments essentiels : le complexe du gène *mecA* et un complexe de gènes codant pour des recombinases *ccr* assurant l'intégration et l'excision de la cassette au chromosome bactérien. Il existe 11 types différents de cassette et il a été démontré que de nombreux transposons de résistance ou des copies de plasmides pouvaient être présents sur les cassettes expliquant la multi-résistance des souches SARM [83]. Le gène *mecA* ou le produit du gène, la PLP2a, s'avèrent être des marqueurs de la résistance à la pénicilline et des marqueurs de multi-résistance. L'origine du gène *mecA* est inconnue. Cependant plusieurs indices comme la présence d'un gène *mecA* homologue chez *Staphylococcus sciuri* ou la présence d'une séquence d'insertion homologue chez *Staphylococcus haemolyticus* orientent l'hypothèse d'un échange horizontal entre *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négative. La dernière cassette répertoriée, SCC*mec* type XI, est fortement divergente des précédentes [84]. Un nouveau gène, *mecA*<sub>LGA251</sub>, codant aussi pour la PLP2a a été identifié et mis en évidence [84,85]. dans cette nouvelle cassette. Il fut préalablement suspecté du fait de son phénotype SARM alors que les tests de confirmation par PCR ne le détectaient pas. Une proposition a été faite de classer les homologues *mecA* en accord avec le degré d'homologie du gène et en accord avec la chronologie de découverte. La nouvelle classification propose de renommer, respectivement, *mecA*<sub>m</sub> et *mecA*<sub>LGA251</sub>, *mecB* et *mecC* [86]. *mecB* n'est présent que chez *Micrococcus caseolyticus* et possède 61.6% d'identité avec le gène *mecA* de la souche *S. aureus* N315, représentant *mecA*. Il est peu relevant cliniquement. Par contre, *mecC* possédant 68.7% d'identité avec le gène *mecA* de la souche *S. aureus* N315, est présent chez *Staphylococcus aureus*. Ce gène a été retrouvé sur des souches du complexe clonal 130. Ces souches sont généralement d'origine animale. Des cas de

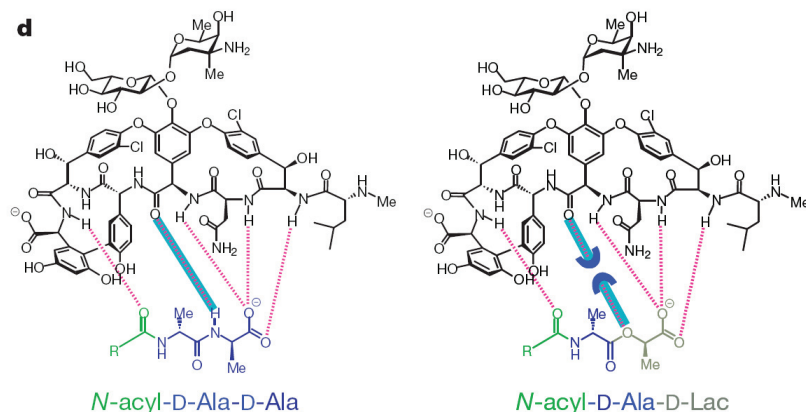
mammites bovines et humaines causés par des SARM du complexe clonale 130 portant mecC ont été répertoriés [87]. Des cas cliniques humains ont aussi été répertoriés sans aucun lien apparent avec les animaux [84]. Ces découvertes mettent en évidence le réservoir animal de nouvelles souches SARM qui peuvent potentiellement infectés les humains.

### 2.1.2 Résistance aux glycopeptides

---

Les glycopeptides constituent une classe d'antibiotiques composés de peptides non-ribosomales glycosylés cycliques ou polycycliques. Les deux représentants majoritaires sont la vancomycine et la teicoplanine. Il s'agit d'une classe d'antibiotiques constituant la dernière ligne de défense effective dans le cas d'infections à SARM ou à entérocoques. Les glycopeptides agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne. Les glycopeptides ont une forte affinité pour l'extrémité des précurseurs monomériques de la paroi se terminant par un dipeptide D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) à laquelle ils se fixent par l'intermédiaire de cinq liaisons hydrogène (figure 7). L'encombrement stérique ainsi généré sur ce précurseur empêche la synthèse du peptidoglycane et la formation de la paroi bactérienne [88] Quand cet événement se prolonge, les enzymes lysant la paroi continuent de fonctionner et causent potentiellement des dégâts irréparables à la cellule [89].

La résistance aux glycopeptides est due à la production de précurseurs modifiés de la paroi de faible affinité (D-alanyl-D-lactate ou D-alanyl-D-sérine) et à l'élimination des précurseurs naturels de haute affinité (D-alanyl-D-alanine). Cette reprogrammation de la cible résulte de la coopération de plusieurs gènes organisés en opéron codant pour l'ensemble des enzymes et des gènes de régulation nécessaires [90].



**Figure 7 : représentation schématique de la liaison entre la vancomycine et les différentes formes de dipeptide terminal des précurseurs pentapeptidiques.** Cinq liaisons hydrogène sont impliquées avec le dipeptide D-Ala-D-Ala, alors que seulement quatre le sont avec le dipeptide D-Ala-D-Lac. (D’après (88) )

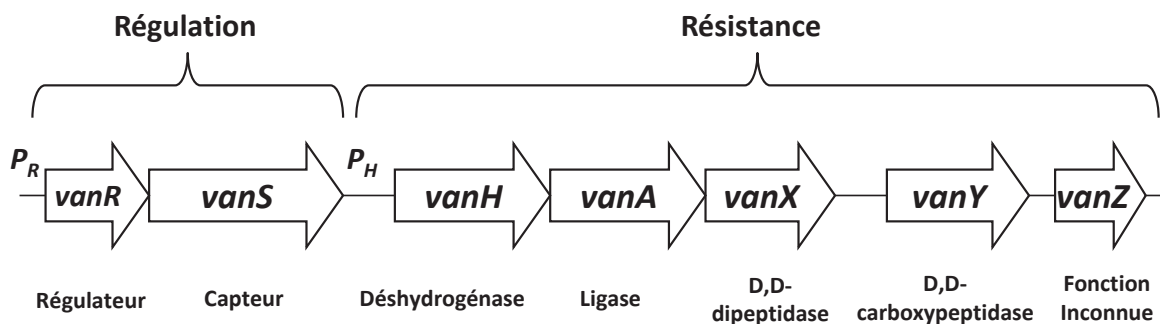
A ce jour, neuf types de résistance aux glycopeptides ont été décrits sur des critères phénotypiques et génotypiques (tableau 4). Huit types correspondent à des mécanismes de résistance acquis résultant de l’acquisition d’un opéron (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM et VanN) tandis qu’un type, VanC, est une caractéristique intrinsèque des espèces *E. casseliflavus* et *E. gallinarum* [91,92].

Type	VanA	VanM	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanN	VanC1/C2/C3
Résistance	Acquise								Naturelle
Niveau de résistance	haut		variable	modéré	bas				
CMI vancomycine (mg/L)	64-1024	>256	4-512	16-128	16	16	8	16	2-32
CMI teicoplanine (mg/L)	16-512	1-256	0.5-1	0.25-4	0,5	0,5	0,5	0,5	0.5-1
Espèces	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>
Support génétique	souvent plasmidique			Chromosomique			?	Chromosomique	
Expression	inductible	?	inductible	constitutif	inductible constitutif	inductible	inductible	constitutif	inductible constitutif
Dipeptide terminal	D-alanyl-D-lactate				D-alanyl-D-sérine				

**Tableau 4 : L’alphabet Van : Caractéristiques de la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques.** (D’après [91,92])

L’opéron VanA est porté par un transposon et possède cinq gènes impliqués dans la résistance et deux gènes impliqués dans la régulation (figure 8). Le gène *vanH* code pour une

déshydrogénase qui réduit le pyruvate en D-lactate et fournit un substrat pour la ligase codée par le gène *vanA* qui catalyse la formation du dipeptide D-alanyl-D-lactate. Le dipeptide néoformé remplace le précurseur naturel de la synthèse du peptidoglycane et réduit l'affinité des précurseurs aux glycopeptides de plus d'un facteur 1000. Pendant ce temps, *vanX* qui code pour une dipeptidase se charge d'éliminer les précurseurs naturels en hydrolysant le dipeptide D-Ala-D-Ala. Si les précurseurs naturels ont déjà été incorporés au peptidoglycane en formation, *vanY* qui code pour une carboxypeptidase se charge d'éliminer le D-alanine terminal. Le rôle de *vanZ* n'est pas encore connu. L'expression de l'opéron de type VanA est régulée par un système de régulation à deux composants, un activateur transcriptionnel cytoplasmique codé par *vanR* et un capteur membranaire histidine-kinase codé par *vanS* [93]. La vancomycine et la téicoplanine sont des inducteurs de l'expression des gènes de résistance de l'opéron VanA. La régulation peut différer d'un opéron à un autre. Par exemple, le type VanB est induit par la vancomycine mais pas par la téicoplanine. Le niveau d'expression des produits des gènes de résistance n'a pas encore été observé. Les résultats sont qualitatifs et basés sur le niveau de résistance vis-à-vis des antibiotiques. Le type de l'opéron tire son nom de la ligase présente.



**Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation de l'opéron VanA.** Les flèches représentent les séquences codantes et indiquent le sens de transcription, les gènes de régulation et de résistance sont co-transcrits par les promoteurs, respectivement,  $P_R$  et  $P_H$  (Image modifiée d'après [90]).

Les types VanA et VanB sont les plus fréquemment rencontrés et sont pertinents cliniquement. Le transfert de l'opéron VanA de *E. faecalis* à *S. aureus* a été démontré *in vitro* et rapportée *in vivo*. Ce phénomène fut inquiétant car *S. aureus* est une espèce fortement pathogène. Heureusement le transfert est assez rare. Le type VanA a diffusé chez une dizaine de souches de *S. aureus* aux Etats-Unis [94]. Cependant, les souches d'entérocoques résistantes à

la vancomycine (ERV) constituent un réservoir de gènes de résistance mobiles, il apparaît important de suivre l'évolution de la résistance à la vancomycine chez les entérocoques pour limiter la diffusion à des espèces à fort pouvoir pathogène. En effet, les entérocoques sont des colonisateurs naturels du tractus gastro-intestinal chez la plupart des hommes et des animaux. Des facteurs de l'hôte et du micro-organisme ont probablement contribué à la conversion de ce pathogène de second ordre en un problème clinique majeur. La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques fut rencontrée en premier en France et en Angleterre puis montra une croissance dramatique aux Etats-Unis et fut attribuée à l'utilisation massive de la vancomycine dans les hôpitaux américains [95,96]. En Europe, la majorité des infections entérococciques humaines sont causées par *Enterococcus faecalis* représentant 80% des isolats cliniques tandis que *Enterococcus faecium* explique la majorité des infections restantes. Les taux de résistance entérococcique à la vancomycine restent faibles dans la majorité des pays européens mais ils sont supérieurs à 20% en Irlande, au Portugal et en Grèce. La situation est contrastée aux Etats-Unis, les taux de résistance entérococciques restent très élevés dans les unités de soins intensifs et les souches de *E. faecium* résistantes à la vancomycine sont devenues endémiques [97]. Les entérocoques colonisent naturellement le tractus gastro-intestinal La proportion de souches *E. faecalis* reste majoritaire mais la proportion de *E. faecium* devient importante.

A noter l'émergence de souches de *S. aureus* ayant une résistance intermédiaire aux glycopeptides [98]. Ces bactéries présentent un épaissement de la paroi bactérienne qui limiterait la diffusion des glycopeptides et augmenterait ainsi la résistance des bactéries.

### 2.1.3 Résistance aux azoles

---

Les azoles constituent une classe d'antifongiques dérivés du pyrrole. Ils sont composés d'un anneau nitrogéné hétérocyclique comportant au moins un atome autre que le carbone parmi l'azote, l'oxygène ou le soufre. Trois groupes d'antifongiques existent en pratique médicale les imidazoles, les triazoles et les thiazoles. Le groupe des imidazoles inclut notamment le ketoconazole, le miconazole et le clotrimazole. Le groupe des triazoles inclut notamment le fluconazole, l'itraconazole et le voriconazole. Les dérivés azolés sont de loin les

antifongiques les plus utilisés en clinique et ils représentent aujourd'hui le traitement de référence des infections fongiques superficielles ou disséminées.

La cible des azoles est le produit du gène *erg11*, le cytochrome P450 lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase, lequel est impliqué dans la voie de synthèse de l'ergostérol. L'ergostérol assure la fluidité et l'intégrité de la membrane cellulaire et favorise l'adhésion à la membrane de nombreuses enzymes. La déplétion d'ergostérol rend la cellule fongique vulnérable aux dommages membranaires à venir.

Quatre mécanismes de résistance conférant la résistance à l'ensemble des azoles ont été mis en évidence chez *Candida albicans*. (99) Le premier est la réduction de l'accumulation d'azoles dû à la surexpression de gènes codant pour des pompes à efflux appartenant à la superfamille ABC ('(ATP)-binding cassette') ou à la superfamille MFS ('Major facilitator superfamily'). Le second est l'altération du gène *erg11* codant pour le cytochrome P450, la lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase. Les mutations affectent l'affinité pour les produits azolés mais pas la liaison pour son composé naturel, le lanostérol. Le troisième est une surexpression du gène *erg11*. Cette surexpression n'excède pas un facteur 3 à 5 dans les souches résistantes en comparaison aux souches sensibles. L'effet de la résistance par ce mécanisme serait modeste. Le quatrième mécanisme est une altération dans la composition en stérol. Ce mécanisme n'a été observé que très rarement jusqu'à présent [99]. Ainsi, seuls les deux premiers mécanismes semblent d'importance clinique. Toutefois, il est possible que la surexpression du gène *erg11* amplifie la résistance aux azoles.

Une étude de Morio *et al* [100] illustre la complexité de la résistance aux triazoles en raison de l'altération du gène *erg11*. Ils ont analysés 73 isolats cliniques dont 20 ont une sensibilité réduite aux triazoles. Seulement 13 isolats cliniques possèdent la séquence sauvage. Leurs données montrent que les mutations ponctuelles amenant au changement d'acide aminé sont des événements fréquents dans le gène *erg11* observés non seulement dans les souches résistantes aux azoles mais aussi dans les souches sensibles. Toutefois, quelques mutations sont exclusives aux souches résistantes et leur implication dans la résistance aux azoles a été démontrée *in vitro*.

## 2.2 Virulence

---

La virulence traduit la capacité d'un pathogène à provoquer une maladie et désigne le caractère pathogène, nocif et violent d'un micro-organisme. Ce caractère se traduit par la faculté du micro-organisme à favoriser l'adhésion, la colonisation, l'invasion, l'échappement à la réponse immunitaire et enfin, la synthèse de toxines lors de l'infection de l'hôte. Les facteurs d'adhésion, la synthèse d'enzymes fonctionnelles et les mécanismes de défense des pathogènes contre la phagocytose sont les éléments clefs qui permettent à un micro-organisme d'infecter l'organisme humain. Certes, la présence de bactéries est importante, mais elle suffit rarement à expliquer les symptômes de la maladie. Les symptômes sont essentiellement dus à des composés toxiques produits par les pathogènes et libérés sur le site de l'infection. La circulation sanguine permet le transport des toxines vers d'autres régions de l'organisme. Les toxines bactériennes sont de deux types : les endotoxines et les exotoxines.

Les endotoxines, propres aux BGN, sont de nature lipopolysaccharidique. Elles sont libérées lors de la lyse du micro-organisme. Elles ont peu d'effet à faible concentration mais une libération massive d'endotoxines peut déclencher une réponse inflammatoire démesurée pouvant entraîner la mort.

Les exotoxines, quant à elles, sont sécrétées au cours de la multiplication de l'organisme. De nature protéique, elles sont thermolabiles. Ces toxines sont fortement immunogènes. Elles peuvent être classées en fonction de leur site d'action :

- les entérotoxines sont responsables de syndromes dysentériques ;
- les neurotoxines perturbent la transmission de l'influx nerveux ;
- les cytotoxines détruisent les membranes des cellules des organes infectés ;
- les toxines superantigéniques stimulent la libération de cytokines entraînant fièvre et syndrome de choc.

### 2.2.1 La virulence chez Staphylocoques

---

*Staphylococcus aureus* est une espèce commensale et pathogène de l'homme. En plus des nombreuses résistances aux antibiotiques et aux antiseptiques qu'il a acquis au fil des années, *S.*

*aureus* a développé un réel arsenal pour survivre au sein de son hôte qui lui oppose anticorps, phagocytose ou cytotoxicité. L'adhésion bactérienne est une étape indispensable pour l'infection en prévenant l'élimination de la bactérie par des phénomènes mécaniques et en permettant l'action ultérieure de toxines. Les propriétés structurales de *S. aureus* favorisent son adhésion, sa paroi cellulaire est constituée de peptidoglycane favorisant l'agrégation des plaquettes, et d'acides lipotéichoïques impliqués dans l'adhésion bactérienne. Il a la capacité de fabriquer une capsule en synthétisant des exopolysaccharides. Cela favorise son adhérence, sa résistance à la phagocytose et la formation de biofilm. En plus de ces propriétés structurales favorisant son adhésion, *S. aureus* synthétisent des facteurs d'adhésions, nommées adhésines qui sont soit liées au peptidoglycane soit excrétées dans le milieu extracellulaire. Parmi les protéines liées au peptidoglycane, la protéine A est une protéine de surface spécifique des staphylocoques dorés. Cette caractéristique en plus de son hétérogénéité en fait un modèle intéressant pour le typage. La protéine A est un facteur de virulence pléiotropique. Elle est impliquée dans la coagulation, l'inflammation, l'agrégation bactérienne et la formation de biofilms. De nombreux facteurs permettent à *S. aureus* de résister au système immunitaire humain et de coloniser son hôte. Mais la pathogénicité de *S. aureus* est également et surtout à relier à l'expression de facteurs de virulence. *S. aureus* a la capacité de sécréter, après invasion, des toxines et des enzymes. Les toxines peuvent être classées en protéases, en toxines formant des pores et en superantigènes. Nous nous intéresserons aux deux dernières classes et notamment à deux représentants, la leucocidine de Panton-Valentine et la toxine du choc toxique staphylococcique, et aux syndromes associés.

#### 2.2.1.1 La Leucocidine de Panton-Valentine

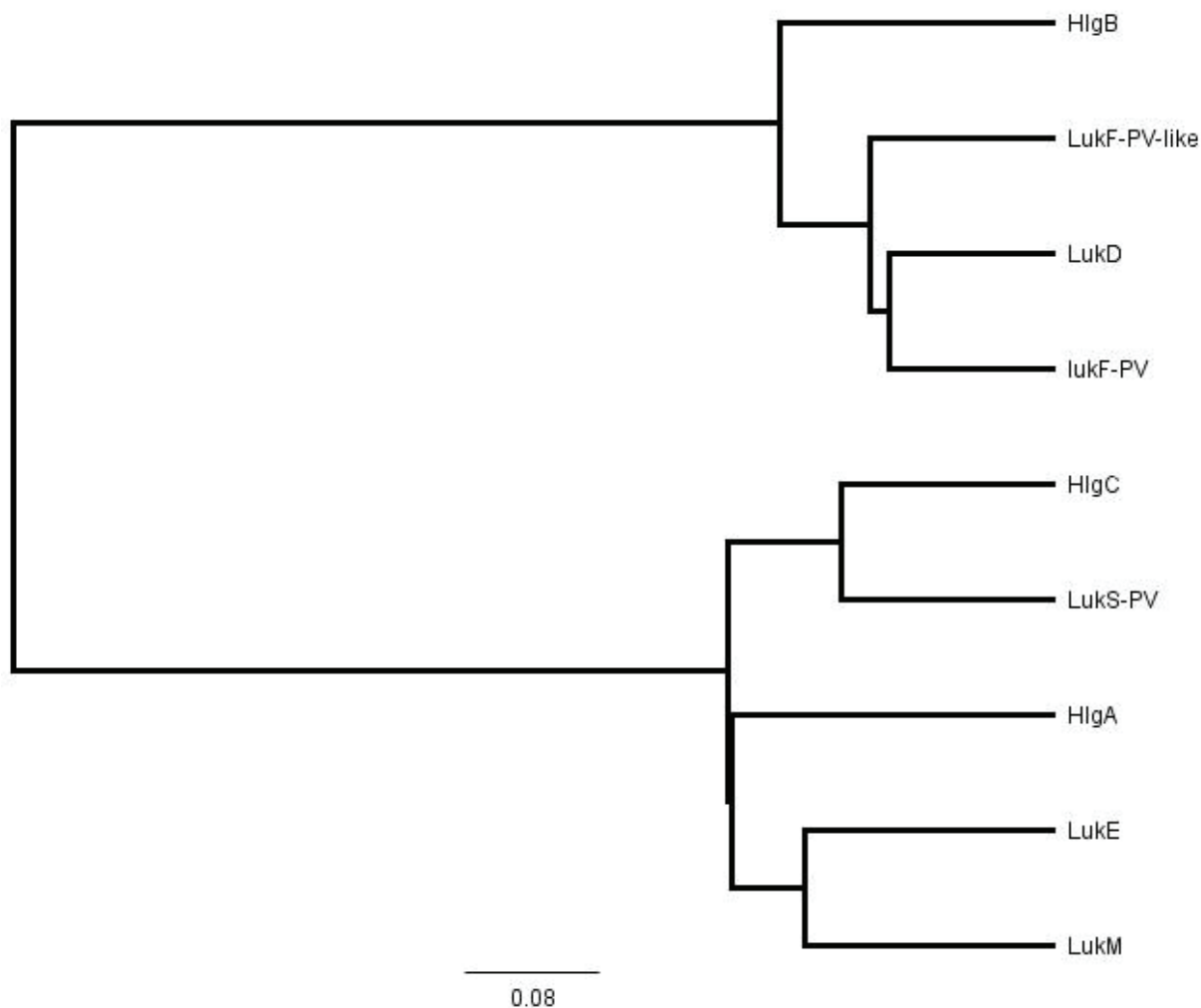
---

En 1932, Panton et Valentine mettent en évidence la capacité leucotoxique de certaines souches de *S. aureus* isolées de furoncles [101]. En 1936, Wright désigne cette toxine par les noms de ces deux découvreurs. La leucocidine de Panton-Valentine (LPV) est une exotoxine à deux composés. Elle est constituée d'un composé LukS-PV (35 kDa) et d'un composé LukF-PV (37 kDa) qui agissent de façon synergique pour former un pore et lyser la membrane cellulaire des leucocytes. Leur dénomination vient du fait que le composé S (Slow eluted) est élué



lentement en chromatographie échangeuse de cations et que le composé F (Fast eluted) est élué plus rapidement dans les mêmes conditions [102]. L'assemblage de quatre sous-unités LukS-PV et de quatre sous-unités LukF-PV en un pore octamérique transmembranaire conduit à la lyse cellulaire et entraîne une libération massive de médiateurs et d'enzymes de dégradation à l'origine de la nécrose des tissus [103,104]. Le gène codant pour la LPV est porté par un bactériophage qui n'est retrouvé que chez 1 à 2% des souches cliniques de *S. aureus* [105]. Les souches productrices de LPV sont classiquement associées à des infections cutanées primitives, de type furoncle, abcès ou panaris [105]. La toxine est également associée à des infections sévères, essentiellement des pneumonies nécrosantes [104 mais aussi des ostéomyélites [106]. La LPV est aussi associée à la survenue de pneumopathies communautaires nécrosantes et hémorragiques chez des enfants ou jeunes adultes auparavant en bonne santé [107].

D'autres types de toxines bi-composantes existent, elles ont la même structure que la toxine de Panton-Valentine mais elles sont moins virulentes pour l'homme [108]. Les composants de la classe F peuvent être LukF-PV like, HlgB ou LukD et les composants de la classe S peuvent être LukM, HlgA, HlgC ou LukE. Les complexes biologiques connus à ce jour sont HlgB-HlgA, HlgC-HlgA, LukF-PV like-LukM, LukE-LukD sans oublier LukS-PV-LukF-PV. Une forte homologie est observée entre les différentes sous-unités (figure 9).



**Figure 9 : Relation phylogénétique des sous-unités lukF-PV et lukS-PV de la toxine LPV avec d'autres exotoxines homologues.** Image construite sous Geneious v5.0, disponible sur <http://www.geneious.com> selon la méthode UPGMA. Les numéros d'accèsion utilisés pour construire l'arbre sont les suivants : LukF-PV : Q2FGV0\_STAA3, *S. aureus* (souche USA300) ; LukS-PV : Q2FGU9\_STAA3, *S. aureus* (souche USA300) HlgA : HLGA\_STAAN, *S. aureus* (souche N315) ; HlgB :HLGB\_STAAN, *S. aureus* (souche N315) ; HlgC : HLGC\_STAAN, *S. aureus* (souche N315) ; lukD : Q99T54\_STAAN (souche N315) ; lukE : Q7A4X5\_STAAN (souche N315) ; LukF-PV-like : Q53704\_STAAU, *S. aureus*.  
Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A (2010)

### 2.2.1.2 Le choc toxique staphylococcique

Le syndrome de choc toxique staphylococcique est provoqué par la diffusion dans l'organisme d'exotoxines superantigéniques. Il peut s'agir de la toxine du choc toxique staphylococcique, (TSST-1 pour « toxic shock syndrome toxin 1 ») codée par le gène *tst* ou de certaines entérotoxines. (B, C...) [109]. Ce sont des protéines non glycosylées de 20 à 30kDa

synthétisées sous forme de précurseurs protéiques. Ces toxines ont une activité superantigénique, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'activer de façon polyclonale les lymphocytes T indépendamment de leur spécificité antigénique. La majorité des effets biologiques expliquant la survenue des signes cliniques du choc toxique staphylococcique découle de cette activation : la libération massive de cytokines, de lymphokines et d'interférons. La sensibilisation des monocytes aux endotoxines et les lésions de l'endothélium sont à l'origine d'une augmentation de la perméabilité capillaire et d'une fuite massive de liquide dans le secteur interstitiel responsable du choc. L'expression de molécules d'adressage des lymphocytes activés vers la peau explique les signes cutanés. Le choc toxique staphylococcique peut succéder à une infection suppurative staphylococcique chez un enfant, toucher un adulte présentant une infection post-opératoire à staphylocoque ou encore apparaître chez une femme en période menstruelle. Le traitement de choc toxique staphylococcique fait appel à l'antibiothérapie anti-staphylococcique classique en combinaison à des antibiotiques anti-toxiniques comme le Linézolid ou la clindamycine [110].

### 2.2.2 Les Shiga-toxines

---

Les Shiga-toxines sont une famille de toxines avec deux groupes majeures Stx1 et Stx2 codées par les gènes *stx1* et *stx2*. Le nom Shiga vient de Kiyoshi Shiga qui fut le premier à décrire l'origine bactérienne d'une dysenterie causée par *Shigella dysenteriae*. Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70 kDa formés d'une sous-unité A de 33 kDa et de 5 sous-unités B de 7,7 kDa. La sous-unité A possède une activité de type N-glycosidase qui permet l'arrêt de la synthèse protéique de la cellule cible infectée.

Les germes les plus communs producteurs de Shiga-toxines sont la bactérie *S. dysenteriae* et le groupe d'*E. coli* producteur de Shiga-toxines nommés STEC pour « Shiga toxin-producing *Escherichia coli* ». De nombreux variants ont été mis en évidence mais ils sont minoritaires (*stx1c*, *stx1d*, *stx2c*, *stx2c2* *stx2d*, *stx2e*, *stf2f*) [111]. Le sérotype de STEC le plus communément retrouvé en clinique humaine est O157:H7 mais de nombreux autres sérotypes sont incriminés dans les épidémies. En 2011, le sérotype O104:H4 fut celui qui sévit en Allemagne. Lors de cette épidémie, plus de 4000 cas et près de 50 décès ont été recensés au centre européen de contrôle et de prévention des maladies. De nombreux cas d'infections

humaines sont consécutifs à la consommation d'aliments contaminés qui sont soit des denrées alimentaires directement liées au réservoir animal de STEC, soit des produits qui peuvent être en contact direct ou indirect avec des fèces d'origine animale et consommés crus ou peu cuits.

La présence de Shiga-toxines dans l'organisme provoque des manifestations cliniques au niveau du rein et de l'intestin. Ces toxines, sécrétées notamment par les STEC, peuvent traverser la barrière de l'épithélium intestinal grâce à un facteur d'attachement, une protéine membranaire nommée intimine, puis elles sont véhiculées par la circulation sanguine jusqu'aux organes cibles. Les symptômes se résument en des diarrhées pouvant évoluer en diarrhées sanglantes. Des complications peuvent conduire à un syndrome hémolytique et urémique (SHU), notamment chez les jeunes enfants [112,113].

### 2.2.3 La lipase 8

---

Les lipases extracellulaires sont des glycoprotéines qui catalysent l'hydrolyse et la synthèse des triglycérides. En plus du rôle d'hydrolyse des lipides pour l'acquisition des nutriments, les lipases extracellulaires ont des rôles suspectés dans :

- l'adhésion aux cellules et tissus hôtes ;
- l'hydrolyse non spécifique grâce aux activités phospholipasiques additionnelles ;
- l'initiation du processus inflammatoire en affectant les cellules immunitaires ;
- la self-défense en lysant la microflore en compétition.

Les lipases sécrétées sont codées par une famille de gènes d'au moins 10 membres de lip1 à lip10. La régulation et l'expression de ces lipases ne sont pas totalement élucidées. Toutefois, une étude a clarifié l'importance des lipases dans la pathogénicité de *Candida albicans* en démontrant que la lipase 8 et sa surexpression était un facteur de virulence dans les candidoses [114].

## 2.3 Typage

---

La capacité à différencier rapidement et correctement les isolats microbiens est essentielle pour la surveillance épidémiologique. Elle permet le suivi de la dissémination de l'infection provenant des patients, des animaux ou d'autres sources à des individus non

colonisés et non infectés. Elle permet aussi l'étude de la présence ou de la propagation de micro-organismes dans un environnement inanimé ou encore l'étude en milieu bio-industriel de micro-organismes contaminants. Le typage peut aussi être utilisé pour identifier des pathogènes émergents comme des souches ou des clones au sein d'une espèce y compris les agents potentiels de bioterrorisme [115]. Pour couvrir ce vaste champ d'applications, de nombreuses méthodes phénotypiques ou génotypiques basées sur une empreinte spécifique de l'isolat ont été développées. Les méthodes de typage doivent être robustes et suffisamment standardisées pour suivre les micro-organismes d'intérêt.

Le typage est considéré soit comme relatif, soit comme définitif. Un typage relatif aura pour but de différencier les isolats en relation avec l'émergence d'une infection. Un typage définitif aura pour but de comparer les souches d'une infection émergente actuelle aux souches d'infections antérieures et de construire et maintenir une collection de souches correctement typées dans les laboratoires de référence. Cette collection permettra de suivre l'évolution naturelle de ces souches dans l'environnement ou chez les patients.

Le typage peut être conduit à différents niveaux géographiques. Au niveau local, à l'hôpital, le typage permet potentiellement d'établir un lien entre différents patients. Au niveau national, les laboratoires de référence peuvent comparer les clones actuels aux clones antérieurs ou étudier de nouveaux micro-organismes. Au niveau international, les réseaux collaboratifs surveillent la dissémination des clones majeurs, en particulier ceux porteurs de résistances à un antimicrobien.

Les besoins et les contraintes sont différents à chacun de ses niveaux, les méthodes de typage sont généralement différentes. Classiquement, les méthodes de comparaison de caractères phénotypiques étaient largement utilisées mais elles ont rapidement été supplantées par les méthodes de comparaison de fragments d'ADN pour des raisons de performance et de commodité.

Au niveau local, la méthode génotypique la plus simple et la plus rapide est l'empreinte PCR. Cette technique repose sur l'amplification de fragments d'ADN génomique. Les paires d'amorce sont souvent conçues de manière à amplifier les séquences présentes entre les éléments répétés. Cette méthode de typage est quasiment universelle, le niveau de

discrimination est facilement ajustable. Ses principaux avantages incluent flexibilité, simplicité technique, large disponibilité des équipements et des réactifs, et relative rapidité. L'amplification et la séparation des fragments peuvent être faites en 1 à 2 jours.

Une technique d'électrophorèse, l'électrophorèse en champs pulsé donnant son nom à la méthode : PFGE, pour « Pulse Field Gel Electrophoresis », rend possible la séparation de larges fragments d'ADN dans un gel d'agarose en alternant périodiquement l'angle directionnel du champ électrique. La méthode PFGE a un remarquable pouvoir de discrimination et une forte reproductibilité. En électrophorèse, les échantillons de référence sont essentiels. L'interprétation des données nécessitent des contrôles qualités. Avec une standardisation précise, des niveaux acceptables de reproductibilité inter-laboratoire peuvent être atteints. Cela a permis de créer et maintenir des bases de données internationales et positionne la méthode PFGE en méthode de référence pour les études épidémiologiques [116,117]. Cependant, deux à trois jours sont nécessaires pour obtenir les résultats et l'équipement PFGE est relativement cher.

L'analyse de la séquence d'ARN ribosomique 16S est devenue la méthode la plus utilisée pour élucider les relations phylogénétiques des procaryotes. Toutefois, il est reconnu que les séquences d'ARN ribosomiques 16S sont limitées dans leur capacité à différencier certaines espèces proches [118]. Cette reconnaissance a contribué à la recherche de nouvelles cibles et de nouvelles méthodes. Le typage de séquences multi-locus (nommé MLST pour « Multi-Locus Sequence Typing ») constitue une de ces méthodes largement acceptée [119]. Avec l'arrivée de séquenceurs haut-débit automatisés, les méthodes basées sur le séquençage de gènes cibles deviennent appropriés et tendent à s'imposer comme des méthodes de référence. La méthode MLST atteste la variabilité de séquences d'ADN parmi les allèles de 5 à 10 gènes de ménage. Parallèlement aux développements des méthodes, des efforts importants ont été réalisés pour standardiser l'interprétation, fournir des logiciels libres et mettre librement à disposition les données via Internet [120,121] La méthode MLST s'avère particulièrement appropriée pour l'étude de l'évolution des clones. La clustérisation des données a permis de formuler les concepts de complexe clonal (CC) et de séquence type (ST) illustrant l'évolution des espèces.

Alors que la séquence génomique des micro-organismes fournira, sans doute, le fondement ultime de la définition des espèces microbiennes et des clones. Des méthodes plus simples, plus rapides, plus pratiques et plus économiques peuvent offrir une information adaptée aux besoins cliniques. Ces méthodes devront corrélérer avec les données de génomique et la phylogénie.

A titre d'exemple, la protéine A est une protéine de surface ancrée dans le peptidoglycane. Cette protéine est spécifique des staphylocoques dorés et elle a une structure tout à fait particulière. Elle est codée par le gène *spa*. Ce gène est composé de séquences répétées qui sont sujettes à des mutations ponctuelles spontanées ou à des insertions et délétions fréquentes [122]. Ces caractéristiques en font un bon modèle pour typer les souches de *S. aureus* avec un bon pouvoir de discrimination. Le développement de logiciel dédié et la possibilité de déterminer les séquences rapidement ont abouti à un système automatisé [123,124]. Cet outil peut facilement être utilisé en cas d'épidémies à staphylocoques dorés.

### 3. Chapitre 3 : Alternative technologique pour la microbiologie en spectrométrie de masse

---

#### 3.1 Au-delà de l'identification microbienne par MALDI-TOF?

---

L'identification microbienne par MALDI-TOF a été introduite, adoptée et largement acceptée par les acteurs de la microbiologie clinique [125]. Actuellement l'utilisation de routine du MALDI-TOF est focalisée sur l'identification microbienne. La question se pose d'aller plus loin dans le diagnostic microbiologique grâce au MALDI-TOF. Pour améliorer la prise en charge du patient, les jalons suivants sont de raccourcir le temps nécessaire à l'antibiogramme, de dépister au plus tôt les résistances aux antimicrobiens ou les facteurs de virulence du pathogène, de typer les micro-organismes ou encore d'analyser les fluides biologiques sans culture préalable. La technologie MALDI-TOF est-elle armée pour répondre à l'ensemble de ces besoins ?

##### 3.1.1 L'antibiogramme par MALDI-TOF

---

En 2006, la société Bruker a breveté une méthode de mesure de la résistance microbienne par spectrométrie de masse [126]. Govorun et Franzen ont revendiqué une méthode de détermination de la résistance d'un microbe à un antibiotique spécifique. Le procédé consiste à mesurer le profil protéique par MALDI-TOF, préférentiellement en mode linéaire, après culture pendant quelques heures dans un milieu nutritif contenant les antibiotiques. Préalablement, des spectres de référence à l'espèce en question ont été acquis pour des souches résistantes et non-résistantes de cette espèce. La comparaison du spectre obtenu aux spectres de référence permettrait d'établir si le micro-organisme est résistant à l'antibiotique. Les inventeurs ont aussi stipulé que tous les spectres devaient être obtenus à partir de colonies homogènes. Ainsi, aucun avantage médical n'est apporté par ce procédé car les phases d'isolement et de culture sont toujours nécessaires avant de faire l'analyse. L'approche n'a pas été reprise par la communauté scientifique à l'exception d'une étude [127].

Marinach *et al* ont fait la preuve de concept que la technique MALDI-TOF pouvait permettre de réaliser un antibiogramme [127]. Ils ont testé la sensibilité de *Candida albicans*



vis-à-vis du fluconazole et ont montré que la méthode était une technique précise et robuste en accord avec la méthode de référence du CLSI. Pour parvenir à ce résultat, ils ont introduit une nouvelle détermination de la CMI, la MPCC pour « Minimum Profile Change Concentration », par MALDI-TOF. Cette valeur est définie comme la plus faible concentration en antimicrobien à laquelle un changement du profil spectral peut être détecté. L'approche nécessite l'obtention d'une empreinte totalement standardisée. Même s'il s'agit d'une phase exploratoire, il est important de souligner que les auteurs ont réalisé trois répétitions biologiques et deux répétitions techniques pour tâcher de s'affranchir du manque de reproductibilité quantitative du MALDI-TOF. Si le nombre de répétitions ne peut être réduit, il sera difficile de tester de nombreux antimicrobiens dans un format adapté aux exigences d'un laboratoire de microbiologie.

Ce premier travail de concordance entre la CMI et le profil MALDI-TOF est le seul à ma connaissance et mérite d'être souligné. Cependant, l'approche demande à être confirmée avec d'autres molécules que le fluconazole mais surtout d'autres micro-organismes incluant les bactéries. D'un point de vue clinique, cette approche ne semble pas modifier le processus actuel et n'améliorera pas la prise en charge des patients.

### 3.1.2 Suivi de dégradation d'antimicrobien

---

Une alternative à l'antibiogramme est le suivi de la dégradation des antimicrobiens par les micro-organismes. Chez les bacilles Gram négatif, le mécanisme principal de résistance aux  $\beta$ -lactamines est l'hydrolyse enzymatique à l'aide de  $\beta$ -lactamases. De nombreux exemples décrivent la détection de la dégradation des  $\beta$ -lactamines dans la littérature [128-131].

Hrabak *et al* [128], Burckhardt & Zimmermann [129] l'ont appliqué à l'analyse de l'hydrolyse des carbapénèmes par différentes souches bactériennes. Sparbier *et al* [131] ont étendu l'approche à l'analyse de l'hydrolyse des pénicillines et des céphalosporines en plus des carbapénèmes. Ces trois études sont qualitatives et basées sur l'absence ou la présence de pics caractéristiques. L'hydrolyse des antibiotiques par ouverture du cycle  $\beta$ -lactame induit l'ajout de +18 Da à la molécule. D'autres modifications sont possibles, les carbapénèmes sont assez labiles et peuvent subir une décarboxylation faisant suite à l'hydrolyse. Par ailleurs, les masses à détecter peuvent être polluées par les masses de la matrice. Les molécules peuvent aussi

formées des adduits sodium selon le tampon utilisé. Les premières études montrent que des adaptations sont nécessaires selon l'antibiotique utilisé pour favoriser la détection des signaux. La seule étude qualitative et quantitative a été réalisée par Hooff *et al* [130]. Ils ont suivi la cinétique de dégradation de l'ampicilline par MALDI-TOF et MALDI-QQQ (source MALDI associée à un triple quadripôle). Ce travail démontre la possibilité de déterminer le taux d'hydrolyse et la préférence de substrat pour les  $\beta$ -lactamases. Le MALDI-QQQ est plus adapté pour l'analyse quantitative.

La rapidité d'obtention des résultats d'une heure à quatre heures selon les études et la disponibilité des MALDI-TOF dans les laboratoires favorisent cette approche. En revanche, de nombreux mécanismes tels que l'altération des porines, les systèmes d'efflux ne seront pas détectés par l'approche. Il en est de même pour de nombreux autres mécanismes de résistance où la cible est modifiée mais pas le substrat. Cette approche est très intéressante mais elle est limitée aux antibiotiques subissant des modifications par les micro-organismes. De plus, le protocole expérimental devra être fortement simplifié et automatisé pour rendre la technique utilisable en routine.

### 3.1.3 Détection de pics spécifiques par MALDI-TOF, quelques limitations...

---

Le terme de biomarqueur a été défini, suite aux conclusions d'un atelier conduit sous la responsabilité du « National Institute of Health » en 1985, comme étant « une caractéristique mesurée objectivement et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique, ou de l'action de médicaments ». La technique MALDI-TOF peut permettre de détecter des biomarqueurs en ce sens. Toutefois, les résultats basés sur une empreinte protéique, parfaitement adaptés à la classification des microorganismes, ne permettent pas toujours de détecter, spécifiquement et de manière reproductible et exhaustive, des biomarqueurs. Plusieurs facteurs limitent une généralisation de la technique dans cette optique.

Premièrement, la gamme de masse couramment utilisée pour l'empreinte protéique est de 2000 à 20000 Dalton. Cela englobe de nombreuses protéines, la masse moyenne des protéines est de 12 000 Da chez les Procaryotes [132]. Selon la parution du 12 Juillet 2012, 34% des séquences présentes dans la base de protéines Uniprot-TrEMBL ont une taille comprise entre 0 et 200 acides aminés. Les fragments de protéines n'ont pas été pris en considération

dans l'analyse. Etant donné que l'ionisation MALDI favorise la formation de molécules monochargés, deux tiers des protéines ont une masse supérieure à celles de la gamme couramment utilisée. Par ailleurs, la sensibilité de la technique MALDI-TOF est inversement proportionnelle à la masse, ce qui favorise la détection des petites molécules.

Deuxièmement, la gamme dynamique au sein du spectre est fortement affectée par le mode d'ionisation employée. Typiquement en ionisation MALDI, la gamme dynamique au sein du spectre est de l'ordre de 100. Seules les protéines majoritaires favorablement ionisées seront visibles.

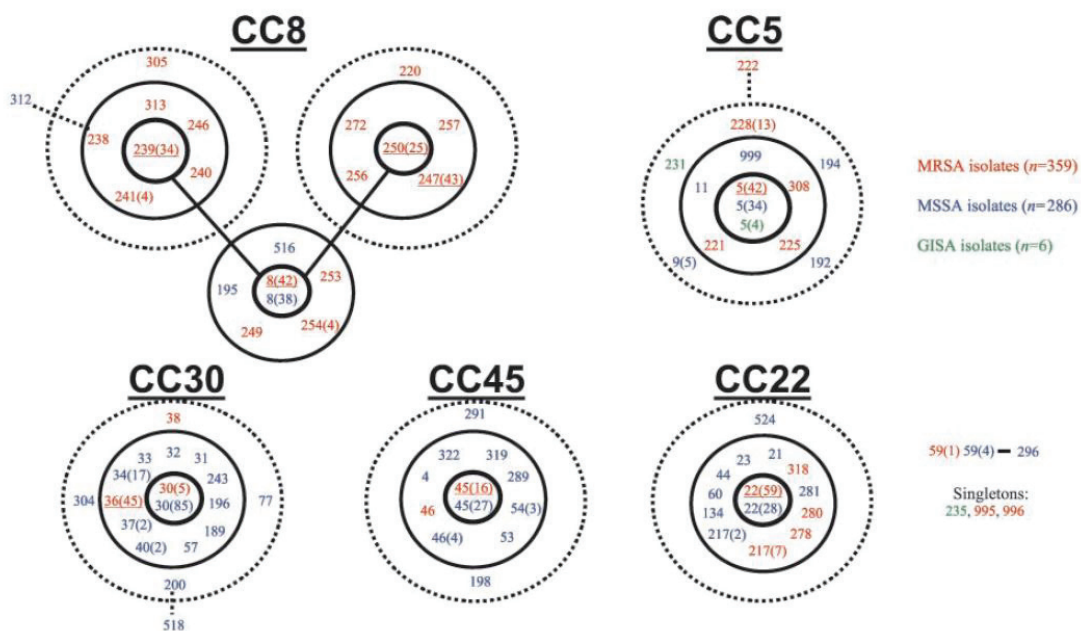
Ces deux premières limites peuvent être résolues par un fractionnement de l'échantillon. Mais c'est la troisième limitation, l'interfaçage aux techniques de séparation n'est pas naturel. L'analyse doit être pratiquée sur un échantillon sous forme solide. L'ionisation MALDI n'est pas idéale pour s'interfacer avec la chromatographie liquide haute performance (HPLC pour « High-Performance Liquid Chromatography ») ou l'électrophorèse capillaire.

Quatrièmement, le pic en soi ne permet pas d'identifier la protéine. Or, connaître l'identité des peptides ou des protéines qui constituent la signature doit améliorer la confiance dans la robustesse de la détection, fournir une compréhension biologique de la pathogénicité, suggérer des cibles thérapeutiques et offrir l'opportunité de transférer la technique sur une plateforme technologique alternative.

Cinquièmement, la reproductibilité est limitée. Entre deux répétitions de mesure d'un même échantillon, la similarité entre les deux spectres peut être aussi faible que 70% [133]. La répétition individuelle peut être réduite en standardisant la procédure de préparation d'échantillon quoiqu'une part de variabilité, propre au processus MALDI-TOF, ne puisse être éliminée.

Dans la littérature, de nombreuses études postulent la possibilité de différencier les souches résistantes des souches sensibles au sein de la même espèce et pour un antibiotique donné. L'exemple le plus marquant est la différenciation des souches SARM vis-à-vis des souches SASM rapportée par de nombreuses études [134-136]. Dans cet exemple de résistance et dans de nombreux autres cas, les gènes responsables de la résistance aux antibiotiques sont

codés par des éléments génétiques mobiles. Dans le cas des SARM, les clones acquièrent une cassette génétique *SCCmec* conférant la résistance à la méticilline. Les lignées dérivant de ces clones devraient conserver la propriété de résistance. Le typage des souches résistantes permettrait d'identifier, indirectement, les lignées de résistance individuelles. Cependant, une étude visant à comprendre l'histoire de l'évolution de la résistance à la méticilline a montré des relations entre les clones actuels. Le typage de différents locus de 912 souches a permis de regrouper les clones selon leur proximité. Certains groupes de souche type ont le même profil de résistance, d'autres sont hétérogènes au sein du complexe de clones ou de la souche type. L'origine polyphylétique de la résistance et l'existence de souche type hétérogène limitent donc l'utilisation du typage pour différencier le statut de la résistance à la méticilline chez les staphylocoques dorés [120]. Cela explique pourquoi deux souches ou cinq souches SASM ont été classées parmi les souches SARM, respectivement, dans les études de Shah *et al* ou Du *et al* [135,136].



**Figure 10 : Analyse de 912 souches de *S. aureus* avec BUSRT.** (D'après [120]) Les 5 complexes clonaux (CC) incluant des souches SARM sont représentés. Les complexes clonaux sont nommés d'après la séquence type (ST) prédite comme étant le génotype ancestral. Le préfixe "ST" n'est pas indiqué. La séquence type prédite comme le génotype ancestral est placée dans le cercle central. Les variants sur un seul locus sont positionnés dans le second cercle et les variants double locus sont positionnés à l'intérieur du cercle extérieur en pointillé. Les isolats sans lien aux complexes clonaux sont aussi présentés. Les séquences types SARM sont présentées en rouge, les séquences types SASM sont

présentées en bleu et les séquences types GISA sont présentées en vert. Le nombre d'isolats dans la séquence type est indiqué entre parenthèse.

Une alternative est de s'intéresser aux déterminants de la résistance. Un exemple de détection d'enzymes responsables de la dégradation des antibiotiques, les  $\beta$ -lactamases, est rapporté par Camara *et al* [137]. Ils ont mis en évidence un pic de 29 000 Th dans une souche sauvage transformée avec un plasmide produisant une  $\beta$ -lactamase de type TEM et ils ont confirmé la nature du pic en analysant par spectrométrie de masse associée à la chromatographie liquide (LC-MS) la bande caractéristique du gel préalablement digérée. Cependant, il est possible que les souches cliniques expriment moins fortement la  $\beta$ -lactamase qu'une souche modifiée artificiellement et la masse du pic observé même avec la meilleure résolution possible ne permet pas de connaître la nature exacte de la  $\beta$ -lactamase. En effet, en ce qui concerne le modèle TEM, 196 protéines différentes sont répertoriées et la combinaison des mutations modifient le spectre d'activité des  $\beta$ -lactamases.

En ce qui concerne la virulence, Bittar *et al* ont proposé de discriminer les souches productrices de la LPV sur la base d'un pic [138]. Ils ont testé 81 souches dont 24 souches productrices de LPV et le pic le plus pertinent de rapport masse sur charge de 4448 Th a permis d'obtenir 83% de sensibilité et 98% de spécificité. Cependant, l'hypothèse qui ressort de ces résultats est l'identification rapide de la LPV dans des souches *S. aureus*, l'hypothèse a été réfutée par Dauwalder *et al* [139]. Ils ont mis en évidence la présence du pic 4448 en analysant un couple de souches isogéniques dont la seule différence est l'expression ou la non expression de la LPV. Par ailleurs, ils soulignent la prévalence forte d'un clone SARM qui exprime la LPV dans les deux localités testées qui pourraient expliquer les bons résultats de l'étude de Bittar *et al*. Ils préconisent d'utiliser la protéine recombinante et des souches isogéniques pour identifier les pics spécifiques avant de valider le modèle en testant des souches cliniques. La preuve de concept de la détection de la LPV par MALDI reste à démontrer.

La preuve de concept de la détection d'un facteur de virulence chez *S. aureus* fut apportée en 2012 par Gagnaire *et al* [140]. Le MALDI-TOF permet de détecter le produit du gène *hld*, la delta hémolysine. La forme naturelle formylée  $3005 \pm 5$  Th et son variant muté G10S  $3035 \pm 5$  Th ont pu être détectés, l'identification des deux pics a été confirmée par MALDI-TOF-

TOF. L'absence de détection atteste la défaillance du gène *agr* et les analyses multivariées de 168 isolats cliniques dont 17 où la toxine est non détectée, ont montré que la chronicité de l'infection et la résistance aux glycopeptides sont significativement associées à l'absence de la delta-hémolysine [140].

En résumé, l'identification de souches résistantes ou de souches virulentes par la technique MALDI-TOF semble peu généralisable dans la configuration actuelle des instruments. Seules les protéines abondantes et de faible taille sont favorablement détectées.

### 3.2 Identification de protéines par spectrométrie de masse

---

L'identification de protéines consiste à affecter correctement un spectre de masse à un peptide ou à une protéine. Il est possible d'effectuer des études protéomiques sans identifier les protéines de l'échantillon. La classification des échantillons basée sur l'empreinte protéique d'un micro-organisme obtenue par MALDI-TOF en est un bon exemple. Cependant, pour déterminer le processus biologique expliquant des variations biologiques observées entre les échantillons ou pour caractériser finement les micro-organismes, l'identification des protéines de l'échantillon devient crucial.

Deux concepts d'identification des protéines par spectrométrie de masse ont été proposés. La première stratégie est descendante. La protéine intacte et purifiée est analysée par spectrométrie de masse en tandem et la fragmentation de la protéine conduit à la formation de larges fragments. L'étape clé est la capacité d'assigner le spectre de fragmentation protéique à la protéine en question en comparant les fragments observés à ceux théoriquement possibles pour des protéines présentes dans une base de données. Cette approche nécessite des instruments de haute résolution et une mesure précise des masses. Ces facteurs importants déterminent la spécificité des ions observés et favorisent la confiance de l'identification. A l'opposé, la seconde stratégie est ascendante. L'identification des protéines est basée sur l'analyse de peptides dérivant d'une hydrolyse, généralement enzymatique avec de la trypsine. La trypsine a la particularité de couper spécifiquement à l'extrémité C-terminale des acides aminés lysine et arginine [141]. Du fait de la taille des fragments, l'approche ascendante ne nécessite pas obligatoirement d'appareils de très haute résolution. Les méthodes les plus

communément utilisées, pour l'analyse d'un échantillon complexe tel que le protéome d'un micro-organisme, sont des méthodes ascendantes compte-tenu de la maturité du retraitement, de l'instrumentation, de l'automatisation, de la connaissance et des résultats. Deux méthodes ascendantes sont succinctement décrites dans ce chapitre.

### 3.2.1 Identification par empreinte peptidique massique par MALDI-TOF

---

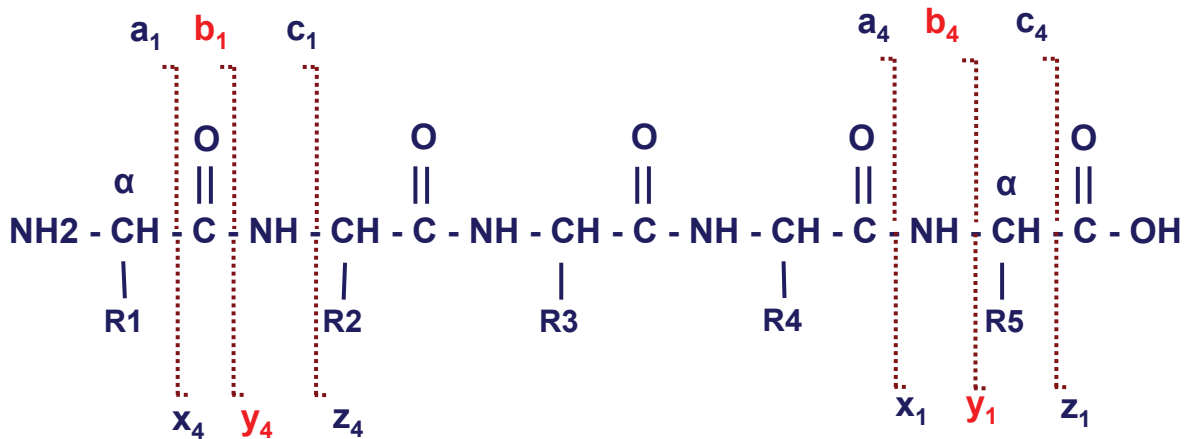
Traditionnellement, la stratégie d'identification combine l'électrophorèse à la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Dans cette méthode, les protéines sont identifiées en comparant une liste expérimentale de masse de peptides à une liste calculée de masse de tous les peptides de chaque protéine présente dans une base de données. Ce type d'empreinte nécessite une cible protéique majoritairement purifiée. Classiquement, la purification est réalisée sur gel d'électrophorèse à une ou deux dimensions. Après séparation et coloration, les tâches protéiques sont excisées, digérées à la trypsine puis déposées sur cible MALDI. Malgré les améliorations de la technique, la gamme dynamique reste limitée. (142)

### 3.2.2 Identification par séquençage peptidique par ESI-MS-MS

---

La méthode qui fait référence actuellement pour l'identification de protéines issues d'échantillons complexes allie la séparation chromatographique à l'ionisation électrospray et à la spectrométrie de masse en tandem. La spectrométrie de masse en tandem, ayant pour acronyme MS/MS, est toute méthode générale qui implique au moins deux étapes d'analyse en masse, en même temps qu'un processus de fragmentation ou une réaction chimique conduisant à un changement de la masse ou de la charge de l'ion. Dans l'expérience d'identification par séquençage peptidique, le processus de fragmentation est nommé « collision induisant dissociation » (CID). Le spectre du peptide ainsi obtenu est plus clair que l'empreinte peptidique massique puisque, en plus de la masse du peptide, la fragmentation du peptide par CID fournit de l'information sur la séquence du peptide [142]. En effet, l'hydrolyse à la trypsine offre l'avantage de fournir des peptides dont l'extrémité C-terminale est constituée d'un acide aminé basique chargé positivement en milieu acide. La fragmentation des peptides tryptiques par CID

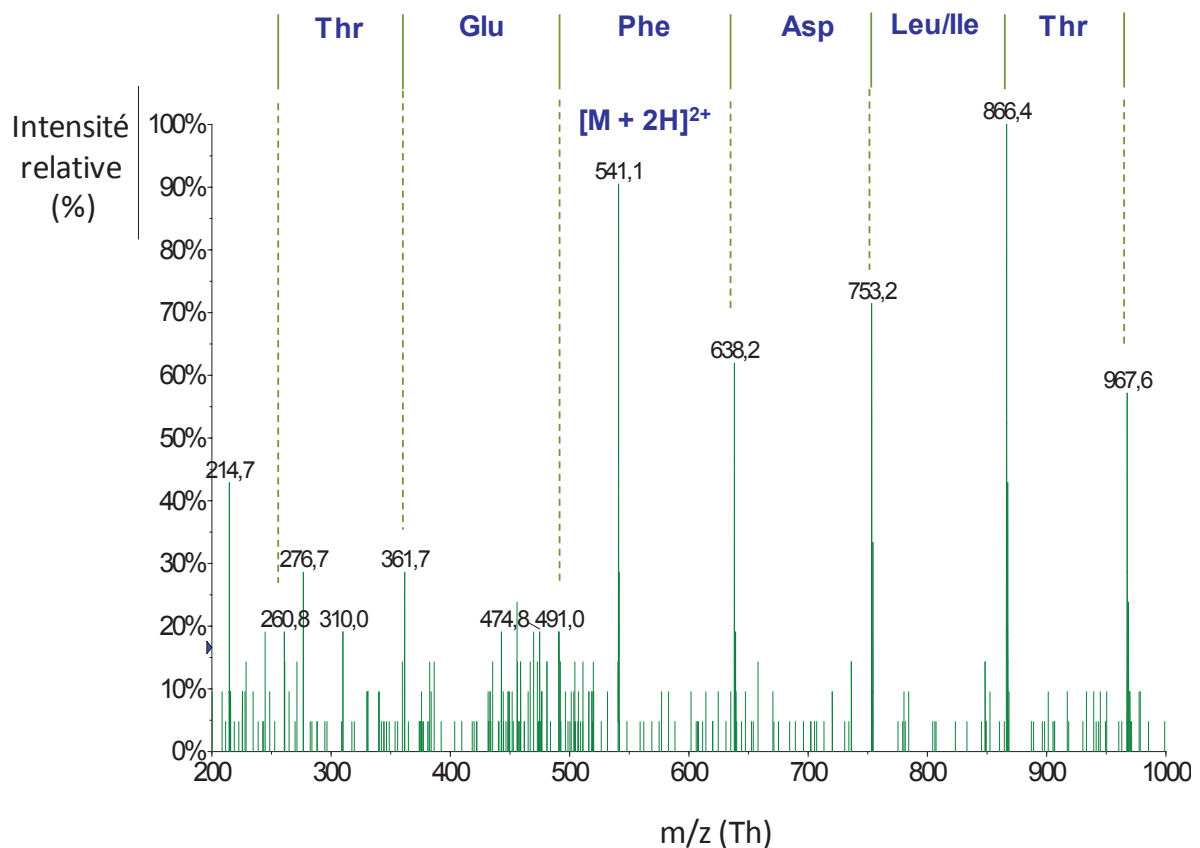
favorise la dissociation au niveau de la liaison peptidique et induit favorablement la formation des ions y et b (figure 11).



**Figure 11 : Nomenclature répertoriant les différents types de fragments observés dans des spectres de fragmentation.** Trois zones de coupures du squelette carboné des peptides sont possibles au niveau des liaisons C $\alpha$ -C, C-N ou N-C $\alpha$  pour donner six types de fragments désignés respectivement a<sub>n</sub>, b<sub>n</sub>, c<sub>n</sub> si la charge est retenue par le côté N-terminal et respectivement x<sub>n</sub>, y<sub>n</sub>, z<sub>n</sub> si la charge est retenue par le côté C-terminal. Les ions y et b formés par la rupture au niveau de la liaison peptidique sont précisées en rouge.

Ce type de rupture fait que la nature des acides aminés présents dans la séquence peuvent être déduits aisément (figure 12). Généralement, la séquence complète ne peut être connue directement. Des algorithmes font une comparaison du spectre obtenu aux spectres théoriques dérivant des protéines présentes dans les bases de données et attribuent un score à la séquence peptidique la plus probable. Mascot est un exemple de logiciel utilisant un modèle probabiliste qui calcule la significativité des correspondances entre les spectres obtenus et théoriques [143].





**Figure 12 : Spectre de fragmentation représentant l'intensité relative des ions analysés dans la gamme de masse 200-1000 Th.** Du fait de son abondance, l'ion précurseur de m/z 541.1 a été isolé et fragmenté. L'écart de masse entre deux ions fragments peut être caractéristique d'un acide aminé. En haut du graphe, les acides aminés déduits sont indiqués.

La spectrométrie de masse en tandem peut combiner différents analyseurs selon les avantages escomptés : haute précision en masse, haute résolution, haute sensibilité ou large gamme dynamique. Le quadripôle, la trappe à ions, l'orbitrap, le TOF ou l'analyseur à résonance cyclotronique d'ion sont les analyseurs les plus couramment utilisés. L'orbitrap, le TOF et l'analyseur à résonance cyclotronique d'ion favorisent la haute résolution et la haute précision en masse. La trappe à ions, le TOF et surtout le quadripôle favorisent la sensibilité. Le quadripôle favorise également la gamme dynamique.

Dans une expérience ascendante typique, le rapport masse sur charge des ions peptidiques est enregistré par intermittence au fil de l'analyse pour générer un spectre dans une gamme de masse présélectionnée. Ce spectre de masse, souvent nommé balayage

d'inspection, permet de choisir puis d'isoler et de fragmenter les ions majoritaires successifs en respectant des heuristiques basées sur l'intensité. Cette approche requiert l'emploi d'analyseur à balayage rapide afin que le cycle total soit le plus court possible de manière à identifier le protéome détectable le plus exhaustivement possible. Ce schéma de mesure est nommé acquisition dépendante des données (DDA pour « Data Dependent Acquisition ») car la fragmentation des peptides est guidée par l'abondance des ions précurseurs détectables. Le protéome entier de la souche COL de *S. aureus* dont le génome est séquencé a été étudié par DDA. L'analyse a permis de détecter 63% du protéome de la souche [144]. Une fois l'obstacle identification surmonté, il est nécessaire de détecter les biomarqueurs d'intérêt, simultanément, de manière reproductible et avec une méthode sensible. Or l'analyse DDA est reconnue pour être une méthode analytique médiocrement répétable. Par exemple, le recouvrement médian des peptides identifiés est de 45% et la répétabilité médiane pour les protéines est de 75% entre deux répétitions techniques. Ces résultats sont indépendants de la complexité de l'échantillon (levure versus mélange de protéines) ou de la charge de l'échantillon [145]. Cette étude souligne l'importance du nombre de répétitions à exécuter et le manque de robustesse propre à l'analyse DDA y compris sur un des instruments les plus performants du marché, le LTQ-Orbitrap. Cette approche semble donc inappropriée à une analyse de routine en laboratoire de microbiologie.

### 3.3 L'approche ciblée : le mode SRM

---

Réservé dans les années 90 au milieu académique, la MS/MS a rapidement été adoptée comme une méthode de référence pour le dosage de petites molécules. Sans séparation en amont, la MS/MS s'est imposée pour le diagnostic néonatal de routine des maladies héréditaires métaboliques. Couplé à l'HPLC, de nombreux systèmes sont présents dans les laboratoires hospitaliers pour à la fois des analyses de routine et des activités de recherche dans le domaine du suivi thérapeutique de médicaments, en particulier le suivi quantitatif de médicaments immunosuppresseurs ou des nouvelles générations d'anticonvulsifs ou d'antipsychotiques [146]. La méthode MS/MS qui se cache derrière toutes ces applications n'est autre que la SRM pour « Selected Reaction Monitoring » dont le principe est détaillé ci-après.

L'approche ciblée par SRM est une méthode mature qui est maintenant une alternative viable à la détection de protéines par immuno-dosage lorsque la sensibilité le permet [83]. C'est la méthode que j'ai privilégiée au cours de mon travail expérimental.

### 3.3.1 Principe

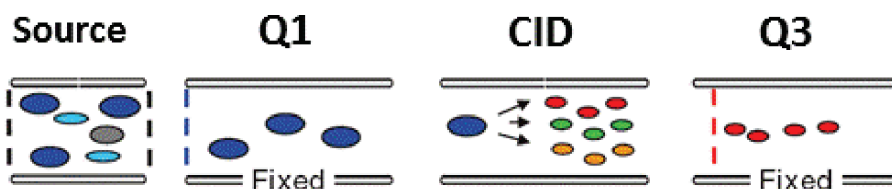
---

Un quadripôle est un analyseur constitué de quatre électrodes, de section idéalement hyperbolique mais le plus souvent circulaire, qui sont soumises deux à deux à un potentiel  $\pm\phi_0$  composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V :  $\phi_0 = U - V \cos\omega t$

Le principe de fonctionnement est décrit en 1953 par Paul et Steinwedel qui présentent son utilisation comme spectromètre de masse quelques années plus tard. Les ions formés dans la source d'ions entrent dans l'analyseur et subissent l'effet du champ quadripolaire. Selon les valeurs de U et de V, certains ions adoptent des trajectoires stables franchissant le quadripôle, et peuvent être détectés, d'autres non, et sont perdus. Leur trajectoire oscillante obéit aux équations de Mathieu en fonction du rapport m/z [147].

Sweeley *et al* en 1966 [148] et Hammar *et al* en 1968 [149], en utilisant ces propriétés, ont introduit le concept de détection d'ion sélectionné, nommé mode SIM pour « Selected Ion Monitoring », dans lequel le spectromètre de masse est utilisé pour suivre un nombre restreint de molécules ioniques, augmentant ainsi la sensibilité. La détection de réaction sélectionnée, nommé mode SRM pour « Selected Reaction Monitoring », utilise le même principe mais en ajoutant la spectrométrie de masse en tandem, permettant une augmentation de la spécificité. En effet, le mode SRM, réalisé dans un analyseur de type triple quadripôle, consiste à utiliser le premier quadripôle comme un filtre pour sélectionner un ion précurseur, qui sera fragmenté dans le deuxième quadripôle, la cellule de collision, afin de générer des ions produits. Le troisième quadripôle étant utilisé comme filtre pour ne suivre qu'un ion produit spécifique. Le terme transition représente un couple de valeurs m/z dans lequel la première valeur représente l'ion précurseur et la deuxième l'ion produit (figure 13). Généralement, les ions sont filtrés unitairement c'est-à-dire avec une fenêtre de 0.7 Th. Les deux niveaux de sélection de masse, de l'ion précurseur et de l'ion produit, donnent à cette technique une grande spécificité. De plus, l'absence de balayage permet de focaliser les ions précurseurs et fragments pendant de

plus longues périodes et, ainsi, d'améliorer la sensibilité en comparaison aux autres méthodes. Cette approche permet également une réponse linéaire sur une large gamme dynamique. La dernière caractéristique concerne la rapidité d'analyse. Typiquement, le suivi d'une transition par SRM ne nécessite que 10 ms dont 5 ms pour le suivi de réaction lui-même et 5 ms pour réajuster les paramètres pour la transition suivante. Associée à une chromatographie conventionnelle dont les pics d'éluion durent de l'ordre de 12 secondes, il est raisonnable de suivre 100 transitions successivement. Chaque pic chromatographique serait alors détecté à l'aide de 12 points. Ces caractéristiques permettent la détection multiple de protéines à des faibles concentrations dans des échantillons complexes.



**Figure 13 : Schéma représentant l'analyse en mode SRM.** Suite à l'ionisation dans la source, les ions précurseurs sont filtrés par le premier quadripôle (Q1), fragmentés dans le deuxième qui est la cellule de collision (CID) afin de générer des ions produits. Le troisième quadripôle (Q3) étant utilisé comme filtre pour ne suivre qu'un ion produit spécifique. Image reproduite d'après [150]

### 3.3.2 Mise au point de la méthode de détection

La mise au point des méthodes de détection comprend différentes étapes successives et sont :

- la sélection d'une liste de protéines cibles basées sur la littérature scientifique (chapitre 2) ou sur des expériences antérieures ;
- la sélection de peptides cibles caractéristiques des protéines cibles ;
- la sélection des transitions SRM adaptées pour chaque peptide cible et l'optimisation de certains paramètres ;
- l'application de la méthode à la détection des protéines cibles dans l'échantillon complexe et sa validation.

#### 3.3.2.1 Choix des protéines cibles

Les connaissances scientifiques de nombreux mécanismes de résistance et de facteurs de virulence, rendent possible une sélection des protéines par étude bibliographique. En revanche, l'identification des protéines caractéristiques d'une espèce donnée est beaucoup moins triviale. L'information contenue dans les bases de données est trop parcellaire pour être suffisante. Les données obtenues par séquençage peptidique de type ESI-MS/MS en mode DDA (méthodes décrites au chapitre 3.2.2) sont incontournables. Cette voie est à privilégier pour identifier les peptides permettant de confirmer l'identité du micro-organisme.

### 3.3.2.2 *Choix des peptides cibles*

---

Le but est de mesurer le peptide le plus informatif pour chaque protéine sélectionnée ou pour chaque espèce investiguée. Les peptides cibles sont choisis de sorte qu'ils caractérisent uniquement la protéine recherchée et qu'ils soient facilement détectables en spectrométrie de masse. Ces deux critères définissent un peptide protéotypique. Pour confirmer l'identité du micro-organisme, le peptide protéotypique doit être unique à l'espèce.

L'unicité d'une séquence peptidique pour une protéine ou une espèce peut être déterminée, en principe, sur la base de l'information génétique disponible. La spécificité du peptide peut être vérifiée, *in silico*, en alignant la séquence du peptide cible contre les séquences présentes dans les bases de données protéiques. La base de données de référence pour les protéines est UniProtKB/Swiss-Prot. Elle est manuellement annotée et révisée par des curateurs. Néanmoins, elle est loin d'être exhaustive. La base de données UniProtKB/TrEMBL est préférée pour évaluer l'unicité des peptides sélectionnés. Cette dernière est annotée automatiquement et non révisée, de nombreuses séquences sont redondantes et quelques erreurs d'annotation sont présentes mais elle offre l'avantage d'être beaucoup plus complète. Cependant, l'évaluation *in silico* est insuffisante pour deux raisons, les bases de données ne sont pas exhaustives et la complexité des peptides générés est importante. En mode SRM, les ions ciblés sont typiquement filtrés unitairement. Outre la séquence elle-même, certaines combinaisons d'acides aminés ont la même masse. Parmi les combinaisons isobariques pour un état de charge donné, on peut citer les combinaisons suivantes I=L ; K=Q=AG=GA ; W=SV=VS=EG=GE=AD=DA. Le nombre de combinaisons est encore plus important si des états de

charges différents sont comparés [151]. Cela montre la difficulté de prédire la spécificité réelle d'une transition SRM. Pour assurer la spécificité du dosage, il est nécessaire de suivre plusieurs transitions par peptide et de valider la méthode SRM avec l'échantillon biologique. Le temps de rétention du peptide peut être un facteur supplémentaire de spécificité.

Le choix du peptide qui offre des propriétés favorables de détectabilité en masse est crucial. Différentes équipes ont étudié la prédiction de ce choix [152-154]. Toutes les équipes ont étudié les propriétés physico-chimiques, comme la longueur, le nombre d'acides aminés acides ou basiques, la masse ou encore le point isoélectrique des peptides pour développer des algorithmes permettant la sélection des peptides ayant la meilleure réponse en analyse par spectrométrie de masse. Les résultats sont bons mais ne sont pas totalement satisfaisants. La sélection est grandement facilitée quand un échantillon contenant les peptides cibles est disponible. Cela peut être le micro-organisme lui-même si la protéine ciblée est concentrée, un échantillon contenant la protéine purifiée ou encore, des peptides de synthèse en solution. L'introduction de stratégies innovantes de synthèse chimique, telle que la synthèse sur membrane, a eu pour effet de réduire significativement les coûts et les temps de synthèse. L'investissement financier devient raisonnable de l'ordre de 10€ par peptide [155]. Lorsque les données en spectrométrie de masse sont disponibles sur des référentiels publiques de données brutes (PeptideAtlas [156], GPMDB [157], PRIDE [158]) ou acquises au sein du laboratoire à l'étape de découverte, le choix des peptides est facile puisque la réponse des peptides d'une protéine donnée est connue. Dans le cas contraire, la multi-synthèse de peptides est une manière de sélectionner les peptides les plus sensibles et de faciliter la mise au point de la méthode SRM. La liste des peptides théoriquement possibles pour détecter les protéines désirées peut être réduite à l'aide de critères simples. En général, les petits peptides hydrophiles à cause de leur manque de spécificité et de la difficulté à les séparer en phase inverse et les longs peptides hydrophobes à cause de leur faible détectabilité en spectrométrie de masse doivent être évités. Le peptide qui est facilement détectable est un bon candidat mais la détection doit également être robuste. Par conséquent, les peptides qui peuvent induire un biais analytique doivent être évités tels que les peptides qui sont susceptibles d'être modifiés chimiquement pendant le processus. Ainsi, les peptides contenant des méthionines pouvant

s'oxyder, les peptides avec glutamine ou acide glutamique en position N-Terminal pouvant se cycliser doivent être écartés. Quelques exceptions peuvent être envisagées lorsque le choix en peptide est restreint. De la même manière, la réaction d'hydrolyse trypsique n'est pas toujours complète. Parfois, deux peptides qui sont attendus séparément restent liés l'un à l'autre à cause d'une erreur de digestion. Cela modifie les proportions attendues des deux peptides de sorte que leur quantification n'est pas robuste. Pour limiter ce problème, le choix privilégiera les peptides qui n'ont pas de site de clivage interne possible.

La robustesse de l'analyse quantitative d'un peptide est dépendante des critères cités ci-dessus. Afin de renforcer la robustesse de la détection d'une protéine, plusieurs peptides représentatifs de cette protéine peuvent être sélectionnés. Cela permet d'obtenir plusieurs dosages indépendants pour une même protéine. L'agrégation des doses obtenues pour chaque dosage indépendant permet d'augmenter singulièrement la robustesse de l'analyse SRM.

Un dernier critère qui s'ajoute aux précédents est la conservation du peptide au sein du monde bactérien. Les bactéries ont des temps de génération très rapides et peuvent facilement mutées du fait du nombre d'individus. Le choix devra prendre en considération l'occurrence du peptide au sein de la protéine ou au sein de l'espèce.

### *3.3.2.3 Choix des transitions et optimisation des potentiels et des fenêtres d'acquisition*

---

De manière générale, la sélection des transitions adaptées doit favoriser les ions fragments les plus intenses et le plus faible niveau de signaux interférents. De préférence, les ions fragments dont le  $m/z$  est supérieur au  $m/z$  de l'ion précurseur sont à privilégier. Les ions fragments qui ont un  $m/z$  proche de l'ion précurseur sont éliminés.

La méthode de sélection est facilitée par des logiciels publics (Skyline [159]) ou propriétaires (MRMPilot™). Le choix privilégiera les ions précurseurs  $y$  di-chargés ou tri-chargés et les ions fragments de type  $y$  ou  $b$  mono-chargés et di-chargés. L'ensemble des transitions tenant compte des paramètres ci-dessus est généré et peut être recherché expérimentalement au sein d'une même méthode SRM.

Le paramètre influençant grandement la fragmentation est l'énergie de collision (CE). Le CE est un paramètre instrumental qui est fréquemment optimisé pour améliorer l'intensité des

ions fragments. Une alternative à l'optimisation empirique du CE de chaque peptide, voire de chaque transition, est de prédire la valeur du CE optimal de l'ion précurseur. Des équations dérivant de données expérimentales peuvent être exprimées comme une équation linéaire du type  $CE = k * (m/z) + b$  où les coefficients  $k$  et  $b$  sont calibrés expérimentalement pour chaque état de charge du précurseur. MacLean et ses collègues ont montré sur différents instruments que le gain moyen sur l'aire, entre l'optimisation empirique et la prédiction du CE, est seulement de 7.6% [160]. En tenant compte du nombre de peptides étudiés et du temps instrumental et humain nécessaire, la prédiction du CE est à privilégier sauf lorsque la plus grande sensibilité est attendue. Dans ce dernier cas, tous les potentiels du spectromètre sont optimisés un à un en injectant une solution contenant quelques peptides.

De nombreux logiciels aident à l'intégration des pics. Il est ensuite assez trivial de sélectionner les couples de transitions qui offrent la meilleure réponse tout en privilégiant, dans la mesure du possible, les ions fragments supérieurs aux ions précurseurs. L'extraction du temps d'éluion de chaque peptide est également un paramètre important à collecter. Il pourra être réutilisé pour planifier une courte fenêtre de temps pendant laquelle un peptide donné sera recherché. Cela permet de considérablement augmenter la capacité de multiplexage. Cette technique est connue sous le nom anglo-saxon de « scheduled MRM<sup>TM</sup> ».

Une méthode alternative pour choisir les transitions est d'utiliser une méthode DDA (partie 3.2.2) associée à une liste d'inclusion. Cette liste contient les masses des ions précurseurs à rechercher avec leurs différents états de charge. Une autre possibilité est de déclencher un spectre de fragmentation lorsqu'au moins une des trois transitions théoriques d'un peptide est détectée dans le spectre d'inspection. Chaque spectre de fragmentation ainsi obtenu est alors comparé aux bases de données pour attribuer le peptide identifié au spectre obtenu. Les limitations de cette approche sont que les protéines doivent être présentes dans la base de données, que le spectre de fragmentation doit permettre l'identification du peptide même si la fragmentation est atypique et que le processus de sélection des transitions favorables dans les spectres de fragmentation doit être automatisé.

Il est généralement considéré que 1 à 3 peptides par protéine et que 2 à 3 transitions par peptide sont suffisants pour étudier les protéines des micro-organismes.



La géométrie des instruments peut influencer l'optimisation. Le type de source et les conditions expérimentales jouent sur l'ionisation. Les conditions d'ionisation peuvent influencer sur la distribution de l'état de charge d'un peptide et par voie de conséquence sur la fragmentation du peptide selon son état de charge. Un compromis des conditions expérimentales peut être recherché à l'aide d'un peptide de référence. De la même manière, la distribution des intensités des ions fragments est dépendante du type d'instrument et des paramètres utilisés. Par contre, pour un instrument donné, avec des conditions analytiques figées, la reproductibilité est généralement excellente (CV inférieur à 5%).

### 3.3.3 Extraction des pics et validation de détection sans marquage

---

Plusieurs challenges sont présents lors de l'extraction de l'information d'intérêt des données collectées. Le processus d'extraction de l'information peut être décomposé en trois parties : la réduction du bruit, la détection des pics et la validation de ces pics. La réduction du bruit et la détection des pics sont deux piliers incontournables qui font parties d'un processus plus générique de traitement du signal. Des algorithmes dédiés généralement inclus dans les logiciels constructeurs ou les logiciels libres permettent à l'utilisateur de simplifier ces étapes. Seul le paramétrage des algorithmes est optimisé par l'utilisateur. Le choix des pics intégrés est contrôlé par un œil expérimenté de sorte que, lorsque le pic est présent, les intégrations respectent des règles élémentaires comme le fait que le temps de rétention de toutes les transitions d'un même peptide soit identique et à proximité du temps de rétention attendu. La validation des peptides reste toujours une part critique d'un développement de méthode de détection par SRM. Traditionnellement, la détection et la validation des peptides sont réalisées grâce à l'ajout de standard interne marqué aux isotopes stables et lourds (SIS) dans les échantillons d'intérêt. Le peptide de synthèse dit SIS a les mêmes propriétés physico-chimiques que son homologue naturel, la seule chose qui le différencie est sa masse puisque l'acide aminé N-terminal est marqué aux isotopes stables  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ . Ce dernier permet notamment d'identifier le pic à intégrer puisque le SIS a le même temps de rétention que son homologue naturel. La similarité des caractéristiques de fragmentation entre les deux peptides permet aussi de valider la nature du peptide. Un ratio entre une transition du peptide naturel et la transition

correspondante du peptide SIS permet un dosage quantitatif relatif du peptide naturel. Cette méthode est sans aucun doute la plus fiable mais elle augmente le coût des méthodes SRM.

La conservation de la distribution de l'intensité des ions fragments dans des conditions définies est largement décrite. Abbatiello *et al* ont utilisé cette propriété pour éliminer les transitions imprécises [161]. Ils utilisent le SIS pour contrôler la distribution de l'intensité des ions fragments. A noter que le marquage modifie très faiblement les propriétés de séparation, d'ionisation et de fragmentation. Les perturbations sont infimes et négligeables. L'avantage de leur méthodologie est qu'ils utilisent le SIS comme référence interne pour comparer deux à deux les aires de trois transitions par peptide. Cela permet d'éliminer ou de mettre en évidence toutes les transitions imprécises ou douteuses lorsque le ratio de l'analyte diverge du ratio du SIS correspondant. Ici, l'objet n'est pas de quantifier mais de détecter de manière reproductible les peptides. L'utilisation de SIS pour chaque détection serait la solution idéale, sauf au regard du coût par test.

Une alternative est de comparer les aires des analytes à des standards externes identiques. Les peptides qui ont été synthétisés pour mettre au point le dosage servent alors, de référence externe et sont analysés, préalablement, dans les mêmes conditions que les échantillons. L'emploi de peptide de synthèse a un coût mais il est limité à la phase de développement analytique. Cette approche économique en routine présume l'absence d'interférence pour chaque transition suivie, fait l'hypothèse que les temps de rétention pour chaque peptide sont identiques entre l'analyse du standard externe et l'analyse des échantillons et suppose qu'il en soit de même pour l'effet matrice. Elle demande donc une validation clinique pour identifier le peptide unique qui respectera toutes ces suppositions et qui sera reproductible et spécifique. Plusieurs peptides qui respectent ces critères renforceront la détection de la protéine.

### 3.3.4 Quantification selon le principe de dilution isotopique

---

En spectrométrie de masse, le signal mesuré pour une transition est quantitatif. Il peut permettre de remonter à la quantité de peptide puis à la quantité de protéine si le facteur de

réponse est connu et si le peptide et les transitions ont bien été choisis. La préparation d'échantillon permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité des dosages. Cependant de nombreux biais peuvent intervenir. Le peptide peut subir des modifications biologiques, chimiques ou encore réagir physiquement avec son environnement tout au long du processus. Les rendements de lyse et de digestion peuvent varier d'un échantillon à un autre ou d'une expérience à une autre. Les performances de l'instrument peuvent également fluctuer au cours du temps en fonction de l'encrassement, de la matrice. De même, l'étape de séparation chromatographique peut ne pas être reproductible.

Des méthodes de standardisation ont été développées pour corriger tout ou partie de ces phénomènes. La quantification absolue de protéines par spectrométrie de masse est basée sur le principe de la dilution d'isotopes. Ce principe consiste à ajouter dans les échantillons à doser une quantité connue de peptides synthétiques, utilisés comme standard interne. Ces peptides ont les mêmes propriétés physico-chimiques que les peptides endogènes à doser, mais avec une masse différente. En effet, ces peptides synthétiques sont le plus souvent synthétisés avec une incorporation d'isotopes stables de  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  dans un acide aminé de la séquence du peptide. Etant donné que la trypsine est communément utilisée pour l'étape d'hydrolyse, la lysine et l'arginine sont avantageusement marquées. Pour corriger les variations subies par les peptides endogènes au niveau de la chaîne analytique, l'ajout de peptides marqués aux isotopes stables est la méthode de référence [162]. Pour compenser, en plus, le biais potentiel subi par les peptides à l'étape d'hydrolyse, l'ajout de protéines marquées aux isotopes stables est préféré [163]. Enfin, une méthode élégante pour comparer les niveaux d'expression entre différentes populations cellulaires est la technique SILAC [164]. Pour une population cellulaire donnée, les acides aminés naturels sont remplacés par des acides aminés marqués aux isotopes stables dans le milieu de culture. La comparaison du mélange des populations cellulaires permet d'évaluer les niveaux d'expression des différentes populations. Tous les biais qui peuvent intervenir lors des étapes de lyse, de digestion des micro-organismes ou au niveau de la chaîne analytique sont compensés.



## 4 TRAVAUX DE RECHERCHE

---

### 4.1 Méthode de caractérisation d'au moins un micro-organisme au moyen de la spectrométrie de masse.

---

Ce travail conceptuel de caractérisation complète des micro-organismes au moyen de la spectrométrie de masse a fait l'objet d'un brevet qui a été déposé en octobre 2009. Un résumé du brevet est décrit dans cette partie. Pour plus de détails, le brevet complet est également consultable dans l'annexe électronique.

“Method for characterizing at least one microorganism by means of mass spectrometry”.

Brevet : WO 2011045544 A2 –

Ce brevet est un brevet méthodologique. Il fait la preuve de concept de la détection simultanée des propriétés d'identité, de typage, de résistance aux antimicrobiens et de virulence d'un micro-organisme par spectrométrie de masse de type SRM. Le seul préalable est d'identifier le micro-organisme en question par toute technique d'identification existante. La diversité des micro-organismes procaryotes et eucaryotes est représentée par les exemples et permet d'élargir les revendications à la détection des micro-organismes. Avantagusement, la détection des propriétés peut se faire sans l'étape de culture préalable, la preuve a été apportée sur les urines cliniques. Ce brevet ouvre des perspectives de caractérisation rapide et complète des micro-organismes améliorant la prise en charge des patients. L'aspect conceptuel est largement mis en avant dans ce brevet puisque c'est cela même qui fait l'originalité, la nouveauté et l'inventivité de ce brevet. Toutefois, les exemples proposés ne sont évidemment pas exhaustifs et méritent une validation analytique et une validation clinique plus poussées.

#### 4.1.1 Aspect contextuel

---

La caractérisation des microorganismes est fondamentale tant dans le domaine clinique que dans le domaine industriel. Historiquement, les microorganismes sont étudiés grâce à des méthodes basées sur les propriétés morphologiques et physiologiques des microorganismes après culture. Malgré l'apparition d'appareil miniaturisé et automatisé, les méthodes

traditionnelles restent longues. Pour dépasser les limites des méthodes traditionnelles, les méthodes physiques font leur apparition. Très tôt, l'utilisation de la spectrométrie de masse est proposée pour identifier les bactéries. Plus récemment, l'utilisation d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF permet aisément d'identifier les bactéries après culture en quelques minutes. Cette technique diffuse de nos jours dans les laboratoires microbiologiques. Cependant, l'empreinte protéique ainsi générée permet seulement d'avoir une probabilité d'identification et n'est pas adaptée à l'antibiogramme.

L'objet de ce brevet est d'élargir le champ des applications de la spectrométrie de masse pour la caractérisation des microorganismes en caractérisant des biomarqueurs protéiques ou métaboliques spécifiques. En effet, l'identification précoce de résistance aux antimicrobiens tels que les antibiotiques et la détection précoce de facteurs de virulence sont des éléments essentiels pour assurer une prise en charge optimale des patients. La PCR associée à un spectromètre de masse répond à ses exigences mais ce procédé ne répond que difficilement aux exigences du diagnostic de routine à savoir fournir un procédé peu coûteux, sans réactifs spécifiques, en un temps court et ne nécessitant pas un personnel hautement qualifié.

Dans ce contexte, l'intention de ce brevet est de mettre en évidence, de manière simultanée, l'identité du microorganisme (« I » pour identité), la détermination des propriétés de typage (« T » pour typage), la résistance potentielle à un antimicrobien (« R » pour résistance) ainsi que les facteurs de virulence (« V » pour virulence). Suite à l'hydrolyse trypsique de protéines microbiennes issues de colonies, d'un échantillon enrichi ou non enrichi, une approche triple quadripôle en mode SRM couplée à une séparation chromatographique et à une ionisation électrospray en amont est proposée pour répondre à ces exigences. Le mode SRM est un mode particulier de MS/MS. Il offre de nombreux avantages. Il présente une double sélectivité, en relation avec la sélection de l'ion précurseur d'une part et de la sélection de l'ion fragment de première génération d'autre part. La double sélectivité permet de cibler en particulier la molécule ou le peptide à doser. Le choix des ions fait par l'homme du métier vise à favoriser les ions les plus sensibles, les plus spécifiques et les plus robustes de sorte que les ions soient caractéristiques des propriétés citées en amont. Les ions choisis sont caractéristiques de peptides eux-mêmes spécifiques d'une protéine et nommés peptides protéotypiques. En plus

de la sélectivité, le mode SRM a pour avantage d'utiliser des temps de cycle très court de quelques dizaines de millisecondes. Le mode SRM offre la possibilité de détecter ou doser, de façon multiplexée, un grand nombre de molécules.

#### 4.1.2 Interprétation des exemples :

---

La méthodologie décrite est appliquée à la caractérisation d'une bactérie Gram positive, *Staphylococcus aureus*, d'une bactérie Gram négative, *Escherichia coli* et d'une levure, *Candida albicans*. Chronologiquement, ce brevet a été déposé en octobre 2009 avec l'exemple de la caractérisation de *S. aureus*. L'extension a eu lieu un an après, en octobre 2010. Des exemples chez *E. coli*, chez *C. albicans* et une analyse directe d'urines cliniques ont été ajoutés. L'ensemble des exemples a été retraité à l'aide de la méthode 1 décrite dans la partie 6.3.1.

##### 4.1.2.1 Caractérisation de *Staphylococcus aureus* :

---

Les peptides cibles ont été identifiés selon différentes stratégies. La stratégie non ciblée et la stratégie ciblée. Les deux stratégies font appels au séquençage peptidique par ESI-MS/MS décrit dans le paragraphe 3.2.2 pour confirmer la nature des peptides supposés. Le spectre d'inspection de la première stratégie est un balayage des ions précurseurs tandis que le spectre d'inspection de la seconde stratégie cible trois transitions par peptide issus de la digestion théorique des protéines cibles. Pour les peptides I, les deux stratégies ont été utilisées puisque quelques protéines ribosomales identifiées par MALDI-TOF ont pu être ciblées. La spécificité des peptides à l'espèce a été confirmée *in silico* par BLAST [165]. Pour les peptides T, R ou V, la stratégie ciblée est préférée puisque les cibles sont connues. Les cibles sont la protéine A pour le typage, la toxine LPV pour la virulence et la PLP2a pour la résistance aux antibiotiques. L'intérêt et la description de ces cibles sont plus largement dépeints dans le chapitre 2. Lorsque tous les peptides cibles ont été retenus, la méthode SRM avec les trois meilleurs fragments d'après les spectres de fragmentation est élaborée et appliquée aux différentes souches bactériennes. Volontairement, le choix a été d'utiliser un critère simple pour déterminer la positivité d'une transition. Une transition est positive lorsque l'aire dépasse un seuil fixé,

arbitrairement, à 1000 (unités arbitraires). L'ensemble des transitions positives sont sommé pour chaque application et répertorié dans le tableau 5.

Expérimental: Somme des transitions positives				Caractérisation théorique		
Echantillons	Application I	Application R	Application V	Espèces	Présence <i>mecA</i> <sup>1</sup>	Présence toxine LPV <sup>1</sup>
ID2	30	14	0	<i>S. aureus</i>	+	-
ID3	30	1	0	<i>S. aureus</i>	-	-
ID4	30	15	1	<i>S. aureus</i>	+	-
ID2bis	30	14	0	<i>S. aureus</i>	+	-
ID3bis	30	1	0	<i>S. aureus</i>	-	-
ID4bis	30	15	2	<i>S. aureus</i>	+	-
AST7	29	0	1	<i>S. aureus</i>	-	-
AST8	29	0	2	<i>S. aureus</i>	-	-
AST13	28	15	1	<i>S. aureus</i>	+	-
AST14	28	9	1	<i>S. aureus</i>	+	-
VIR5	13	0	10	<i>S. aureus</i>	-	+
VIR6	29	1	1	<i>S. aureus</i>	-	-
VIR7	24	0	10	<i>S. aureus</i>	-	+
ID7	1	0	0	<i>E. coli</i>	-	-
AST2	0	2	0	<i>E. coli</i>	-	-
VIR21	1	0	0	<i>S. pneumoniae</i>	-	-
VIR26	0	1	0	<i>C. difficile</i>	-	-

**Tableau 5 : Caractérisation des staphylocoques dorés .** A gauche, le nombre de transitions positives est répertorié par application. A droite figure la caractérisation des souches avec les techniques usuelles.

<sup>1</sup>La présence du gène *mecA* et des gènes *lukF-PV* ou *lukS-PV* a été confirmée par PCR.

Si on fixe un seuil de négativité à 2 pour chaque application, l'ensemble des résultats négatifs est en accord avec les résultats des techniques usuelles. Le seuil de positivité peut être fixé à 12 pour l'identité, 8 pour la résistance et 9 pour la virulence. Ces seuils sont très au-dessus du seuil de négativité fixé. L'ensemble des résultats positifs est en accord avec les résultats des techniques usuelles.

Ainsi, les 13 échantillons identifiés comme appartenant à l'espèce *S. aureus* sont confirmés et les 4 échantillons n'appartenant pas à cette espèce sont également confirmés ce qui souligne la spécificité de la méthode. Les 6 échantillons identifiés comme SARM sont confirmés. La présence de la PLP2a est mise en évidence dans ces souches. Les 6 échantillons



identifiés comme SASM et les 4 échantillons négatifs appartenant à d'autres espèces qui n'expriment pas la PLP2a sont confirmés. Cela souligne la spécificité des transitions R sélectionnées. De la même manière, les 2 échantillons produisant la toxine LPV sont confirmés. La présence de transitions caractéristiques de la toxine LPV est mise en évidence dans ces deux souches. Les 11 échantillons de *S. aureus* n'exprimant pas cette toxine sont confirmés.

Pour le typage, toutes les transitions de la méthode SRM de chaque souche sont comparées aux transitions des autres souches considérées comme des souches de référence. En pratique, une valeur 0 est attribuée lorsque les transitions entre les deux souches se classent dans la même catégorie (positive ou négative) et une valeur de 1 est attribuée lorsque les transitions entre les deux souches se classent dans des catégories différentes. Afin d'établir un score à chaque couple de souches comparé, les valeurs sont sommées pour toutes les transitions de chaque couple de souche et figurent dans le tableau 6.

	ID2	ID3	ID4	ID2 bis	ID3 bis	ID4 bis	AST 7	AST 8	AST 13	AST 14	VIR 5	VIR 6	VIR 7	ID7	AST 2	VIR 21	VIR 26
ID2	0	17	6	1	17	7	24	24	10	18	51	18	38	52	51	52	52
ID3	17	0	15	18	0	16	15	15	27	25	42	9	29	43	46	43	43
ID4	6	15	0	7	15	3	30	30	14	24	55	22	42	58	57	58	58
ID2bis	1	18	7	0	18	8	23	23	9	17	50	17	37	51	50	51	51
ID3bis	17	0	15	18	0	16	15	15	27	25	42	9	29	43	46	43	43
ID4bis	7	16	3	8	16	0	31	31	15	25	54	23	41	59	58	59	59
AST7	24	15	30	23	15	31	0	4	20	12	27	8	16	32	35	32	34
AST8	24	15	30	23	15	31	4	0	20	14	27	10	14	32	35	32	34
AST13	10	27	14	9	27	15	20	20	0	14	43	24	30	46	45	46	46
AST14	18	25	24	17	25	25	12	14	14	0	33	18	24	40	43	40	40
VIR5	51	42	55	50	42	54	27	27	43	33	0	35	13	27	28	25	27
VIR6	18	9	22	17	9	23	8	10	24	18	35	0	24	40	43	40	42
VIR7	38	29	42	37	29	41	16	14	30	24	13	24	0	34	37	34	36
ID7	52	43	58	51	43	59	32	32	46	40	27	40	34	~	~	~	~
AST2	51	46	57	50	46	58	35	35	45	43	28	43	37	~	~	~	~
VIR21	52	43	58	51	43	59	32	32	46	40	25	40	34	~	~	~	~
VIR26	52	43	58	51	43	59	34	34	46	40	27	42	36	~	~	~	~

Tableau 6 : Score de typage des staphylocoques dorés pour chaque couple de souche comparé

Si on fixe le score pour définir un type à 4, les souches ID2 et ID2bis, ID3 et ID3bis, ID4 et ID4bis, AST7 et AST8 sont de même type. Toutes les autres souches prises deux à deux sont de type différent.

On peut noter les sommes élevées obtenues entre les souches ID7, AST2, VIR21 et VIR26, qui ne sont pas des *S. aureus*, et toutes les autres souches qui sont des *S. aureus*. Ces résultats confirment la spécificité de la méthode. La méthode est dédiée au typage des staphylocoques dorés. Les souches ID7, AST2, VIR21 et VIR26 ne peuvent pas être comparées entre elles et aucune valeur n'est reportée dans le Tableau 6. De façon extrêmement intéressante, des scores supérieurs à 25, comme par exemple entre ID4 et VIR7, traduisent une grande divergence entre souches. Des scores entre 15 et 25, comme entre ID2 et AST14, traduisent une divergence modérée et des scores entre 5 et 15, comme entre ID2 et ID4bis, une divergence faible. La méthode ainsi mise en œuvre permet non seulement d'établir si deux souches sont de même type, ce qui est important pour identifier un foyer infectieux commun, mais également d'estimer la proximité de 2 souches, ce qui est extrêmement important pour les études épidémiologiques.

#### 4.1.2.2 Caractérisation d'*Escherichia coli*

La stratégie d'identification et de mise au point de la détection des peptides cibles est identique à celle développée pour *S. aureus*. Les cibles sont la toxine Shiga pour la virulence et la protéine TEM-2 pour la résistance aux antibiotiques. L'intérêt et la description de ces cibles sont plus largement détaillés dans le chapitre 2. Volontairement, le choix a été d'utiliser un critère simple pour déterminer la positivité d'une transition. Une transition est positive lorsque l'aire dépasse un seuil fixé, arbitrairement, à 2500. L'ensemble des transitions positives est sommé pour chaque application et répertorié dans le tableau 7.

Expérimental: Somme des transitions positives				Caractérisation théorique			
Echantillons	Application I	Application R	Application V	Espèces	Présence bla <sub>TEM</sub> <sup>1</sup>	Présence stx1 <sup>1</sup>	Présence stx2 <sup>1</sup>
AST1	48	1	2	<i>E. coli</i>	-	-	-
AST2	48	15	2	<i>E. coli</i>	+	-	-
AST3	47	15	1	<i>E. coli</i>	+	-	-

AST4	47	15	0	<i>E. coli</i>	+	-	-
AST5	47	15	2	<i>E. coli</i>	+	-	-
VIR41	47	3	8	<i>E. coli</i>	-	+	+
VIR42	47	4	5	<i>E. coli</i>	-	-	+
VIR43	47	5	6	<i>E. coli</i>	-	+	-
VIR44	47	6	5	<i>E. coli</i>	-	-	+
VIR45	48	5	2	<i>E. coli</i>	-	-	-
ID6	48	0	1	<i>E. coli</i>	-	-	-
ID7	45	2	0	<i>E. coli</i>	-	-	-
ID8	45	2	1	<i>E. coli</i>	-	-	-
ID9	45	3	1	<i>E. coli</i>	-	-	-
ID10	45	1	1	<i>E. coli</i>	-	-	-
VIR10	1	1	0	<i>S. aureus</i>	-	-	-
VIR19	1	1	0	<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-
VIR28	2	0	0	<i>C. difficile</i>	-	-	-

**Tableau 7 : Caractérisation d'*E. coli*.** A gauche, le nombre de transitions positives est répertorié par application. A droite figure la caractérisation des souches avec les techniques usuelles.

<sup>1</sup>La présence du gène *bla<sub>TEM</sub>* et des gènes *stx1* ou *stx2* a été confirmée par PCR.

Si on fixe un seuil de négativité à 2 pour les applications I et V et un seuil de négativité à 6 pour l'application R, l'ensemble des résultats négatifs est en accord avec les résultats des techniques usuelles. Une interprétation peptide par peptide permettrait d'éliminer les quelques transitions artéfactuelles observées pour les souches négatives. Le seuil de positivité peut être fixé à 44 pour l'identité, 14 pour la résistance et 4 pour la virulence. Ces seuils sont très au-dessus des seuils de négativité fixés. L'ensemble des résultats positifs est en accord avec les résultats des techniques usuelles.

Ainsi, les 15 échantillons identifiés comme appartenant à l'espèce *E. coli* sont confirmés positifs et les 3 échantillons n'appartenant pas à cette espèce sont confirmés négatifs ce qui souligne la spécificité de la méthode. Les 4 échantillons identifiés comme porteur du gène *bla<sub>TEM</sub>* sont confirmés. La présence de l'enzyme TEM-2 est mise en évidence dans ces souches. Les 11 échantillons où le gène *bla<sub>TEM</sub>* n'est pas identifié et les 4 échantillons négatifs appartenant à d'autres espèces qui n'expriment pas TEM-2 sont confirmés. Cela souligne la spécificité des transitions R sélectionnées. De la même manière, les 4 échantillons produisant la toxine Shiga sont confirmés. La présence de transition caractéristique de la toxine Shiga sont mises en évidence dans ces 4 souches. Plus précisément, un peptide caractéristique de Stx1 est suivi par

3 transitions, un peptide spécifique de Stx2 est suivi par 3 transitions et un peptide commun aux deux types est suivi par 2 transitions. Lorsque les deux types sont présents, 8 transitions sont attendus positives ce qui est le cas pour VIR41, lorsque seulement le type Stx1 est présent, 6 transitions positives sont attendus ce qui est le cas de VIR43 et lorsque seulement le type Stx2 est présent, 5 transitions positives sont attendus ce qui est le cas des souches VIR42 et VIR44. Les 11 échantillons de *E. coli* n'exprimant pas cette toxine sont confirmés négatifs tout comme les trois témoins négatifs.

Pour le typage, toutes les transitions de la méthode SRM de chaque souche sont comparées aux transitions des autres souches considérées comme des souches de référence. En pratique, une valeur 0 est attribuée lorsque les transitions entre les deux souches se classent dans la même catégorie (positive ou négative) et une valeur de 1 est attribuée lorsque les transitions entre les deux souches se classent dans des catégories différentes. Afin d'établir un score à chaque couple de souches comparé, les valeurs sont sommées pour toutes les transitions de chaque couple de souche et figurent dans le tableau 8.

	AST 1	AST 2	AST 3	AST 4	AST 5	VIR 41	VIR 42	VIR 43	VIR 44	VIR 45	ID6	ID7	ID8	ID9	ID 10	VIR 10	VIR 19	VIR 28
AST1	0	19	18	18	19	17	12	15	17	16	3	11	12	11	9	92	92	95
AST2	19	0	3	3	2	24	21	18	22	19	22	22	23	22	22	109	109	112
AST3	18	3	0	0	1	25	22	21	23	20	19	19	20	19	19	106	106	109
AST4	18	3	0	0	1	25	22	21	23	20	19	19	20	19	19	106	106	109
AST5	19	2	1	1	0	24	23	20	24	21	20	20	21	20	20	107	107	110
VIR41	17	24	25	25	24	0	5	6	12	13	16	22	23	20	20	105	105	108
VIR42	12	21	22	22	23	5	0	7	7	8	13	19	20	17	17	102	102	105
VIR43	15	18	21	21	20	6	7	0	10	9	16	20	21	18	20	105	105	108
VIR44	17	22	23	23	24	12	7	10	0	5	18	22	23	22	22	103	103	106
VIR45	16	19	20	20	21	13	8	9	5	0	17	19	20	19	19	102	102	105
ID6	3	22	19	19	20	16	13	16	18	17	0	10	11	10	8	91	91	94
ID7	11	22	19	19	20	22	19	20	22	19	10	0	1	4	4	89	89	92
ID8	12	23	20	20	21	23	20	21	23	20	11	1	0	2	3	90	92	92
ID9	11	22	19	19	20	20	17	18	22	19	10	4	2	0	3	90	94	94
ID10	9	22	19	19	20	20	17	20	22	19	8	4	3	3	0	87	91	91
VIR10	92	109	106	106	107	105	102	105	103	102	91	89	90	90	87	~	~	~
VIR19	92	109	106	106	107	105	102	105	103	102	91	89	92	94	91	~	~	~
VIR28	95	112	109	109	110	108	105	108	106	105	94	92	92	94	91	~	~	~

Tableau 8 : Score de typage des différentes souches *E. coli* testées pour chaque couple de souche comparé

Selon la méthode de typage proposée, les souches qui ont un score à 0 sont de même type. Les souches qui ont un score inférieur ou égal à 4 sont de forte proximité ou du même type. Les souches qui ont un score strictement supérieur à 4 sont de type différent. Plus le score est important, plus les souches sont éloignées. Ainsi, AST3 et AST4 sont de même type. Les groupes AST2, AST3, AST4 et AST5, et ID7, ID8, ID9 et ID10 sont des souches de type proche. AST1 et ID6 sont également de type proche. Toutes les autres combinaisons sont de types différents.

#### 4.1.2.3 Caractérisation de *Candida albicans*

La sélection des peptides I a été faite par une stratégie non ciblée où les ions les plus intenses sont fragmentés au fil de l'analyse. La nature des peptides est confirmée par leur spectre de fragmentation. La spécificité des peptides à l'espèce a été confirmée *in silico*.

Pour les propriétés « R » et « V », les cibles sont la lipase 8 pour la virulence et la lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase pour la résistance aux antifongiques. Cette fois-ci la détection des protéines ne suffit pas au diagnostic. En effet, les souches produisent naturellement la lipase 8. Ce n'est que lorsqu'elles sur-expriment cette protéine que les souches deviennent virulentes. Le cytochrome P450 est lui-aussi naturellement présent chez *Candida albicans*. Ce n'est que certaines mutations spécifiques de cette protéine qui perturbent l'affinité aux produits azolés mais pas l'affinité de la protéine vis-à-vis de sa cible naturelle, le lanostérol. L'intérêt et la description de ces cibles sont plus largement décrits dans le chapitre 2. Volontairement, le choix a été d'utiliser un critère simple pour déterminer la positivité d'une transition. Une transition est positive lorsque l'aire dépasse un seuil fixé, arbitrairement, à 2000. L'ensemble des transitions positives est sommé pour l'application et répertorié dans le tableau 9.

Echantillons	Transitions I positive	Espèces
ATF1	75	<i>C. albicans</i>
ATF2	75	<i>C. albicans</i>
ATF3	75	<i>C. albicans</i>
ATF4	75	<i>C. albicans</i>
VIR31	61	<i>C. albicans</i>
ATF5	75	<i>C. albicans</i>

ATF6	75	<i>C. albicans</i>
ATF7	75	<i>C. albicans</i>
VIR32	68	<i>C. albicans</i>
VIR33	75	<i>C. albicans</i>
VIR34	72	<i>C. albicans</i>
VIR35	75	<i>C. albicans</i>
VIR36	73	<i>C. albicans</i>
VIR37	74	<i>C. albicans</i>
VIR38	75	<i>C. albicans</i>
VIR39	75	<i>C. albicans</i>
CA16	80	<i>C. albicans</i>
VIR43	12	<i>E coli</i>
VIR5	2	<i>S. aureus</i>
AST-VAN8	1	<i>E. faecium</i>

**Tableau 9 : Caractérisation de *Candida albicans*.** Au centre figure le nombre de transitions positives pour l'application I. A droite figure la caractérisation des souches avec les techniques usuelles.

Dans les échantillons n'appartenant pas à l'espèce *Candida albicans*, le nombre de transitions considérés comme positives va de 1 à 12 et correspond à des transitions isolées d'ions isobariques. Elles ne signent pas la présence des peptides caractéristiques et auraient pu être éliminées de l'analyse par un traitement approprié telles que les méthodes 2, 3, 4 ou 5 décrites dans la partie 6. Les 17 échantillons testés ont au moins 60 transitions positives caractéristiques de l'espèce.

En ce qui concerne la résistance aux azoles, elle peut impliquer des mutations spécifiques du gène *erg11*. Dans l'étude présentée, seules les souches ATF ont été séquencées pour connaître les mutations du gène *erg11*. Les séquences des souches ATF1 et ATF4 ne sont pas mutés et sont sensibles au fluconazole alors que les séquences des souches ATF2, ATF3, ATF5, ATF6 et ATF7 sont mutés. Les souches ATF ont subi une préparation d'échantillon particulière pour favoriser la détection de la lanostérol 14- $\alpha$  déméthylase qui est une protéine membranaire. L'étape de digestion a été réalisée en présence de 60% de méthanol. Les résultats pour cette protéine ne sont donc pas comparables aux autres souches de l'étude qui ont subi le protocole standard de digestion et dont les séquences du gène *erg11* ne sont pas connues. Les résultats présentés dans le tableau 10 ont été obtenus à l'aide de la méthode 1 de

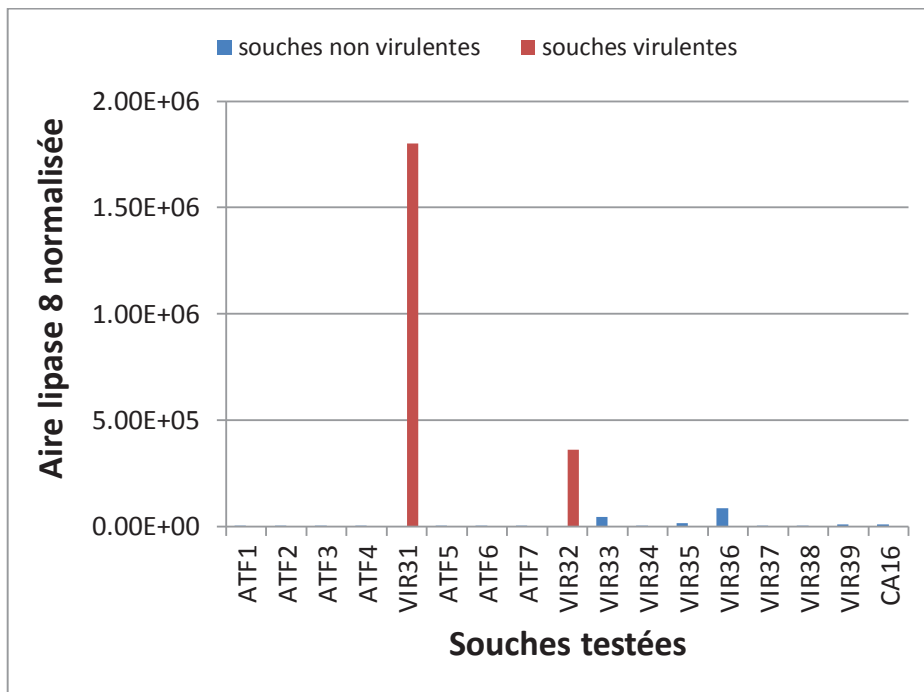
retraitement. Aucun peptide de synthèse n'a été utilisé pour mettre au point les méthodes de dosage.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Mutation gène <i>erg 11</i> induisant résistance	Fréquence de détection (souches détectées/ souches testées)		Souches identifiées comme résistantes
1	GVIYDCPNSR	natif	0%	0/3	NA <sup>2</sup>
2	<b>A</b> VIYDCPNSR	G129A	100%	2/2	ATF6 ; ATF7
3	GVI <b>H</b> DCPNSR	Y132H	non testé <sup>1</sup>		non testé <sup>1</sup>
4	GHYVLVSPGYAHTSER	natif	20%	1/5	NA <sup>2</sup>
5	GHYVLV <b>F</b> PGYAHTSER	S405F	100%	2/2	ATF2 ; ATF3
6	GVSSPYLPFGGGR	natif	100%	5/5	NA <sup>2</sup>
7	GVSSPYLP <b>S</b> GGK	G464S + R467K	100%	1/1	ATF5
8	GVSSPYLP <b>S</b> GGR	G464S	100%	1/1	ATF7

**Tableau 10 : Détection des peptides caractéristiques de la lanostérol 14- $\alpha$  déméthylase.** <sup>1</sup>la mise au point de la détection de ce peptide n'a pu être réalisé. <sup>2</sup>NA signifie non applicable, les peptides natifs ne peuvent être utilisés pour prédire la résistance des souches. Les acides aminés mutés sont indiqués en rouge.

4 peptides mutés (1, 5, 7 et 8) conférant la résistance ont pu être mis en évidence. A eux 4, ils permettent de détecter les 5 souches résistantes testées. Cependant, la détection de ces peptides a nécessité un protocole adapté à l'extraction de la lanostérol déméthylase.

En ce qui concerne la lipase 8, c'est la surexpression de cette protéine dans les souches qui est la cause de la virulence. Les sommes des aires des transitions de la lipase 8 ont été normalisées par la somme des aires des transitions I. Ce rapport corrige ainsi la quantité de levure estimée par la somme des aires des transitions I. Le rapport des aires est représenté dans la figure 14.



**Figure 14 : représentation des aires de lipase 8 normalisées des souches testées.** En rouge, les souches testées sont virulentes, en bleu les souches ne le sont pas.

La figure 14 montre clairement que les souches virulentes sur-expriment la lipase 8. A noter que la surexpression est plus importante pour VIR31 que pour VIR32.

Pour le typage, la méthodologie utilisée est la même que celle utilisée pour *E. coli* ou *S. aureus*. Les scores de typage des souches de *Candida albicans* sont répertoriés dans le tableau 11.



	ATF 1	ATF 2	ATF 3	ATF 4	ATF 5	ATF 6	ATF 7	VIR 31	VIR 32	VIR 33	VIR 34	VIR 35	VIR 36	VIR 37	VIR 38	VIR 39	CA 16	VIR 43	VIR 5	AST- VAN 8
ATF1	0	2	5	4	4	3	8	39	30	23	23	25	25	24	23	22	16	70	78	79
ATF2	2	0	3	6	6	3	10	41	32	25	25	25	25	26	25	24	16	70	78	79
ATF3	5	3	0	9	9	6	9	40	31	26	24	24	24	25	24	23	15	69	77	78
ATF4	4	6	9	0	8	7	12	41	32	25	27	27	27	26	25	26	18	72	82	83
ATF5	4	6	9	8	0	7	10	37	28	21	25	23	23	22	21	20	14	70	78	79
ATF6	3	3	6	7	7	0	7	42	33	26	26	26	26	27	26	25	17	71	79	80
ATF7	8	10	9	12	10	7	0	41	32	25	23	25	25	24	23	24	18	72	80	81
VIR31	39	41	40	41	37	42	41	0	9	22	26	22	20	21	22	21	29	65	69	70
VIR32	30	32	31	32	28	33	32	9	0	13	19	13	13	12	13	14	22	66	74	75
VIR33	23	25	26	25	21	26	25	22	13	0	8	4	6	5	4	5	15	71	79	80
VIR34	23	25	24	27	25	26	23	26	19	8	0	10	12	9	8	9	19	71	73	74
VIR35	25	25	24	27	23	26	25	22	13	4	10	0	2	3	4	5	11	69	77	78
VIR36	25	25	24	27	23	26	25	20	13	6	12	2	0	5	6	7	13	67	75	76
VIR37	24	26	25	26	22	27	24	21	12	5	9	3	5	0	1	6	12	70	76	77
VIR38	23	25	24	25	21	26	23	22	13	4	8	4	6	1	0	5	13	71	77	78
VIR39	22	24	23	26	20	25	24	21	14	5	9	5	7	6	5	0	14	68	76	77
CA16	16	16	15	18	14	17	18	29	22	15	19	11	13	12	13	14	0	72	80	81
VIR43	70	70	69	72	70	71	72	65	66	71	71	69	67	70	71	68	72	~	~	~
VIR5	78	78	77	82	78	79	80	69	74	79	73	77	75	76	77	76	80	~	~	~
AST- VAN8	79	79	78	83	79	80	81	70	75	80	74	78	76	77	78	77	81	~	~	~

**Tableau 11 : Score de typage des différentes souches de *Candida albicans* testées pour chaque couple de souche comparé**

Les souches qui ont un score inférieur ou égal à 2 sont de même type, les souches qui ont un score strictement supérieur à 2 sont de type différent. Ainsi, les souches ATF1 et ATF2, VIR35 et VIR36, VIR37 et VIR38 sont respectivement de même type. Toutes les autres souches prises deux à deux sont de type différent. Il faut noter les sommes élevées obtenues entre les souches VIR43, VIR5 et AST-VAN8, qui ne sont pas des levures. Ces résultats confirment la spécificité de la méthode.

#### 4.1.2.4 Analyse d'urines cliniques

6 échantillons urinaires d'un laboratoire d'analyse de ville ont été traités par centrifugation différentielle. Les urines sont fréquemment infectées par *E. coli*. La méthode SRM pour caractériser *E. coli* est alors utilisée. La concentration bactérienne urinaire peut fortement

varier, la quantité de bactéries est estimée par la somme des aires des transitions I et reportée dans le tableau 12. L'aire de chaque transition est normalisée en la divisant par l'aire de l'ensemble des transitions I pour tenir compte des fluctuations de concentrations bactériennes. Toutes les transitions dont le ratio est supérieur ou égal à 0.00015 (ratio adimensionnel) sont considérées comme positives. Les transitions positives pour chaque application sont sommées. Parallèlement, les urines ont suivi la procédure classique. *E. coli* a été identifiée dans les urines 1 à 5. Aucune espèce n'est identifiée dans l'urine 6. Un antibiogramme a été pratiqué sur ces urines. Le statut de l'ampicilline est représenté dans le tableau 12.

Echantillons cliniques	somme aire transitions I	Transitions I	Transitions R	Transitions V	Espèces	Ampicilline
Urine 1	1,5E+06	36	6	1	<i>E. coli</i>	résistant
Urine 2	8,3E+05	36	6	1	<i>E. coli</i>	résistant
Urine 3	5,3E+06	40	6	1	<i>E. coli</i>	résistant
Urine 4	1,2E+07	44	0	0	<i>E. coli</i>	sensible
Urine 5	1,1E+06	41	5	0	<i>E. coli</i>	résistant
Urine 6	0,0E+00	0	0	0	aucune	NA

**Tableau 12 : Caractérisation des urines cliniques.** A gauche, la charge bactérienne est estimée par la somme des aires des transitions I, au centre, le nombre de transitions positives par application est représentée, à droite la caractérisation des souches avec les techniques usuelles est réalisée parallèlement et reportée. NA signifie que l'antibiogramme est non applicable.

La somme des aires des transitions I nous permet d'estimer la charge bactérienne. L'urine 4 est la plus concentrée en bactéries, l'urine 2 est la moins concentrée. La charge bactérienne de l'urine 6 est nulle. Le nombre de transitions I indiquent clairement que les urines 1 à 5 sont infectées par *E.coli* et que l'urine 6 n'est pas infectée. Les résultats sont confirmés par les techniques usuelles. Le nombre de transition R indique la présence d'une enzyme de type TEM dans les urines cliniques 1, 2, 3 et 5. Ces résultats sont en accord avec la résistance à l'ampicilline constatée dans ces urines. De la même manière, le nombre de transition V est inférieur ou égale à 1, cela montre que la toxine Shiga n'est pas présente dans ces urines. Pour le typage, les résultats sont comparés deux à deux et le score de typage est établi pour chacune de ces urines et reporté dans le tableau 13.

	Urine 1	Urine 2	Urine 3	Urine 4	Urine 5
Urine 1	0	11	13	19	15
Urine 2	11	0	16	24	20
Urine 3	13	16	0	16	12
Urine 4	19	24	16	0	8
Urine 5	15	20	12	8	0

**Tableau 13 : Score de typage des urines cliniques infectées par *E. coli***

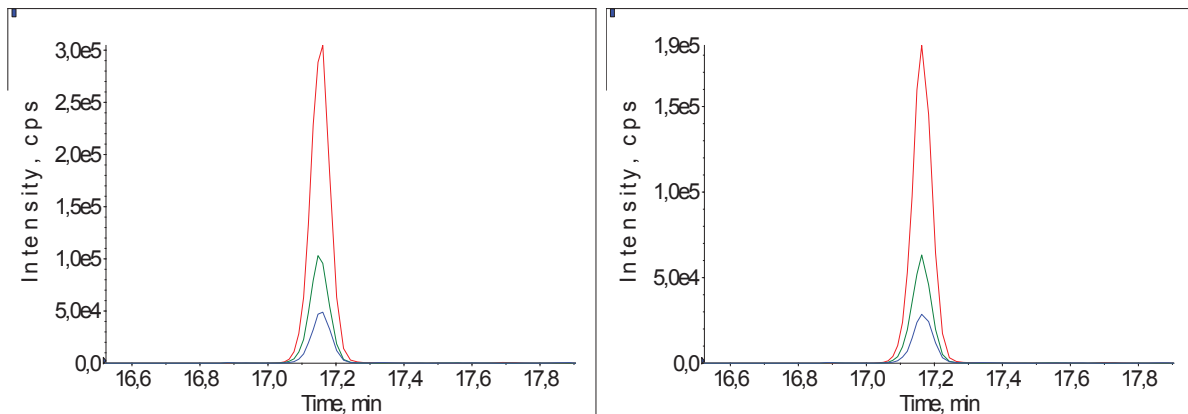
Aucune urine n'a un score de typage inférieur ou égale à 4. Cela montre que les urines sont toutes de type différent. Ce résultat est cohérent du fait que les urines proviennent d'un laboratoire de ville où les infections proviennent sans doute d'environnement différent. Il est peu probable que l'infection urinaire soit due au même clone.

Cette étude permet directement à partir de l'échantillon primaire, ici l'urine clinique, de confirmer l'identité d'une espèce telle que *E. coli* et de déterminer, simultanément au sein de la même analyse, les propriétés de typage, et de résistance potentielle à au moins un antibiotique.

#### 4.1.3 Discussion

En ce qui concerne la validation analytique, le critère de seuil utilisé pour la positivité des transitions convient tout à fait pour l'étude mais il est scientifiquement insuffisant. Ce critère pourrait atteindre ses limites si une diversité d'espèces et une diversité de types d'échantillon étaient analysées. Des transitions interférentes pourraient perturber le retraitement. D'autres propriétés propres à l'analyse qui ont été décrites dans le paragraphe 3.2.3 pour bien choisir les transitions peuvent être utilisées pour distinguer les transitions interférentes des transitions positives :

- conservation du temps de rétention des transitions appartenant au même peptide. Toutes les transitions d'un même peptide doivent avoir le même temps de rétention, ce qui revient à dire qu'elles doivent coéluées (figure 15).



**Figure 15 : Chromatogramme représentant le courant ionique extrait de trois transitions du peptide LPGILELSR. Les transitions sont caractéristiques de la succinate déshydrogénase sous-unité flavoprotéine de l'espèce *E. coli* chez les souches AST2 à gauche et AST4 à droite**

-conservation de la proportionnalité entre les aires des transitions d'un même peptide. Toutes les transitions d'un même peptide analysées en SRM dans des conditions identiques conservent la même proportionnalité à condition qu'elles ne soient pas perturbées par un ion contaminant (figure 15). Ces deux propriétés peuvent permettre de valider analytiquement la spécificité des pics en prouvant que la nature du signal est comparable à celle d'un référentiel. Le référentiel peut être des peptides de synthèse ou des peptides naturels. Plus le nombre de transitions suivies par peptide sera grand, plus la spécificité du peptide sera confirmée.

En ce qui concerne la validation clinique, le nombre d'échantillons positifs et le nombre d'échantillons négatifs sont insuffisants pour connaître les performances cliniques du test. Toutefois, les méthodes ont montré une excellente spécificité dans les souches testées.

L'approche typage est prometteuse à condition d'avoir un nombre suffisant de peptides pour obtenir un bon pouvoir de discrimination, à condition de pondérer l'importance des peptides du point de vue du typage et à condition de cibler aussi des peptides mutés. L'absence d'un peptide peut être due à la présence d'une mutation au sein de la protéine ou à la non expression de la protéine ou à la sous-expression. Pour étudier une méthode de typage, il est nécessaire de connaître un maximum de métadonnées des souches testées, d'avoir des répétitions techniques et biologiques pour évaluer la répétition de la méthode proposée et surtout de la comparer à une méthode de référence.

## 4.2 Mise au point d'un procédé de détection d'au moins un mécanisme de résistance aux céphalosporines par spectrométrie de masse.

---

Le premier brevet (partie 5.1) a une visée conceptuelle, le brevet présenté ci-après a une visée d'approfondissement des mécanismes de résistance liées aux céphalosporines. Ce brevet vise à couvrir par le procédé proposé les mécanismes majeurs de résistance aux céphalosporines et a fait l'objet d'un dépôt en avril 2011. Les mécanismes principaux de résistance sont enzymatiques. Le brevet complet est consultable dans l'annexe électronique.

### 4.2.1 Aspect Contextuel :

---

Moins de 30 ans après leur première identification, les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) c'est-à-dire capable d'hydrolyser les céphalosporines de quatrième génération sont devenues des micro-organismes communs dans les institutions médicales de nombreux pays et dans de larges régions géographiques. De nombreux facteurs ont contribué à leur dissémination mondiale. Parmi ces facteurs, citons la diversité parentale des  $\beta$ -lactamases, la relative facilité d'émergence d'une BLSE, la forte mobilité des gènes associés à cette résistance, la prévalence mondiale de clones spécifiques et enfin la forte pression de sélection due à l'usage des antibiotiques. Les problèmes de santé publique posés par les BLSE s'aggravent régulièrement à l'échelle mondiale. Différents mécanismes évolutifs sont à l'œuvre. Par mutation, des  $\beta$ -lactamases peuvent acquérir des niveaux de résistance plus élevés ou des spectres de résistance plus large. C'est le cas pour les résistances induites par l'expression des protéines SHV ou TEM. Selon la nature des mutations, SHV ou TEM induisent une résistance allant des pénicillines aux céphalosporines de dernière génération. En parallèle, les échanges de gènes entre espèces permettent la diffusion de BLSE à des espèces communautaires comme en témoigne l'incidence croissante de BLSE chez *Salmonella spp.* Les BLSE n'ont plus de frontières. Alors que le nombre de nouveaux antibiotiques développés par l'industrie pharmaceutique s'amenuise, la détection des organismes porteurs de BLSE offre une des meilleures solutions pour apporter une solution aux problèmes de Santé Publique posés par les céphalosporinases. Notamment, le dépistage rapide des BLSE doit permettre de mettre en

œuvre une prophylaxie hospitalière adaptée pour réduire les transmissions nosocomiales. Enfin, l'utilisation inappropriée d'antibiotique doit être évitée pour que les antibiotiques conservent leur activité.

Actuellement, les tests de sensibilité aux antibiotiques sont les techniques de référence dans les laboratoires de microbiologie. Ces techniques permettent de détecter la majorité des phénotypes BLSE ou AmpC acquise sans pour autant en faire la distinction. La nature moléculaire de la résistance doit être confirmée par des tests phénotypiques adaptés ou par séquençage de gènes de résistance. Les tests phénotypiques sont longs retardant le diagnostic et peuvent manquer de sensibilité et de spécificité. Ces tests confirmeront s'il s'agit d'une BLSE ou d'une AmpC acquise mais ne permettront pas d'identifier les enzymes impliquées. Les méthodes par PCR permettent d'identifier et de discriminer les enzymes mais leur coût limite leur utilisation. L'objet de ce brevet est de proposer une approche universelle pour la détection et l'identification des mécanismes de résistance aux céphalosporines.

#### 4.2.2 Interprétation des exemples

---

Deux groupes majeurs de ces enzymes qui dégradent les céphalosporines mais pas les carbapénèmes sont généralement distingués, les céphalosporinases plasmidiques de la Classe C (AmpC) et les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Les familles majeures de ces groupes phénotypiques nous intéressent. Lors du dépôt du brevet, en avril 2011, l'exemple de BLSE sur la famille TEM est exposé. A l'extension du brevet, en avril 2012, les exemples de CTX-M, PER, VEB et SHV sont décrits pour les BLSE et les exemples de ACC, CMY, DHA, FOX et MOX sont présentés pour les  $\beta$ -lactamases plasmidiques de type AmpC.

##### 4.2.2.1 Les enzymes de type TEM

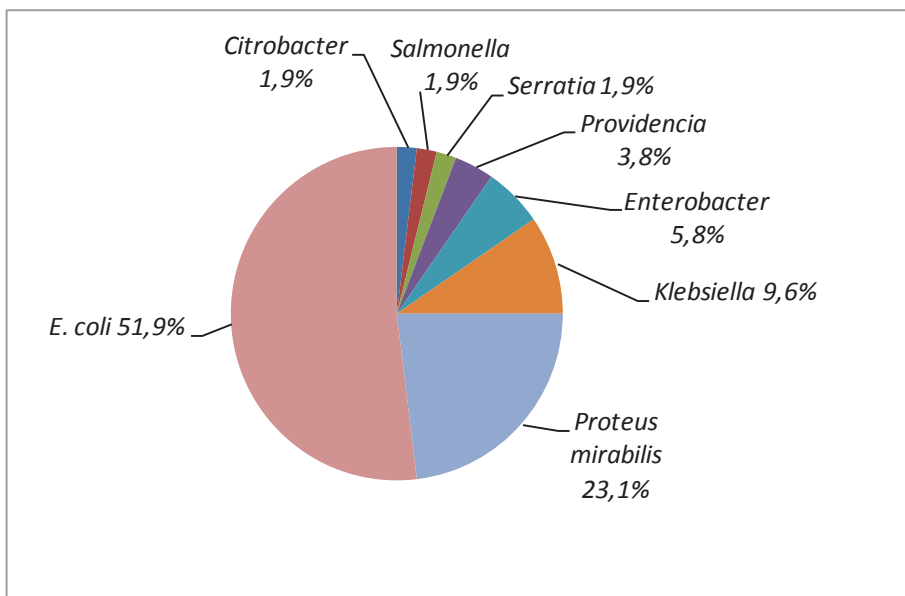
---

*Se référer à l'exemple 6 du brevet.*

TEM est une des trois familles d'enzymes les plus complexes avec les familles SHV et OXA. La complexité vient du nombre de variants décrits qui est de 201 en novembre 2012 (site <http://www.lahey.org/Studies/>) mais surtout du fait qu'en fonction des mutations observées, les capacités hydrolytiques de l'enzyme sont modifiées. Cela se traduit par des capacités de

dégradation différentes selon la classe de céphalosporines. Les différents variants sont classés, principalement, en trois catégories selon leurs propriétés enzymatiques : 2b ; 2br ; 2be (Se reporter à la classification de Bush-Jacoby-Medeiros décrite dans la partie 2.1.1.2). Même si l'homologie reste forte (95.4% d'identité entre TEM-1 et TEM-194, TEM-194 étant le variant le plus éloigné de l'enzyme d'origine), les positions de mutations possibles sont multiples et représentent 30% des acides aminés de la séquence (86 positions sur 286 positions d'après <http://www.lahey.org/Studies/> [42]). Théoriquement, l'intérêt clinique de chaque peptide protéotypique potentiel peut être déterminé d'après les connaissances des séquences et des phénotypes enzymatiques associés. Le nombre de cibles recherchées dans la méthode SRM est de 116 peptides, dont 20 peptides correspondent à des peptides avec la forme oxydée de la méthionine. Pour faciliter la mise au point de la méthode SRM, chaque peptide a été synthétisé.

Le jeu d'échantillon est composé de 52 souches appartenant toutes aux entérobactéries majoritairement représentés par *E. coli* et *P. mirabilis* (figure 16). Les souches testées sont toutes productrices d'une seule enzyme de type TEM et représentent 50 enzymes TEM différentes. Chaque souche sert de témoin négatif pour les variants TEM qu'elle n'exprime pas.



**Figure 16 : Diagramme des espèces bactériennes testées produisant des β-lactamases de type TEM**

La méthode d'intégration qui fut utilisée est la méthode 2 décrite dans la partie 6.3.2. Les peptides sont considérés comme détectés lorsque les trois transitions dépassent un seuil de

positivité fixé à 2500 (unité arbitraire) de manière à éliminer les faibles signaux interférents. Lorsque le signal est fortement interféré pour l'une des trois transitions d'un même peptide, le seuil de positivité est augmenté pour l'ensemble des transitions du peptide de manière à éliminer les résultats faussement positifs. L'ensemble des résultats obtenus est résumés dans le tableau 14 ci-après.

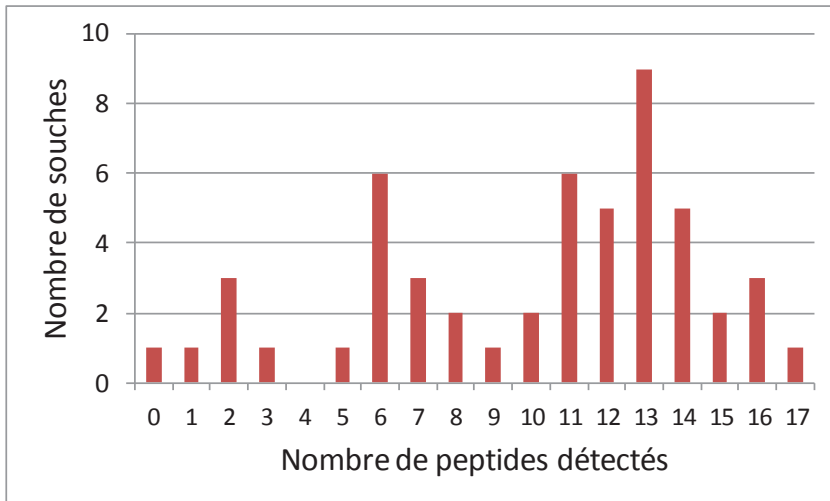
Numéro peptide	Intérêt Clinique	Séquence peptidique	occurrence peptide (52 souches testées)	fréquence de détection du peptide (souches détectées/souches testées théoriquement positives)	
1	TEM	DAEDQLGAR	65,4%	64,7%	(22/34)
2	TEM	DTTMPAAMATTLR	90,4%	38,3%	(18/47)
3	TEM	DTTTPAAMATTLR	7,7%	100,0%	(4/4)
4	TEM	EPELNEAIPNDER	1,9%	100,0%	(1/1)
5	TEM	GIIAALGPDGKPSR	88,5%	91,3%	(42/46)
6	2br	GSCGIIAALGPDGKPSR	5,8%	100,0%	(3/3)
7	TEM	GSSGIIAALGPDGKPSR	5,8%	100,0%	(3/3)
8	TEM	HLTDGMTVR	100,0%	65,4%	(34/52)
9	TEM	IHYSQNDLVEYSPVTEK	59,6%	32,3%	(10/31)
10	2be ou 2ber	IHYSQNDLVK	40,4%	57,1%	(12/21)
11	TEM	ILESFRPEER	100,0%	59,6%	(31/52)
12	2be ou 2ber	LDHWEPELNEAIPNDER	7,7%	50,0%	(2/4)
13	2be ou 2ber	LDSWEPELNEAIPNDER	28,8%	73,3%	(11/15)
14	TEM	LLTGELLTLASR	100,0%	69,2%	(36/52)
15	TEM	QIAEIGASLIK	100,0%	61,5%	(32/52)
16	TEM	QQLIDWMEADK	100,0%	57,7%	(30/52)
17	TEM	VAGPLLR	100,0%	94,2%	(49/52)
18	TEM	VDAGQEQLGR	98,1%	90,2%	(46/51)
19	TEM	VGYIELDLNSGK	100,0%	94,2%	(49/52)
20	TEM	WEPELNEAIPNDER	61,5%	68,8%	(22/32)
21	2be ou 2ber	YSPVTEK	40,4%	90,5%	(19/21)

**Tableau 14 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type TEM.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type TEM.

Premièrement, 21 biomarqueurs sont intéressants puisqu'ils apportent de l'information quant à la détection d'un mécanisme de type TEM dans les souches testées. Si le but est de privilégier la détection d'un mécanisme enzymatique de type TEM sans tenir compte du phénotype de l'enzyme, les peptides 5, 8, 11, 14, 15, 16, 17, 18 et 19 seront les cibles à privilégier puisqu'ils sont consensuels et sensibles. Si le but est de différencier précisément les phénotypes de



résistance de type TEM, le peptide 6 serait à privilégier pour la détection d'enzyme de type TEM capable de dégrader les  $\beta$ -lactamines jusqu'aux céphalosporines de première génération et résistantes aux inhibiteurs (phénotype 2br), et les peptides 10, 12, 13 et 21 sont à privilégier pour la détection d'enzyme de type TEM et de phénotype BLSE (phénotype 2be ou 2ber). Le nombre de peptides détectés par souche testée est calculé et représenté dans la figure 17.



**Figure 17 : Histogramme représentant le nombre de peptides protéotypiques des enzymes de type TEM détectés dans les souches testées**

L'ensemble de ces résultats permettent de prédire le phénotype des souches testées par la mise en évidence de ces peptides spécifiques et sont résumés dans le tableau 15.

		Classement des souches testées				
		TEM	TEM 2b	TEM 2br	TEM 2be	non classé
Phénotype attendu	TEM ?	-	-	-	1	-
	TEM 2b	3	-	-	-	1
	TEM 2br	10	-	3	-	-
	TEM 2be	7	-	-	27	-

**Tableau 15 : Tableau croisé du phénotype des souches testées au phénotype attendu.**

Sur les 52 souches testées, un mécanisme de type TEM a été détecté dans 51 souches soit un taux de détection de 98%. Dans une seule souche, il n'a pas été possible de détecter un mécanisme de type TEM (figure 17). Il s'agit d'une souche produisant TEM-1 et appartenant à l'espèce *Proteus mirabilis*. Cette espèce est réputée pour exprimer en plus faible quantité les enzymes de type TEM. Une autre souche est détectée par un seul peptide. Là aussi, il s'agit

d'une souche de l'espèce *Proteus mirabilis* produisant l'enzyme TEM-110. Ces deux souches où la détection de l'enzyme est plus délicate produisent des enzymes du phénotype 2b.

La détection du mécanisme de type TEM des souches d'un phénotype étendu de résistance ne pose pas de problème quel que soit l'espèce testée. Les 48 souches à phénotype étendu ont toutes été détectées avec un minimum de 2 peptides détectés. En revanche, la détection précise du phénotype 2br est plus délicate. 23% des souches (3/13) de ce phénotype ont pu être détecté grâce à la détection du peptide numéro 6.

Pour ce qui est du phénotype BLSE, le phénotype de l'enzyme TEM-111 produit par une souche *E. coli* n'est pas connu à ce jour. L'étude indique qu'il s'agit d'une souche de type BLSE grâce à la détection des peptides 10 et 21 spécifiques de ce phénotype. Des tests phénotypiques antérieurs confirment que cette souche est du phénotype BLSE. Idéalement, il serait nécessaire de purifier l'enzyme TEM de cette souche et de vérifier que le spectre d'activité de cette enzyme est celui d'une BLSE. Pour l'étude, nous ferons l'hypothèse que l'enzyme TEM-111 est de phénotype BLSE. Par conséquent, 80% des souches (28/35) de phénotype BLSE ont pu être correctement identifiées grâce à la détection de 4 peptides spécifiques de ce phénotype. Tous ces résultats sont issus d'une collection de souches. Cela ne représente pas la prévalence actuelle des mécanismes de résistance qui a fortement évolué ces dernières années.

#### 4.2.2.2 Les enzymes de type SHV

---

Se référer à l'exemple 30 du brevet.

Même si le nombre d'enzymes différentes de type SHV est relativement moindre par rapport au nombre de TEM (170 versus 201), la complexité est encore plus importante que pour TEM. En effet, 101 positions de mutation sont répertoriées sur les 286 acides aminés de l'enzyme SHV. De la même manière, les mutations affectent les capacités hydrolytiques de l'enzyme et forment les trois mêmes groupes de phénotype principaux (2b, 2br, 2be : les phénotypes sont détaillés dans la partie 2.1.1.2). La méthode SRM est développée de manière à cibler 98 peptides.

Le jeu d'échantillon est composé de 14 souches appartenant toutes aux entérobactéries dont 9 *K. pneumoniae*, 4 *E. coli* et 1 *E. aerogenes*. Elles produisent toutes une seule enzyme de

type SHV sauf une souche de *K. pneumoniae* qui exprime 2 enzymes SHV différentes : SHV-40 et SHV-2a. Le total d'enzymes différentes étudiées est ainsi de 15. La méthode d'intégration qui fut utilisée est la méthode 2 décrite dans la partie 6.3.2. L'ensemble des résultats obtenus ont été repris à l'aide de la méthode 3 et ces résultats sont résumés dans le tableau 16 ci-après.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique peptide (135 enzymes de type SHV)	fréquence de détection du peptide (souches détectées/souches testées théoriquement positives)
1	DTPASMAER	SHV	96%	50% 7/14
2	DTTTPASMAATLR	SHV	93%	64% 9/14
3	GIVALLGPNNK	SHV	96%	100% 14/14
4	LLTSQR	SHV	96%	7% 1/14
5	LSEQLSGR	SHV	62%	57% 4/7
6	NQQIAGIGAALIEHWQR	SHV	98%	93% 13/14
7	QIGDNVTR	SHV	94%	36% 5/14
8	QQDLVDYSPVSEK	SHV	99%	21% 3/14
9	TLTAWR	SHV	98%	36% 5/14
10	VAGPLIR	SHV	99%	86% 12/14
11	VDAGDEQLER	SHV	99%	64% 9/14
12	VGMIEMDLASGR	SHV	93%	45% 5/11
13	WETELNEALPGDAR	SHV	95%	29% 4/14

**Tableau 16 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type SHV.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type SHV.

Aucun peptide spécifique d'un phénotype particulier de SHV n'est détecté. La raison est simple, plus d'un tiers des positions de la séquence peuvent potentiellement mutées pour étendre le spectre d'activité de l'enzyme. A la différence du modèle TEM, les peptides spécifiques de phénotype particulier sont rares et non protéotypiques du fait de la taille réduite de ces séquences. En revanche, des portions de l'enzyme sont fortement conservées comme l'illustre la fréquence théorique des peptides détectés. Les peptides 2, 6 et 10 sont les plus sensibles d'entre eux. Le peptide 6 est détecté dans 13 souches sur 14, il n'est pas détecté dans la souche de l'espèce *E. aerogenes* avec les critères établis à cause d'une interférence pour l'analyse du fragment y15 dichargé. Il serait possible de choisir une autre transition pour détecter ce peptide mais il serait nécessaire de valider le choix car d'autres interférences dans d'autres espèces

pourraient intervenir. Le peptide 10 n'est pas détecté dans deux autres échantillons avec les critères choisis. Il s'agit de deux souches de l'espèce *K. pneumoniae* produisant SHV-14 ou SHV-28. Les peptides 2 et 6 sont détectés dans ces deux souches.

Deux peptides au minimum ont pu être détectés dans les 14 souches testées. La détection d'un mécanisme de type SHV ne semble pas poser de problème grâce à la détection de séquences conservées au sein de la famille SHV. En revanche, l'attribution du phénotype de résistance exacte n'est pas possible.

Par ailleurs, les peptides NTTTPASMAATLR, GIVALLGPDNK et NQQIAGLGAALIEHWQR ont été détectés alors qu'ils ne devaient pas l'être (Tableau 17). La raison est que les ions entrant dans le quadripôle sont filtrés unitairement en fonction de leur rapport masse sur charge. Pour simplifier, la fenêtre des filtres Q1 et Q3 est de 1 Thomson. Or, les peptides 2 et 14 ne diffèrent que par la mutation D-N en position N-ter, en Q1 les ions diffèrent de 0.33 ou 0.5 Thomson selon l'état de charge analysé et en Q3 les ions fragments sont identiques car il s'agit d'ion fragment de type  $\gamma$ . De même, les peptides 3 et 15 ne diffèrent que par la mutation N-D, en Q1 les ions dichargés diffèrent de 0.5 Thomson et en Q3, les ions monochargés diffèrent de près de 1 Thomson. La fragmentation de ces deux couples de peptides semble similaire puisque les proportions observées respectent celles obtenues pour les peptides de référence. Etant donné, que ces ions ne sont pas ceux attendus, une quantité moindre passe les filtres et explique les résultats observés. Enfin, les peptides 6 et 16 ne diffèrent que par la mutation I-L, ils ont donc exactement la même masse ce qui explique les résultats observés pour ce couple de peptide.

Ici, il n'est pas nécessaire de distinguer les couples de peptides 3-15 ou 6-16 car les peptides sont tous caractéristiques de SHV. Par contre, distinguer le peptide 2 du peptide 14 pourrait permettre de mettre en évidence le phénotype 2be dans les souches qui exprimeraient le peptide 14. Une manière de les distinguer serait d'être plus exigeant sur le temps de rétention. Préalablement, des peptides de synthèse ont été analysés. Contrairement aux peptides absents théoriquement, l'ensemble des séquences peptidiques attendues élue à proximité du temps de rétention des peptides de synthèse.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	Occurrence théorique peptide	Occurrence de détection du peptide	Raison observation	Temps de rétention attendu en minutes	Temps de rétention observé en minutes (minimum-maximum)
2	DTTTPASMAATLR	SHV	14	9	mutation	16,4	16,34-16,38
14	NTTTPASMAATLR	2be	0	1	isobarique D-N	16	16,38
3	GIVALLGPNK	SHV	14	14	mutation	18,4	18,32-18,42
15	GIVALLGPDNK	SHV	0	5	isobarique N-D	18,95	18,32-18,42
6	NQQIAGIGAALIEHWQR	SHV	14	13	mutation	22,25	22,08-22,16
16	NQQIAGLGAALIEHWQR	SHV	0	13	isobarique I-L	22,66	22,08-22,16

**Tableau 17 : Liste des résultats inattendus observés dans les données associés à la présence de mutation isobarique.** Le temps de rétention attendu correspond au temps de rétention observé lors de l'analyse des peptides de synthèse.

Cependant nous avons constaté que la méthode 2 de retraitement utilisée dans le brevet était inadaptée pour les peptides 19 et 20 (tableau 18). Les proportions des transitions de ces peptides ne sont pas respectées. Les ions détectés ne correspondent donc pas aux peptides attendus mais à des ions isobariques non identifiés. Par ailleurs le peptide 17 est non spécifique à la protéine SHV. Il est notamment commun à la protéine YehQ présente chez *E. coli*. Le peptide 18 est très hydrophile, il n'est pas retenu dans les conditions testées.

Aucun des peptides 17 à 20 ne peut être retenu pour détecter SHV.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	Occurrence théorique peptide	Occurrence de détection du peptide	hypothèse invalidité
17	GIVALR	SHV	0	14	peptide commun à YEHQ_ECOLI
18	TGAAER	2be	1	6	élution au volume mort
19	LSASSQR	SHV	0	1	proportion transition non respecté
20	NVLTSQR	SHV	0	1	proportion transition non respecté

**Tableau 18 : Résumé des résultats invalides observés dans les données SHV**

#### 4.2.2.3 Les enzymes de type CTX-M

Se référer à l'exemple 27 du brevet.

Sur les 291 acides aminés de la séquence, seulement 144 positions sont conservés au sein de toutes les enzymes de type CTX-M. Par exemple, deux séquences extrêmes, CTX-M-1 et CTX-M-2 n'ont que 79.725% d'identité. Cependant, il est possible de regrouper les 130 variants répertoriés à ce jour en cinq groupes d'identité supérieure à 90%. Ces 5 groupes sont le groupe CTX-M1, le groupe CTX-M2, le groupe CTX-M8, le groupe CTX-M9 et le groupe CTX-M25. Les enzymes de type CTX-M sont plus actives contre le céfotaxime et le ceftriaxone que contre la ceftazidime, mais des mutations ponctuelles peuvent augmenter l'activité contre la ceftazidime. C'est le cas de CTX-M-15 et CTX-M-32 qui diffèrent de CTX-M-3 et CTX-M-1, respectivement, par seulement la substitution de l'asparagine par la glycine en position 240. Ces enzymes mutées sont 100 fois plus active contre le ceftazidime [166,167]. En dehors de ces différences d'activité sur les céphalosporines de troisième génération, les CTX-M ont toutes le même spectre d'activité, celui d'une BLSE.

Le jeu est composé de 10 échantillons dont 4 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 2 *Salmonella*, 1 *P. mirabilis* et 1 *E. aerogenes*. Chaque souche exprime une enzyme de type CTX-M différente. Les 5 groupes d'enzymes de type CTX-M sont représentés. 4 enzymes du groupe CTX-M1, 3 enzymes du groupe CTX-M9 et une enzyme pour chacun des autres groupes. La méthode a été mise au point pour cibler 49 peptides spécifiques des enzymes de type CTX-M. Les données ont été retraitées à l'aide de la méthode 3 décrite dans la partie 6.3.3 et ont permis de mettre en évidence les résultats présentés dans le tableau 19.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 110 enzymes de type CTX-M	fréquence de détection (souches détectées / souches testées théoriquement positives)
1	AGLPK	BLSE	13,6%	100% 1/1
2	AMAQTLR	BLSE	72,7%	100% 8/8
3	AQLVTWLK	BLSE	50,9%	100% 5/5
4	DVLAAAAK	BLSE	8,2%	100% 2/2
5	DVLASAAK	BLSE	34,5%	25% 1/4
6	DVLASAAR	BLSE	33,6%	100% 3/3
7	FAMCSTSK	BLSE	63,6%	100% 7/7
8	FPMCSTSK	BLSE	36,4%	33% 1/3
9	GNTTGAASIQAGLPASWVVGDK	BLSE	37,3%	25% 1/4
10	GNTTGAASIQAGLPTSWVVGDK	BLSE	9,1%	100% 1/1
11	GNTTGAASIR	BLSE	34,5%	100% 4/4
12	GNTTGSASIR	BLSE	14,5%	100% 1/1
13	LAALEK	BLSE	44,5%	80% 4/5
14	LAELER	BLSE	34,5%	100% 4/4
15	LIAHLGGPDK	BLSE	25,5%	100% 3/3
16	LIAHVGGPASVTAFAR	BLSE	33,6%	25% 1/4
17	QLTLGHALGETQR	BLSE	34,5%	100% 3/3
18	SDLVNYNPIAEK	BLSE	50,9%	100% 5/5
19	SESEPNLLNQR	BLSE	35,5%	50% 2/4
20	TEPTLNTAIPGDPR	BLSE	86,4%	100% 9/9
21	TGSGDYGTTNDIAVIWPQGR	BLSE	29,1%	100% 4/4
22	TGSGGYGTTNDIAVIWPK	BLSE	17,3%	50% 1/2
23	VMAAAAVLK	BLSE	77,3%	100% 9/9
24	VMAVA AVLK	BLSE	20,0%	100% 1/1

**Tableau 19 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type CTX-M.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type CTX-M. Ils sont tous spécifiques de la classe BLSE.

24 peptides au total ont pu être détectés dans les 10 souches testées. Plusieurs critères indiquent que la détection de CTX-M par le procédé ne présente pas de difficultés particulières. De 5 à 11 peptides ont pu être détectés par souche testée. La souche, où 11 peptides ont été détectés, est la souche produisant CTX-M-15. Il s'agit de l'enzyme de type CTX-M la plus prévalente au monde. Les 5 groupes de type CTX-M sont détectés. Enfin, les peptides 23 et 24 qui ont pour différence une seule mutation sont présents dans 97.3% des enzymes de type CTX-M. Ils ont été détectés dans les 10 souches testées. Les trois enzymes comportant d'autres

mutations de cette région semblent également détectables à l'aide des séquences : AMAVAAVLK ; VMAAAALLK ; VMAAAAVLEQSETQK. La difficulté de ce modèle réside dans le nombre de cibles nécessaires pour détecter l'ensemble des enzymes de type CTX-M.

Malgré l'hétérogénéité des enzymes de type CTX-M, seulement deux peptides ont été nécessaires pour détecter les 10 souches testées exprimant une enzyme de type CTX-M.

#### 4.2.2.4 Les enzymes de type PER

Se référer à l'exemple 12 du brevet.

255 positions des 308 acides aminés que comptent les enzymes de type PER sont conservés formant 7 enzymes différentes. Ces 7 enzymes peuvent être décomposées en deux groupes selon leur homologie. 97.727% d'identité entre PER-1, PER-3, PER-4, PER-5 et PER-7. 92.857% d'identité entre PER-2 et PER-6.

5 souches ont été testés dans ce jeu dont 3 *P. aeruginosa* et 2 *A. baumannii*. Ces 5 souches expriment toutes l'enzyme PER-1. Les données ont été retraitées à l'aide la méthode 3 (partie 6.3.3) et ont permis de mettre en évidence 9 peptides (Tableau 20).

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	Occurrence théorique (7 variants)	Fréquence de détection du peptide (5 souches testées)
1	EQIESIVIGK	2be	4	100%
2	FPMQSVFK	2be	7	40%
3	GAAEILK	2be	5	100%
4	GLLPAGTVVAHK	2be	6	100%
5	LDLNQTVIVNR	2be	5	100%
6	TGTSGIK	2be	4	40%
7	TQLSETSQALLWK	2be	5	80%
8	VLQNTWAPIMK	2be	5	100%
9	WMVETTTGPER	2be	5	100%

**Tableau 20 : récapitulatif des peptides détectés des enzymes de type PER.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type PER. Ils sont tous spécifiques de la classe BLSE.

Cette analyse met particulièrement en avant 6 peptides (1, 3, 4, 5, 8 et 9). Pris isolément, ils permettent de détecter l'ensemble des souches testées. Cependant, seul PER-1 a été testé.

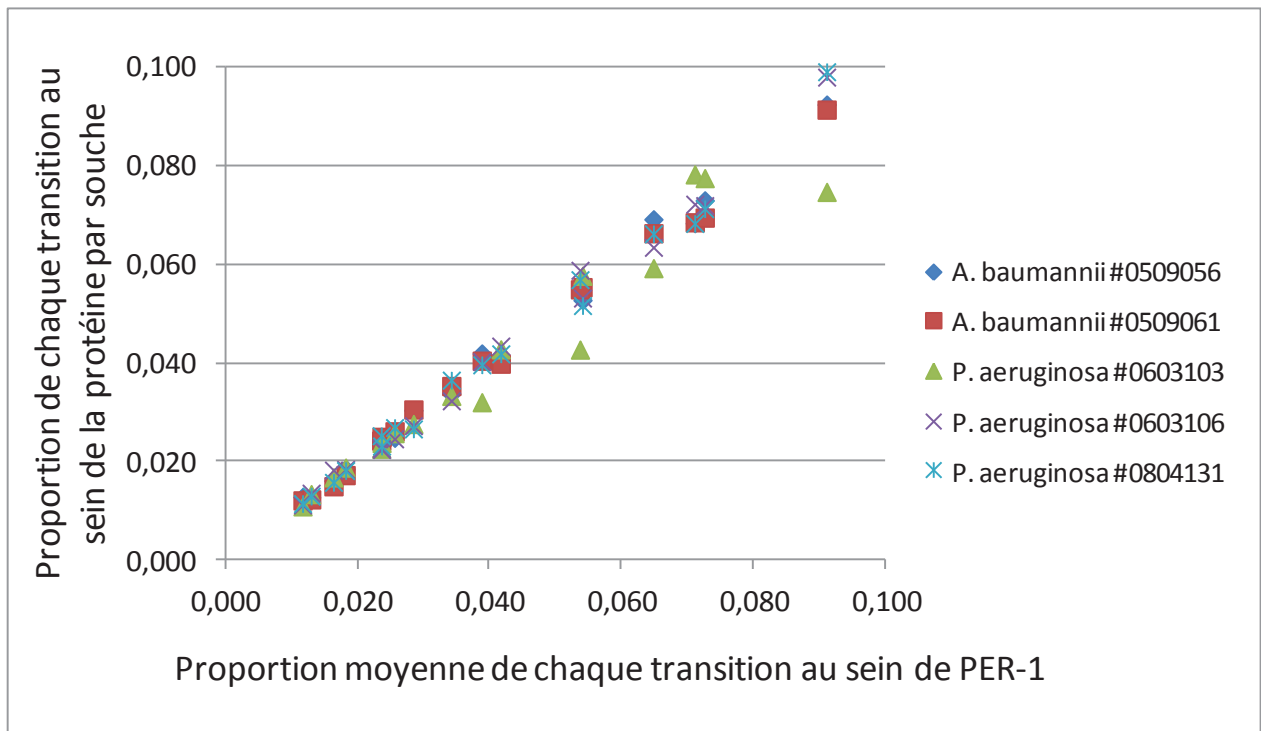


Sur ce jeu de données, il est possible de pousser l'analyse des résultats plus loin que cela n'est décrit dans le brevet. Etant donné que six peptides sont détectés dans les 5 souches, il est possible de calculer la proportion que représente chaque transition au sein de la somme de l'ensemble de ces transitions (tableau 21).

Numéro Peptide	Séquence peptidique	m/z filtré en Q1	m/z filtré en Q3	Coefficient de variation (%)	<i>P. aeruginosa</i>				
					<i>A. baumannii</i> #0509056	<i>A. baumannii</i> #0509061	<i>P. aeruginosa</i> #0603103	<i>P. aeruginosa</i> #0603106	<i>P. aeruginosa</i> #0804131
1	EQIESIVIGK	558.3	317.2	3,47%	0,041	0,040	0,043	0,043	0,042
			616.4	6,07%	0,068	0,069	0,078	0,072	0,068
			745.4	4,14%	0,073	0,070	0,078	0,072	0,071
3	GAAEILK	351.2	322.7	4,06%	0,024	0,025	0,024	0,022	0,023
			502.3	4,46%	0,053	0,055	0,058	0,053	0,052
			573.4	4,59%	0,310	0,315	0,342	0,308	0,308
4	GLLPAGTVVAHK	581.9	440.3	5,77%	0,069	0,066	0,059	0,063	0,066
			496.8	6,46%	0,013	0,012	0,011	0,011	0,011
			879.5	6,50%	0,030	0,031	0,028	0,027	0,027
5	LDLNQTVIVNR	642.9	501.3	7,54%	0,016	0,015	0,017	0,018	0,016
			600.4	3,88%	0,013	0,012	0,013	0,014	0,013
			701.4	3,23%	0,018	0,017	0,019	0,018	0,018
8	VLQNTWAPIMK	650.9	488.3	10,73%	0,093	0,091	0,075	0,098	0,099
			559.3	11,83%	0,055	0,055	0,043	0,059	0,057
			745.4	10,06%	0,042	0,040	0,032	0,040	0,040
9	WMVETTTGPER	653.8	761.4	4,73%	0,023	0,024	0,023	0,023	0,025
			890.4	3,68%	0,025	0,026	0,026	0,025	0,027
			989.5	4,88%	0,034	0,035	0,033	0,032	0,037

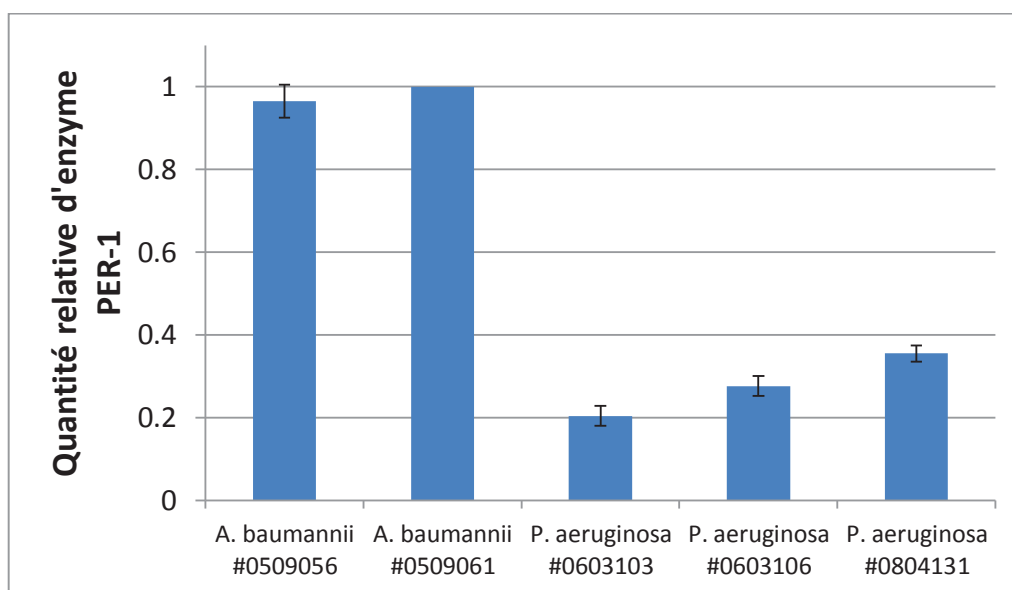
**Tableau 21 : Proportion de chaque transition au sein de la somme des transitions par souche bactérienne**

La proportionnalité entre ces 6 peptides est bien conservée quel que soit la transition au sein des 5 souches analysées comme l'illustre le graphe de la figure 18. Les coefficients de variation des proportions de ces 18 transitions entre les 5 souches vont de 3.47% à 11.83%.



**Figure 18 : Comparaison de la proportion de chaque transition au sein de PER-1 aux proportions moyennes par souche bactérienne.**

D'autre part, étant donné que la quantité de bactéries traitée est identique pour les 5 souches testées et que six peptides sont détectés dans les 5 souches, il est possible de calculer la quantité relative d'enzyme PER-1 exprimée dans ces souches. La quantité d'enzyme relative est normalisée par celle de la souche *A. baumannii* #0509061 qui exprime, le plus, l'enzyme PER-1. Ce calcul peut être fait 18 fois pour les 6 peptides et les 3 transitions par peptide et permet de calculer la variabilité technique sur les 18 valeurs. L'ensemble des résultats est reporté sur la figure 19.



**Figure 19 : graphe représentant la quantité relative d'enzyme PER-1 détectée dans les souches bactériennes.**

En faisant l'hypothèse que le rendement de lyse-digestion du protocole est identique entre les souches testées, la quantité d'enzyme PER-1 est du même ordre de grandeur pour les 2 *Acinetobacter*, la quantité d'enzyme PER-1 est constitutivement plus faible chez *P. aeruginosa* que chez *A. baumannii* d'un facteur 3 à 5.

#### 4.2.2.5 Les enzymes de type VEB

Se référer à l'exemple 13 du brevet.

Les enzymes de type VEB ont une forte homologie entre elles. Sur les 299 acides aminés de la séquence protéique, seules 6 positions de mutation sont répertoriées formant les 7 variants connus à ce jour en novembre 2012. Les 7 séquences ont la même activité hydrolytique et sont des BLSE. Le choix de peptides commun à l'ensemble des 7 séquences est large. La méthode développée cible 20 peptides caractéristiques de VEB. 4 souches dont 3 *A. baumannii* et 1 *E. coli* exprimant une enzyme de type VEB ont été analysés. Les données ont été retraitées à l'aide de la méthode 3 (partie 6.3.3) et ont permis de mettre en évidence 4 peptides (Tableau 22).

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	Nombre de détection théorique	Nombre de détection observé
1	ETTTGSNR	2be	4	3
2	FLNANHFTDISIK	2be	4	2
3	IEITPQDLLPK	2be	4	4
4	SYDFIWK	2be	4	3

**Tableau 22 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type VEB.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type VEB. Ils sont tous spécifiques du phénotype 2be qui correspond à la classe BLSE.

Malgré un choix large de peptides consensus, un seul peptide est détecté dans l'ensemble des souches testées. Cela peut traduire une expression plus faible de cette enzyme ou aussi une faible sensibilité des autres peptides ciblés. Néanmoins, la détection des enzymes de type VEB est assurée par le peptide 3.

#### 4.2.2.6 Les enzymes de type ACC

*Se référer à l'exemple 25 du brevet.*

Quatre enzymes de type ACC sont référencées en novembre 2012. ACC-1 et ACC-4 ne diffèrent que par une mutation. L'homologie d'ACC-2 et d'ACC-3 tombent respectivement à 94.9% et 87.7% vis-à-vis d'ACC-1. Ces deux enzymes ne sont pas portées par des plasmides, elles sont naturellement présentes chez l'espèce *Hafnia alvei* [168]. D'ailleurs il est fort probable que cette espèce ou une espèce proche soit l'espèce réservoir de l'enzyme plasmidique ACC-1. La méthode a été développée pour cibler 22 peptides de l'enzyme ACC-1. 2 *Klebsiella* et 3 *Salmonella* produisant ACC-1 sont étudiées. La souche *Hafnia alvei* produisant naturellement ACC-2 complète cette étude.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 4 enzymes ACC	fréquence de détection (souches détectées / souches testées théoriquement positives)
1	AWKPADAAGTHR	AmpC	75%	83% 5/6
2	DEPVHVNMEILGNEAYGIK	AmpC	50%	83% 5/6
3	DTVDDLIQPLMQK	AmpC	50%	100% 5/5
4	ILSSLEGNK	AmpC	50%	100% 5/5
5	LSLDQSVSHYVPELR	AmpC	50%	100% 5/5
6	MGIVMLANK	AmpC	100%	83% 5/6
7	MQQALTATHTGYFK	AmpC	50%	100% 5/5
8	NNIPGMSVAVTVNGK	AmpC	50%	100% 5/5
9	NTTQLMAYLK	AmpC	50%	100% 5/5
10	NYIYNYGLAAK	AmpC	75%	83% 5/6
11	NYSIDQR	AmpC	100%	83% 5/6
12	QPQQPVTEENTLFEVGSLSK	AmpC	75%	83% 5/6
13	SLGVSYEDAIEK	AmpC	50%	100% 5/5
14	SVATPIVPPLPPQENVWINK	AmpC	100%	100% 6/6
15	TFAATLASYAQVSGK	AmpC	75%	100% 5/5
16	TGSTNGFGAYIAFVPAK	AmpC	100%	83% 5/6
17	TLLPQLGMHHSYLK	AmpC	50%	100% 5/5
18	TTSSDLLR	AmpC	75%	100% 6/6
19	VYSNIGTGLLGMIAAK	AmpC	75%	100% 6/6
20	YVQANMGQLK	AmpC	100%	83% 5/6

**Tableau 23 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type ACC.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type ACC. Ils sont tous spécifiques du phénotype AmpC.

20 peptides sont parfaitement détectés dans les 5 souches qui produisent ACC-1. (tableau 23) Seulement 3 peptides sur les 11 peptides ciblant ACC-2 sont détectés dans la souche *Hafnia alvei* produisant l'enzyme ACC-2. Le support de l'enzyme ACC-1 est plasmidique. Il est fort probable que le plasmide soit présent en plusieurs exemplaires dans les 5 souches testées tandis qu'il s'agit d'une résistance naturelle chez *Hafnia alvei*. De plus, les résultats de Girlich *et al* [168] supposent que l'expression de cette enzyme chromosomique soit fortement induite par la présence de  $\beta$ -lactamines et que le système de régulation soit similaire à celui décrit chez *Enterobacter cloacae* avec un régulateur *AmpR* qui empêche la synthèse du gène *AmpC* par sa liaison à un précurseur du peptidoglycane en l'absence de  $\beta$ -lactamines.

La détection de l'enzyme plasmidique de type ACC-1 est possible avec 20 biomarqueurs tandis que la détection de l'enzyme chromosomique de type ACC-2 ne semble possible en l'absence de  $\beta$ -lactamines qu'avec 3 biomarqueurs.

#### 4.2.2.7 Les enzymes de type CMY

---

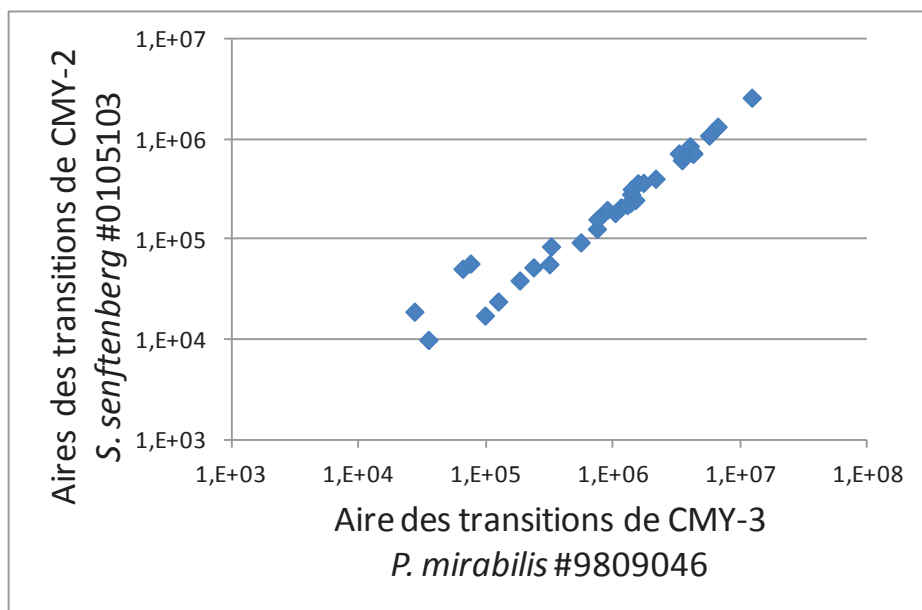
*Se référer à l'exemple 26 du brevet.*

97 enzymes de type CMY sont référencées en novembre 2012. Au moment de l'étude, en novembre 2011, 58 séquences étaient disponibles. Si on se base sur l'homologie, cette famille pourrait être scindée en deux. En effet, la famille englobe deux types de séquences d'après leur séquence protéique. Un type de séquence dérivant de CMY-1 qui englobe six séquences dont l'identité au sein du type est de 97.382% et un type de séquence dérivant de CMY-2 qui regroupe 52 séquences dont l'identité au sein du type est de 85.302%. L'identité entre les deux types est seulement de 40.568% (CMY-1 versus CMY-2). Sans surprise, aucun peptide tryptique n'est commun entre les deux groupes. Le jeu de souches étudiées fait partie du type dérivant de CMY-2. Le jeu est composé de 7 souches dont 3 *P. mirabilis*, 2 *Salmonella*, 1 *E. coli* et 1 *K. oxytoca*. La méthode SRM développée vise à détecter les peptides consensus au sein des groupes respectifs. 31 peptides sont ciblés, 22 peptides ciblent le type CMY-2 et 9 peptides ciblent le type CMY-1. La méthode 3 de retraitement a été appliquée par erreur dans le brevet avec un seuil de détection nulle. Un seuil de positivité à 2500 a été appliqué ici pour éviter de fausses détections. Aucun des neuf peptides de type CMY-1 n'ont été détectés dans les données avec ce seuil. Cela confirme la spécificité de la méthode. Sur les 22 peptides ciblant le type CMY-2, 18 ont pu être détectés au moins une fois dans les sept souches testées et sont résumés dans le tableau 24.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 52 enzymes de type CMY-2	fréquence de détection (souches détectées / souches testées théoriquement positives)
1	AALLHFYQNWQPQWTPGAK	AmpC	79%	29% 2/7
2	ADSIINGSDSK	AmpC	92%	100% 7/7
3	ASWVHK	AmpC	100%	100% 7/7
4	DYAWGYR	AmpC	75%	80% 4/5
5	LAHTWITVPQNEQK	AmpC	85%	43% 3/7
6	LSDPVTK	AmpC	98%	86% 6/7
7	NLGIVMLANK	AmpC	100%	100% 7/7
8	QWQGIR	AmpC	75%	100% 7/7
9	SSVIDMAR	AmpC	90%	100% 7/7
10	SYNPVVR	AmpC	87%	71% 5/7
11	TEQQIADIVNR	AmpC	100%	100% 7/7
12	TFNGVLGGDAIAR	AmpC	94%	100% 7/7
13	TLQQGIALAQSR	AmpC	92%	100% 7/7
14	VALAALPAVEVNPPAPAVK	AmpC	87%	100% 7/7
15	VEAAWR	AmpC	98%	100% 7/7
16	VLQPLK	AmpC	100%	100% 7/7
17	WVQANMDASHVQEK	AmpC	83%	100% 7/7
18	YWPELTGK	AmpC	96%	86% 6/7

**Tableau 24 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type CMY.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type CMY. Ils sont tous spécifiques du phénotype AmpC.

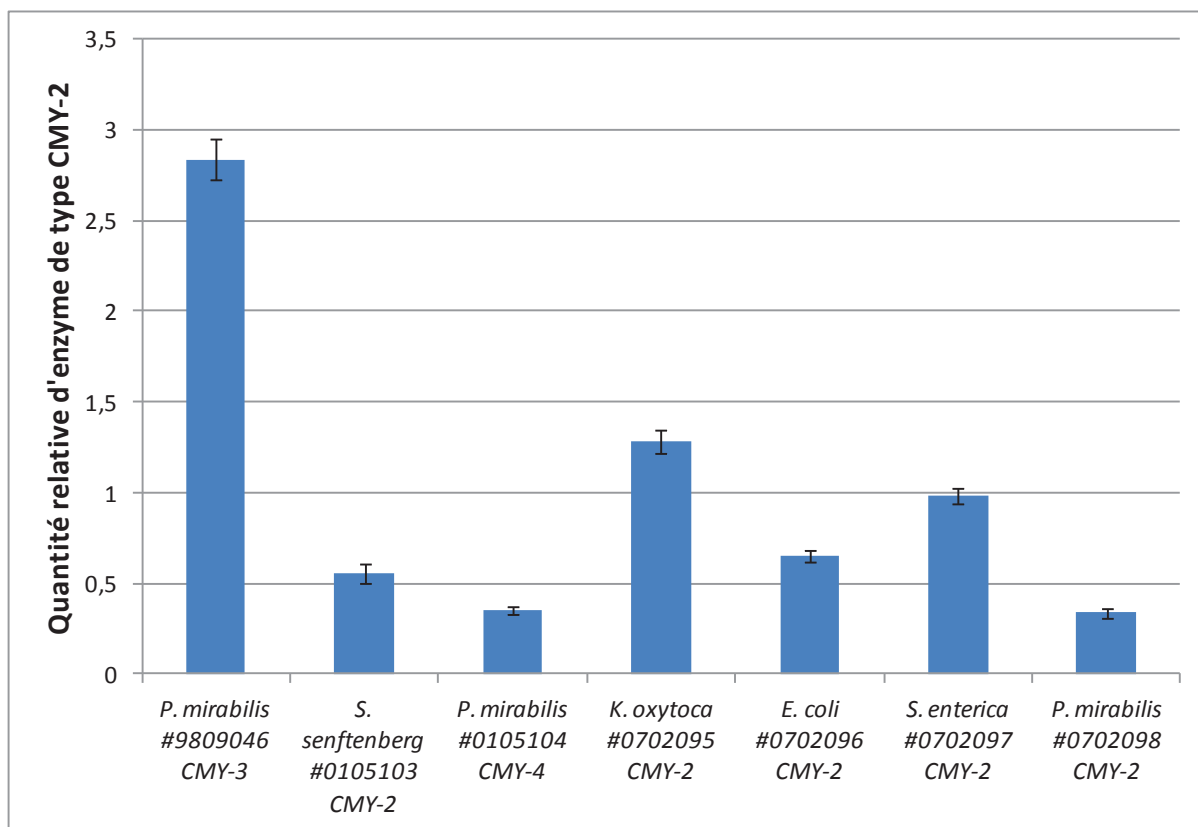
36 transitions ont été détectées pour l'ensemble des 7 souches. Elles correspondent aux 12 peptides 2, 3, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 et 17 analysés par trois transitions chacun. Si l'on compare les aires obtenues pour chaque transition dans deux échantillons selon la méthodologie décrite en 4.2.2.4 (figure 20). Les 3 transitions du peptide 7 (NLGIVMLANK) présentent un défaut de corrélation. Plusieurs explications sont possibles. Cela peut être due à la présence dans la séquence d'une méthionine qui peut s'oxyder ou au fait que la séquence débute par une asparagine et peut potentiellement cycliser. Par ailleurs, les peptides 9 et 17 ont une méthionine dans leur séquence et sont visiblement peu perturbés. Cela plaide pour l'hypothèse de l'instabilité du peptide 7. La transition la moins sensible est également mal corrélée. Lorsqu'une seule transition est moins bien répétable, l'hypothèse la plus probable est un signal interférent pour cette transition. En dehors de ces 4 valeurs variables, les CV des proportions des 32 autres transitions entre les 6 échantillons vont de 1.8% à 11.8%.



**Figure 20 : Comparaison des aires des transitions de la protéine de type CMY-2 de *S. senftenberg* #0105103 et *P. mirabilis* #9809046**

Ces 32 valeurs permettraient d'estimer la quantité relative d'enzyme présente dans les échantillons testés si la quantité de protéines traitées était normalisée par des protéines de ménage. Dans notre cas, les quantités de cellules bactériennes traitées sont identiques, nous estimons la quantité d'enzyme CMY en sommant l'ensemble des 32 transitions corrélant parfaitement entre les souches testées.





**Figure 21 : Graphe représentant la quantité relative d'enzyme détectée de type CMY-2 dans les souches testées.** Les comparaisons sont faites sur un nombre de cellule traité et un volume injecté identique. Les écart-types analytiques sont calculés à partir des 32 doses relatives propres aux 32 transitions.

Dans tous les cas, les quantités détectées sont du même ordre de grandeur. Un facteur 8 est observé entre la quantité détectée la plus forte et la quantité détectée la plus faible. Cela laisse supposer que la méthode est adaptée pour l'ensemble des souches testées et que la quantité d'enzyme produite semble être du même ordre de grandeur.

La détection des enzymes de type CMY-2 est largement couverte par les 11 biomarqueurs détectés de façon répétable dans les 7 souches testées. L'un d'entre eux s'est avéré non répétable en raison d'une altération supposée. Il serait tout à fait possible de réduire le nombre de biomarqueurs à doser pour détecter les enzymes de type CMY-2. En revanche, aucun peptide n'est commun entre les enzymes de CMY-1 et les enzymes de type CMY-2. Pour couvrir l'ensemble de la famille CMY par l'approche proposée, il serait nécessaire de tester des souches

produisant des enzymes de type CMY-1 pour mettre en évidence d'autres biomarqueurs propres aux CMY de type 1.

#### 4.2.2.8 Les enzymes de type DHA

Se référer à l'exemple 28 du brevet.

La famille DHA est fortement homologue avec 96.834 % d'identité entre les 6 enzymes référencées dans les bases.

Le jeu d'échantillon est composé de 4 *K.pneumoniae*, 1 *K. oxytoca* et 1 *E. coli*. La souche *K. oxytoca* exprime l'enzyme DHA-2 tandis que les autres souches expriment DHA-1.

Dans la méthode SRM développée, 12 peptides ont été sélectionnés pour détecter DHA-1, les 3 peptides propres à DHA-2 avaient été oubliés. La méthode 3 de retraitement décrite dans la partie 6.4.3 a été utilisée pour obtenir ces résultats. L'ensemble des peptides détectés sont résumés dans le tableau 25.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 6 enzymes DHA	fréquence de détection (souches détectées / souches testées théoriquement positives)	
1	ADLLNFYQQWQPSR	AmpC	67%	20%	1/5
2	AGNADLEMAMYLQTR	AmpC	100%	17%	1/6
3	EMALNDPAAK	AmpC	83%	100%	5/5
4	GKPYYFNYGFADIQAK	AmpC	67%	40%	2/5
5	NYPNTER	AmpC	100%	50%	3/6
6	QPVTENTLFELGSVSK	AmpC	100%	83%	5/6
7	QVAIVILANK	AmpC	100%	67%	4/6
8	TFTGVLGAVSVAK	AmpC	100%	100%	6/6
9	TGATTGFGAYVAFIPEK	AmpC	83%	33%	2/5
10	VSPGQLDAESYGVK	AmpC	100%	83%	5/6
11	WAEMNMEPSR	AmpC	83%	67%	4/6
12	YQPELALPQWK	AmpC	100%	100%	6/6

**Tableau 25 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type DHA.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type DHA. Ils sont tous spécifiques du phénotype AmpC.

Premièrement, l'analyse des résultats indiquent que le témoin négatif n'est détecté dans aucune des six souches testées. Deuxièmement, l'ensemble des 12 peptides ciblés sont détectés

au moins une fois dans les souches testées. Les peptides 8 et 12 sont particulièrement intéressants puisqu'ils sont détectés dans l'ensemble des souches testées et sont consensuels à la famille DHA.

#### 4.2.2.9 *Les enzymes de type FOX*

---

*Se référer à l'exemple 29 du brevet.*

Neuf enzymes de type FOX sont référencées en novembre 2012. Plus de 90% d'identité est observé entre les enzymes de la famille FOX. Une forte homologie existe entre les enzymes FOX, les enzymes MOX et les enzymes CMY de type 1. Ainsi, FOX-1 a 72,208% d'identité avec MOX-1 ou CMY-1.

Six souches dont la détection de FOX est positive par PCR ont été analysées. Les souches en question sont 2 *E. coli*, 2 *K. oxytoca* et 2 *K. pneumoniae*.

La méthode SRM fut développée pour cibler 15 peptides caractéristiques des FOX. Parmi ces 15 peptides, deux peptides sont aussi communs aux enzymes de type MOX et aux enzymes CMY de type 1.

Le retraitement avait été fait avec la méthode 2 dans ce brevet, un retraitement à l'aide de la méthode 3 a permis d'affiner les résultats et est présenté dans le tableau 26.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 9 enzymes de type FOX	fréquence de détection (6 souches testées)
1	AHYFNYGVANR	AmpC	100%	33%
2	AMGEQR	AmpC	100%	83%
3	GGFELDDK	AmpC	78%	50%
4	GIAIVMLANR	AmpC	100%	83%
5	IPGMAVAVLK	AmpC	78%	100%
6	NYPIEAR	AmpC	100%	100%
7	SWSPVYPAGTHR	AmpC	78%	100%
8	TGSADLLK	AmpC	100%	100%
9	TGSTGGFGAYVAFVPAR	AmpC	100%	50%
10	TLTATLGAYAAVK	AmpC	100%	17%
11	VSEQTLFEIGSVSK	AmpC	100%	100%
12	VSQHAPWLK	AmpC	89%	33%

**Tableau 26 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type FOX.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type FOX sauf les peptides 1 et 5 qui sont communs aux enzymes de type MOX (uniquement MOX-1 pour le peptide 1) et aux enzymes CMY de type 1. Ils sont tous spécifiques du phénotype AmpC.

Les peptides 5, 6, 7, 8 et 11 détectés dans les 6 souches testées sont plus sensibles. Parmi eux, le peptide 5 est aussi présent dans l'ensemble des enzymes MOX et dans l'ensemble des enzymes CMY de type 1. La détection de ce peptide devra être vérifiée pour démontrer son grand intérêt pour des souches exprimant FOX et des souches exprimant les enzymes CMY de type 1.

#### 4.2.2.10 Les enzymes de type MOX

*Se référer à l'exemple 14 du brevet.*

Seulement 75.979% d'identité pour les 7 enzymes de type MOX est observée. Deux groupes d'enzymes sont distingués selon l'homologie. Le groupe MOX-1, MOX-2, MOX-3 et MOX-4 avec 91.361% d'identité et le groupe MOX-5, MOX-6 et MOX-7 avec 92.428% d'identité. A noter que MOX-1 a une identité très forte de 97 à 99% avec les CMY de type CMY-1. La méthode a été développée pour détecter les peptides propres aux MOX. Tous les peptides communs aux CMY

de type CMY-1 n'ont pas été recherchés. Il aurait été judicieux de les cibler également. Néanmoins, une seule souche a été étudiée pour ce mécanisme. Il s'agit d'une souche *E. coli* produisant une enzyme de type MOX-2. Les résultats ont été retraités à l'aide de la méthode 3 et sont présentés dans le tableau 27.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 7 enzymes de type MOX
1	ANISGVHDK	AmpC	14%
2	QWTPAYSPGSHR	AmpC	71%
3	VSPGMLADEAYGIK	AmpC	43%

**Tableau 27 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type MOX.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type MOX. Ils sont tous spécifiques du phénotype AmpC.

Seulement 3 peptides ont pu être détectés dans la souche testée. 10 peptides présents dans MOX-2 n'avaient pas été recherchés car ils étaient communs soit aux CMY de type CMY-1 soit aux FOX. Parmi eux, le peptide IPGMAVAVLK est le seul présent dans l'ensemble des enzymes de type MOX. Il est aussi présent dans l'ensemble des enzymes de type CMY-1 et dans 7 des 9 enzymes de type FOX. Il avait d'ailleurs été détecté dans l'ensemble des souches productrices d'enzyme FOX testées. Il aurait été intéressant de le cibler.

#### 4.2.3 Discussion

L'approche proposée a permis de détecter l'ensemble des mécanismes de résistance enzymatique de la classe A d'Amber qui ont été étudiés à l'exception d'une souche, *Proteus mirabilis* productrice de l'enzyme TEM-1. Mais l'approche n'a pas permis de discriminer totalement ou partiellement le phénotype précis des 2 modèles où les mutations influent sur le spectre d'hydrolyse. Concernant TEM, 80% des souches BLSE ont pu être identifiées de la sorte grâce à 4 biomarqueurs. Concernant SHV, aucune souche n'a pu être identifiée comme obligatoirement BLSE. Le tableau 28 résume les informations principales des enzymes de type BLSE. Les enzymes BLSE les plus communes actuellement sont de type CTX-M. Malgré l'hétérogénéité de la famille CTX-M, seulement deux peptides ont été nécessaires pour détecter les 10 souches bactériennes testées représentant les 5 groupes de CTX-M. En ce qui concerne

les BLSE plus rare, PER est facilement détectée à l'aide de 6 biomarqueurs consensus alors que VEB est plus difficilement détectée avec un seul biomarqueur consensus.

Modèles enzymatiques étudiés	Peptides ciblés (propres aux enzymes testées)	Peptides protéotypiques	Nombre de peptides détectés dans toutes les souches	bio-marqueurs minimum	souches détectées / souches testées	% de détection	Nombre d'enzymes
TEM	96	21	4	3	51/52	98%	196
dont BLSE	32	4	0	3	28/35	80%	95
SHV	98	13	1	2	14/14	100%	135
dont BLSE	21	0	0	0	0/10	0%	40
CTX-M	49	24	17	2	10/10	100%	131
PER	30 (11)	9	6	2	5/5	100%	7
VEB	20	4	1	1	4/4	100%	8

**Tableau 28 : Récapitulatif des modèles de résistance de type BLSE.**

L'approche proposée a permis de détecter l'ensemble des modèles acquis de type AmpC qui ont été étudiés (tableau 29). Le choix des peptides est large pour les modèles ACC, CMY, DHA ou FOX comme en témoigne le nombre de biomarqueurs détectés et consensus au sein des modèles respectifs. Concernant ACC, une souche de l'espèce *Hafnia alvei* ayant une résistance naturelle de type ACC-2 a été difficilement détectée tout simplement car cette résistance est chromosomique et a potentiellement une expression induite seulement en présence de  $\beta$ -lactamines. ACC-3 qui a probablement le même comportement et ACC-4 n'ont pas été étudiées. Concernant CMY, il serait nécessaire d'analyser des souches produisant des enzymes de type CMY-1. Concernant MOX, la méthode développée ne comptait que 8 peptides propres à MOX-2. 19 peptides dont 10 peptides propres à MOX-2 n'avaient pas été étudiés car ils étaient communs aux enzymes CMY de type CMY-1 ou FOX. MOX semble plus délicat à détecter mais il serait nécessaire de mettre au point une méthode SRM plus complète et un jeu de souches plus complet pour avoir des conclusions définitives.

Modèles étudiés	Peptides ciblés (propres aux enzymes testées)	Peptides protéotypiques	bio-marqueurs détectés et consensus	Nombre de peptides détectés dans toutes les souches	bio-marqueurs minimum	souches détectées/souches testées	% de détection	Nombre d'enzymes
ACC	22	20	19	20	1	5/5	100%	5
CMY de type CMY-2	22	18	4	12	1	7/7	100%	52
DHA	12	12	7	3	1	6/6	100%	6
FOX	15	12	8	5	1	6/6	100%	9
MOX	25 (8)	3	0	3	1	1/1	100%	8

**Tableau 29 : Récapitulatif des modèles de résistance acquis de type AmpC.**

18 peptides au minimum sont nécessaires pour couvrir les mécanismes enzymatiques principaux de type BLSE et AmpC. Cependant, si l'on veut conforter les résultats, il est préférable de cibler plusieurs peptides par enzyme ce qui augmente le nombre de cibles nécessaires. Il est préférable de cibler plusieurs peptides par enzyme car de nouveaux mutants peuvent apparaître ou ne sont pas encore connus. Quadrupler ou même quintupler le nombre de biomarqueurs est largement compatible avec les capacités de multiplexage des méthodes SRM.

Bien que le mode SRM soit un mode à la fois sensible et spécifique, quelques résultats erronés sont possibles si les méthodes spécifiques ne sont pas correctement validées. Le nombre de données générés montrent les difficultés à retraiter l'information surtout dans le cas de modèles de résistance aussi complexe que ceux abordés. Un traitement un peu plus poussé des résultats a permis d'éliminer quelques faux positifs ou des résultats douteux. Néanmoins, la grande majorité des résultats est en accord avec les rapports d'intensité établis à l'aide des peptides de synthèse.

Il est important de souligner que la recherche de peptides spécifiques des modèles de résistance étudiés a été faite sans aucune étape d'induction, ni antibiotique, ni promoteur de l'expression de ces enzymes n'ont été utilisés.

Les jeux de souches étudiées visaient à mettre au point les méthodes de détection pour couvrir les BLSE et les céphalosporinases de type AmpC et à évaluer la portée de l'approche. Ce premier pas franchi, les résultats devront être confirmés par l'analyse de nouvelles souches mais surtout par un nombre conséquent de souches négatives. Il est important d'évaluer plus de contrôles négatifs notamment pour les biomarqueurs consensuels qui ont été détectés. Le second pas sera une étude clinique en milieu hospitalier ou dans un laboratoire d'analyses microbiologiques.

### 4.3 Mise au point d'un procédé de détection d'au moins un mécanisme de résistance aux carbapénèmes par spectrométrie de masse.

---

Le premier brevet (partie 5.1) a une visée conceptuelle, le brevet présenté ci-après a une visée d'approfondissement des mécanismes de résistance aux carbapénèmes. Ce brevet vise à couvrir par le procédé proposé les mécanismes majeurs de résistance aux carbapénèmes et a fait l'objet d'un dépôt en avril 2011. Le brevet complet est consultable dans l'annexe électronique.

#### 4.3.1 Aspect conceptuel

---

Les carbapénèmes sont les antibiotiques les plus puissants de la classe des  $\beta$ -lactamines et sont restreints à un usage en dernier recours lorsque tous les autres antibiotiques de cette classe et d'autres classes ne sont plus efficaces. Les carbapénémases acquises sont des déterminants de résistance émergeant chez de nombreux pathogènes Gram négatif, incluant les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et des *Acinetobacter*. Les organismes producteurs de carbapénémases (OPC) sont souvent multi-résistants ou encore pire pan résistants. Comme les BLSE, mais de manière encore plus prononcée, la détection rapide des OPC offre une des meilleures solutions pour améliorer le dépistage et la prise en charge des patients dans les cas sévères, pour améliorer les pratiques de contrôle des infections à l'hôpital ainsi que pour limiter l'usage inappropriée d'antibiotiques. De ce fait, la détection rapide des OPC prolongera



l'efficacité de ces antibiotiques de dernière ligne. Un isolement rapide des patients porteurs d'OPC permet ainsi d'éviter une diffusion du pathogène par transmission nosocomiale.

En stratégie de dépistage, les tests phénotypiques sont favorisés par leur coût. Cependant, aucune méthode standardisée ne s'est imposée. Les tests se sont appuyés sur les différents comportements aux inhibiteurs des OPC, mais des faux positifs par manque de spécificité sont fréquents. La mesure spectrophotométrique de l'hydrolyse des carbapénèmes est considérée comme une méthode de référence pour détecter la production de carbapénémase d'OPC suspecté [169]. Cependant, elle est réservée aux laboratoires de référence qui maîtrisent ces essais laborieux. Les méthodes moléculaires, dont la PCR multipléexée, permettent de mettre en évidence les gènes codant pour les carbapénémases mais le coût de ces méthodes limite leur utilisation. L'objet de ce brevet est de proposer une approche universelle pour la détection et l'identification de protéines caractéristiques des mécanismes de résistance aux carbapénèmes et notamment les carbapénémases.

#### 4.3.2 Interprétation des exemples

---

La grande majorité des carbapénémases acquises appartiennent à 3 des 4 classes de  $\beta$ -lactamases que comptent la classification d'Ambler, à savoir la classe B d'Ambler regroupant les métallob- $\beta$ -lactamases et les carbapénémase de la classe A et D. Lors du dépôt en avril 2011, les exemples des enzymes KPC pour la classe A et des enzymes NDM pour la classe B ont été décrits. Un an plus tard, les enzymes GES complètent la classe A, les enzymes VIM et IMP complètent la classe B et les enzymes du groupe OXA représentent la classe D. Deux exemples de résistance chromosomique à savoir IND et SME complètent le dépôt.

##### 4.3.2.1 Enzymes de type KPC

---

*Se référer à l'exemple 7 du brevet.*

Les enzymes de type KPC sont des carbapénémases plus spécifiques à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Cela explique peut être en partie la forte homologie que compte les 12 enzymes de la famille (97.95% d'identité). Pour cet exemple, douze souches de l'espèce *K. pneumoniae*

ont été étudiés. Parmi elles, 3 produisent KPC-3, 2 souches produisent KPC-2, 1 souche produit KPC-1 et les 6 autres souches ne produisent pas d'enzyme de type KPC. La méthode mise au point cible 15 peptides spécifiques des KPC. Les données ont été retraitées à l'aide la méthode 2 (partie 6.3.2) et ont permis de mettre en évidence 7 peptides (Tableau 30).

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 12 enzymes de type KPC	fréquence de détection (6 souches testées)
1	AAVPADWAVGDK	2f	100%	100%
2	APIVLAVYTR	2f	100%	100%
3	ELGGPAGLTAFMR	2f	100%	100%
4	GFLAAAVLAR	2f	100%	100%
5	LTLGSALAAPQR	2f	100%	100%
6	NALVPWSPISEK	2f	67%	100%
7	SQQQAGLLDTPIR	2f	100%	100%

**Tableau 30 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type KPC.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type KPC. Elles sont de la classe 2f, ces enzymes hydrolysent préférentiellement les carbapénèmes.

Il est important de souligner que le fait d'utiliser des critères tels que les trois transitions d'un peptide supérieures au seuil de positivité permettent de limiter les résultats faussement positifs. La présence de 6 témoins négatifs est là pour évaluer la spécificité des peptides sélectionnés. Aucun des 15 peptides n'est détecté dans les 6 témoins négatifs avec les critères établis. En contrepartie, un peptide qui se fragmente préférentiellement en deux fragments ne passera pas les critères définis si par exemple la troisième transition est en dessous du seuil de détectabilité. Ces critères ont tendance à favoriser quelques résultats faussement négatifs. Dans cet exemple, c'est le cas du peptide SIGDTTFR. L'ion fragment y6 est ultra-majoritaire. Si l'on représente l'aire du peptide par la somme des aires des trois transitions, l'aire de l'ion fragment y6 représente 93 à 96% de l'aire du peptide selon les échantillons. L'aire de l'ion fragment y7 ne représente que 0.4 à 1.2% de l'aire du peptide selon les échantillons et se retrouvent en dessous du seuil de positivité fixé arbitrairement à 2000 pour les valeurs basses. D'après les critères établis dans l'exemple pour éliminer les résultats faussement positifs, le

peptide SIGDTTFR n'a que deux transitions positives dans les six échantillons testés mais aucune dans les témoins négatifs. Dans ce cas précis, diminuer le nombre de transition positive de 3 à 2 aurait permis de mettre en évidence ce peptide. Mais ce critère pourrait atteindre ses limites pour d'autres échantillons, d'autres peptides ou pour d'autres concentrations. La méthodologie proposée de validation de la détection des peptides s'avère inadaptée surtout dans le cas de fragmentation atypique. Néanmoins, elle permet tout de même de mettre en évidence 7 biomarqueurs des enzymes de type KPC dont 6 sont communs à l'ensemble des KPC.

#### 4.3.2.2 Enzymes de type NDM

*Se référer à l'exemple 6 du brevet.*

265 positions des 270 acides aminés que comptent les enzymes de type NDM sont conservés formant 7 enzymes différentes. Cette famille a une forte homologie. En revanche, seulement 17 peptides tryptiques sont présents dans les séquences, le choix de peptides tryptiques potentiellement protéotypiques est restreint. 8 peptides issus de l'hydrolyse théorique à la trypsine de NDM-1 ont été retenus pour cibler 9 souches productrices de NDM-1. Les données ont été retraitées à l'aide de la méthode 2 (partie 6.3.3) et ont permis de mettre en évidence 4 peptides (Tableau 31).

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 7 enzymes de type NDM	fréquence de détection (9 souches testées)
1	AAITHTAR	3a	100%	78%
2	AFGAAFPk	3a	100%	100%
3	FGDLVFR	3a	100%	100%
4	QEINLPVALAVVTHAHQDK	3a	100%	44%

**Tableau 31 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type KPC.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type KPC. Elles sont de la classe 3a, ces enzymes hydrolysent préférentiellement les carbapénèmes.

Sur les 8 peptides ciblés, 4 sont protéotypiques. Deux peptides s'avèrent plus sensibles et sont détectés dans les 9 souches testées. Le peptide 1 est très hydrophile, il est faiblement retenu

sur la colonne. Le peptide 4 est très hydrophobe. Ces deux raisons peuvent expliquer leur faible sensibilité. A noter que le peptide N-ter a été ciblé avec sa méthionine en position N-ter : MELPNIMHPVAK. Le clivage de cet acide aminé est courant et peut expliquer sa non détection. Il serait nécessaire de cibler ce peptide clivé pour essayer de le détecter. Ce peptide est probablement non répétable à cause de la présence de la méthionine, par contre la présence de proline est souvent favorable en mode SRM.

La détection d'un mécanisme de type NDM est assurée par 4 biomarqueurs dont 2 sont plus sensibles.

#### 4.3.2.3 Enzymes de type GES

Se référer à l'exemple 10 du brevet.

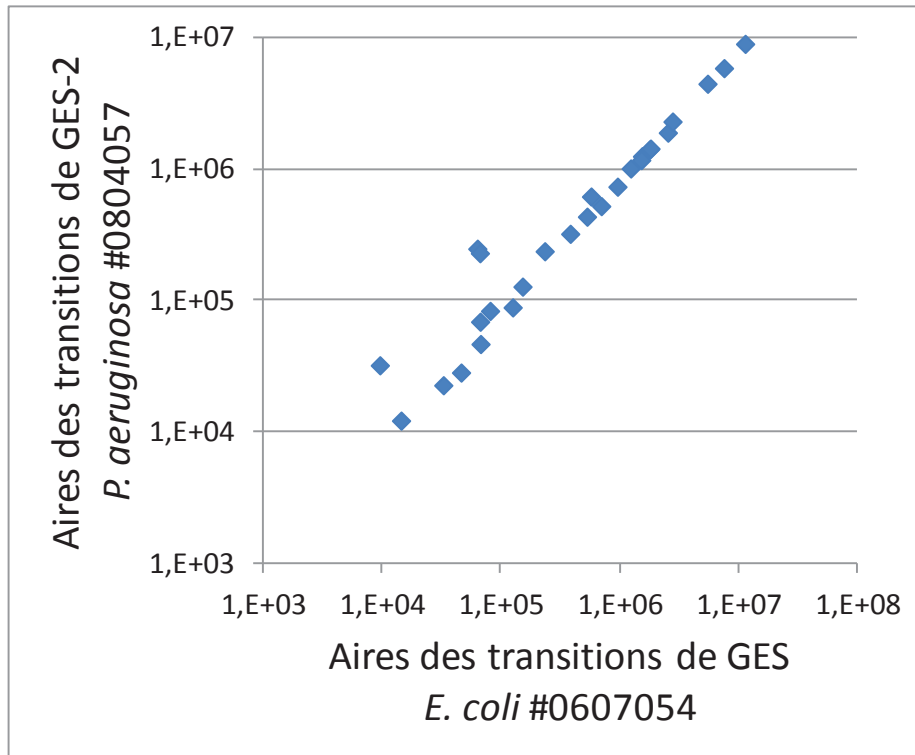
La famille de type GES comporte 17 enzymes différentes avec une très forte homologie. L'identité au sein de la famille est de 96.516%. La méthode mise au point vise à cibler 25 peptides caractéristiques des GES. Deux souches produisant une enzyme de type GES ont été étudiés : 1 *E. coli* et 1 *P. aeruginosa*.

Les données ont été retraitées à l'aide de la méthode 3 (partie 6.3.3). L'étude a permis de mettre en évidence 9 peptides qui ont été retrouvés dans les 2 souches testées comme le tableau 32 le résume.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 17 enzymes de type GES	fréquence de détection (2 souches testées)
1	DTTPIAMAR	2f	100%	100%
2	DWVVG EK	2f	100%	100%
3	IDSGTER	2f	100%	100%
4	IGDSVSR	2f	100%	100%
5	LSAVER	2f	100%	100%
6	LSYGPDMIV EWSPATER	2f	65%	100%
7	NDIGFFK	2f	100%	100%
8	VLYGGALTSTSTHTIER	2f	100%	100%
9	WLIGNQTGDATLR	2f	100%	100%

**Tableau 32 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type GES.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type GES. Elles sont de la classe 2f, ces enzymes hydrolysent les carbapénèmes. GES-1, au contraire des autres membres de la famille GES, hydrolyse faiblement l'imipénème et est classée céphalosporinase. (54)

Etant donné le nombre de peptides détectés, il est possible d'évaluer la corrélation des aires entre les deux échantillons testés. Un graphe à l'échelle logarithmique est représentée figure X.



**Figure 22 : comparaison des aires des transitions de la protéine de type GES de *P. aeruginosa* #0804057 et de *E. coli* #0607054 à échelle logarithmique**

Nous avons vu que la proportion est conservée entre les différentes transitions des différents peptides (4.2.2.4 et 4.2.2.7), ce graphe semble montrer que c'est également le cas pour GES. Seul le peptide IDSGTER ne corrèle pas avec l'ensemble des autres peptides. Ce peptide élu à proximité du volume mort du système, sa quantification est potentiellement faussée et n'est pas répétable dans les conditions testées. Ce peptide doit être écarté. Ces résultats sont préliminaires compte-tenu que deux souches ont été testé, mais sont très encourageants.

La détection d'un mécanisme de type GES est assurée par 8 biomarqueurs dont 7 sont communs à l'ensemble de la famille GES.

#### 4.3.2.4 Enzymes de type SME

Se référer à l'exemple 11 du brevet.

Les enzymes de type SME sont chromosomiques et propres à l'espèce *Serratia marcescens*. 3 mutations forment les 3 enzymes connus à ce jour. La méthode mise au point permet de cibler 20 peptides caractéristiques des enzymes de type SME dont 16 peptides sont communs aux 3 enzymes. Un total de 5 souches est testé dont 2 produisent SME-1 et 3 produisent SME-2. La méthode d'intégration qui a été utilisée est la méthode 2 décrite dans la partie 6.3.2. L'ensemble des résultats obtenus ont été repris à l'aide de la méthode 3 et ces résultats sont résumés dans le tableau 33 ci-après.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 3 enzymes de type SME	fréquence de détection (6 souches testées)
1	ASVPADWVVGDK	2f	100%	100%
2	AVANSLNK	2f	100%	100%
3	DLEYHSPITTK	2f	67%	100%
4	FLGGPEGMTK	2f	100%	80%
5	GFLAAAVLER	2f	100%	100%
6	LALGNVLNAK	2f	100%	100%
7	LEEDFDGR	2f	100%	80%
8	SIGDNEFR	2f	100%	20%

**Tableau 33 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type SME.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type SME. Elles sont de la classe 2f, ces enzymes hydrolysent préférentiellement les carbapénèmes.

La détection d'un mécanisme chromosomique de type SME est assurée par 8 biomarqueurs dont 5 ont pu être détectés dans les 6 souches testées. La forte homologie pour ce mécanisme fait que 4 peptides détectés dans toutes les souches testées pourraient permettre de détecter les 3 variants connus.

#### 4.3.2.5 Enzymes de type IMP

---

Se référer à l'exemple 17 du brevet.

42 enzymes sont répertoriées sur le site Lahey Clinic en décembre 2012. (42) En décembre 2011, au moment de l'étude, 26 séquences de cette famille étaient disponibles. La variabilité génétique au sein de cette famille est forte, seulement 53.659% d'identité est observée entre les 26 enzymes. En revanche, le spectre d'activité est identique entre les différentes enzymes. La méthode mise au point pour couvrir l'ensemble des 26 enzymes cible 46 peptides.

10 souches ont été testées sans aucun contrôle négatif supplémentaire. Les espèces représentées sont 2 *A. baumannii*, 1 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 4 *P. aeruginosa* et 1 *P. putida*. 8 enzymes différentes sont représentées. Dans le cas de modèle fortement muté, chaque échantillon peut être un témoin négatif vis-à-vis d'un peptide donné. Le nombre de témoin négatif s'élève de 2 à 10 selon les peptides testés dans la méthode. Les données ont été retraitées à l'aide de la méthode 3 (partie 6.3.3). L'étude a permis de mettre en évidence 15 peptides comme le tableau 34 le résume. Pour ces 15 biomarqueurs, le nombre de témoin négatif s'élève de 5 à 9 selon le nombre de résultat positif par biomarqueur testé.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 26 enzymes de type IMP	fréquence de détection (souches détectées / souches testées théoriquement positives)	
1	GDASLMK	3a	4%	100%	1/1
2	LTLEQAVK	3a	31%	100%	4/4
3	LTWEQAVK	3a	23%	100%	1/1
4	LVNWFVER	3a	42%	75%	3/4
5	LVTWFVER	3a	46%	100%	5/5
6	LVVPSHSEAGDASLLK	3a	8%	100%	2/2
7	LVVPSHSEVGDASLLK	3a	19%	100%	3/3
8	LVVSGHSEIGNASLLK	3a	4%	100%	1/1
9	LVVSSHSEIGDASLLK	3a	19%	100%	3/3
10	NSFGGVNYWLK	3a	8%	100%	2/2
11	NSFSGVSYWLK	3a	31%	33%	1/3
12	SIPTYASELTNELK	3a	23%	50%	1/2
13	TLEQAVK	3a	8%	100%	1/1*
14	TWEQALK	3a	4%	100%	1/1
15	TWEQAVK	3a	31%	100%	3/3

**Tableau 34 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type IMP.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type IMP. Elles sont de la classe 3a, ces enzymes hydrolysent préférentiellement les carbapénèmes. \*le peptide 13 est détecté dans deux autres souches où la séquence issue d'une hydrolyse à la trypsine est théoriquement inattendue.

Les peptides 2, 3, 13, 14 et 15 ont tous été détectés dans les souches où leur détection était attendue. Ces 5 peptides représentent les différentes mutations possibles de l'enzyme IMP. A eux cinq, ils représentent 25 des 26 enzymes de type IMP répertoriés. Il faudrait également détecter une souche avec la séquence LTWEQTVK présente dans IMP-9 pour couvrir l'ensemble des enzymes par cette portion de séquence.

Cependant, deux faux positifs ont été détectés pour la séquence 13 : TLEQAVK. Ces deux faux positifs sont détectés selon les critères établis c'est-à-dire que le temps de rétention des 3 transitions du peptide sont très proches et à proximité du temps de rétention attendu, et surtout que la proportion entre les aires des trois transitions est identique à la proportion entre les aires des transitions du peptide de synthèse. La spécificité de la séquence a été vérifiée *in silico*. Le peptide est unique à la famille des enzymes de type IMP. De manière surprenante, les



deux faux positifs proviennent des 2 souches qui expriment le plus la séquence 2 : LTLEQAVK. L'hypothèse qui devra être vérifiée pour utiliser la séquence 13 comme biomarqueur est que les deux faux positifs observés sont dus à une hydrolyse imparfaite. Cette hypothèse est probable puisque la trypsine utilisée dans les expériences est une trypsine porcine qui a une activité chymotrypsique résiduelle. En effet, la chymotrypsine coupe favorablement les acides aminés Y, W, P et L. La séquence TLEQAVK pourrait être issue de cette activité résiduelle et elle serait observée dans les deux souches où la quantité d'IMP est plus forte d'après la quantité observée du peptide 2. Dans ce cas, le résultat ne serait pas totalement erroné puisque la présence du peptide TLEQAVK traduit la présence de IMP. Seul la nature du variant serait mal interprété.

Par ailleurs, la séquence LVVPSHSDIGDASLLK est observée alors qu'elle ne devait l'être. Cette séquence est identique à la séquence 7 attendue à la différence de la double mutation « DI » à la place de « EV ». Ces deux peptides sont isobariques, le choix des fragments réalisé ne permet pas de les distinguer. Autrement dit, les masses ciblées offrent la possibilité de détecter, simultanément, les deux peptides. En revanche, la séquence 7 était attendue à 17.5 minutes tandis que celle inattendue devait éluer vers 18 minutes. Les 3 peptides sont respectivement observés à 17.33, 17.34 et 17.36 minutes ce qui permet de trancher en faveur de la séquence 7. La séquence isobarique est éliminée du tableau pour faciliter la compréhension des résultats.

La difficulté de ce modèle réside dans le nombre de biomarqueurs nécessaires pour détecter l'ensemble des enzymes de type IMP qui s'élève à 6. Ce nombre serait probablement plus important pour couvrir les 41 enzymes répertoriés et il est préférable de confirmer la présence de l'enzyme par un second peptide par enzyme. Cela est d'autant plus justifié que de nouvelles séquences avec de nouvelles mutations existent probablement et que ces mutations interviennent dans les portions ciblées. Dans ce jeu de souches, les 15 biomarqueurs retenus permettent de détecter de 2 à 5 peptides par souche.

#### *4.3.2.6 Enzymes de type VIM*

---

*Se référer à l'exemple 19 du brevet.*

37 enzymes sont répertoriées sur le site lahey clinic (<http://www.lahey.org/Studies/>) en décembre 2012 [42]. Au moment de l'étude, en décembre 2011, 26 séquences de cette famille étaient disponibles. La variabilité génétique au sein de cette famille est forte, seulement 62.782% d'identité est observée au sein des 26 enzymes. Il est possible de grouper les 26 enzymes en 2 clusters et une séquence orpheline : le cluster VIM-1 avec 86.466% d'identité en son sein, le cluster VIM-2 avec 88.782% d'identité en son sein et la séquences orpheline VIM-7 (74% d'identité avec VIM-2). Le spectre d'activité est identique entre les différentes enzymes. La méthode, mise au point pour couvrir l'ensemble des 26 enzymes, cible 31 peptides. 6 souches ont été testées représentant 2 *Acinetobacter*, 2 *E. coli*, 1 *K. pneumoniae* et 1 *P. aeruginosa*. 4 enzymes différentes sont représentées. Les enzymes VIM-1 et VIM-2 ayant deux représentants. Les résultats présentés dans le brevet ont été retraités avec la méthode 2. Mais une erreur dans le retraitement a limité le nombre de biomarqueurs détectés. Les résultats ont été repris et corrigé à l'aide de la méthode 3 (partie 6.3.3). L'étude a permis de mettre en évidence 10 peptides comme le tableau 35 le résume.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 26 enzymes de type VIM	fréquence de détection (souches détectées / souches testées théoriquement positives)	
1	AAGVATYASPSTR	3a	81%	17%	1/6
2	AVSTHFHDDR	3a	92%	100%	6/6
3	DGDELLIDTAWGAK	3a	92%	100%	6/6
4	NTAALLAEIEK	3a	92%	100%	6/6
5	QIGLPVTR	3a	100%	100%	6/6
6	SFDGAVYPSNGLIVR	3a	12%	67%	4/6*
7	TSAGNVADADLAEWPTSIER	3a	46%	100%	2/2
8	TSAGNVADADLAEWPTSVER	3a	23%	100%	2/2
9	VGGVDVLR	3a	96%	100%	6/6
10	VLYGGCAVHELRSR	3a	4%	100%	1/1

**Tableau 35 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type VIM.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type VIM. Elles sont de la classe 3a, ces enzymes hydrolysent préférentiellement les carbapénèmes. Le peptide 6 est théoriquement absent des 6 souches car il est précédé d'une glutamine.

La séquence 6 est présente dans les 6 enzymes VIM mais elle n'est pas issue d'une hydrolyse trypsique complète. Dans les 6 enzymes testées, l'acide aminé qui précède ce peptide est une glutamine. La séquence présumée serait détectée dans les 4 souches où la quantité de VIM est la plus importante comme en témoigne la somme des aires des peptides 2, 3, 4, 5, et 9. Soit ce peptide est issu d'une hydrolyse imparfaite, soit ce résultat est un faux positif. Un spectre de fragmentation et le test de souches contrôles négatives pourraient permettre d'appuyer l'une des deux hypothèses.

Si la détection du peptide 6 est exacte, la détection d'un mécanisme de type VIM est assurée par 10 biomarqueurs dont 5 sont fortement consensuels et détectés dans toutes les souches testées.

#### 4.3.2.7 Enzymes de type OXA-48

---

*Se référer à l'exemple 18 du brevet.*

La famille OXA est la famille de  $\beta$ -lactamase la plus diversifiée. Elle est caractérisée par une diversité génétique importante et une grande hétérogénéité en terme de spectre d'hydrolyse des  $\beta$ -lactames [170]. Au total, 252 séquences sont répertoriées en décembre 2012. Au moment de l'étude, 162 séquences étaient disponibles en décembre 2011. Un groupe est particulièrement pertinent d'un point de vue clinique. Il s'agit du groupe OXA-48. Ces enzymes sont portées par un plasmide, elles se propagent chez les entérobactéries et le spectre d'hydrolyse des enzymes du groupe est étendu jusqu'au carbapénèmes. L'enzyme OXA-48 fut découverte en 2004. Cinq autres mutants (1 à 5 mutations) découvert plus récemment OXA-162 ; OXA-163 ; OXA-181 ; OXA-204 ; OXA-232 complètent ce groupe [52]. Leur phénotype est similaire à OXA-48 sauf OXA-163 qui a un phénotype tout à fait particulier. Il a une activité d'hydrolyse sur les céphalosporines de dernière génération et son activité sur les carbapénèmes est très faible. 10 souches produisant OXA-48 ont été testées dont 8 *K. pneumoniae* et 2 *E. cloacae*.

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi le groupe OXA-48 (6 enzymes)	fréquence de détection (10 souches OXA-48 testées)
1	ANQAFLPASTFK	2df	100%	30%
2	DHNLITAMK	2df	67%	30%
3	IPNSLIALDLGVVK	2df	100%	80%
4	ISATEQISFLR	2df	67%	100%
5	QAMLTEANGDYIIR	2df	100%	90%
6	QQGFTNNLK	2df	100%	90%
7	SWNAHFTEHK	2df	100%	90%
8	VLALSAVFLVASIIGMPAVAK	2df	100%	20%
9	YSVVPVYQEFAR	2df	100%	60%

**Tableau 36 : récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type OXA-48.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes du groupe OXA-48. Elles sont de la classe 2df, ces enzymes hydrolysent les pénicillines et faiblement les carbapénèmes.

Une analyse théorique des 162 séquences disponibles de la famille OXA, nous indique que 105 enzymes ont un phénotype étendu aux carbapénèmes. 196 cibles potentielles, dont la taille est comprise entre 7 et 21 acides aminés, sont spécifiques de ce phénotype étendu. De 9 à 17 peptides potentiels sont détectables par enzyme du phénotype 2df. Par ailleurs une méthode SRM a été mise au point pour cibler les 162 séquences disponibles par l'intermédiaire de 452 peptides compris entre 5 et 21 acides aminés.

Pour ce qui est de l'exemple du brevet, 12 peptides avaient entre 7 et 21 acides aminés. La méthode SRM a pu être mise au point pour cibler ces 12 peptides. 9 peptides ont été détectés dans les souches testées et sont résumés dans le tableau 36. 6 peptides détectés dans plus de 50% des souches testées. 4 peptides détectés dans 90% des souches. 1 seul peptide détecté dans 100% des souches testées. Si le seuil de positivité est abaissé à 1500 au lieu de 2000, ce qui peut correspondre à de vrais pics lorsque le signal est peu impacté par les interférences, le nombre de peptides détectés dans la souche où un seul peptide avait été détecté passe à 3. Les autres résultats sont inchangés sauf le peptide 1 qui est détecté dans 30% à 60% des souches. Cela montre la nécessité de valider la détection des peptides lorsqu'une transition a un signal en limite de détection.

La détection théorique des autres enzymes OXA de phénotype 2df semble possible à condition que le taux d'expression soit au moins aussi important que celui des souches testées produisant l'enzyme OXA-48.

En revanche, la distinction entre le phénotype 2d et 2de est impossible dans la majorité des cas, cela doit probablement s'expliquer par le fait que ce sont des mutations ponctuelles de séquences 2d qui forment les enzymes du phénotype 2de.

#### 4.3.2.8 Enzymes de type IND

14 enzymes de type IND sont identifiés chez *Chryseobacterium indologenes* en décembre 2012. En décembre 2011, au moment de l'étude, 7 séquences étaient disponibles [42]. Les séquences sont très hétérogènes de 28.5% d'identité entre IND-4 et IND6 à 99% d'identité entre IND2 et IND-2a [171]. Il s'agit très probablement d'une résistance naturelle [172]. Pour ce jeu, 5 souches de l'espèce *C. indologenes* produisant une enzyme de type IND ont été étudiées. La méthode SRM a été développée pour cibler 62 peptides propres aux IND. Les données ont été retraitées à l'aide de la méthode 3 (partie 6.3.3) et ont permis de mettre en évidence 8 peptides (tableau 37).

Numéro peptide	Séquence peptidique	Intérêt Clinique	fréquence théorique parmi les 7 enzymes de type IND	fréquence de détection (souches détectées / souches testées théoriquement positives)	
1	AATDLGYIK	3a	14%	100%	1/1
2	ASLVIPGHDEWK	3a	14%	100%	1/1
3	ATSTEIIK	3a	71%	100%	4/4
4	EANVEQWPK	3a	29%	100%	1/1
5	TATDLGYTGEANVK	3a	29%	100%	2/2
6	TFGVFDGK	3a	14%	100%	1/1
7	VLDGGCLVK	3a	43%	100%	2/2
8	YNVLDGGCLVK	3a	57%	50%	1/2

**Tableau 37 : Récapitulatif des peptides détectés pour les enzymes de type IND.** Chaque peptide est protéotypique des enzymes de type IND. Ils sont tous spécifiques du phénotype 3a. Ces enzymes représentés par ces peptides hydrolysent les carbapénèmes.

4 souches sur 5 ont pu être détectées avec ces 8 peptides. De 2 à 5 peptides ont été détectés dans ces 4 souches. Le peptide 3 est absent de la cinquième souche par mutation et n'a pu être détecté. Aucun peptide n'a pu être détecté dans cette cinquième souche. La détection de ce modèle est assurée par 8 biomarqueurs et a permis de détecter 80% des souches testées. La résistance aux carbapénèmes est intrinsèque à l'espèce. La difficulté à détecter l'enzyme dans la cinquième souche peut être expliquée par la nature intrinsèque de la résistance aux carbapénèmes. En effet, les gènes des enzymes de type IND sont très probablement localisées sur le chromosome [172]. Il est assez fréquent que les résistances de support chromosomique aient une expression inductible.

### 4.3.3 Discussion

---

L'approche proposée a permis de détecter convenablement les carbapénémases de la classe A d'Ambler. Pour KPC et GES, respectivement 6 et 7 biomarqueurs sont consensuels et détectés. Toutefois, seulement deux souches productrices d'enzymes GES ont été testées. De même, l'approche proposée a permis de détecter les metallo- $\beta$ -lactamases. Le nombre de cibles nécessaires est plus important pour VIM et IMP. Pour NDM, deux biomarqueurs consensus sont détectés dans les 9 souches testées. En ce qui concerne la classe D d'Ambler, 4 biomarqueurs de l'enzyme OXA-48 ont été détectés dans toutes les souches à l'exception d'une souche où un seul biomarqueur est détecté. Le groupe OXA-48 majoritairement retrouvés chez les entérobactéries est bien détecté. Il serait nécessaire d'étudier les autres groupes de carbapénémases de la classe D de la famille OXA. Un élément encourageant est que l'analyse théorique de ces groupes est favorable à l'approche à condition que la quantité d'enzyme constitutive soit au rendez-vous. Enfin, en ce qui concerne les deux modèles chromosomiques étudiés, SME est largement décelée grâce à 4 biomarqueurs consensus et détectés tandis que l'enzyme de type IND est plus difficilement détectée, deux biomarqueurs au minimum ont pu être détectés dans quatre souches mais aucun biomarqueur n'a pu être détecté dans la cinquième souche testée. Toutefois, ces deux modèles sont rares et l'identification des espèces suffit à suspecter la présence de carbapénémases.

En résumé, toutes les organismes producteurs de carbapénémases (OPC) acquises ont été convenablement détectés avec 11 biomarqueurs au minimum (tableau 38).

Modèles enzymatiques étudiés	Peptides ciblés (peptides ciblés propres aux enzymes testées)	Peptides protéotypiques	Nombre de biomarqueurs détectés et consensus	Nombre de peptides détectés dans toutes les souches testées	Nombre de biomarqueurs minimum	Nombre de souches détectées/ testées	Pourcentage de détection	Nombre d'enzymes
KPC	15	7	6	7	1	6/6	100%	12
NDM-1	8	4	2	2	1	9/9	100%	7
OXA-48 groupe	12	9	0	1	1	10/10	100%	6
VIM	31	10	1	8	1	6/6	100%	26
IMP	46	15	0	12	6	10/10	100%	26
SME	20	8	4	5	1	5/5	100%	3
GES	25	8	7	8	1	2/2	100%	17
IND	65	8	0	0	1	4/5	80%	7

**Tableau 38 : Récapitulatif des modèles de résistance de type carbapénémase.**

L'impact notoire de la détection de ces mécanismes serait la détection rapide des mécanismes de résistance aux carbapénèmes dans les infections communautaires mais surtout dans les infections nosocomiales des unités de soins intensifs et dans l'ensemble de l'hôpital. Pour cela, la détection pourrait être envisagée après l'hémoculture ou après culture rapide d'isolats issus de cathéters, de prothèses, de pus profonds. Il serait d'ailleurs intéressant de comparer le taux d'expression des enzymes présentes dans les échantillons issus d'hémoculture ou de culture rapide au taux d'expression des enzymes présentes, avec un protocole standard d'isolement, sur boîte de Pétri. Deux problèmes majeurs sont soulevés pour une détection rapide, à savoir le traitement des hémocultures ou des cultures rapides pour collecter les micro-organismes et le protocole de lyse-digestion qui doit être inférieur à l'heure. Sans oublier la contrainte inhérente à la spectrométrie de masse qu'est la sensibilité. Dans un premier temps, il apparaît important d'évaluer les biomarqueurs identifiés avec les souches actuelles de l'hôpital. L'ensemble des biomarqueurs de carbapénémases serait compilé dans une seule méthode globale. La méthode

serait testée avec le protocole standard de préparation d'échantillon. Cela permettrait aussi de tester un nombre plus important de contrôles négatifs que lors de l'étape de mise au point des méthodes. Dans un second temps, la quantité d'enzyme présente dans les hémocultures serait évaluée en comparaison au protocole standard. Cela nécessite de définir des modèles d'intérêt clinique et de mettre au point la normalisation de la quantité d'enzyme. Dans un troisième temps, une fois les méthodes rapides développées, la recherche de carbapénémases pourrait cibler directement les hémocultures ou les cultures rapides au sein des hôpitaux.

#### 4.4 Mise au point d'un procédé de détection d'au moins un mécanisme de résistance aux glycopeptides par spectrométrie de masse.

---

L'objet de ce brevet est de détecter les mécanismes impliqués dans la résistance aux glycopeptides. Le brevet complet est consultable dans l'annexe électronique.

##### 4.4.1 Contexte

---

Les glycopeptides sont des antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation à un précurseur, le dipeptide D-alanyl-D-alanine. La fixation crée un encombrement stérique qui empêche la formation de la paroi bactérienne. Les glycopeptides sont actifs dans le traitement d'infections à bactéries gram positive. Cette classe d'antibiotiques constitue la dernière ligne de défense effective dans le cas d'infections à SARM ou à entérocoques. Une résistance totale ou partielle à cette famille est apparue chez les Entérocoques (ERV) par une reprogrammation de la cible des glycopeptides. Plusieurs gènes organisés en opéron coopèrent pour modifier le précurseur naturel de haute affinité aux glycopeptides et produire un précurseur de faible affinité. De nombreux types ont été décrits en fonction de la ligase présente dans l'opéron mais ce sont les types VanA et VanB les plus pertinents cliniquement. La vancomycine et la téicoplanine sont des inducteurs de l'expression des gènes de résistance de l'opéron VanA. Un autre fait marquant fut le transfert de l'opéron VanA de l'espèce *E. faecalis* à *S. aureus*. Décrit *in vitro*, les premières souches cliniques furent observées aux Etats-Unis où la prévalence des ERV était forte. Ce phénomène fut alarmant car *S. aureus* est une espèce



fortement pathogène dont la multi-résistance est déjà avérée notamment chez les SARM. Cette émergence de Staphylocoques dorés résistants à la vancomycine fut attribuée à l'utilisation massive de la vancomycine dans les hôpitaux américains. Les entérocoques jouant un rôle de réservoir de résistance mobile pour les staphylocoques. Face à la gravité de cette situation, la surveillance de la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques et les staphylocoques est capitale tout comme l'usage à bon escient de cette classe d'antibiotique. Les mesures de contrôle ont pu être prises pour enrayer la diffusion aux staphylocoques mais le taux d'ERV reste très élevé dans les unités de soins intensifs aux Etats-Unis. D'autres zones endémiques ont pu être observées dans quelques pays européens notamment le Portugal, la Grèce et l'Irlande.

Dans ce contexte, la détection rapide de la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques permet non seulement de prendre les mesures effectives pour limiter la diffusion de la résistance au sein des unités de soins mais aussi de traiter au mieux les patients atteints d'une infection entérococcique. De nombreux milieux chromogéniques offrent de bons résultats, ils sont adaptés à l'analyse de routine des cas suspectés ou pour les études de surveillance mais ces tests nécessitent un test de confirmation. En cas de survenue dans une unité de soins intensifs, la PCR multiplexée offre l'avantage de la rapidité de détection des ERV directement dans les fèces au détriment de la sensibilité et du coût. L'objet de ce brevet est de proposer une approche universelle pour la détection et l'identification des mécanismes de résistance aux glycopeptides et notamment des différents opérons.

#### 4.4.2 Interprétation des exemples

---

Une méthode de détection des enzymes de type Van est proposée après une étape de culture en présence de glycopeptides mais surtout la méthode est proposée après une étape de culture en l'absence de glycopeptides. Cette méthode est aussi appliquée suite à un protocole rapide de préparation d'échantillon.

##### 4.4.2.1 Identification de biomarqueurs des enzymes de type VAN avec ou sans induction

---

*Se référer à l'exemple 8 pour l'identification de biomarqueurs en l'absence de vancomycine et à l'exemple 9 pour l'identification de biomarqueurs en présence de vancomycine.*

Huit types de résistance acquise et un type de résistance intrinsèque sont répertoriés. (90) La méthode développée cible 5 des 8 opérons acquis et l'opéron naturel. Le jeu est composé de 11 souches dont 7 *E. faecalis*, 3 *E. faecium* et 1 *E. gallinarum*. 9 souches expriment un mécanisme de résistance acquis dont 3 souches produisent vanA, 3 souches produisent vanB et 3 souches produisent, respectivement, vanD, E ou G. La souche de l'espèce *E. gallinarum* exprime naturellement une résistance de type VanC1 et la souche ATCC 29212 de l'espèce *E. faecalis* est un témoin négatif. Pour les 3 opérons décrits récemment, VanL, M ou N, les biomarqueurs potentiels sont proposés mais aucune souche n'a pu être testée. Pour cette expérience, les souches ont été cultivées à la fois sur un milieu COS sans antibiotique et sur un milieu VRE qui contient 8mg/L de vancomycine.

La méthode d'intégration qui fut utilisée est la méthode 2 décrite dans la partie 6.3.2. Les peptides sont considérés comme détectés lorsque les trois transitions dépassent un seuil de positivité fixé à 2000 (unité arbitraire) de manière à éliminer les signaux bruités. Lorsque le signal est fortement bruité pour une transition donnée, le seuil de positivité est augmenté pour cette transition de manière à éliminer les résultats faussement positifs. L'ensemble des résultats obtenus est résumés dans le tableau 39 ci-après. Le nombre de témoins négatifs est de 8 pour les biomarqueurs de vanA et B et ce nombre s'élève à 10 pour les biomarqueurs de vanD, E ou G.

Enzymes	Cibles potentielles	Niveau de résistance à la Vancomycine	Niveau de résistance à la Tétracycline	Souches testées	Nombres de peptides détectés	
					sans induction	avec induction
Van A	12	haut	haut	9404059	3	non testé <sup>1</sup>
				0702053	8	9
				0807061	2	7
Van B	7	haut (niveau variable)	sensible	9404060	0	3
				9907071	0	3
				0603069	0	1
Van C1	10	faible	sensible	9006050	0	non testé <sup>2</sup>
Van D	4	modéré	modéré	0511067	3	3
Van E	7	faible	sensible	0511066	0	1
Van G	8	faible	sensible	0511065	2	6

**Tableau 39 : Récapitulatif des peptides détectés des enzymes de type Van dans les différentes souches bactériennes.** Chaque peptide est protéotypique d'une seule enzyme Van. Le niveau de résistance associé à la vancomycine ou à la tétracycline est indiqué pour chaque enzyme. <sup>1</sup>perte échantillon <sup>2</sup>la concentration en vancomycine de 8mg/L présente dans le milieu VRE est supérieure à la CMI de la souche produisant VanC1, la souche n'a pu pousser dans ces conditions.

Aucun peptide n'est détecté dans les différents témoins négatifs testés confirmant la spécificité des méthodes développées. Concernant VanA, la détection a été possible dans les 3 souches testées y compris sans induire l'expression de la ligase. Deux peptides, au minimum, ont été détectés dans les 5 analyses. Concernant VanB et E, la détection de ces types n'est possible qu'après induction. De 1 à 3 biomarqueurs ont été détectés dans les souches testées. La ligase de la souche exprimant une résistance naturelle n'a pu être détectée. Pour VanD, trois biomarqueurs ont été détectés avec et sans induction. Pour ce qui est de vanG, 2 peptides ont pu être détectés sans induire l'expression de la ligase alors que 6 peptides sont détectés avec induction. La littérature indique que tous les opérons sont inductibles sauf VanD qui est seulement constitutif et les types VanC qui peuvent être constitutifs ou inductibles. Les résultats semblent en accord avec l'art antérieur notamment pour VanB et E. Une part constitutive semble être mise en évidence pour VanA et G, mais pour évaluer ce phénomène, il serait

nécessaire de le quantifier. Pour répondre à la question du taux d'expression de la ligase VanA, il convient de normaliser par la quantité de bactéries traitées.

#### 4.4.2.2 *Quantification relative de biomarqueurs des enzymes de type VanA avec ou sans induction*

---

*S'agissant d'un modèle inductible étudié en présence et en absence de vancomycine, l'aspect quantification s'est naturellement imposé pour étudier ce phénomène d'induction. Les résultats présentés ci-après ne font pas partie du brevet déposé en avril 2012. Deux expériences seront succinctement détaillées et comparées : une expérience « B » reprenant les résultats de la partie VanA du brevet (partie 4.4.2.1) et une étude similaire antérieure, expérience « A ».*

Nous avons vu que les méthodes de quantification de référence font appel au principe de dilution isotopique (partie 3.3.4). Toutes ces techniques nécessitent l'usage de réactifs spécifiques. Le but ici n'est pas de mesurer la quantité absolue mais d'avoir une estimation de la quantité relative des enzymes entre les échantillons. Des méthodes sans marquage ont également été proposées. Elles sont moins précises mais elles peuvent permettre d'estimer la quantité présente. Premièrement, il est nécessaire de normaliser chaque échantillon par la quantité réellement traitée. Les protéines de ménage qui sont exprimés de manière stable entre différents états et qui sont présentes en forte concentration sont de bons candidats. Les protéines de structure, les enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire ou encore les protéines ribosomales ont été proposées. Deuxièmement, il est nécessaire de s'assurer que le peptide détecté est celui ciblé et que sa détection est comparable d'une souche à l'autre.

Expérience A : Dans cette expérience, 7 peptides VanA ont été ciblés par 3 transitions. Aucune optimisation, excepté le choix des transitions, n'a été réalisée pour faciliter la détection des peptides VanA car les peptides de synthèse n'étaient pas encore synthétisés. Dans la méthode SRM, 29 peptides représentant majoritairement des protéines ribosomales ont, simultanément, été ciblés.

Expérience B : Dans cette expérience, 12 peptides VanA ont été ciblés par 3 transitions. L'optimisation de l'ensemble des potentiels du spectromètre de masse décrite dans la partie 6.2

a été réalisée pour les 12 peptides à l'aide de peptides de synthèse. Dans la méthode SRM, 28 peptides représentant majoritairement des protéines ribosomales ont, simultanément, été ciblés.

Les deux méthodes SRM ont été appliquées sur le même jeu de souches produisant VanA avec et sans induction. La méthode 3 de retraitement a été utilisée et les résultats sont présentés (tableau 40).

Souches testées	Expérience A: transitions VanA non optimisées		Expérience B: transitions VanA optimisées	
	Nombres de peptides détectés		Nombres de peptides détectés	
	sans induction	avec induction	sans induction	avec induction
#9404059	0	5	3	non testé <sup>1</sup>
#0702053	3	5	8	9
#0807061	2	4	2	7

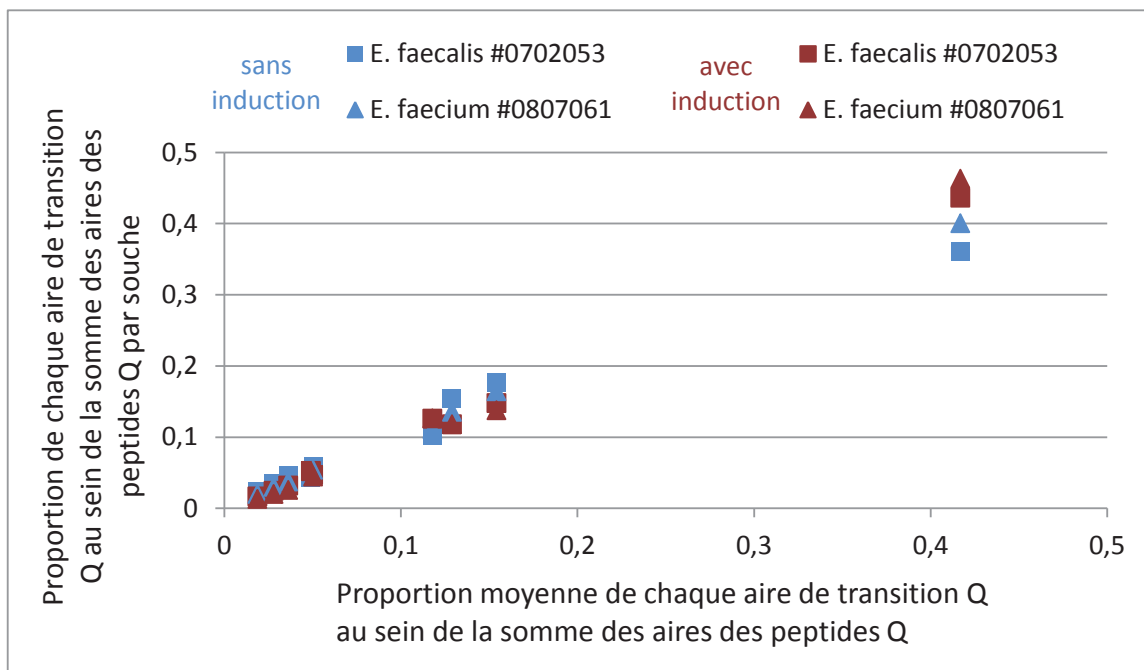
**Tableau 40 : Récapitulatif du nombre de peptide détectés par souche avant optimisation de la méthode pour l'expérience A et après optimisation de la méthode pour l'expérience B.** <sup>1</sup>perte échantillon

Pour les trois souches testées, le nombre de peptides détectés est supérieur en présence de vancomycine au nombre de peptides détectés en absence de vancomycine quel que soit l'expérience. Sans surprise, le nombre de peptides détectés est égal ou amélioré après optimisation de la détection des peptides VanA. Pour la souche #9404059, l'optimisation a permis notamment de rendre possible la détection de l'enzyme VanA sans induction par 3 biomarqueurs. Les résultats semblent clairement indiqués que la détection de l'enzyme VanA est facilitée en présence de vancomycine. Pour évaluer le niveau d'expression de l'enzyme VanA, la détection des protéines de ménage est évaluée pour normaliser les quantités bactériennes réellement traitées. La souche #9404059 est éliminée de la comparaison compte-

tenu qu'une donnée est manquante et que VanA n'a pu être détecté sans induction dans l'expérience A.

Les peptides issus de protéines différentes qui sont exprimés en proportion comparable entre eux semblent de bons candidats pour évaluer la quantité bactérienne traitée. Ces peptides sont qualifiés de peptide « Q » pour peptide de quantification bactérienne. 3 peptides respectant ces conditions ont été sélectionnés dans les deux expériences. Ces 3 peptides sont issus de trois protéines ribosomales différentes : RL29 ; RS19 ; RL22 et sont communs aux trois espèces d'entérocoques testées. L'hypothèse initiale est que les protéines ribosomales sont proportionnelles à la quantité d'entérocoques.

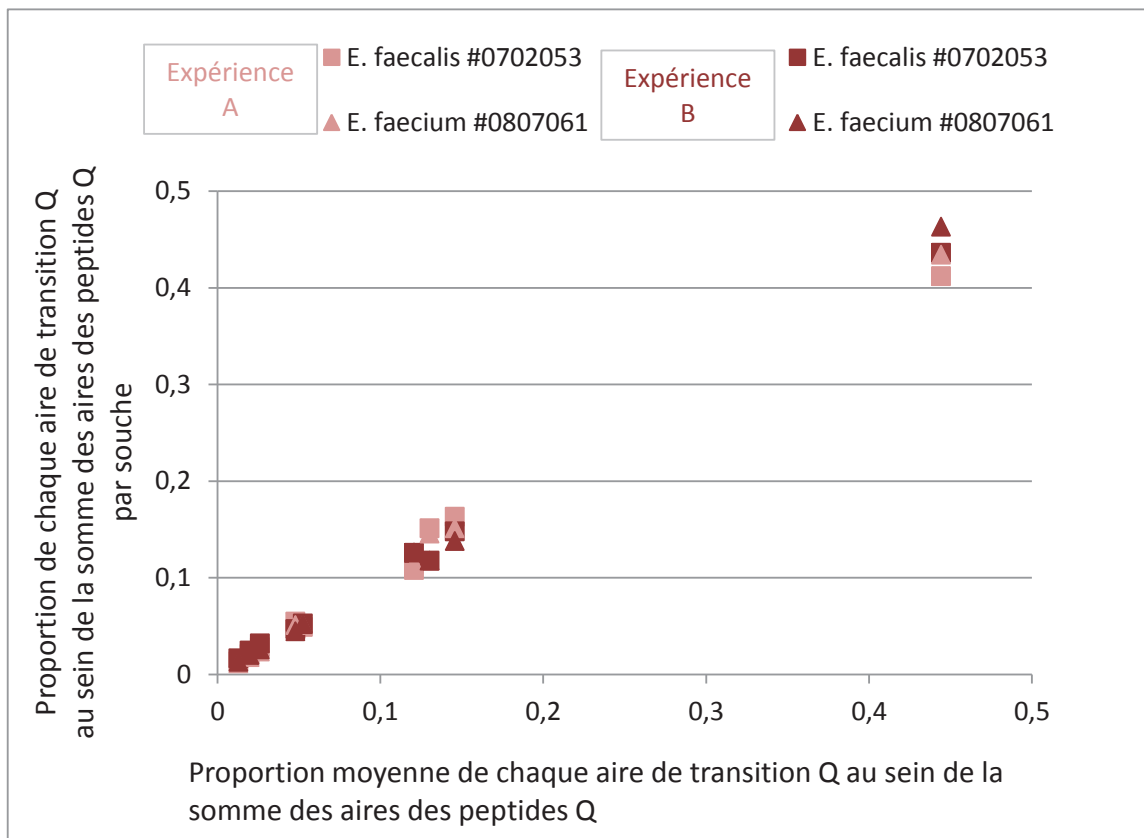
Dans l'expérience B, l'impact des conditions de culture et des souches testées est évalué sur ces peptides Q (figure 23). La proportion que représente chacune des 9 transitions est calculée pour chaque souche ainsi que la proportion moyenne.



**Figure 23 : Comparaison des proportions des transitions Q au sein des peptides supposés représentés la quantité de bactéries traitée dit Q aux proportions moyennes.** Les symboles en bleu correspondent aux souches cultivées sur milieu standard, les symboles en rouge correspondent aux souches cultivées sur milieu incorporé de vancomycine

Cette figure illustre que les proportions des différents peptides sont conservées, à la fois entre la souche de l'espèce *E. faecalis* et la souche de l'espèce *E. faecium* et entre les conditions de

culture avec et sans induction. Les CV des proportions sont compris entre 9 et 24% pour ces 4 analyses. Ces trois protéines représentées par ces trois peptides ont un taux d'expression relativement stable entre les différentes analyses. La somme des aires des 3 peptides Q peut permettre de normaliser l'aire de la ligase VanA dans l'expérience B en faisant l'hypothèse que les protéines ribosomales sont proportionnelles à la quantité d'entérocoques. Pour comparer l'expérience B à l'expérience A, la proportion des 3 peptides Q ainsi que la proportion moyenne sont calculées pour le milieu incorporé de vancomycine (figure 24).

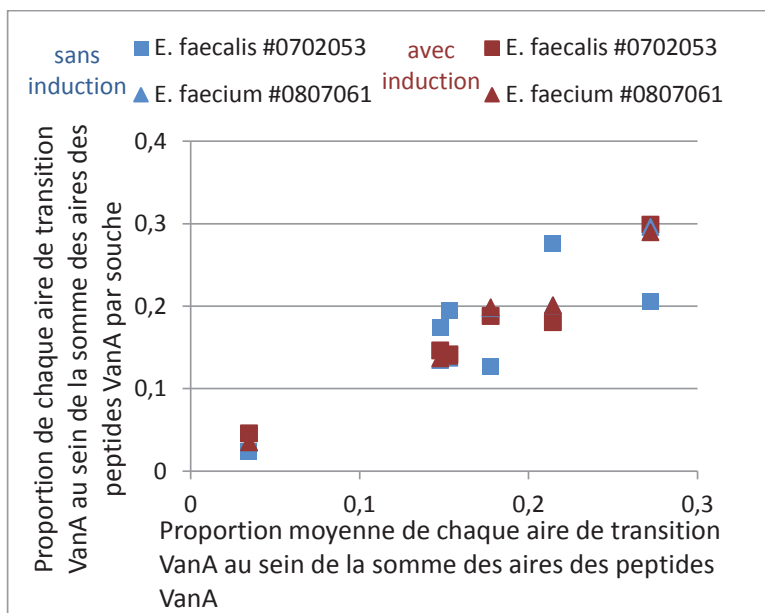
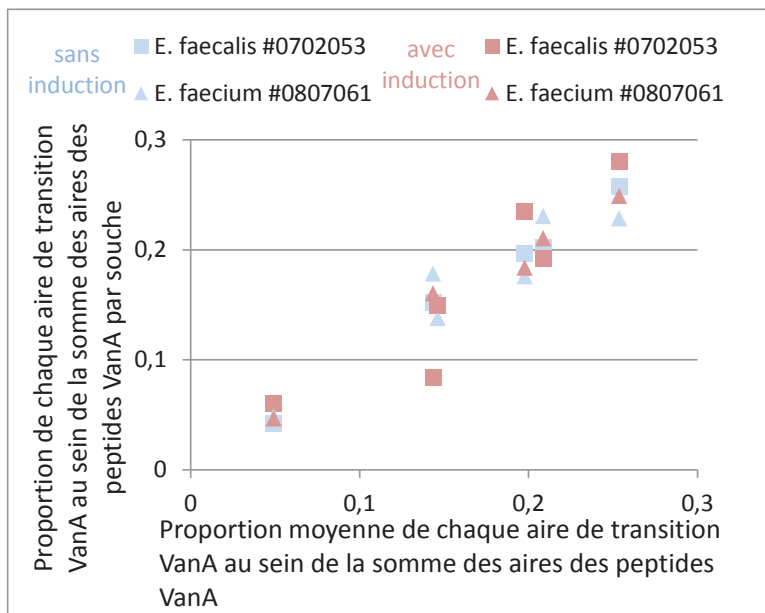


**Figure 24 : Comparaison des proportions des transitions Q au sein des peptides supposés représentés la quantité de bactéries traitée aux proportions moyennes.** Les symboles clairs correspondent aux souches cultivées sur un milieu incorporé de vancomycine et analysées lors de l'expérience A. Les symboles foncés correspondent aux souches cultivées sur un milieu incorporé de vancomycine et analysées lors de l'expérience B.

Comme la figure 24 l'illustre, les proportions sont conservées entre les deux expériences quel que soit les souches testées. Les CV sur les proportions vont de 4 à 15%. Les taux d'expression de ces protéines sont comparables. La somme des aires des 3 peptides Q peut permettre de normaliser l'aire de la ligase VanA dans les deux jeux de données en faisant l'hypothèse que les

protéines ribosomales sont proportionnelles à la quantité d'entérocoques. Une fois, le normalisateur choisi, il est nécessaire d'évaluer quelles transitions de vanA seront utilisées pour évaluer la quantité de l'enzyme. Le choix est limité à 6 transitions puisque deux peptides au maximum ont pu être détectés dans les deux souches des deux expériences (tableau 40).

De la même manière que pour les transitions Q, les comparaisons de proportions des transitions VanA par souche aux valeurs moyennes sont effectuées pour évaluer la qualité de chaque transition (figure 25).





**Figure 25 : Comparaison des proportions des transitions VanA au sein des peptides VanA aux proportions moyennes.** Dans le graphe du haut, les symboles clairs correspondent aux souches analysées lors de l'expérience A. Dans le graphe du bas, les symboles foncés correspondent aux souches analysées lors de l'expérience B.

Les 2 jeux de données ne sont pas exactement comparables car les paramètres instrumentaux pour cibler VanA ont été optimisés à l'aide des peptides de synthèse entre temps. Dans l'expérience A, les CV des transitions vont de 4 à 29%. La valeur haute correspond à la transition dont une valeur est en dehors de la corrélation. Dans l'expérience B, les CV vont de 12 à 25%. Globalement, la proportion entre les transitions VanA est respectée au sein des deux expériences. L'ensemble des transitions est conservé pour évaluer la dispersion des dosages de la ligase VanA.

Pour l'ensemble des données, les codes suivants sont utilisés :

i représente les échantillons :  $i = 1$  à  $n$  ;

j représente les transitions VanA ;  $j = 1$  à  $m$  ;

k représente les transitions Q ;  $k = 1$  à  $l$  ;

VanA  $i, j$  représente l'aire de la transition j d'un peptide VanA pour l'échantillon i ;

Q  $i, k$  représente l'aire de la transition k d'un peptide Q pour l'échantillon i.

La normalisation ( $N_{i,j}$ ) des données en fonction de la quantité de bactéries peut être effectuée par le calcul suivant pour chaque transition et pour chaque échantillon:

$$N_{i,j} = \frac{VanA_{i,j}}{\sum_{k=1}^l Q_{i,k}}$$

Pour accorder le même poids à chaque transition, les valeurs des aires des transitions j sont divisés par la valeur moyenne des aires des transitions j des n échantillons :

$$P_{i,j} = N_{i,j} \frac{n}{\sum_{i=1}^n VanA_{i,j}}$$

Pour faciliter le confort de visualisation, les données sont centrées par la valeur moyenne des aires des transitions k des n échantillons .

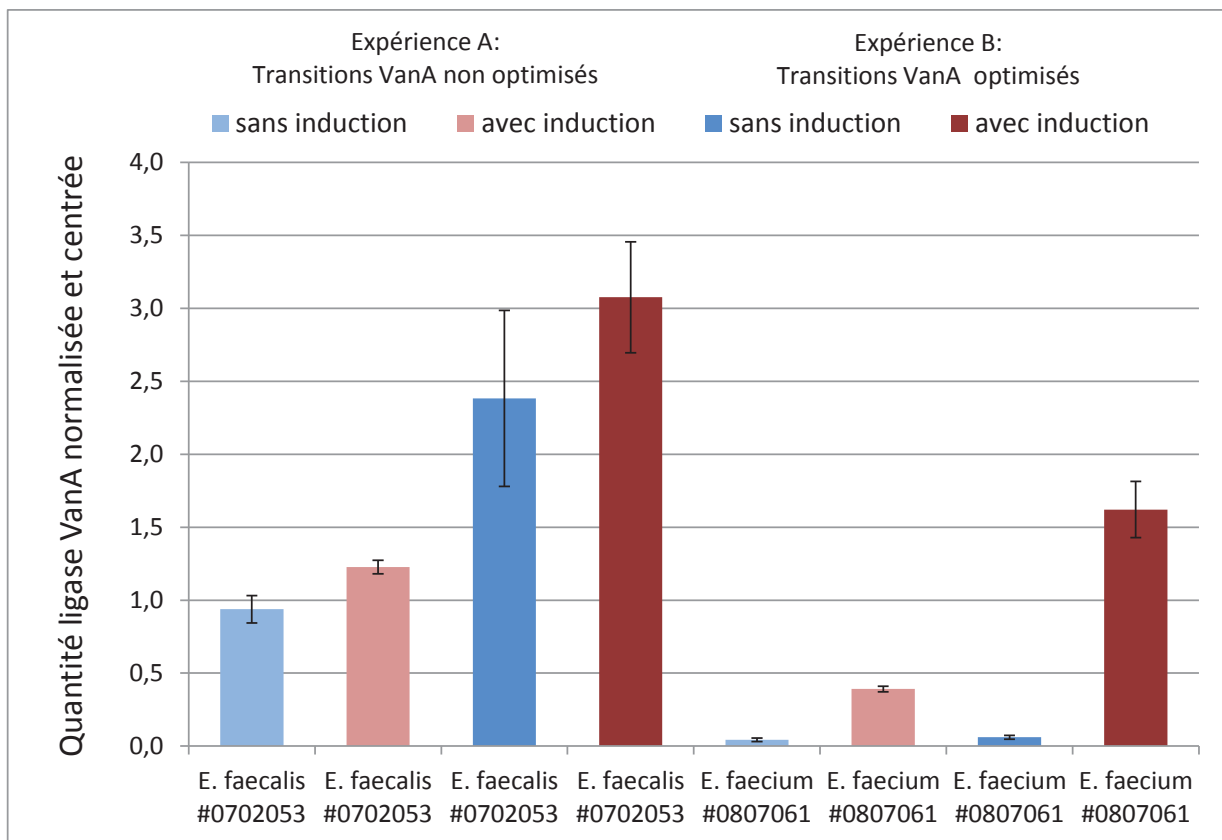
$$C_{i,j} = P_{i,j} \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^l Q_{i,k}}{n}$$

Toutes les transitions ayant le même poids, il est possible de calculer un écart-type analytique au sein de chaque échantillon en calculant l'écart-type entre les 6 transitions. La moyenne ( $M_i$ ) et l'écart-type analytique ( $S_i$ ) de ces transitions peuvent être calculés pour les 8 échantillons :

$$M_i = \frac{\sum_{j=1}^m C_{i,j}}{m}$$

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (C_{i,j} - M_j)^2}{m-1}}$$

Ces valeurs sont représentées dans le graphe (figure 26).



**Figure 26 : Evaluation du niveau d'expression de la ligase VanA avec ou sans induction.** A gauche, les 4 barres représentent l'expérience A où l'optimisation des peptides VanA n'a pu être faite, à droite, les 4 barres représentent l'expérience B où la détection des peptides VanA a été optimisée. Les deux souches ont été cultivées sur un milieu standard pour les barres foncées tandis qu'elles ont été cultivées sur un milieu incorporé de vancomycine pour les barres claires. Les barres d'erreur représentent l'écart-type obtenu grâce à la détection de 6 transitions représentative de la ligase VanA.

Pour chaque expérience, le taux d'induction ( $T_{induction}$ ) de la ligase VanA par la vancomycine peut être calculé pour chaque souche :

$$T_{induction} = \left(1 - \frac{M_{induit}}{M_{non\ induit}}\right) \times 100$$

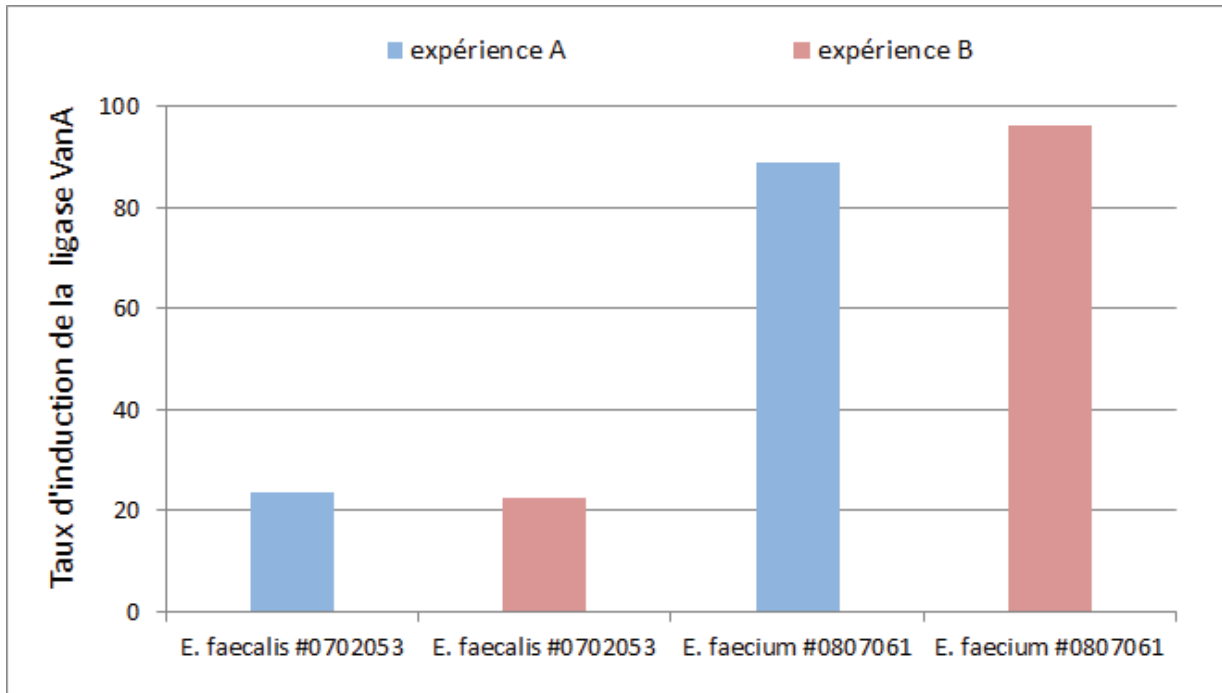
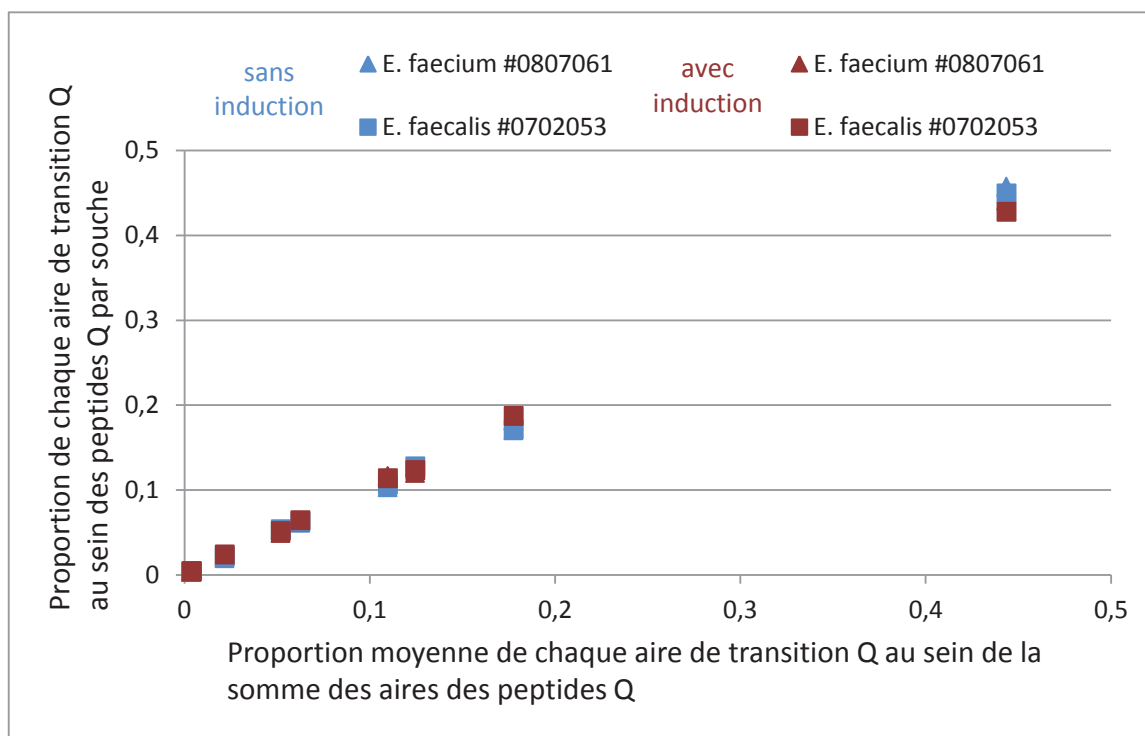


Figure 27 : Taux d'induction de la ligase VanA des souches *E. faecalis* #0702053 et *E. faecium* #0807061 pour les expériences A et B.

Les deux expériences indiquent les mêmes résultats. L'expression de la ligase VanA semble quasiment constitutive pour la souche #0702053 (20% d'induction seulement) alors que l'expression de la ligase VanA semble fortement induite en présence de vancomycine pour la souche #0807061 (plus de 90% d'induction). Par ailleurs, la souche #9404059 n'est pas présentée car une donnée est manquante. Mais l'expérience A semble indiquer le même comportement que la souche #0807061. La ligase VanA n'est pas détectée sans induction alors que le taux d'expression est important après induction. Après induction de l'expression pendant 18 heures de culture, le taux d'expression est du même ordre de grandeur entre les deux

souches. Après induction, la souche #0702053 semble exprimer 2 à 3 fois plus de ligase que la souche #0807061 (figure 26).

Il paraît important de souligner l'impact du choix des normalisateurs. Dans l'expérience B, les données d'identification de peptides avaient été retravaillées et avaient permis de sélectionner d'autres peptides en plus de ceux sélectionnés dans l'expérience A. Parmi eux, 2 peptides nouvellement ciblés et un peptide issu de la sélection précédente sont particulièrement intéressants. En effet, tout comme précédemment, ils sont issus de 3 protéines ribosomales différentes, RS13, RL14 et RL22 mais surtout, la dispersion des transitions dans l'ensemble de l'expérience et dans les souches productrices de VanA en particulier est moindre. Les CV vont de 2 à 8% pour les souches productrices de VanA. Ceci semble indiquer qu'ils sont moins sujets aux interférences que la sélection précédente (figure 28).



**Figure 28 : Comparaison des proportions des peptides supposés représentés la quantité de bactéries traitée : nouvelle sélection de peptides Q.** Les symboles en bleu correspondent aux souches cultivées sur milieu standard, les symboles en rouge correspondent aux souches cultivées sur milieu incorporé de vancomycine.

Il manque clairement des répétitions techniques et biologiques pour conclure sur les niveaux d'expression de la ligase VanA. L'hypothèse faite en préambule sur les protéines

ribosomales ne semble pas trop absurde. Les protéines ribosomales forment avec l'ARN ribosomique le ribosome. Ce complexe est impliqué dans la synthèse des protéines de la cellule. Dans l'expérience, une culture de 18 heures a été réalisée quel que soit le milieu de culture. Ce temps correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance ou au début de la phase stationnaire. En phase stationnaire, le nombre de cellules n'augmente plus. Il y a autant de cellules qui meurent que celles qui se divisent. A ce stade-là, le ribosome doit fonctionner de manière stable. Il est tout à fait probable que la quantité de ribosomes soit similaire entre différentes souches de la même espèce ou entre des espèces très proches qui poussent sur un milieu et dans des conditions identiques. Cibler des protéines de structure ou des protéines du métabolisme énergétique de base pourrait conforter cette hypothèse. Il serait judicieux d'avoir un nombre de peptide Q plus important et représentatif à la fois du cytosquelette du micro-organisme et des enzymes constitutives du métabolisme énergétique de base. Idéalement, ces expériences devraient être confortées par des études transcriptomiques.

La ligase VanA semble être détectée de manière constitutive dans une souche et de manière fortement induite par l'antibiotique dans une autre souche. Ces résultats supposent que la régulation induite par la présence de l'antibiotique est indirecte et qu'elle fait suite à un autre mécanisme. L'accumulation de précurseurs du peptidoglycane avait été supposée pour expliquer la régulation de l'induction [89]. Cependant le signal de régulation qui interagit avec vanS n'est pas encore connu. Le séquençage des opérons, les mesures de l'activité et du taux d'expression de toutes les enzymes de l'opéron ainsi que la mesure quantitative des précurseurs du peptidoglycane pourraient éclaircir le mécanisme de régulation de l'induction.

#### *4.4.2.3 Détection des enzymes de type VAN à l'aide d'un protocole rapide*

---

*Se référer à l'exemple 11 du brevet.*

L'exemple vise à démontrer la possibilité de détecter VanA en utilisant une préparation d'échantillon rapide, ici, en moins de 3 heures. Par ailleurs, l'étape de dessalage par extraction en phase solide proposée sur cartouche jetable dans l'exemple pourrait être remplacée par une extraction en phase solide en ligne sur l'HPLC. Ceci éliminerait les deux heures nécessaires à

cette étape. Cette expérience fut réalisée en comparaison à un protocole standard de digestion. Le protocole standard comprend une lyse chimique à l'aide de la guanidine 6M. La digestion est réalisée sur un temps long de 18 heures à 37°C. Au contraire, la lyse du protocole rapide est physique. Elle dure 5 minutes et elle est réalisée à l'aide de billes et d'ultrasons délivrés par une sonde Hielscher. L'hydrolyse trypsique dure 15 minutes et est réalisée à 50°C. La quantité traitée était inférieure à celle de l'exemple précédent. 10<sup>8</sup> bactéries ont été traitées dans ce cas. Le tableau 41 résume le nombre de peptides détectés dans les 2 souches testées et dans les deux protocoles testés.

Enzymes	Souches testées	Nombres de peptides détectés	
		Lyse chimique Digestion 37°C (18 heures)	Lyse physique Digestion 50°C (15 minutes)
Van A	9404059	0	6
	0702053	6	12

**Tableau 41 : Comparaison de deux protocoles de lyse-digestion.** L'élément de comparaison est le nombre de peptides VanA détecté.

Les résultats sont clairs, il est possible de réduire le temps de préparation d'échantillon sans affecter la qualité des résultats. Au contraire, les résultats sont nettement meilleurs. Pour la souche #9404059, il n'est pas possible de détecter de peptides protéotypiques avec le protocole standard alors que, avec le protocole rapide, la détection de VanA est assurée par 6 peptides. De la même manière, la totalité des peptides ciblés sont détectés avec le protocole rapide tandis que la moitié était détectée avec le protocole standard pour la souche #0702053. Si l'on considère la quantité d'enzyme détectée par la somme des aires des 6 peptides détectés, le facteur d'amélioration de détection entre les deux protocoles est de 190 d'après la souche #0702053. Ces résultats sont absolument surprenants compte-tenu que le gain observé sur les 3 peptides Q ou les 3 nouveaux peptides Q est, respectivement, d'un facteur 3 à 7. Le protocole rapide permet sans doute de mieux lyser la paroi des entérocoques. Ces résultats supposent que l'extraction ou la digestion de la ligase sont nettement améliorées avec le protocole rapide.

La ligase est une protéine membranaire située dans le cytoplasme en périphérie de la membrane cytoplasmique. Il semblerait que le protocole rapide soit favorable aux protéines membranaires associées à la membrane cytoplasmique.

#### 4.4.3 Discussion

---

Les deux opérons les plus pertinents cliniquement sont VanA et VanB, il serait nécessaire de détecter l'opéron VanB sans induction pour proposer un test rapide et universelle de détection des infections à ERV. De toute évidence, le protocole rapide de digestion favorise la détection de la ligase VanA. Ce protocole devra être testé sur les autres types de résistance de manière à évaluer le facteur d'amélioration. Il est possible de supposer que les ligases VanB, C ou E seraient détectées avec ce protocole sans l'étape d'induction à condition qu'une part constitutive existe dans les conditions standards de culture. Toutefois, si la détection de ces modèles n'était toujours pas possible sans induction, d'autres protéines pourraient être ciblées pour mettre en évidence la présence des opérons. Les produits des gènes de régulation pourraient être ciblés. L'activateur transcriptionnel cytoplasmique codé par *vanR* et le capteur membranaire histidine-kinase codé par *vanS* seraient les deux cibles à privilégier dans les opérons respectifs.

Le concept de peptide Q semble montrer qu'il est possible de normaliser la quantité de micro-organismes réellement traitée. Ce concept sera à étudier plus largement et pourra être confronté à des données transcriptomiques. Si ce concept est validé, il pourra permettre de comparer aisément des taux d'expression de différentes protéines de différentes souches de la même espèce ou d'espèces proches. Par ailleurs, ce concept peut permettre de valider les résultats. Le ratio peptide Van sur peptide Q sera interprété si la quantité de peptide Q est suffisante pour que la quantité de peptide Van soit supérieure à la limite de détection. Prenons pour exemple une hémoculture positive où le modèle VanA est suspectée. L'identité du micro-organisme aura été confirmée en amont. Au-delà du seuil de peptide Q, un tel procédé permettrait d'affirmer si le résultat est positif ou négatif vis-à-vis du mécanisme de résistance en question sans réactif spécifique ou contrôle supplémentaire.

## 4.5 IRVT-MS (Identification, Resistance, Virulence, Typing – Mass Spectrometry): the next revolution in microbiology?

---

### 4.5.1 Contexte de l'article :

---

En 2004, les maladies infectieuses furent estimées être la seconde cause de décès dans le monde [173]. La vaccination et les antimicrobiens ont joué et continuent de jouer un rôle clé dans la bataille contre ces maladies infectieuses. Bien qu'elle soit une bactérie commensale des plus communes dans notre flore naturelle, *Staphylococcus aureus* est une bactérie fréquemment rencontrée en maladies infectieuses. *S. aureus* est responsable, d'infections localisées, suppuratives ou systémiques ainsi que de syndromes spécifiques liées à l'activité de toxines. *S. aureus* a la capacité de moduler son activité de synthèse, en fonction de son environnement, en faveur de facteurs d'adhésion ou de facteurs de virulence. *S. aureus* a acquis un véritable arsenal pour échapper au système immunitaire et aux antibiotiques. Longtemps confinée à l'hôpital, la résistance à la méticilline est apparue dans des souches communautaires produisant aussi la toxine de Panton-Valentine responsable d'infections sévères telles que les pneumonies nécrosantes [107,174]. A ce titre, les infections staphylococciques sont un problème de santé publique tant par les facteurs de virulence de la bactérie que par l'émergence de bactéries multi-résistantes.

Les bactériémies, qui représentent l'incapacité du système immunitaire à contenir l'infection au site focal et qui par conséquent entraînent des infections disséminées, sont une cause majeure de morbidité et de mortalité [175]. La bactérie la plus répandue à travers le monde, responsable de bactériémies nosocomiales est *S. aureus* [81,176]. Dans l'union européenne, une étude récente confirme que les SARM sont les bactéries multi-résistantes les plus fréquentes [177].

Dans ce contexte, des mesures doivent être prises pour détecter avec confiance, aussi rapidement que possible, l'agent étiologique mais aussi ses facteurs de virulence et les mécanismes de résistance aux antibiotiques pertinents en particulier pour les bactériémies où le pronostic vital peut être engagé.

L'objet de cet article est d'illustrer l'intégration du concept IRVT par la caractérisation de *S. aureus*, une des espèces capitales en maladies infectieuses, et de montrer comment le



concept proposé pourrait aider à relever les défis cliniques, techniques, organisationnels et économiques qui se posent. Le concept proposé est, en particulier, comparé aux technologies émergentes ou actuellement présentes au sein du laboratoire de microbiologie clinique.

#### 4.5.2 Article :

---

*Article en soumission*

##### **IRVT-MS: the next mass spectrometry revolution in microbiology ?**

Y. Charretier<sup>1,2</sup>, C. Franceschi<sup>3</sup>, O. Dauwalder<sup>4,5,6</sup>, E. Degout-Charmette<sup>1</sup>, G. Zambardi<sup>3</sup>, T. Cecchini<sup>1</sup>, X. Lacoux<sup>7</sup>, P. Dufour<sup>3</sup>, L. Veron<sup>1</sup>, H. Rostaing<sup>8</sup>, V. Lanet<sup>1</sup>, T. Fortin<sup>1</sup>, C. Beaulieu<sup>1</sup>, N. Perrot<sup>3</sup>, D. Dechaume<sup>3</sup>, S. Pons<sup>1</sup>, V. Girard<sup>3</sup>, A. Salvador<sup>2</sup>, G. Durand<sup>3</sup>, F. Mallard<sup>8</sup>, A. Theretz<sup>1</sup>, P. Broyer<sup>8</sup>, S. Chatellier<sup>3</sup>, G. Gervasi<sup>1</sup>, M. Van Nuenen<sup>9</sup>, J. Lemoine<sup>2</sup>, F. Vandenesch<sup>3,4,5</sup>, J.-P. Charrier<sup>1</sup>

1 : Technology Research Department, Marcy l'Etoile, bioMérieux SA, France

2 : ANABIO, UMR 5180, CNRS / Université de Lyon, Lyon-1 (UCBL-1)

3 : R&D Microbiologie, La Balme Les Grottes, bioMérieux SA, France

4 : Centre National de Référence des Staphylocoques, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron F-69677.

5 : Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron F-69677.

6 : INSERM U851, Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine Lyon Est, Lyon F-69008.

7 : R&D ImmunoAssays, Marcy l'Etoile, bioMérieux SA, France

8 : Technology Research Department, Grenoble, bioMérieux SA, France

9: Microbiology unit, bioMérieux Inc. Durham, NC, USA.

**Microbial identification based on Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization – Time-Of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) has been broadly embraced in Clinical microbiology laboratory. Nevertheless, resistance, virulence and typing have not been well addressed by MALDI-TOF. Here, MS in Selected Reaction Monitoring (SRM) mode is proposed to allow a multiplexed characterization of microorganisms in a single analysis. In less than 30min, the SRM method performs microbial identification (I), antibiotics resistance mechanisms detection (R), virulence assessment (V) and brings typing information (T). This IRVT-MS concept is illustrate with the characterization of *Staphylococcus aureus*, one of the paramount Gram positive bacterial species in infectious diseases both in prevalence, severity and resilience.**

Initiated by the visionary work of Catherine Fenselau *et al*<sup>1</sup>, microbial identification using mass spectrometry revolutionizes now in days microbiology analysis. Whole cell mass spectrometry (WC-MS) by MALDI-TOF is a real breakthrough: the methodology is faster, cheaper and more accurate than conventional biochemical tests<sup>2</sup>. As a consequence, mass spectrometry gains rapidly in acceptance in clinical microbiology laboratory<sup>3</sup>. However, not only microorganism identification is central to manage infection in patients. Appropriate treatment selection has ideally been assessed by antibiotic susceptibility testing (AST). In practice this usual test relies on pure culture growth monitoring in presence of antibiotics and results are known days after the treatment initiation. This delay contributes to initial inappropriate therapy which was associated with additional hospitalization costs<sup>4</sup> and higher in-hospital mortality<sup>5</sup>. To overcome this barrier, like conventional methods in the past, MALDI-TOF identification has been performed directly on positive blood culture broths. Wimmer *et al* proposed a strategy including MALDI-TOF identification and usual AST of Gram negative bacteria directly recovered from positive blood cultures<sup>6</sup>. It reduced the time until definitive identification of bacterial species and increased the proportion of patients on appropriate antimicrobial therapy within 24 hours<sup>7</sup>. Results were generated a full day earlier in comparison with conventional methods. However, a few limitations have not been well handle such as Gram positive, anaerobes or yeasts and polymicrobial samples which lead to erroneous results.

We report here a short analytical method enabling a molecular characterization at the protein level of virtually all microorganism classes, compatible with both bacterial suspension and direct recovery from positive blood cultures. With this intention, an ElectroSpray Ionization – Triple-Quadrupole (ESI-QqQ) mass spectrometer operating in Selected Reaction Monitoring (SRM) mode was preferred to a MALDI-TOF. Indeed, MALDI-TOF is perfectly suited to obtain protein profiles for WC-MS, but when different ion species should be specifically detected, SRM seems more adapted. Isobaric ions, undistinguishable using a simple TOF analyzer, may be unequivocally attributed to a particular protein sequence using ion fragmentation and filtrations into a ESI-QqQ in SRM mode<sup>8,9</sup>. SRM is now recognized as a method of choice to target proteic biomarkers thanks to an exquisite sensitivity, a large dynamic range in complex matrixes, a high selectivity and multiplexing capacities<sup>10</sup>. Taking advantage of these analytical performances, the pathological properties of the microorganism will be accurately assessed at the amino acid sequence level using a simple process. Only a generic sample preparation and a conventional bore chromatography separation, hyphenated to the ESI-QqQ, will be necessary.

Due to its medical importance, *S. aureus* was considered of particular interest to demonstrate the utility of the proposed method. Even though it is a commensal bacterium among the more common in our natural flora, *S. aureus* is frequently encountered in infectious diseases. This Gram positive bacterium constitutes a significant public health concern, being responsible for community as well as hospital acquired infections, especially for patients with open wounds or treated with invasive devices. Moreover, *S. aureus* is the major cause of morbidity and mortality in bloodstream infections<sup>11</sup> and more particularly in nosocomial bloodstream infections throughout the world<sup>12</sup>. This public health threat is reinforced by both the existence of drug resistant and virulent strains.

Methicillin Resistance *S. aureus* (MRSA) strains were discovered in 1961<sup>13</sup>. They have rapidly spread in hospitals all around the world and more recently into the community. Thanks to PBP2a, a low affinity binding penicillin protein<sup>14</sup>, these strains developed a crossed resistance to near all  $\beta$ -lactam antibiotics, such as methicillin, oxacillin, and penicillin G. The gene coding PBP2a (*mecA*), is carried by a chromosomal element including others resistance genes. As a consequence, MRSA is the most common, single, multi-drug resistant bacterium in the European Union<sup>15</sup> and the therapeutic choice is frequently restricted to Vancomycin, a nephrotoxic drug. In 2011, a gene variant (*mecC*) with 70% analogy was described<sup>16</sup> and should also be considered. During the last decade, MRSA strains acquired Pantone Valentine Leukocidin (PVL) expression capabilities<sup>17</sup>. *S. aureus* strains producing PVL toxin are traditionally involved in acute primary skin infections<sup>18</sup> but also in serious infections such as necrotizing pneumonia<sup>19</sup>. Other toxins such as TSST-1 and delta lysine have been seen of clinical relevance.

A SRM method was applied in this context, to answer to four main clinical questions with confidence and as quickly as possible, especially for bloodstream infections when vital prognosis may be engaged. Specific proteotypic peptides were designed to target simultaneously each four questions. I-peptides were selected to confirm *S. aureus* identification at a molecular level (ribosomal proteins, bifunctional autolysin, triosephosphate isomerase...). R-peptides, specific to PBP2a (from *mecA* and *mecC* genes), were used to detect MRSA strains. The method was completed by V-peptides characteristic of PVL, delta hemolysin and TSST-1 toxins. Moreover, the presence/absence of all the selected peptides defines a strain pattern, carrying typing information. When a peptide mutation leads to a mass shift, the corresponding peptide becomes undetectable using the original SRM method. Like in Multi-Locus Sequence Typing (MLST)<sup>20</sup>, peptide absence/presence brings typing information and each usually intense peptide may be considered as a T-peptide. Protein A gene (*spa*) is highly mutated, and its analysis is frequently used to characterize *S. aureus* strains<sup>21</sup>. As a result, Protein A peptides are particularly sensitive to strain mutation and may monitor *S. aureus* evolution. Fare-related strains are therefore distinguishable using Protein A peptides and the whole T-peptide pattern. Acquired at no additional cost, this typing information is valuable to suspect or reject nosocomial contamination at the hospital.

The resulting SRM method, built to answer all IRVT questions, multiplex 327 transitions, corresponding to 109 peptides, and 27 proteins in a single experiment (**Supplementary Table 1**). Each peptide is detected using 3 independent assays thanks to 3 SRM transitions (*i.e.* 3 couples of masses formed by the masses of the precursor ion and the masses of 3 of its fragment ions). Following **Figure 1a** workflow, the peptides are generated from whole bacteria using a generic trypsin digestion protocol and resolved using a conventional 2.1 mm bore chromatography before SRM analysis in an ESI-QqQ (**Online method**). All the process may be run in less than one hour: 25min for the sample preparation, plus 34 min for the LC gradient and the ESI-MS analysis.

The built *S. aureus* IRVT-MS method was applied to a train set of 38 different *S. aureus* strains and other *Staphylococci species* (**Supplementary Table 2a and 3a**). According to the transitions intensity and to the observed background, a sub set of 42 peptides was considered as *bona fide* proteotypic peptide and selected for clinical evaluation (**Figure 1b**). SRM having high multiplexing capability, the 327 transitions were still acquired but only 126 transitions were further interpreted. The 42 peptides selection was confirmed using an independent set of 38 *S. aureus* and other *Staphylococci* strains (**Supplementary Table 2b and 3b**). Examples of typical extracted ion mass chromatogram are displayed in **Supplementary Figure 1 to 5**. When present, strong signal were observed for IRT-peptides and weakest signal for V-peptides. Some isobaric interfering ions were also observed, but ruled-out as having only a single

positive transition. Positive peptide detection laid on the simultaneous detection of 3 transitions per peptide and on the conservation of the ratio between the transition areas (Supplementary Figure 6). When multiple peptides were detected for a single protein (*e.g.* PBP2a, PVL), the ratio conservation criteria was extended to all the transitions related to the same protein. In practice, an area covariance between the specimen under study and positive reference samples from the train set was used. The protein was assumed to be detected if the correlation coefficient was up than 0.5 and if the origin of the correlation curve was zero with a p-value < 0.05. All the results were consistent with the molecular and phenotypic tests, except one strain of *S. warneri* harboring a constitutive *mecA* gene, but with no detectable presence of PBP2a by IRVT-MS.

The reproducibility of the IRVT-MS method was verified by 3 independent characterization of 12 strains. All triplicate interpretations were constant (**Supplementary Table 3e**). To note, the addition of AQUA peptides as internal standard<sup>22</sup> was seen as noncompulsory during the train set study and was omitted during the later evaluation phases. The quantity of treated bacteria (*i.e.* 1ml at 4McF for colony or 0.8 ml of positive blood culture) assures a reproducible qualitative detection without internal standard requirement.

A first clinical evaluation was performed on 20 *S. aureus* strains, selected by the French National Reference Center for *S. aureus* (CNR-SA), as representative of the natural diversity of *S. aureus* (**Supplementary Table 2c**). These strains were analyzed and reported to CNR-SA in blind condition. Impressively, all the IRVT-MS results were 100% accurate, in perfect agreement with molecular and phenotypic methods (**Supplementary Table 3c**). Especially, both covariance criteria shown a very clear cutoff for PBP2a (**Supplementary Figure 7, Supplementary Table 3a**), when the two criteria were mandatory for PVL detection (**Supplementary Table 3a**). Encouraged by these results, a second evaluation set of clinical sample (**Supplementary Table 2d**) was collected from the routine of Lyon's University Hospital (Hospices Civils de Lyon, HCL, France). This set was constituted by 14 positive blood cultures from patients under treatment at the hospital. All the samples were prepared and acquired in blind conditions. Positive crude blood cultures were directly treated by a 5 minutes chemical lysis of the human blood cells. A bacterial cake was obtained after filtration and washing during 6 additional minutes. This cake was suspended in carbonate buffer and bacteria were lysed and digested as previously mentioned. Again, the results were totally in agreement with the clinical data (**Supplementary Table 3d**).

These results demonstrate the potential of IRVT-MS to achieve a fine characterization of microorganism from colony or positive blood cultures. IRVT-MS address questions previously only questionable through multiplexed Polymerase Chain Reaction (PCR). However, when PCR target genes, IRVT-MS targets proteins, *i.e.* gene products. The gene regulation, which affects protein expression and phenotypic behaviors, is sometime difficult to predict using PCR. Direct protein detection solves this pitfall. Only expressed proteins are detectable, leading to an assessment closer to bacteria phenotypes. Moreover, SRM mode has been recognized as a quantitative technology for a long time and may enable protein expression measurement. This possibility offers new perspectives such as toxin production monitoring,  $\beta$ -lactamase concentration measurement or  $\beta$ -lactamin degradation rate evaluation. Nevertheless, PCR will continue to surpass IRVT-MS for sensitivity, thanks to DNA amplification. Unfortunately, similar approach does not exist for protein, except if microorganism grown is considered as a natural amplification. In the configuration proposed here, IRVT-MS is therefore limited to samples harboring up to  $10^7$  colony-forming unit, making affordable only analysis of pure colonies, positive blood cultures, or highly contaminated crude sample (*e.g.* sputum or urines during acute infections). On another side,

grown methods are cheap and well established techniques. They are not susceptible to detect dead bacteria and to lead to false positive results, which is important to avoid overtreatment of the patients.

IRVT-MS effectiveness is here demonstrated on crude *S. aureus* positive blood culture to detect MRSA. The method seems therefore especially adapted to speed up sepsis patient management. According to Figure 2, the classical workflow in the microbiology laboratory take up to 3 days after a blood culture turns positive. During this mean time the probabilistic treatment is empirically adapted by the clinician according to patient behaviors. The tremendous faculty of microbes to adapt to drug pressure stresses therefore microbiologists to give faster resistance information. As shown by others, MALDI-TOF may quickly identify the pathogen in positive blood cultures without microorganism isolation. When associated with AST directly from positive blood cultures, this strategy, may faster the treatment adaptation, first following the identification result and secondly, 10 to 12 hours later, after AST completion. AST are generally reported the day after to clinicians except for biologists working in two shifts. In this case, it was demonstrated the possibility to reduce patient hospitalization cost by approximately a 2 factor. Frequent in lab core, multi shift organization, is nevertheless not common in clinical microbiology laboratory. An alternatively option may be the use of PCR strategies, using short protocols and adapted multiplexing<sup>23</sup>, but the technology seems of exceptional use, due to cumbersome workflow and additional health costs. In this context and as represented in Figure 2, IRVT-MS may be an attractive and cost effective approach to bring, one hour after the identification, a multiplexed resistance phenotype associated with virulence and typing information. IRVT-MS may also be advantageously used for epidemiology to confirm resistance mechanism detected using conventional AST workflow.

Keeping in mind these clinical applications and constraints, four criteria were privileged to design IRVT-MS: (1) clinical accuracy of the method, (2) method and system robustness, (3) workflow convenience for the clinics, (4) affordable cost per sample analysis.

Clinical accuracy of the method relies first on the selection of the proteotypic peptides characterizing the microorganisms. Proteotypic peptides are defined as unique peptide sequences, enabling unequivocal clinical assessment, *i.e.* microorganism identity, resistance mechanism or toxin detection and typing notion. They were experimentally selected using either a proteomic bottom-up approach or *in silico* digestion of informative proteins such as PBP2a or PVL. Importantly, specificity should be checked both experimentally using negative samples and *in silico* using BLAST alignments<sup>24</sup>. Alignments were done against TrEMBL database (release august 2012), but proteome of bacterial world is far to be exhaustive and experimental inspection is still required. Second, specificity of each detected peptide should be controlled by retention time, strict co-elution of multiple transitions and constant signal proportion between transitions. Interestingly, the last constraint was extended with success to all the transitions belonging to the same protein. A simple covariance statistical test, using the train set as a reference, enables a confident detection, including weak SRM traces (*e.g.* PVL).

The method and system robustness was privileged by choosing conventional 2.1 internal diameter bore chromatography column, instead of nano-chromatography usually adopted in proteomic studies. Nano-chromatography would be expected to enhance IRVT-MS sensitivity and to address samples with a lower bacterial charge, but the difficulty to assure reliable retention time in routine<sup>25</sup> was considered as incompatible with clinical use. For the same reason, a triple quadruple mass spectrometer was preferred to high resolution instruments broadly used in proteomic researches. This workhorse mass spectrometer has demonstrated for years its effectiveness in delivering results in routine for small molecules<sup>26</sup>. The

same reliability is anticipated for peptide quantification. The particularly well suited configuration of ESI-MS for targeted analysis in SRM mode was also seen as key for IRVT-MS robustness. The targeted acquisition leads to reproducible chromatographic peaks, defined with a constant number of points. As a consequence, signal integration is reproducible and enables analytical and clinical validation. The latter would be challenging using traditional proteomic data depending acquisition mode.

The workflow convenience in a microbiological laboratory was of particular concern. For this reason, specific reagent such as antibodies or manual steps such as centrifugation were avoided. The automation of a generic sample preparation protocol was privileged. Sensitivity and specificity may probably be improved using SISCAPA<sup>27</sup> or similar protein capture, but at the cost of a reduced versatility of the approach. For the same reason the use of internal standards such as AQUA peptides<sup>28</sup>, or PSAQ<sup>29</sup> was seen as not well adapted. A process needing a special mixture of internal calibrants for each clinical question would be very difficult to imagine in routine when analytical question have to be personalized to both microorganism specie and patient treatment. Moreover to preserve the workflow simplicity, a cumbersome method to calibrate the quantity of treated bacteria was excluded. A simple preparation of roughly the same bacteria quantity (*e.g.* 1ml at 4McF of bacteria suspension or 0.8ml of blood culture) was privileged. In this condition, the analytical reproducibility of IRVT-MS may not fit with the demonstrated performances of SRM for peptides and internal standard may not significantly improve the analytical performances. However, the sensitivity and the specificity of SRM were demonstrated to be enough to obtain reproducible qualitative clinical information.

Multiplexed assays suffer frequently from cost issues. Conversely SRM is perfectly suited to multiplexed analysis at no additional cost. Low mass spectrometry time cycles per transition allow to multiplex hundreds of peptide with sensitivity generally superior to other mass spectrometer configuration and with a cost independent of the number of assays.

SRM was elected as the technology of the year by Nature Methods in 2012. IRVT-MS illustrates potential new clinical applications of this powerful technology, and offers new perspectives to personalize patient treatment according to accurate microorganism characterization. In the context of emergence of multidrug resistant microorganisms and of the threat of lacking of alternative therapies, accurate antibiotic prescription may be an effective strategy for humanity to adapt to the tremendous capacity of evolution of microbes world.

Figure 1a :

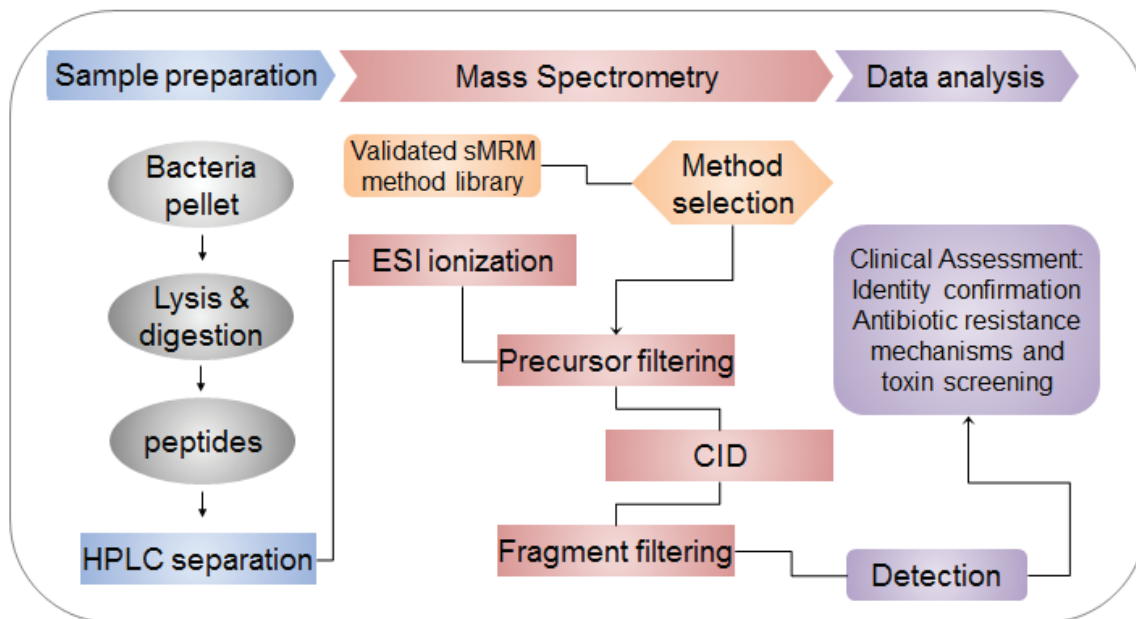


Figure 1b :

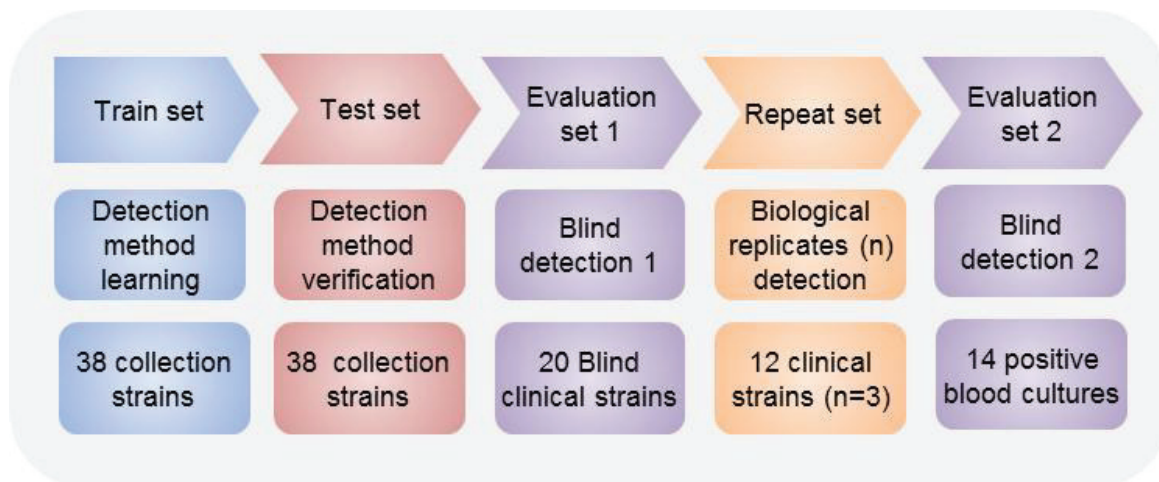


Figure 1a represents the sample analysis workflow: bacteria are lysed and proteins are subsequently digested. The mix of peptides is separated by conventional chromatography before analyses by ESI-MS. Peptides are ionized by ESI. The sMRM method previously validated is selected and targeted analysis is typically performed using a triple-quadrupole mass spectrometer. Specific precursor ions are subjected to fragmentation by CID and specific fragment ions are filtered. For each peptide, a series of transitions (pairs of precursor and fragment ion  $m/z$  values) are monitored during a time that specifically corresponds with its validated elution time. Finally, microorganism identity, antibiotic resistance mechanisms and toxins are highlighted thanks to adequate peptides.

Figure 1b shows the method validation strategy. First, a train set allow to construct the method, a test set allow to verify the constructed method and two blind evaluation sets allow to verify using blind clinical samples and positive blood cultures. Between these two evaluation sets, a repeat set is performed to evaluate the result quality.

Figure 2 :

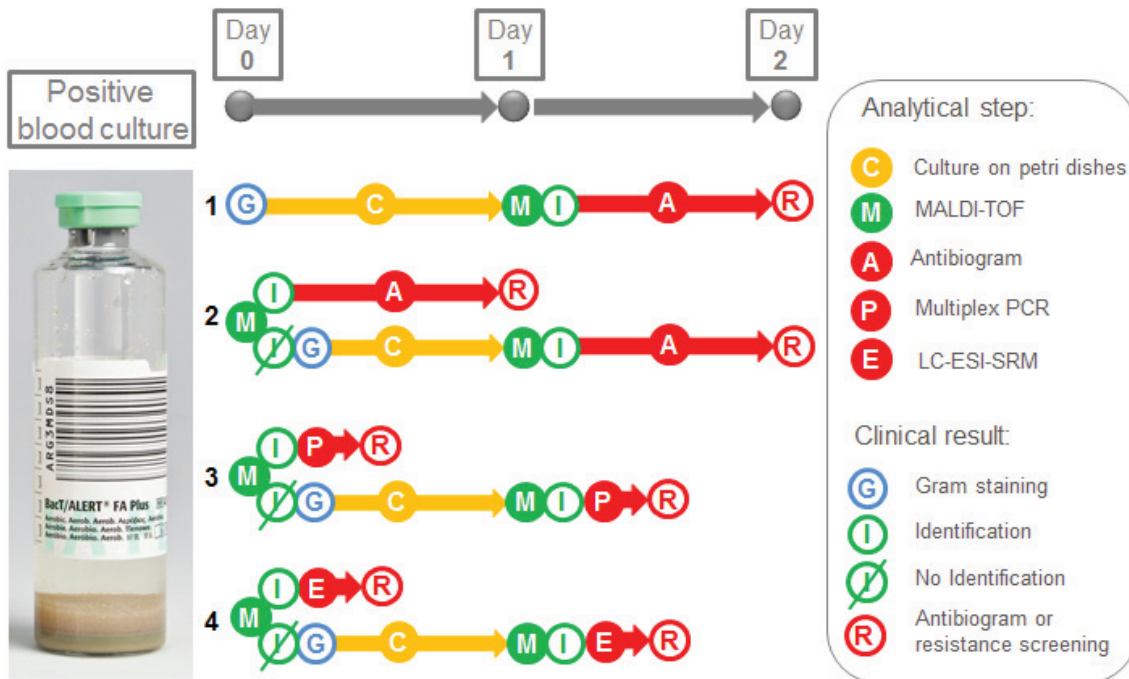


Figure 2 represents the Clinical microbiology workflow from positive blood culture bottles and some strategies foreseen. First, this is the usual workflow using MALDI-TOF ID after subculture and antibiotic choice is based on antibiotic susceptibility test (AST) after subculture. Identification is known in less than one hour after subculture and AST result is obtained two days after blood culture became positive. Historically, a gram staining is performed directly from positive blood culture to adapt antimicrobial therapy sooner. Second, MALDI-TOF ID and AST are directly performed on positive blood cultures, flagged by automated incubator, using appropriate experimental protocol. Identification and AST result are obtained a full day earlier within the same day according to Romero-Gomez *et al.*<sup>30</sup> We should expect to have 100% of appropriateness within 24 hours except for a significant part of gram-positive cocci which are not identified directly. In this case, it is necessary to follow the usual workflow. Third, MALDI-TOF ID directly performed on blood culture allows a result in one hour. Instead of antibiogram, resistance screening should be foreseen. It should be a multiplex PCR according to Klein *et al.*<sup>31</sup> Identity and best antibiotic choice should be known before AST analysis in less than three hours. Fourth, in the same way, we proposed to use LC-ESI-SRM instead of a multiplexed PCR. Identity and best antibiotic choice should be known before AST analysis in less than three hours.

## References

1. Anhalt, J.P. & Fenselau, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **47**, 219-225 (1975).
2. Welker, M. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics*. **11**, 3143-3153 (2011).



3. Seng, P. et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 543-551 (2009).
4. Perez, K.K. et al. Integrating Rapid Pathogen Identification and Antimicrobial Stewardship Significantly Decreases Hospital Costs. *Arch. Pathol. Lab Med.* (2012).
5. Khatib, R. et al. Impact of initial antibiotic choice and delayed appropriate treatment on the outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**, 181-185 (2006).
6. Wimmer, J.L. et al. Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2452-2454 (2012).
7. Vlek, A.L., Bonten, M.J. & Boel, C.H. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS. One.* **7**, e32589-(2012).
8. Fortin, T. et al. Clinical quantitation of prostate-specific antigen biomarker in the low nanogram/milliliter range by conventional bore liquid chromatography-tandem mass spectrometry (multiple reaction monitoring) coupling and correlation with ELISA tests. *Mol. Cell Proteomics.* **8**, 1006-1015 (2009).
9. Keshishian, H. et al. Quantification of cardiovascular biomarkers in patient plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol. Cell Proteomics.* **8**, 2339-2349 (2009).
10. Picotti, P., Bodenmiller, B. & Aebersold, R. Proteomics meets the scientific method. *Nat. Methods* **10**, 24-27 (2013).
11. Seifert, H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clin. Infect. Dis.* **48 Suppl 4**, S238-S245 (2009).
12. Wisplinghoff, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 309-317 (2004).
13. Oliveira, D.C., Tomasz, A. & De Lencastre, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 180-189 (2002).
14. Ito, T. et al. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4997-4999 (2012).
15. Norrby, R. et al. "The bacterial challenge: time to react" ECDC/EMA joint technical report. Stockholm, September 2009. (2009).

16. Shore, A.C. et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *bla<sub>Z</sub>*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3765-3773 (2011).
17. Dufour, P. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 819-824 (2002).
18. Prevost, G. et al. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J. Med. Microbiol.* **42**, 237-245 (1995).
19. Labandeira-Rey, M. et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* **315**, 1130-1133 (2007).
20. Maiden, M.C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 3140-3145 (1998).
21. Koreen, L. et al. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 792-799 (2004).
22. Kirkpatrick, D.S., Gerber, S.A. & Gygi, S.P. The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods* **35**, 265-273 (2005).
23. Maurin, M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **12**, 731-754 (2012).
24. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410 (1990).
25. Addona, T.A. et al. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat. Biotechnol.* **27**, 633-641 (2009).
26. Vogeser, M. & Seger, C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--goals for further developments. *Clin. Biochem.* **41**, 649-662 (2008).
27. Anderson, N.L. et al. Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J. Proteome. Res.* **3**, 235-244 (2004).
28. Kirkpatrick, D.S., Gerber, S.A. & Gygi, S.P. The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods* **35**, 265-273 (2005).

29. Brun, V. et al. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics*. **6**, 2139-2149 (2007).
30. Romero-Gomez, M.P., Gomez-Gil, R., Pano-Pardo, J.R. & Mingorance, J. Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective. *J. Infect.* **65**, 513-520 (2012).
31. Klein, S. et al. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *J. Med. Microbiol.* **61**, 323-331 (2012).

## **ONLINE METHODS:**

### **Reagents and chemicals:**

Acetonitrile and water (LC-MS grade) were obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France). Formic acid was obtained from Fluka (...). Dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), Ammonium bicarbonate and porcine trypsin were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). COS agar plates were obtained from bioMérieux (Saint-Vulbas, France). Peptides were synthesized using Fmoc chemistry on a MultiPep RS peptide synthesizer from Intavis Bioanalytical Instruments AG (Koeln, Germany).

### **Clinical samples storage and culture:**

76 clinical strains were obtained from bioMérieux collection. 20 blind clinical strains were obtained from the French National Reference Center for *Staphylococcus aureus*, CNR-SA (Lyon, France). All strains are stored in glycerol solution at -80°C. A pre-culture was performed on CBA (Columbia Blood Agar) agar plate (bioMérieux, France) grown at 37°C during 18 h. A second culture was performed in the same way to allow full phenotypic expression recovery. 16 positive blood cultures were collected and preserved at 2-8°C until treatment from Hospices Civil de Lyon (Lyon Hospital, France).

Ethics statement:

Samples were collected according to the French Law. Blood cultures were part of the standard care protocol. The samples were de-identified before shipment from the hospital. Informed consent was obtained from the patients who were not expecting direct benefit from the study.

### **Positive blood cultures sample preparation :**

Positive bottles are brought to room temperature before aliquots withdrawn. After venting them with a needle, a syringe is adapted to the needle. The bottle is gently inverted several times and 2 mL of blood culture are withdrawn with the syringe and transferred into a 2 mL eppendorf tube. 0,8 mL of this aliquot are then transferred into another 2 mL tube and 0,4 mL of Lysis Buffer buffer (CAPS 0,3M/ Brij 97 0,45% pH 11.4) are added. The tube is mixed for 5 seconds and let 2 minutes for lysis of human cells. During lysis, the PES 0,2 µm filtration membrane, mounted on a home-made specific device, is wetted by

passing 200  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution (Wash Buffer 2: Brij 97 0,005%). After the completion of lysis, 0.4 mL of the lysate are applied dropwise on the PES membrane under vacuum. Filtration time must not exceed 2 minutes. Within this slot, if the complete volume is filtered, additional 0,4 mL are applied on the membrane, and then last 0,4 mL is the 2 min time is not finished yet. At the end of the 2 min filtration time, vacuum is stopped and the excess of liquid above the membrane is cautiously removed and discarded. Vacuum is re-initiated and 200  $\mu\text{L}$  of WB1 (Wash Buffer 1: NaCl 0,45%/ Brij 97 0,005%) are applied on the membrane to wash the bacterial residue. This operation is performed two more times with WB1. Then a final wash is done with 200  $\mu\text{L}$  of wash buffer 2 (WB2: Brij 97 0,005%). After vacuum being stopped, micro-organisms are collected with 200  $\mu\text{L}$  of a harvest buffer (carbonate 50 mM pH8.0) by repeating 25-30 of drawing-up/ forcing back cycles. This suspension is centrifuged at 15000 g during 15 minutes. The pellet is ready for the bacterial lysis and digestion steps.

#### **Petri dish colony sample preparation :**

Colony grown on Petri dishes are dispersed in saline buffer (NaCl 0,45%) at 4 McF. 1 mL are centrifuged at 8000g during 15 minutes. After discarding the supernatant, the pellet is ready for bacterial lysis and digestion steps.

#### **Lysis and digestion:**

Positive blood cultures pellets or colonies pellets treated as above-mentioned are introduced in an eppendorf tube, containing a glass beads mixture and 100  $\mu\text{L}$  of 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5mM DTT, pH 8.0, and placed on a ultrasound probe (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany). The sample are disrupted during 5 minutes and further alkylated with 12.5 mM iodoacetamide during 5 minutes in the dark. 10  $\mu\text{g}$  of trypsin are added to the samples and the digestion is performed on a heating block at 50°C during 15 minutes. The tryptic digestion is stopped by acidifying samples with 0.5 $\mu\text{L}$  formic acid. Samples are stored at -20 °C until analysis.

#### **LC-SRM analysis:**

An Ultimate 3000 series HPLC instrument including a binary pump and an autosampler (Dionex, Sunnyvale, CA) coupled to a QTRAP 5500 MS instrument, hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, CA) equipped with a Turbo V ion source was used for LC-MS analyses. Instrument control, data acquisition and processing, were performed using Analyst 1.5.1 software. LC separation was carried out on a XBridge BEH C18 column (100 mm \* 2.1 mm, particle size 3.5 $\mu\text{m}$ , porosity 130Å) from Waters (Milford, MA). Elution was performed at a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$  with water containing 0.1% (v/v) formic acid as solvent A and acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid as solvent B. An isocratic step at 2% solvent B during 3 min was followed by a 31-min linear gradient from 2% to 45.4% solvent B. The mass spectrometer was initially tuned and calibrated using polypropylene glycol, reserpine, and Agilent Tuning Mix (all AB Sciex, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Q1 resolution was adjusted to  $0.7 \pm 0.1$  amu fwhm referred to as unit resolution. Q3 was also set to unit resolution. MS analysis was carried out in positive ionization mode using an ion spray voltage of 5500 V. The nebulizer and the curtain gas flows were set at 45 psi using nitrogen. The Turbo V ion source was operated at 550 °C with the auxiliary gas flow (nitrogen) set at 40 psi.

**Data analysis:**

MultiQuant™ 2.1 software (AB Sciex), with the integration algorithm Summation for peak integration, was used for SRM data analysis. Peak integration parameters were set as follows with a Gaussian smooth width of 1.0 points, a summation window of 10 s, a recentering window of 20 s around the expected retention time and a 10% noise for baseline.

**SRM assays construction:**

SRM assays were created using synthetic peptides, pure protein or directly using bacteria samples for high-abundant peptides. The 3 most intense transitions were selected to build the SRM method.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary table 1: *S. aureus* multiplexed SRM characterization method

Protein name	Accession number	Gene name	Proteotypic peptide sequence	Q1 - Precursor ion (m/z)	Q3 - Fragment ion (m/z)	Target retention time (min)	Collision energy (Volts)	Conserved versus excluded transitions (based on train set analysis) <sup>b</sup>
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	P99076	<i>ahpC</i>	NFDVLDEATGLAQR	774.89	960.47	19.4	39.9	excluded
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	P99074	<i>ahpC</i>	NFDVLDEATGLAQR	774.89	1073.56	19.4	39.9	excluded
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	P99075	<i>ahpC</i>	NFDVLDEATGLAQR	774.89	1172.63	19.4	39.9	excluded
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	AYLAVPAAPK	500.79	653.40	14	27	conserved
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	AYLAVPAAPK	500.79	766.48	14	27	conserved
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	AYLAVPAAPK	500.79	929.55	14	27	conserved
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	AYLAVPAAPK	504.79	661.40	14	27	excluded
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	AYLAVPAAPK	504.79	774.48	14	27	excluded
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	AYLAVPAAPK	504.79	937.55	14	27	excluded
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	DYNSPTLIGWVK	696.86	913.55	19.6	35.5	conserved
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	DYNSPTLIGWVK	696.86	1000.58	19.6	35.5	conserved
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	DYNSPTLIGWVK	696.86	1114.63	19.6	35.5	conserved
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	LYSVPWGTGYK	607.32	751.38	17.4	32	conserved
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	LYSVPWGTGYK	607.32	850.45	17.4	32	conserved
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	LYSVPWGTGYK	607.32	937.48	17.4	32	conserved
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	LYSVPWGTGYK	611.32	759.38	17.4	32	excluded
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	LYSVPWGTGYK	611.32	858.45	17.4	32	excluded
Bifunctional autolysin	POC5Z8	<i>atl</i>	LYSVPWGTGYK	611.32	945.48	17.4	32	excluded
Virulence factor EsxA	Q7A754	<i>esxA</i>	FAQLLEIK	545.81	744.45	18.3	26.8	excluded
Virulence factor EsxA	Q7A754	<i>esxA</i>	FAQLLEIK	545.81	872.51	18.3	26.8	excluded
Virulence factor EsxA	Q7A754	<i>esxA</i>	FAQLLEIK	545.81	943.55	18.3	26.8	excluded
Virulence factor EsxA	Q7A754	<i>esxA</i>	SQSYGQGSQDIK	663.31	860.42	8.8	33.5	conserved
Virulence factor EsxA	Q7A754	<i>esxA</i>	SQSYGQGSQDIK	663.31	1023.49	8.8	33.5	conserved
Virulence factor EsxA	Q7A754	<i>esxA</i>	SQSYGQGSQDIK	663.31	1110.52	8.8	33.5	conserved
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	POA038	<i>gapA1</i>	TLAYLAELSK	554.82	823.46	17.8	27.4	excluded
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	POA038	<i>gapA1</i>	TLAYLAELSK	554.82	894.49	17.8	27.4	excluded
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	POA038	<i>gapA1</i>	TLAYLAELSK	554.82	1007.58	17.8	27.4	excluded
Dihydropyridyl dehydrogenase	POA0E8	<i>pdhD</i>	ALSDDTNGFVK	640.33	780.39	16.3	32.2	excluded
Dihydropyridyl dehydrogenase	POA0E8	<i>pdhD</i>	ALSDDTNGFVK	640.33	895.42	16.3	32.2	excluded
Dihydropyridyl dehydrogenase	POA0E8	<i>pdhD</i>	ALSDDTNGFVK	640.33	1008.50	16.3	32.2	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	ATDDDLGIDK	524.76	775.38	11.84	25.6	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	ATDDDLGIDK	524.76	876.43	11.84	25.6	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	ATDDDLGIDK	524.76	977.48	11.84	25.6	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	EEIPFEK	446.23	520.28	13.7	21.2	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	EEIPFEK	446.23	633.36	13.7	21.2	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	EEIPFEK	446.23	762.40	13.7	21.2	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	EFNPDLKPGEEK	701.85	800.45	12.03	35.7	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	EFNPDLKPGEEK	701.85	915.48	12.03	35.7	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	EFNPDLKPGEEK	701.85	1012.53	12.03	35.7	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	TQVVDVAK	480.77	632.36	10.26	23.1	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	TQVVDVAK	480.77	731.43	10.26	23.1	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	TQVVDVAK	480.77	859.49	10.26	23.1	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	TTTTPTTINPLTGEK	787.92	871.49	14.82	40.6	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	TTTTPTTINPLTGEK	787.92	972.54	14.82	40.6	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	TTTTPTTINPLTGEK	787.92	1073.58	14.82	40.6	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	VGYGFVK	435.74	551.32	13.61	20.6	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	VGYGFVK	435.74	714.38	13.61	20.6	excluded
Surface protein	P80544	<i>pls</i>	VGYGFVK	435.74	771.40	13.61	20.6	excluded
50S ribosomal protein L6	Q7A466	<i>rplF</i>	VLELVGVGYR	552.82	763.45	17.4	27.2	excluded
50S ribosomal protein L6	Q7A466	<i>rplF</i>	VLELVGVGYR	552.82	892.49	17.4	27.2	excluded
50S ribosomal protein L6	Q7A466	<i>rplF</i>	VLELVGVGYR	552.82	1005.57	17.4	27.2	excluded
50S ribosomal protein L17	Q7A469	<i>rplQ</i>	DLATSLUISER	609.34	817.48	18.4	32	excluded
50S ribosomal protein L17	Q7A469	<i>rplQ</i>	DLATSLUISER	609.34	918.53	18.4	32	excluded
50S ribosomal protein L17	Q7A469	<i>rplQ</i>	DLATSLUISER	609.34	989.56	18.4	32	excluded
50S ribosomal protein L17	Q7A469	<i>rplQ</i>	DLATSLUISER	614.34	827.48	18.4	32	excluded
50S ribosomal protein L17	Q7A469	<i>rplQ</i>	DLATSLUISER	614.34	928.53	18.4	32	excluded
50S ribosomal protein L17	Q7A469	<i>rplQ</i>	DLATSLUISER	614.34	999.56	18.4	32	excluded
50S ribosomal protein L20	P66108	<i>rplT</i>	AFACLVTK	439.26	588.37	13.5	20.8	conserved
50S ribosomal protein L20	P66108	<i>rplT</i>	AFACLVTK	439.26	659.41	13.5	20.8	conserved
50S ribosomal protein L20	P66108	<i>rplT</i>	AFACLVTK	439.26	806.48	13.5	20.8	conserved
30S ribosomal protein S9	P66646	<i>rpsI</i>	LVPGEINVTNNR	691.87	887.47	12.4	35.2	excluded
30S ribosomal protein S9	P66646	<i>rpsI</i>	LVPGEINVTNNR	691.87	1016.51	12.4	35.2	excluded
30S ribosomal protein S9	P66646	<i>rpsI</i>	LVPGEINVTNNR	691.87	1073.53	12.4	35.2	excluded
30S ribosomal protein S20	Q7A5C0	<i>rpsT</i>	AAQSNLIHSNK	591.82	825.46	8	29.5	excluded
30S ribosomal protein S20	Q7A5C0	<i>rpsT</i>	AAQSNLIHSNK	591.82	912.49	8	29.5	excluded
30S ribosomal protein S20	Q7A5C0	<i>rpsT</i>	AAQSNLIHSNK	591.82	1040.55	8	29.5	excluded
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	AGTYVNNTPK	532.77	672.37	8.8	28	conserved
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	AGTYVNNTPK	532.77	773.42	8.8	28	conserved
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	AGTYVNNTPK	532.77	936.48	8.8	28	conserved
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	AGTYVNNTPK	536.77	680.37	8.8	28	excluded
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	AGTYVNNTPK	536.77	781.42	8.8	28	excluded
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	AGTYVNNTPK	536.77	944.48	8.8	28	excluded
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	SISSGYTSGR	507.75	640.30	8.6	27	conserved
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	SISSGYTSGR	507.75	727.34	8.6	27	conserved
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	SISSGYTSGR	507.75	814.37	8.6	27	conserved
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	SISSGYTSGR	512.75	650.30	8.6	27	excluded
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	SISSGYTSGR	512.75	737.34	8.6	27	excluded
Staphylococcal secretory antigen ssaA2	Q7A423	<i>ssaA2</i>	SISSGYTSGR	512.75	824.37	8.6	27	excluded

Protein name	Accession number	Gene name	Proteotypic peptide sequence	Q1 - Precursor ion (m/z)	Q3 - Fragment ion (m/z)	Target retention time (min)	Collision energy (Volts)	Conserved versus excluded transitions (based on train set analysis) <sup>b</sup>
Triosephosphate isomerase	P68823	<i>tpiA</i>	DFVNALPTLPDSK	708.87	870.49	18.6	36.1	conserved
Triosephosphate isomerase	P68823	<i>tpiA</i>	DFVNALPTLPDSK	708.87	941.53	18.6	36.1	conserved
Triosephosphate isomerase	P68823	<i>tpiA</i>	DFVNALPTLPDSK	708.87	1055.57	18.6	36.1	conserved
Thioredoxin	P0A0K6	<i>trxA</i>	VTDADFDSK	499.23	682.30	9.2	24.2	excluded
Thioredoxin	P0A0K6	<i>trxA</i>	VTDADFDSK	499.23	797.33	9.2	24.2	excluded
Thioredoxin	P0A0K6	<i>trxA</i>	VTDADFDSK	499.23	898.38	9.2	24.2	excluded
Elongation factor Ts	P99171	<i>tsf</i>	NPDVTVVEAFLK	616.83	807.46	18.6	30.9	excluded
Elongation factor Ts	P99171	<i>tsf</i>	NPDVTVVEAFLK	616.83	906.53	18.6	30.9	excluded
Elongation factor Ts	P99171	<i>tsf</i>	NPDVTVVEAFLK	616.83	1021.56	18.6	30.9	excluded
Elongation factor Tu	P99152	<i>tuf</i>	TVGSGVVTEIHK	601.85	801.51	16.8	31	excluded
Elongation factor Tu	P99152	<i>tuf</i>	TVGSGVVTEIHK	601.85	858.53	16.8	31	excluded
Elongation factor Tu	P99152	<i>tuf</i>	TVGSGVVTEIHK	601.85	945.56	16.8	31	excluded
Elongation factor Tu	P99152	<i>tuf</i>	TVGSGVVTEIHK	605.85	809.51	16.8	31	excluded
Elongation factor Tu	P99152	<i>tuf</i>	TVGSGVVTEIHK	605.85	866.53	16.8	31	excluded
Elongation factor Tu	P99152	<i>tuf</i>	TVGSGVVTEIHK	605.85	953.56	16.8	31	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	ADESKFEQAK	576.78	837.45	7.5	28.6	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	ADESKFEQAK	576.78	966.49	7.5	28.6	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	ADESKFEQAK	576.78	1081.52	7.5	28.6	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	AKEFVENAK	518.28	707.37	8	25.3	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	AKEFVENAK	518.28	836.42	8	25.3	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	AKEFVENAK	518.28	964.51	8	25.3	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	ATDFIDKVK	518.79	749.46	12.3	28	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	ATDFIDKVK	518.79	864.48	12.3	28	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	ATDFIDKVK	518.79	965.53	12.3	28	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	ATDFIDKVK	522.79	757.46	12.3	28	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	ATDFIDKVK	522.79	872.48	12.3	28	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	ATDFIDKVK	522.79	973.53	12.3	28	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	EFVENAKEK	547.28	718.37	7.9	29	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	EFVENAKEK	547.28	817.44	7.9	29	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	EFVENAKEK	547.28	964.51	7.9	29	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	EFVENAKEK	551.28	726.37	7.9	29	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	EFVENAKEK	551.28	825.44	7.9	29	excluded
UPF0337 protein SA0772	Q7A6L9	SA0772	EFVENAKEK	551.28	972.51	7.9	29	excluded
Putative universal stress protein SA1532	Q7A551	SA1532	FIVGSVSESIVR	646.86	876.48	17.4	32.6	excluded
Putative universal stress protein SA1532	Q7A551	SA1532	FIVGSVSESIVR	646.86	933.50	17.4	32.6	excluded
Putative universal stress protein SA1532	Q7A551	SA1532	FIVGSVSESIVR	646.86	1032.57	17.4	32.6	excluded
Probable tautomerase SA1195.1	P99132	SAS044	NLVSEVTDAVEK	652.34	890.45	18.9	32.9	conserved
Probable tautomerase SA1195.1	P99132	SAS044	NLVSEVTDAVEK	652.34	977.48	18.9	32.9	conserved
Probable tautomerase SA1195.1	P99132	SAS044	NLVSEVTDAVEK	652.34	1076.55	18.9	32.9	conserved
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	LDSKDVS	460.25	604.34	7.14	25	excluded
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	LDSKDVS	460.25	691.37	7.14	25	excluded
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	LDSKDVS	460.25	806.40	7.14	25	excluded
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	LDSKDVS	465.25	614.34	7.14	25	excluded
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	LDSKDVS	465.25	701.37	7.14	25	excluded
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	LDSKDVS	465.25	816.40	7.14	25	excluded
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	NITQDQDIHAVPK	739.88	664.41	10.9	38	conserved
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	NITQDQDIHAVPK	739.88	779.44	10.9	38	conserved
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	NITQDQDIHAVPK	739.88	907.50	10.9	38	conserved
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	NITQDQDIHAVPK	743.88	672.41	10.9	38	excluded
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	NITQDQDIHAVPK	743.88	787.44	10.9	38	excluded
UPF0457 protein SA1975.1	Q99593	SAS074	NITQDQDIHAVPK	743.88	915.50	10.9	38	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	DINIQR	437.22	418.22	10.3	24	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	DINIQR	437.22	531.30	10.3	24	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	DINIQR	437.22	645.33	10.3	24	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	DINIQR	442.22	428.22	10.3	24	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	DINIQR	442.22	541.30	10.3	24	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	DINIQR	442.22	655.33	10.3	24	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	IYNSLGVK	447.26	503.30	11.7	25	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	IYNSLGVK	447.26	617.36	11.7	25	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	IYNSLGVK	447.26	780.43	11.7	25	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	IYNSLGVK	451.26	511.30	11.7	25	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	IYNSLGVK	451.26	625.36	11.7	25	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	IYNSLGVK	451.26	788.43	11.7	25	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ILTAMIGLNK	594.34	789.43	17.3	31	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ILTAMIGLNK	594.34	860.47	17.3	31	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ILTAMIGLNK	594.34	961.51	17.3	31	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ILTAMIGLNK	598.34	797.43	17.3	31	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ILTAMIGLNK	598.34	868.47	17.3	31	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ILTAMIGLNK	598.34	969.51	17.3	31	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ELISIEDYIK	598.81	754.36	15.8	31	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ELISIEDYIK	598.81	867.45	15.8	31	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ELISIEDYIK	598.81	954.48	15.8	31	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ELISIEDYIK	602.81	762.36	15.8	31	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ELISIEDYIK	602.81	875.45	15.8	31	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	ELISIEDYIK	602.81	962.48	15.8	31	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	FQITSPGSTQK	647.84	617.30	12.2	26	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	FQITSPGSTQK	647.84	704.40	12.2	34	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	FQITSPGSTQK	647.84	906.45	12.2	34	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	FQITSPGSTQK	651.84	625.30	12.2	26	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	FQITSPGSTQK	651.84	712.40	12.2	34	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>3</sup>	FQITSPGSTQK	651.84	914.45	12.2	34	excluded

Protein name	Accession number	Gene name	Proteotypic peptide sequence	Q1 - Precursor ion (m/z)	Q3 - Fragment ion (m/z)	Target retention time (min)	Collision energy (Volts)	Conserved versus excluded transitions (based on train set analysis) <sup>b</sup>
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	SYANLIGK	433.24	544.30	13	24	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	SYANLIGK	437.24	552.30	13	24	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	SYANLIGK	433.24	615.38	13	24	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	SYANLIGK	437.24	623.38	13	24	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	SYANLIGK	433.24	778.45	13	24	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	SYANLIGK	437.24	786.45	13	24	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	VALELGSK	408.74	533.29	12.7	23	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	VALELGSK	412.74	541.29	12.7	23	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	VALELGSK	408.74	646.38	12.7	23	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	VALELGSK	412.74	654.38	12.7	23	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	VALELGSK	408.74	717.41	12.7	23	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	VALELGSK	412.74	725.41	12.7	23	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	YEVVNGNIDLK	632.33	773.42	14.65	33	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	YEVVNGNIDLK	636.33	781.42	14.65	33	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	YEVVNGNIDLK	632.33	872.48	14.65	33	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	YEVVNGNIDLK	636.33	880.48	14.65	33	excluded
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	YEVVNGNIDLK	632.33	971.55	14.65	33	conserved
Penicillin binding protein 2 prime	Q7A8C6	<i>mecA</i> <sup>a</sup>	YEVVNGNIDLK	636.33	979.55	14.65	33	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	FQITTSFGSTQK	647.84	617.33	12.3	26	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	FQITTSFGSTQK	647.84	805.41	12.3	34	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	FQITTSFGSTQK	647.84	906.45	12.3	34	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	IALALGAK	378.75	459.29	14.1	22	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	IALALGAK	378.75	572.38	14.1	22	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	IALALGAK	378.75	643.41	14.1	22	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	ILTSIALK	486.33	644.43	18.8	26	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	ILTSIALK	486.33	745.48	18.8	26	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	ILTSIALK	486.33	858.57	18.8	26	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	INIETLK	415.75	490.29	13.65	23	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	INIETLK	415.75	603.37	13.65	23	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	INIETLK	415.75	717.41	13.65	23	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	LAYGEEIVDR	647.32	760.38	13.5	33	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	LAYGEEIVDR	647.32	946.45	13.5	33	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	LAYGEEIVDR	647.32	1109.51	13.5	33	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	NNPNMLMAINVK	679.85	565.81	17.97	35	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	NNPNMLMAINVK	679.85	919.51	17.97	35	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	NNPNMLMAINVK	679.85	1130.61	17.97	35	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	NTNFDIYGG	536.26	742.38	13.99	29	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	NTNFDIYGG	536.26	856.42	13.99	29	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	NTNFDIYGG	536.26	957.47	13.99	29	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	NTQLNFIYEDK	692.84	667.33	16.61	35	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	NTQLNFIYEDK	692.84	814.40	16.61	35	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	NTQLNFIYEDK	692.84	928.44	16.61	35	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	QAISSDNIFAR	749.37	540.29	17.6	38	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	QAISSDNIFAR	749.37	767.42	17.6	38	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	QAISSDNIFAR	749.37	882.45	17.6	38	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	SYNLQINTIK	597.33	716.43	15.1	31	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	SYNLQINTIK	597.33	829.51	15.1	31	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	SYNLQINTIK	597.33	943.56	15.1	31	conserved
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	TGMTYEIVGNPK	703.37	358.21	14.7	36	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	TGMTYEIVGNPK	703.37	740.47	14.7	36	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	TGMTYEIVGNPK	703.37	869.51	14.7	36	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	VYDDLYDNGK	601.27	824.38	11.65	31	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	VYDDLYDNGK	601.27	939.41	11.65	31	excluded
Beta-lactam-inducible penicillin-binding protein	GOLPN8	<i>mecC</i> <sup>a</sup>	VYDDLYDNGK	601.27	1102.47	11.65	31	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADAQQNK	387.69	517.27	1.38	17	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADAQQNK	387.69	588.31	1.38	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADAQQNK	387.69	703.34	1.38	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADAQQNK	391.69	525.27	1.38	17	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADAQQNK	391.69	596.31	1.38	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADAQQNK	391.69	711.34	1.38	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADNNFNK	411.69	522.27	5.68	20	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADNNFNK	411.69	636.31	5.68	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADNNFNK	411.69	751.34	5.68	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADNNFNK	415.69	530.27	5.68	20	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADNNFNK	415.69	644.31	5.68	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ADNNFNK	415.69	759.34	5.68	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ANGTTADK	389.19	434.22	1.38	20	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ANGTTADK	389.19	592.29	1.38	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ANGTTADK	389.19	706.34	1.38	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ANGTTADK	393.19	442.22	1.38	20	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ANGTTADK	393.19	600.29	1.38	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	ANGTTADK	393.19	714.34	1.38	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	DDPSQSANLLAEAK	729.86	614.83	14	32	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	DDPSQSANLLAEAK	729.86	829.48	14	35	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	DDPSQSANLLAEAK	729.86	916.51	14	35	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	DDPSQSANLLAEAK	733.86	618.83	14	32	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	DDPSQSANLLAEAK	733.86	837.48	14	35	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	DDPSQSANLLAEAK	733.86	924.51	14	35	excluded



Protein name	Accession number	Gene name	Proteotypic peptide sequence	Q1 - Precursor ion (m/z)	Q3 - Fragment ion (m/z)	Target retention time (min)	Collision energy (Volts)	Conserved versus excluded transitions (based on train set analysis) <sup>b</sup>
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSANVLGEAQK	779.87	532.27	11.9	34	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSANVLGEAQK	779.87	664.84	11.9	34	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSANVLGEAQK	779.87	929.51	11.9	35	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSANVLGEAQK	783.87	540.27	11.9	34	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSANVLGEAQK	783.87	668.87	11.9	34	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSANVLGEAQK	783.87	937.51	11.9	35	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSTNVLGEAK	730.85	615.82	11.7	33	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSTNVLGEAK	730.85	831.46	11.7	40	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSTNVLGEAK	730.85	918.49	11.7	38	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSTNVLGEAK	734.85	619.82	11.7	33	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSTNVLGEAK	734.85	839.46	11.7	40	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSQSTNVLGEAK	734.85	926.49	11.7	38	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSVSK	374.18	259.15	5.39	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSVSK	374.18	420.25	5.39	24	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSVSK	374.18	517.30	5.39	16	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSVSK	378.18	263.15	5.39	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSVSK	378.18	428.25	5.39	24	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DDPSVSK	378.18	525.30	5.39	16	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DQQSAFYEILNMPNLEEQR	813.71	500.25	22.5	28	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DQQSAFYEILNMPNLEEQR	813.71	969.39	22.5	32	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DQQSAFYEILNMPNLEEQR	813.71	999.49	22.5	33	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DQQSAFYEILNMPNLEEQR	817.04	505.25	22.5	28	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DQQSAFYEILNMPNLEEQR	817.04	969.39	22.5	32	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	DQQSAFYEILNMPNLEEQR	817.04	1009.49	22.5	33	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDNGVHVVKPGDVTNDIAK	688.68	515.26	12.4	34	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDNGVHVVKPGDVTNDIAK	688.68	746.91	12.4	33	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDNGVHVVKPGDVTNDIAK	688.68	1029.52	12.4	36	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDNGVHVVKPGDVTNDIAK	691.35	519.26	12.4	34	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDNGVHVVKPGDVTNDIAK	691.35	750.91	12.4	33	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDNGVHVVKPGDVTNDIAK	691.35	1037.52	12.4	36	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDGNKPKG	422.71	301.19	1.38	27	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDGNKPKG	422.71	429.28	1.38	26	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDGNKPKG	422.71	600.35	1.38	24	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDGNKPKG	426.71	309.19	1.38	27	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDGNKPKG	426.71	437.28	1.38	26	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EDGNKPKG	426.71	608.35	1.38	24	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EEDNNKPGK	515.74	301.19	1.37	31	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EEDNNKPGK	515.74	429.28	1.37	31	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EEDNNKPGK	515.74	772.40	1.37	27	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EEDNNKPGK	519.74	309.19	1.37	31	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EEDNNKPGK	519.74	437.28	1.37	31	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EEDNNKPGK	519.74	780.40	1.37	27	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EILAEAK	387.22	347.19	10	15	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EILAEAK	387.22	418.23	10	18	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EILAEAK	387.22	531.31	10	19	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EILAEAK	391.22	355.19	10	15	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EILAEAK	391.22	426.23	10	18	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EILAEAK	391.22	539.31	10	19	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	829.08	884.45	22.55	33	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	829.08	962.98	22.55	33	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	829.08	993.51	22.55	33	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	832.40	889.45	22.55	33	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	832.40	962.98	22.55	33	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	832.40	998.51	22.55	33	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	824.74	877.96	23.2	33	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	824.74	951.49	23.2	33	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	824.74	986.49	23.2	44	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	828.07	882.96	23.2	33	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	828.07	956.49	23.2	33	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILHLPNLEEQR	828.07	996.49	23.2	44	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILNMPNLEEQR	827.39	500.25	22.5	30	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILNMPNLEEQR	827.39	735.87	22.5	24	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILNMPNLEEQR	827.39	999.49	22.5	31	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILNMPNLEEQR	830.72	505.25	22.5	30	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILNMPNLEEQR	830.72	740.87	22.5	24	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	EQQNAFYEILNMPNLEEQR	830.72	1009.49	22.5	31	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	IAADNK	316.17	376.18	2.18	22	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	IAADNK	316.17	447.22	2.18	14	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	IAADNK	316.17	518.26	2.18	15	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	IAADNK	320.17	384.18	2.18	22	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	IAADNK	320.17	455.22	2.18	14	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	IAADNK	320.17	526.26	2.18	15	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	LNDAQPK	428.73	514.30	7	23	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	LNDAQPK	428.73	629.33	7	21	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	LNDAQPK	428.73	743.37	7	20	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	LNDAQPK	432.76	522.30	7	23	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	LNDAQPK	432.76	637.33	7	21	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	spa	LNDAQPK	432.76	751.37	7	20	excluded

Protein name	Accession number	Gene name	Proteotypic peptide sequence	Q1 - Precursor ion (m/z)	Q3 - Fragment ion (m/z)	Target retention time (min)	Collision energy (Volts)	Conserved versus excluded transitions (based on train set analysis) <sup>b</sup>
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNDSQAPK	436.73	530.29	6.8	23	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNDSQAPK	436.73	645.32	6.8	19	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNDSQAPK	436.73	759.36	6.8	20	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNDSQAPK	440.73	538.29	6.8	23	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNDSQAPK	440.73	653.32	6.8	19	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNDSQAPK	440.73	767.36	6.8	20	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNESQAPK	443.74	530.29	7.1	23	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNESQAPK	443.74	659.34	7.1	21	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNESQAPK	443.74	773.38	7.1	22	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNESQAPK	447.74	538.29	7.1	23	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNESQAPK	447.74	667.34	7.1	21	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	LNESQAPK	447.74	781.38	7.1	22	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NGFIQSLK	453.76	475.29	14.4	23	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NGFIQSLK	453.76	588.37	14.4	23	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NGFIQSLK	453.76	792.46	14.4	23	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NGFIQSLK	457.76	483.29	14.4	23	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NGFIQSLK	457.76	596.37	14.4	23	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NGFIQSLK	457.76	800.46	14.4	23	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NMIKPGQELVVDK	735.90	556.82	13.4	38	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NMIKPGQELVVDK	735.90	830.46	13.4	41	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NMIKPGQELVVDK	735.90	984.54	13.4	38	conserved
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NMIKPGQELVVDK	739.90	560.82	13.4	38	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NMIKPGQELVVDK	739.90	838.46	13.4	41	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	NMIKPGQELVVDK	739.90	992.54	13.4	38	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	QPANHADANK	533.26	332.19	9.31	29	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	QPANHADANK	533.26	447.22	9.31	29	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	QPANHADANK	533.26	840.40	9.31	28	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	QPANHADANK	537.26	340.19	9.31	29	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	QPANHADANK	537.26	455.22	9.31	29	excluded
Immunoglobulin G-binding protein A	P38507	<i>spa</i>	QPANHADANK	537.26	848.40	9.31	28	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	AQDIISTIGDLVK	686.89	745.45	22.8	35	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	AQDIISTIGDLVK	686.89	832.48	22.8	35	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	AQDIISTIGDLVK	686.89	945.56	22.8	35	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	AQDIISTIGDLVK	701.89	775.46	23.47	36	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	AQDIISTIGDLVK	701.89	862.49	23.47	36	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	AQDIISTIGDLVK	701.89	975.57	23.47	36	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[For]AQDIISTIGDLVK	766.41	474.17	28.44	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[For]AQDIISTIGDLVK	766.41	832.48	28.44	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[For]AQDIISTIGDLVK	766.41	945.56	28.44	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[For]AQDIISTISDLVK	781.41	474.17	28.68	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[For]AQDIISTISDLVK	781.41	862.49	28.68	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[For]AQDIISTISDLVK	781.41	975.57	28.68	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[Oxi]AQDIISTIGDLVK	760.41	462.17	22.8	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[Oxi]AQDIISTIGDLVK	760.41	832.48	22.8	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[Oxi]AQDIISTIGDLVK	760.41	945.56	22.8	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[Oxi]AQDIISTISDLVK	775.41	674.41	23.56	39	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[Oxi]AQDIISTISDLVK	775.41	862.49	23.56	39	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	M[Oxi]AQDIISTISDLVK	775.41	975.57	23.56	39	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	MAQDIISTIGDLVK	752.41	446.17	23.49	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	MAQDIISTIGDLVK	752.41	832.48	23.49	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	MAQDIISTIGDLVK	752.41	945.56	23.49	38	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	MAQDIISTISDLVK	767.41	674.41	24.21	39	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	MAQDIISTISDLVK	767.41	775.46	24.21	39	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	MAQDIISTISDLVK	767.41	862.49	24.21	39	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	WIIDTVNKK	494.78	576.30	16.35	27	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	WIIDTVNKK	494.78	689.38	16.35	27	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	WIIDTVNKK	494.78	802.47	16.35	27	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	WIIDTVNKKFTK	682.88	736.44	18.21	35	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	WIIDTVNKKFTK	682.88	837.48	18.21	35	excluded
Delta-hemolysin	POC1V1	<i>hld</i>	WIIDTVNKKFTK	682.88	952.51	18.21	35	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	GNFNPEFIGVLSR	725.38	531.42	19.9	37	conserved
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	GNFNPEFIGVLSR	725.38	791.48	19.9	37	conserved
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	GNFNPEFIGVLSR	725.38	920.52	19.9	37	conserved
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	GNFNPEFIGVLSR	730.38	541.32	19.9	37	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	GNFNPEFIGVLSR	730.38	801.48	19.9	37	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	GNFNPEFIGVLSR	730.38	930.52	19.9	37	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	ITVYQQR	440.75	567.29	10.4	24	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	ITVYQQR	440.75	666.36	10.4	24	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	ITVYQQR	440.75	767.40	10.4	24	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	ITVYQQR	445.75	577.29	10.4	24	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	ITVYQQR	445.75	676.36	10.4	24	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	ITVYQQR	445.75	777.40	10.4	24	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	LIDTQSK	402.73	463.25	7.7	23	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	LIDTQSK	402.73	578.28	7.7	23	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	LIDTQSK	402.73	691.36	7.7	23	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	LIDTQSK	406.73	471.25	7.7	23	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	LIDTQSK	406.73	586.28	7.7	23	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	<i>lukF</i>	LIDTQSK	406.73	699.36	7.7	23	excluded

Protein name	Accession number	Gene name	Proteotypic peptide sequence	Q1 - Precursor ion (m/z)	Q3 - Fragment ion (m/z)	Target retention time (min)	Collision energy (Volts)	Conserved versus excluded transitions (based on train set analysis) <sup>b</sup>
Leukocidin-F subunit	P31715	lukF	MPVLSR	351.70	375.24	11.6	20	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	lukF	MPVLSR	351.70	474.30	11.6	20	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	lukF	MPVLSR	351.70	571.36	11.6	20	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	lukF	MPVLSR	356.70	385.24	11.6	20	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	lukF	MPVLSR	356.70	484.30	11.6	20	excluded
Leukocidin-F subunit	P31715	lukF	MPVLSR	356.70	581.36	11.6	20	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	ANSFITSLGK	519.28	618.40	15.6	28	conserved
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	ANSFITSLGK	519.28	765.45	15.6	28	conserved
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	ANSFITSLGK	519.28	852.48	15.6	28	conserved
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	ANSFITSLGK	523.28	626.40	15.6	28	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	ANSFITSLGK	523.28	773.45	15.6	28	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	ANSFITSLGK	523.28	860.48	15.6	28	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	DALILK	336.72	373.30	14.08	20	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	DALILK	336.72	486.36	14.08	20	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	DALILK	336.72	557.40	14.08	20	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	DALILK	340.72	381.30	14.08	20	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	DALILK	340.72	494.36	14.08	20	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	DALILK	340.72	565.40	14.08	20	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	SVQWGIK	409.23	503.30	13.6	23	conserved
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	SVQWGIK	409.23	631.36	13.6	23	conserved
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	SVQWGIK	409.23	730.42	13.6	23	conserved
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	SVQWGIK	413.23	511.30	13.6	23	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	SVQWGIK	413.23	639.36	13.6	23	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	SVQWGIK	413.23	738.42	13.6	23	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	TNDPNVDLILNLYPK	808.42	643.40	20	40	conserved
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	TNDPNVDLILNLYPK	808.42	860.50	20	40	conserved
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	TNDPNVDLILNLYPK	808.42	975.55	20	40	conserved
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	TNDPNVDLILNLYPK	812.42	647.40	20	40	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	TNDPNVDLILNLYPK	812.42	868.50	20	40	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	TNDPNVDLILNLYPK	812.42	983.55	20	40	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	YEVNWK	419.71	447.20	13.19	23	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	YEVNWK	419.71	546.30	13.19	23	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	YEVNWK	419.71	675.35	13.19	23	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	YEVNWK	423.71	455.20	13.19	23	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	YEVNWK	423.71	554.30	13.19	23	excluded
Leukocidin-S subunit	P31716	lukS	YEVNWK	423.71	683.35	13.19	23	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	FEYNTKPPINIDEIK	650.67	519.80	17.35	37	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	FEYNTKPPINIDEIK	650.67	755.91	17.35	37	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	FEYNTKPPINIDEIK	650.67	941.53	17.35	37	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	HQLTQIHGLYR	683.37	645.35	12.59	35	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	HQLTQIHGLYR	683.37	987.54	12.59	35	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	HQLTQIHGLYR	683.37	1100.62	12.59	35	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	IKNTDGSISLIIFSPYSPAFTK	887.14	537.27	22.89	48	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	IKNTDGSISLIIFSPYSPAFTK	887.14	563.32	22.89	48	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	IKNTDGSISLIIFSPYSPAFTK	887.14	1073.53	22.89	48	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	ITMNDGSTYQSDLSK	830.38	549.29	12.6	42	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	ITMNDGSTYQSDLSK	830.38	941.46	12.6	42	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	ITMNDGSTYQSDLSK	830.38	1085.51	12.6	42	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	KQLAISTLDFEIR	767.44	564.31	19.36	39	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	KQLAISTLDFEIR	767.44	980.50	19.36	39	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	KQLAISTLDFEIR	767.44	1093.59	19.36	39	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	LPTPIELPLK	560.85	405.26	19.6	30	conserved
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	LPTPIELPLK	560.85	809.51	19.6	30	conserved
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	LPTPIELPLK	560.85	910.56	19.6	30	conserved
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	LPTPIELPLKVK	674.43	518.84	19.2	35	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	LPTPIELPLKVK	674.43	617.89	19.2	35	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	LPTPIELPLKVK	674.43	1036.68	19.2	35	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	NTDGSISLIIFSPYSPAFTK	806.75	537.27	23.98	40	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	NTDGSISLIIFSPYSPAFTK	806.75	563.32	23.98	40	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	NTDGSISLIIFSPYSPAFTK	806.75	1073.53	23.98	40	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	NTDGSISLIIFSPYSPAFTKGEK	911.47	694.35	22.57	45	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	NTDGSISLIIFSPYSPAFTKGEK	911.47	786.39	22.57	45	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	NTDGSISLIIFSPYSPAFTKGEK	911.47	859.92	22.57	45	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	QLAISTLDFEIR	703.39	564.31	21.14	36	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	QLAISTLDFEIR	703.39	893.47	21.14	36	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	QLAISTLDFEIR	703.39	980.50	21.14	36	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	SSDKTGGYWK	564.77	610.30	10.1	30	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	SSDKTGGYWK	564.77	711.35	10.1	30	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	SSDKTGGYWK	564.77	954.47	10.1	30	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	TGGYWK	356.18	496.30	10.71	21	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	TGGYWK	356.18	553.28	10.71	21	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	TGGYWK	356.18	610.30	10.71	21	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	TIEAEIN	395.20	415.22	12.54	22	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	TIEAEIN	395.20	526.25	12.54	22	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	TIEAEIN	395.20	544.26	12.54	22	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	VDLNTK	345.19	362.20	8.77	20	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	VDLNTK	345.19	475.29	8.77	20	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	VDLNTK	345.19	590.31	8.77	20	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	VDLNTKR	423.25	518.30	8.11	24	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	VDLNTKR	423.25	631.39	8.11	24	excluded
Toxic shock syndrome toxin-1	P06886	tst	VDLNTKR	423.25	746.42	8.11	24	excluded

Q1 (m/z), mass-to-charge ratio for the peptide ion used as Q1 value; Q3 m/z, mass-to-charge ratio for the fragment ion used as Q3 value.

<sup>a</sup> according to Ito *et al*<sup>1</sup>

<sup>b</sup>undetected, heavy or incongruous transitions were excluded based on train set analysis

**Supplementary table 2: Datasets, characterization using phenotypic and molecular methods**

Supplementary table 2a: Train set characterization

Sample name	Data Set	Species <sup>a</sup>	<i>mecA</i> <sup>b</sup>	<i>mecC</i> <sup>b</sup>	<i>lukS, lukF</i> <sup>b</sup>	<i>tst</i> <sup>b</sup>
Strain_001	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_003	Train set	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	-	-	-
Strain_005	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_006	Train set	<i>Staphylococcus simulans</i>	+	-	-	-
Strain_007	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_009	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_010	Train set	<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-	-	-
Strain_012	Train set	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	-	-	-
Strain_014	Train set	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	-	-
Strain_015	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_019	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_020	Train set	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	-	-	-
Strain_023	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_024	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_027	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_029	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_031	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_033	Train set	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	-	-	-
Strain_041	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_043	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_044	Train set	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-
Strain_046	Train set	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	-
Strain_047	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_049	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_051	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_052	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_053	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_054	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_055	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	+
Strain_056	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_057	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_058	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_087	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_088	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_089	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_090	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_091	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_092	Train set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-

<sup>a</sup>species were assessed using VITEK2

<sup>b</sup>*mecA, mecC, lukF, lukS* and *tst* genes were assessed using RT-PCR test

Supplementary table 2b: Test set characterization

Sample name	Data Set	Species <sup>a</sup>	<i>mecA</i> <sup>b</sup>	<i>mecC</i> <sup>b</sup>	<i>lukS, lukF</i> <sup>b</sup>	<i>tst</i> <sup>b</sup>
Strain_004	Test set	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	-	-	-
Strain_008	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_011	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_016	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_017	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_018	Test set	<i>Staphylococcus simulans</i>	+	-	-	-
Strain_021	Test set	<i>Staphylococcus capitis</i>	+	-	-	-
Strain_022	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+
Strain_025	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+
Strain_026	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_028	Test set	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	-	-	-
Strain_030	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_032	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_034	Test set	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	-	-
Strain_035	Test set	<i>Staphylococcus warneri</i>	-	-	-	-
Strain_037	Test set	<i>Staphylococcus warneri</i>	+	-	-	-
Strain_038	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_039	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_040	Test set	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	-	-
Strain_042	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_045	Test set	<i>Staphylococcus simulans</i>	-	-	-	-
Strain_048	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_050	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+
Strain_059	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	+
Strain_060	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_061	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_062	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_063	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_064	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_065	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_066	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_093	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_094	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_095	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_096	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_097	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_098	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_100	Test set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+

<sup>a</sup>species were assessed using VITEK2

<sup>b</sup>*mecA*, *mecC*, *lukF*, *lukS* and *tst* genes were assessed using RT-PCR test

Supplementary table 2c: Blind evaluation set 1, characterization:

Sample name	Data Set	Species <sup>a</sup>	<i>mecA</i> <sup>b</sup>	<i>mecC</i> <sup>b</sup>	<i>lukS, lukF</i> <sup>b</sup>	<i>tst</i> <sup>b</sup>
Strain_067	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_068	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_069	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_070	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_071	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+
Strain_072	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_073	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_074	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_075	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+
Strain_076	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_077	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_078	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_079	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_080	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_081	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+
Strain_082	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_083	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_084	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_085	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+
Strain_086	Evaluation 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-

<sup>a</sup>species were assessed using Whole Cell MALDI-TOF analysis

<sup>b</sup>*mecA, mecC, lukF, lukS* and *tst* genes were assessed using an in-house PCR test. Results were given after ESI-MS analysis and interpretation.

Supplementary table 2d: Blind evaluation set 2, characterization:

Sample name	Data Set	Species <sup>a</sup>	<i>mecA</i> <sup>b</sup>	<i>mecC</i> <sup>b</sup>	<i>lukS, lukF</i> <sup>b</sup>	<i>tst</i> <sup>b</sup>
Strain_101	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_102	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_103	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_104	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_105	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_106	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_107	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_108	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_109	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_110	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_111	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_112	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_113	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_114	Evaluation 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-

<sup>a</sup>species were assessed using Whole Cell MALDI-TOF analysis

<sup>b</sup>*mecA, mecC, lukF, lukS* and *tst* genes were assessed using an in-house PCR test. Results were given after ESI-MS analysis and interpretation.

Supplementary table 2e: Repeat set characterization:

Sample name	Data Set	Species <sup>a</sup>	<i>mecA</i> <sup>b</sup>	<i>mecC</i> <sup>b</sup>	<i>lukS, lukF</i> <sup>b</sup>	<i>tst</i> <sup>b</sup>
Strain_010_1	Repeat set	<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-	-	-
Strain_010_2	Repeat set	<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-	-	-
Strain_024_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_024_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_067_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_067_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_067_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_070_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_070_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_070_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-
Strain_071_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+
Strain_071_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+
Strain_071_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+
Strain_075_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+
Strain_075_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+
Strain_075_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+
Strain_077_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_077_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_077_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-
Strain_078_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_078_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_078_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_079_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_079_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_079_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	-	-
Strain_080_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_080_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_080_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
Strain_084_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_084_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_084_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-
Strain_085_1	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+
Strain_085_2	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+
Strain_085_3	Repeat set	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+

<sup>a</sup>species were assessed using Whole Cell MALDI-TOF analysis or VITEK2 analysis

<sup>b</sup>*mecA*, *mecC*, *lukF*, *lukS* and *tst* genes were assessed using an in-house PCR test.

### Supplementary table 3: Results



Supplementary table 3a: Train set results

Sample name	"Identity peptide" <sup>a</sup>			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecA</i> product)			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecC</i> product)			"PVL peptide" <sup>b</sup>			"TSST-1 peptide" <sup>c</sup>	Discrepant results (MS versus molecular methods)
	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	Result	
Strain_001	0.993	1.005	+	0.081	0.145	-	0.032	0.002	-	0.955	1.063	+	-	no
Strain_003	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.887	0.875	+	0.011	0.075	-	0.082	0.075	-	-	no
Strain_005	0.986	0.977	+	0.068	0.210	-	0.062	-0.092	-	0.411	0.473	-	-	no
Strain_006	0.851	1.123	+	0.901	0.959	+	0.742	0.174	-	0.105	0.162	-	-	no
Strain_007	0.985	0.986	+	0.514	0.830	+	0.018	-0.064	-	0.003	0.562	-	-	no
Strain_009	0.997	1.004	+	0.067	0.178	-	0.049	-0.201	-	0.991	0.928	+	-	no
Strain_010	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.002	0.083	-	0.120	0.269	-	0.107	0.380	-	-	no
Strain_012	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.711	0.772	+	0.029	-0.025	-	0.023	0.256	-	-	no
Strain_014	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.698	0.744	+	0.006	0.087	-	0.129	0.104	-	-	no
Strain_015	0.996	1.009	+	0.975	0.996	+	0.019	-0.012	-	0.002	0.243	-	-	no
Strain_019	0.999	1.003	+	0.082	0.157	-	0.012	0.062	-	0.000	0.425	-	-	no
Strain_020	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.880	0.864	+	0.000	0.098	-	0.385	0.161	-	-	no
Strain_023	0.987	0.981	+	0.571	0.856	+	0.017	-0.065	-	0.077	0.569	-	-	no
Strain_024	0.998	1.003	+	0.969	0.941	+	0.025	-0.033	-	0.023	0.022	-	-	no
Strain_027	0.999	1.002	+	0.071	0.137	-	0.030	-0.103	-	0.010	0.295	-	-	no
Strain_029	0.998	0.990	+	0.926	0.943	+	0.032	-0.024	-	0.023	0.021	-	-	no
Strain_031	0.999	0.986	+	0.767	0.898	+	0.027	-0.010	-	0.016	0.011	-	-	no
Strain_033	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.007	0.142	-	0.032	0.215	-	0.235	0.155	-	-	no
Strain_041	0.999	0.993	+	0.987	0.982	+	0.021	-0.017	-	0.007	0.022	-	-	no
Strain_043	0.997	0.997	+	0.961	0.951	+	0.021	-0.010	-	0.000	0.230	-	-	no
Strain_044	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.153	0.241	-	0.000	0.131	-	0.147	0.126	-	-	no
Strain_046	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.001	0.221	-	0.001	0.005	-	0.000	0.211	-	-	no
Strain_047	0.977	1.020	+	0.050	0.111	-	0.055	-0.009	-	0.026	0.020	-	-	no
Strain_049	0.997	1.014	+	0.071	0.166	-	0.002	0.143	-	0.993	1.028	+	-	no
Strain_051	0.996	0.994	+	0.081	0.176	-	0.990	0.925	+	0.038	0.150	-	-	no
Strain_052	0.991	0.968	+	0.076	0.147	-	0.957	0.826	+	0.000	0.231	-	-	no
Strain_053	0.996	1.001	+	0.114	0.155	-	0.948	0.946	+	0.104	-0.176	-	-	no
Strain_054	0.991	0.961	+	0.066	0.219	-	0.956	0.932	+	0.220	0.402	-	-	no
Strain_055	0.999	0.996	+	0.075	0.183	-	0.984	0.945	+	0.004	0.126	-	+	no
Strain_056	0.999	1.010	+	0.055	0.143	-	0.989	0.937	+	0.037	0.020	-	-	no
Strain_057	0.998	1.002	+	0.075	0.155	-	0.985	0.878	+	0.001	0.133	-	-	no
Strain_058	0.998	1.003	+	0.065	0.165	-	0.977	0.899	+	0.097	0.217	-	-	no
Strain_087	0.987	0.987	+	0.081	0.211	-	0.016	0.028	-	0.972	0.880	+	-	no
Strain_088	0.999	0.995	+	0.977	0.997	+	0.021	-0.031	-	0.990	1.015	+	-	no
Strain_089	0.999	0.989	+	0.985	0.973	+	0.022	-0.007	-	0.974	1.012	+	-	no
Strain_090	0.997	0.995	+	0.105	0.184	-	0.018	-0.078	-	0.986	0.980	+	-	no
Strain_091	0.991	0.986	+	0.072	0.245	-	0.015	0.020	-	0.987	0.936	+	-	no
Strain_092	0.997	0.994	+	0.982	1.013	+	0.023	-0.050	-	0.983	0.944	+	-	no

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from adapted strain figure 6

<sup>b</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from appropriate protein and adapted strain figure7

<sup>c</sup> TSST-1 detection is based on LPTPIELPLK transitions detection respecting transitions retention time standard deviation lower than 0.02 and signal higher than 3000

<sup>d</sup> NA means not applicable because no peptide were detected according to figure 6 criteria

Supplementary table 3b: Test set results

Sample name	"Identity peptide" <sup>a</sup>			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecA</i> product)			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecC</i> product)			"PVL peptide" <sup>b</sup>			"TSST-1 peptide" <sup>c</sup>	Discrepant results (MS versus molecular methods)
	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	Result	
Strain_004	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.934	0.936	+	0.021	0.003	-	0.698	0.236	-	-	no
Strain_008	0.981	1.007	+	0.976	0.911	+	0.012	0.129	-	0.018	0.528	-	-	no
Strain_011	0.989	1.009	+	0.097	0.171	-	0.004	0.275	-	0.006	0.171	-	-	no
Strain_016	0.985	1.034	+	0.086	0.140	-	0.000	0.268	-	0.475	0.492	-	-	no
Strain_017	0.983	1.019	+	0.971	0.947	+	0.016	0.053	-	0.001	0.388	-	-	no
Strain_018	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.914	0.940	+	0.779	0.284	-	0.142	0.132	-	-	no
Strain_021	0.005	-0.127	-	0.865	0.876	+	0.012	0.038	-	0.005	0.057	-	-	no
Strain_022	0.986	0.991	+	0.087	0.183	-	0.000	0.150	-	0.004	0.703	-	+	no
Strain_025	0.985	1.002	+	0.078	0.181	-	0.000	0.075	-	0.000	0.511	-	+	no
Strain_026	0.979	1.006	+	0.962	0.921	+	0.019	0.065	-	0.047	0.505	-	-	no
Strain_028	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.818	0.703	+	0.101	0.238	-	0.444	0.160	-	-	no
Strain_030	0.982	1.030	+	0.092	0.141	-	0.001	0.120	-	0.577	0.454	-	-	no
Strain_032	0.987	1.028	+	0.587	0.819	+	0.011	0.125	-	0.500	0.417	-	-	no
Strain_034	0.129	-0.562	-	0.829	0.924	+	0.009	0.006	-	0.017	-0.102	-	-	no
Strain_035	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.055	0.128	-	0.140	0.274	-	0.045	-0.233	-	-	no
Strain_037	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.076	0.146	-	0.033	0.225	-	0.007	-0.261	-	-	yes
Strain_038	0.982	1.027	+	0.070	0.146	-	0.000	0.226	-	0.447	0.566	-	-	no
Strain_039	0.985	1.015	+	0.950	0.910	+	0.015	0.055	-	0.488	0.563	-	-	no
Strain_040	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.141	0.114	-	0.182	0.348	-	0.353	0.002	-	-	no
Strain_042	0.979	1.023	+	0.975	0.910	+	0.015	0.065	-	0.000	0.408	-	-	no
Strain_045	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.102	0.172	-	0.795	0.272	-	0.145	0.176	-	-	no
Strain_048	0.989	1.027	+	0.055	0.113	-	0.000	0.322	-	0.558	0.485	-	-	no
Strain_050	0.987	1.014	+	0.059	0.158	-	0.001	0.221	-	0.947	1.003	+	+	no
Strain_059	0.979	1.023	+	0.071	0.200	-	0.995	1.004	+	0.525	0.467	-	+	no
Strain_060	0.984	1.037	+	0.067	0.135	-	0.994	0.943	+	0.766	0.606	-	-	no
Strain_061	0.986	1.033	+	0.050	0.110	-	0.989	0.979	+	0.682	0.413	-	-	no
Strain_062	0.983	1.022	+	0.073	0.208	-	0.991	1.125	+	0.551	0.539	-	-	no
Strain_063	0.979	1.048	+	0.086	0.170	-	0.991	0.954	+	0.611	0.622	-	-	no
Strain_064	0.983	1.043	+	0.082	0.213	-	0.986	1.018	+	0.220	0.575	-	-	no
Strain_065	0.985	1.030	+	0.074	0.181	-	0.995	0.922	+	0.493	0.524	-	-	no
Strain_066	0.984	1.033	+	0.069	0.163	-	0.991	0.880	+	0.743	0.531	-	-	no
Strain_093	0.978	1.033	+	0.959	0.966	+	0.016	0.059	-	0.977	0.976	+	-	no
Strain_094	0.987	1.022	+	0.078	0.145	-	0.001	0.160	-	0.949	1.000	+	-	no
Strain_095	0.979	1.015	+	0.983	0.951	+	0.016	0.031	-	0.980	0.972	+	-	no
Strain_096	0.981	1.024	+	0.938	0.972	+	0.016	0.017	-	0.968	0.938	+	-	no
Strain_097	0.983	1.038	+	0.077	0.134	-	0.001	0.157	-	0.883	0.991	+	-	no
Strain_098	0.987	1.024	+	0.091	0.166	-	0.000	0.205	-	0.961	0.909	+	-	no
Strain_100	0.984	1.003	+	0.057	0.167	-	0.002	0.165	-	0.936	0.984	+	+	no

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from adapted strain figure 6

<sup>b</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from appropriate protein and adapted strain figure7

<sup>c</sup> TSST-1 detection is based on LPTPIELPLK transitions detection respecting transitions retention time standard deviation lower than 0.02 and signal higher than 3000

<sup>d</sup> NA means not applicable because no peptide were detected according to figure 6 criteria

Supplementary table 3c: Blind evaluation set 1, results

Sample name	"Identity peptide" <sup>a</sup>			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecA</i> product)			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecC</i> product)			"PVL peptide" <sup>b</sup>			"TSST-1 peptide" <sup>c</sup>	Discrepant results (MS versus molecular methods)
	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	Result	
Strain_067	0.986	1.009	+	0.971	0.946	+	0.018	-0.021	-	0.973	0.901	+	-	no
Strain_068	0.984	1.016	+	0.982	0.961	+	0.018	-0.026	-	0.163	0.405	-	-	no
Strain_069	0.989	1.010	+	0.086	0.377	-	0.013	0.026	-	0.973	0.939	+	-	no
Strain_070	0.972	1.015	+	0.985	0.976	+	0.018	-0.021	-	0.957	0.850	+	-	no
Strain_071	0.981	1.014	+	0.963	0.900	+	0.012	0.017	-	0.023	0.588	-	+	no
Strain_072	0.982	0.998	+	0.935	0.904	+	0.002	0.043	-	0.008	0.503	-	-	no
Strain_073	0.974	0.994	+	0.901	0.902	+	0.012	0.014	-	0.337	0.494	-	-	no
Strain_074	0.987	1.011	+	0.976	0.921	+	0.009	0.003	-	0.949	0.843	+	-	no
Strain_075	0.979	0.993	+	0.084	0.279	-	0.027	0.099	-	0.100	0.876	-	+	no
Strain_076	0.990	1.015	+	0.974	0.923	+	0.016	-0.021	-	0.133	0.703	-	-	no
Strain_077	0.985	1.000	+	0.071	0.165	-	0.008	0.070	-	0.981	0.970	+	-	no
Strain_078	0.985	1.037	+	0.045	0.142	-	0.945	0.851	+	0.610	0.443	-	-	no
Strain_079	0.986	1.013	+	0.088	0.189	-	0.912	0.850	+	0.169	0.372	-	-	no
Strain_080	0.981	1.002	+	0.043	0.143	-	0.001	0.147	-	0.007	0.233	-	-	no
Strain_081	0.987	0.995	+	0.970	0.934	+	0.018	0.006	-	0.625	0.750	-	+	no
Strain_082	0.985	1.004	+	0.973	0.943	+	0.013	0.018	-	0.097	0.023	-	-	no
Strain_083	0.990	1.018	+	0.978	0.950	+	0.017	-0.006	-	0.025	0.536	-	-	no
Strain_084	0.980	0.961	+	0.936	0.944	+	0.017	-0.015	-	0.014	0.096	-	-	no
Strain_085	0.985	1.005	+	0.965	0.958	+	0.018	-0.008	-	0.594	0.451	-	+	no
Strain_086	0.984	1.006	+	0.978	0.939	+	0.017	-0.017	-	0.082	0.638	-	-	no

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from adapted strain figure 6

<sup>b</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from appropriate protein and adapted strain figure7

<sup>c</sup> TSST-1 detection is based on LPTPIELPK transitions detection respecting transitions retention time standard deviation lower than 0.02 and signal higher than 3000

Supplementary table 3d: Blind evaluation set 2, results

Sample name	"Identity peptide" <sup>a</sup>			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecA</i> product)			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecC</i> product)			"PVL peptide" <sup>b</sup>			"TSST-1 peptide" <sup>c</sup>	Discrepant results (MS versus molecular methods)
	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	Result	
Strain_101	0.980	0.859	+	0.026	0.181	-	0.008	0.094	-	0.087	0.628	-	-	no
Strain_102	0.969	0.897	+	0.022	0.113	-	0.000	0.096	-	0.664	0.808	-	-	no
Strain_103	0.950	0.793	+	0.024	0.212	-	0.003	0.038	-	0.060	-0.037	-	-	no
Strain_104	0.985	0.903	+	0.172	0.184	-	0.007	0.002	-	0.722	0.530	-	-	no
Strain_105	0.983	0.851	+	0.039	0.221	-	0.038	0.031	-	0.291	0.221	-	-	no
Strain_106	0.979	0.905	+	0.176	0.210	-	0.021	0.027	-	0.710	1.080	-	-	no
Strain_107	0.984	0.914	+	0.845	0.810	+	0.015	0.013	-	0.258	0.461	-	-	no
Strain_108	0.989	0.878	+	0.205	0.346	-	0.006	0.127	-	0.383	1.004	-	-	no
Strain_109	0.964	0.849	+	0.063	0.204	-	0.002	0.103	-	0.247	1.070	-	-	no
Strain_110	0.982	0.902	+	0.016	0.169	-	0.000	0.048	-	0.276	0.983	-	-	no
Strain_111	0.991	0.864	+	0.056	0.063	-	0.048	-0.037	-	0.242	0.963	-	-	no
Strain_112	0.973	0.905	+	0.016	0.146	-	0.007	0.076	-	0.179	0.848	-	-	no
Strain_113	0.978	0.929	+	0.018	0.078	-	0.000	0.157	-	0.002	0.379	-	-	no
Strain_114	0.974	0.861	+	0.210	0.222	-	0.000	0.037	-	0.668	0.822	-	-	no

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from adapted strain figure 6

<sup>b</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from appropriate protein and adapted strain figure7

<sup>c</sup> TSST-1 detection is based on LPTPIELPK transitions detection respecting transitions retention time standard deviation lower than 0.02 and signal higher than 3000

Supplementary table 3e: Repeat set results

Sample name	"Identity peptide" <sup>a</sup>			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecA</i> product)			"PBP2a peptide" <sup>b</sup> ( <i>mecC</i> product)			"PVL peptide" <sup>b</sup>			"TSST-1 peptide" <sup>c</sup>	Discrepant results (between replicates)
	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	R <sup>2</sup>	slope	Result	Result	
Strain_010_1	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.001	0.145	-	0.116	0.229	-	0.163	0.445	-	-	no
Strain_010_2	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>	-	0.001	0.077	-	0.116	0.226	-	0.166	0.494	-	-	no
Strain_024_1	0.975	0.971	+	0.791	0.854	+	0.010	0.045	-	0.033	0.120	-	-	no
Strain_024_2	0.973	0.983	+	0.759	0.808	+	0.022	-0.004	-	0.520	0.425	-	-	no
Strain_067_1	0.971	0.959	+	0.917	0.885	+	0.016	-0.011	-	0.913	0.864	+	-	no
Strain_067_2	0.970	0.966	+	0.958	0.921	+	0.017	-0.021	-	0.932	0.800	+	-	no
Strain_067_3	0.974	0.973	+	0.935	0.865	+	0.016	-0.018	-	0.919	0.840	+	-	no
Strain_070_1	0.980	0.989	+	0.917	0.833	+	0.018	-0.020	-	0.818	0.968	+	-	no
Strain_070_2	0.970	0.979	+	0.965	0.897	+	0.017	0.012	-	0.954	1.019	+	-	no
Strain_070_3	0.974	0.983	+	0.945	0.869	+	0.017	-0.020	-	0.962	0.932	+	-	no
Strain_071_1	0.976	0.973	+	0.934	0.904	+	0.018	-0.021	-	0.522	0.518	-	+	no
Strain_071_2	0.979	0.967	+	0.959	0.928	+	0.018	-0.018	-	0.496	0.438	-	+	no
Strain_071_3	0.978	0.984	+	0.930	0.870	+	0.019	-0.007	-	0.519	0.406	-	+	no
Strain_075_1	0.966	0.976	+	0.101	0.224	-	0.001	0.200	-	0.568	0.529	-	+	no
Strain_075_2	0.977	0.966	+	0.125	0.290	-	0.114	0.270	-	0.014	0.535	-	+	no
Strain_075_3	0.975	0.962	+	0.117	0.293	-	0.068	0.186	-	0.007	0.174	-	+	no
Strain_077_1	0.970	0.950	+	0.051	0.202	-	0.050	0.008	-	0.881	0.800	+	-	no
Strain_077_2	0.967	0.967	+	0.079	0.151	-	0.036	0.003	-	0.892	0.821	+	-	no
Strain_077_3	0.971	0.976	+	0.065	0.174	-	0.035	0.007	-	0.893	0.820	+	-	no
Strain_078_1	0.976	0.982	+	0.053	0.152	-	0.912	0.754	+	0.524	0.313	-	-	no
Strain_078_2	0.969	0.980	+	0.086	0.156	-	0.916	0.759	+	0.501	0.420	-	-	no
Strain_078_3	0.975	0.971	+	0.085	0.186	-	0.877	0.739	+	0.512	0.464	-	-	no
Strain_079_1	0.975	0.970	+	0.074	0.169	-	0.933	0.722	+	0.724	0.486	-	-	no
Strain_079_2	0.981	0.983	+	0.080	0.170	-	0.949	0.746	+	0.692	0.537	-	-	no
Strain_079_3	0.980	0.986	+	0.102	0.153	-	0.925	0.743	+	0.725	0.524	-	-	no
Strain_080_1	0.978	0.969	+	0.074	0.181	-	0.010	0.157	-	0.522	0.492	-	-	no
Strain_080_2	0.977	0.985	+	0.048	0.145	-	0.012	0.032	-	0.516	0.377	-	-	no
Strain_080_3	0.973	0.972	+	0.073	0.166	-	0.007	0.107	-	0.541	0.458	-	-	no
Strain_084_1	0.980	0.961	+	0.936	0.944	+	0.017	-0.015	-	0.504	0.297	-	-	no
Strain_084_2	0.972	0.975	+	0.959	0.933	+	0.017	-0.006	-	0.510	0.474	-	-	no
Strain_084_3	0.976	0.979	+	0.949	0.915	+	0.018	-0.013	-	0.515	0.534	-	-	no
Strain_085_1	0.975	0.973	+	0.962	0.928	+	0.015	0.043	-	0.000	0.386	-	+	no
Strain_085_2	0.970	0.959	+	0.952	0.916	+	0.015	0.039	-	0.000	0.403	-	+	no
Strain_085_3	0.973	0.967	+	0.947	0.899	+	0.016	0.025	-	0.003	0.112	-	+	no

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from adapted strain figure 6

<sup>b</sup> R<sup>2</sup> and slope are exported from appropriate protein and adapted strain figure7

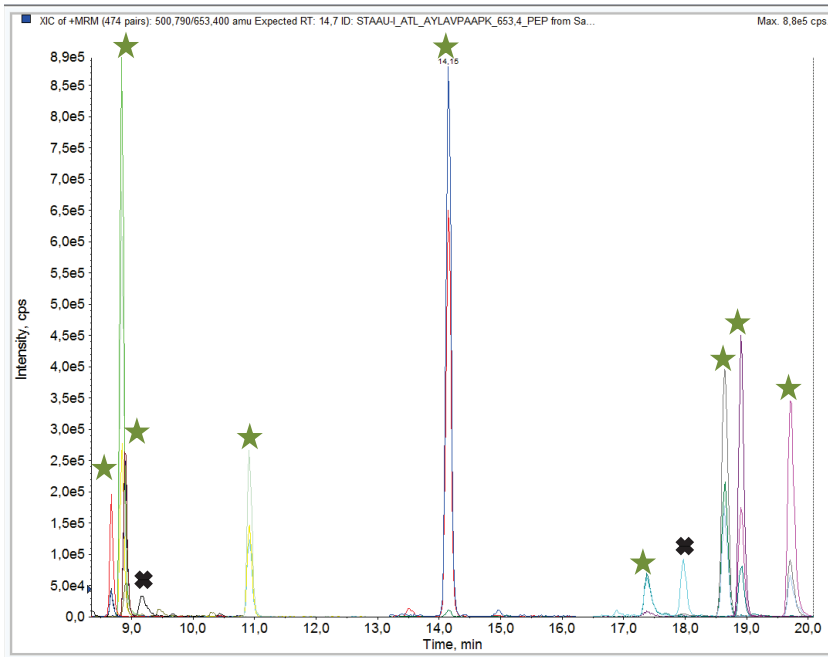
<sup>c</sup> TSST-1 detection is based on LPTPIELPLK transitions detection respecting transitions retention time standard deviation lower than 0.02 and signal higher than 3000

<sup>d</sup> NA means not applicable because no peptide were detected according to figure 6 criteria

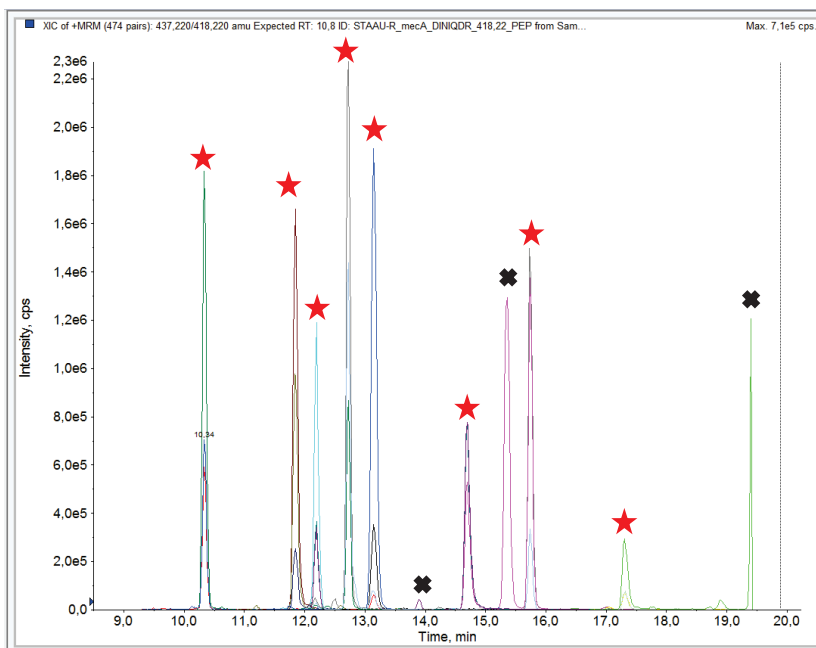
**Supplementary figure 1: Screenshot of blind sample number 067 identified as *S. aureus* harboring *mecA* and PVL toxin**

Green stars represent peptide for identification, red stars represent peptide for resistance, blue stars represent peptide for virulence and black crosses indicate isolated transitions.

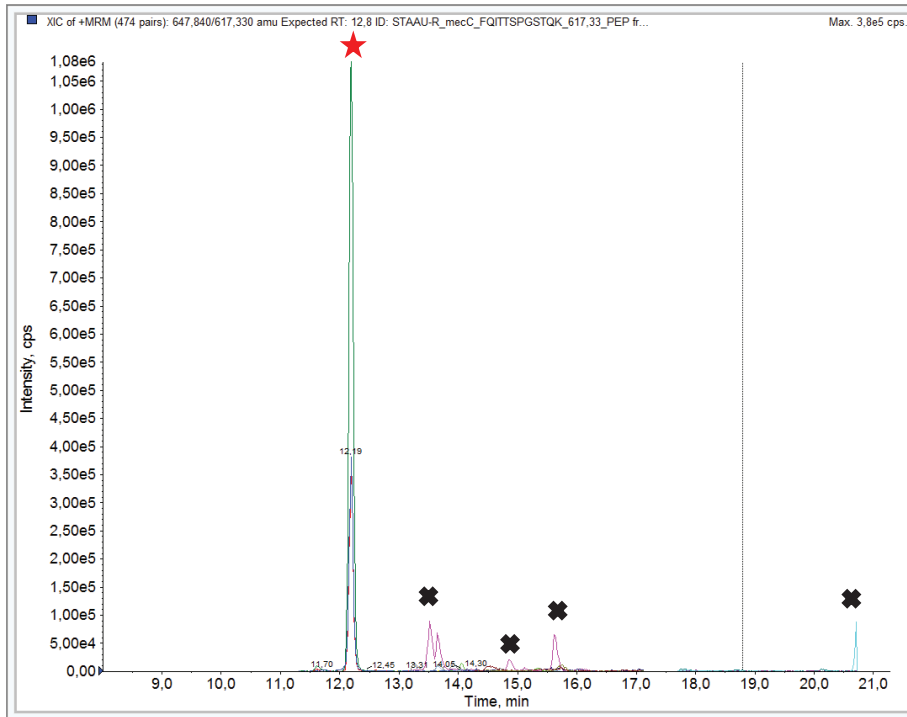
Supplementary figure 1.a: Extracted Ion chromatogram of peptide for identification



Supplementary figure 1.b: Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from *mecA*

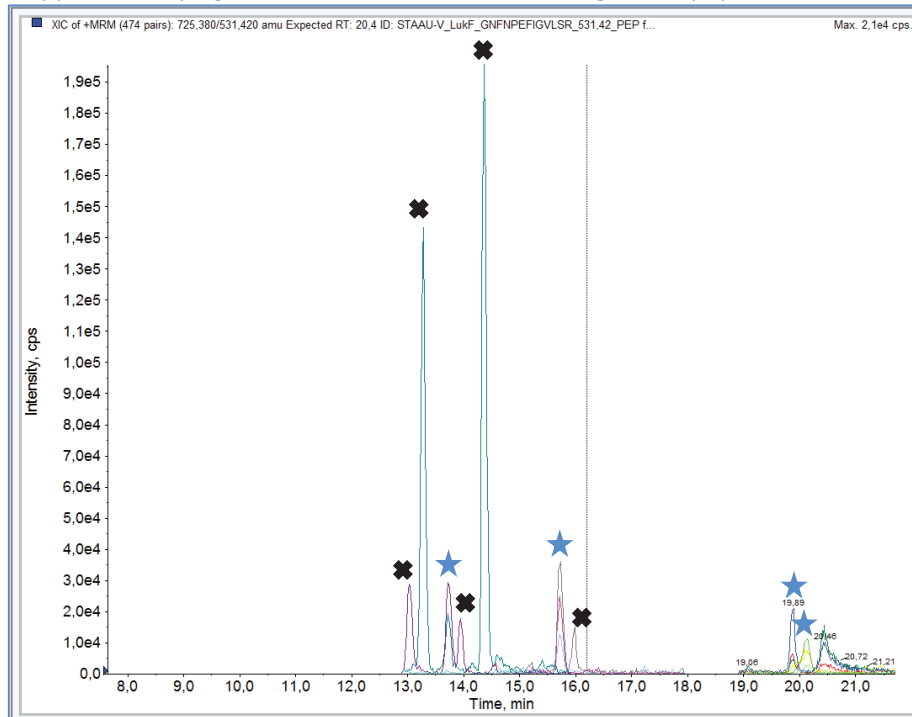


Supplementary figure 1.c: Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from mecC

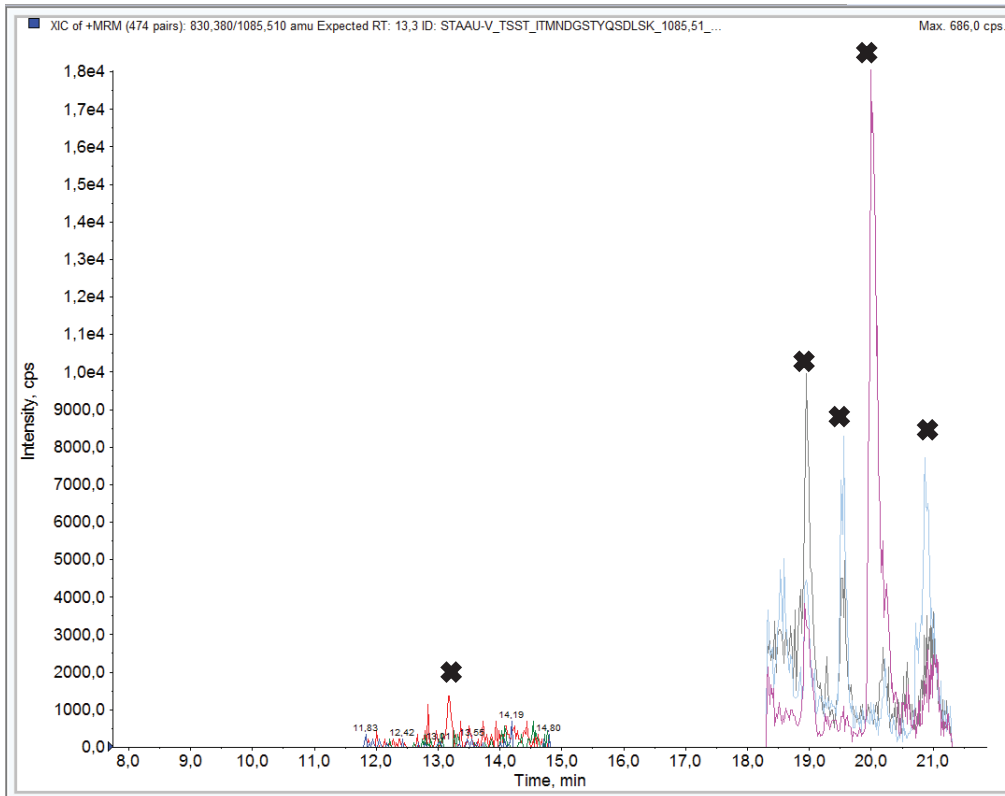


1 peptide is shared by *mecA* product and *mecC* product. When *mecA* product is detected, it is normal to detect the shared peptide for *mecC* product

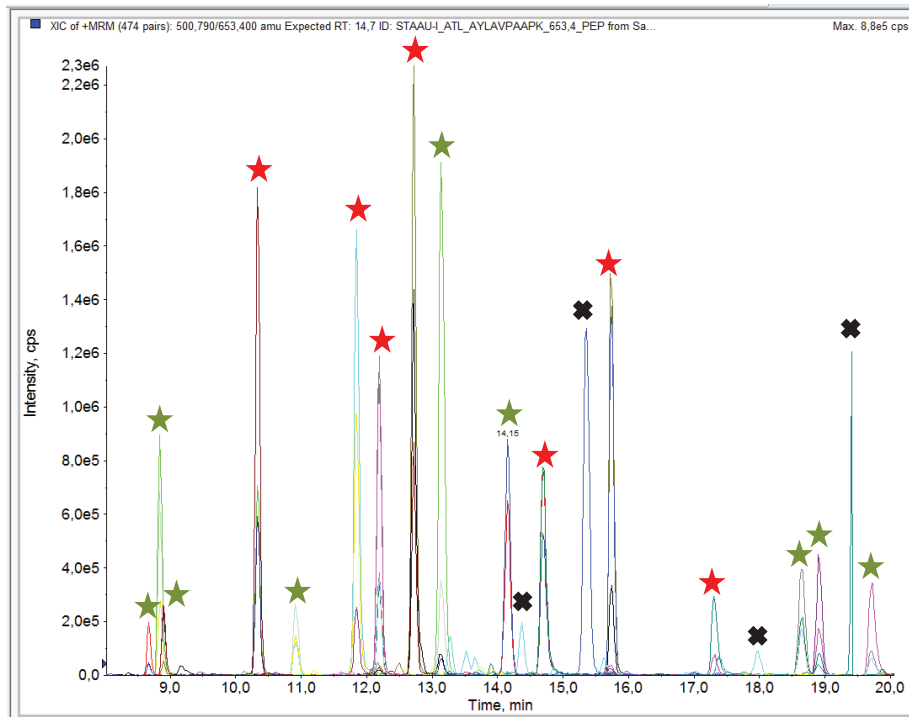
Supplementary figure 1.d: Extracted Ion chromatogram of peptide from PVL



Supplementary figure 1.e: Extracted Ion chromatogram of peptide from TSST

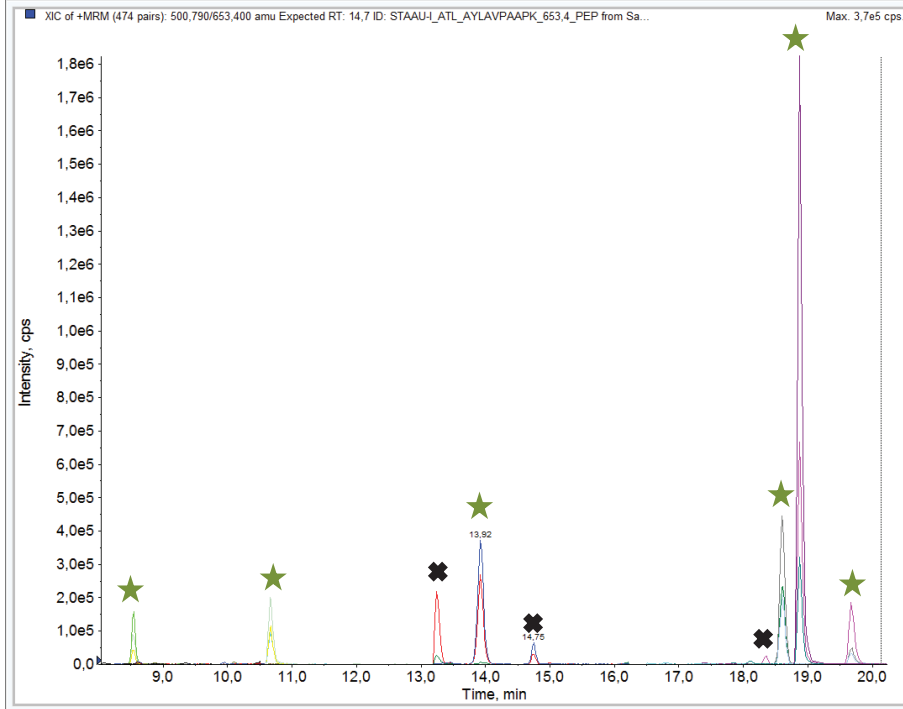


Supplementary figure 1.f: Total Extracted Ion chromatogram

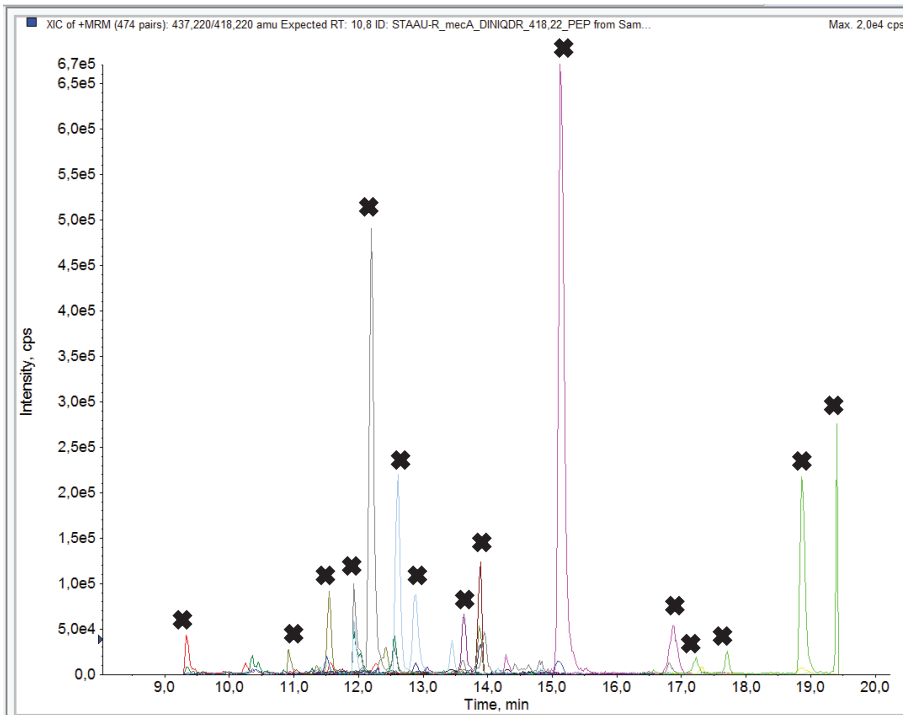


Supplementary figure 2: Screenshot of blind Sample number 080 identified as *S.aureus* harboring neither *mecA*, *mecC*, PVL nor TSST.

Supplementary figure 2.a: Extracted Ion chromatogram of peptide for identification

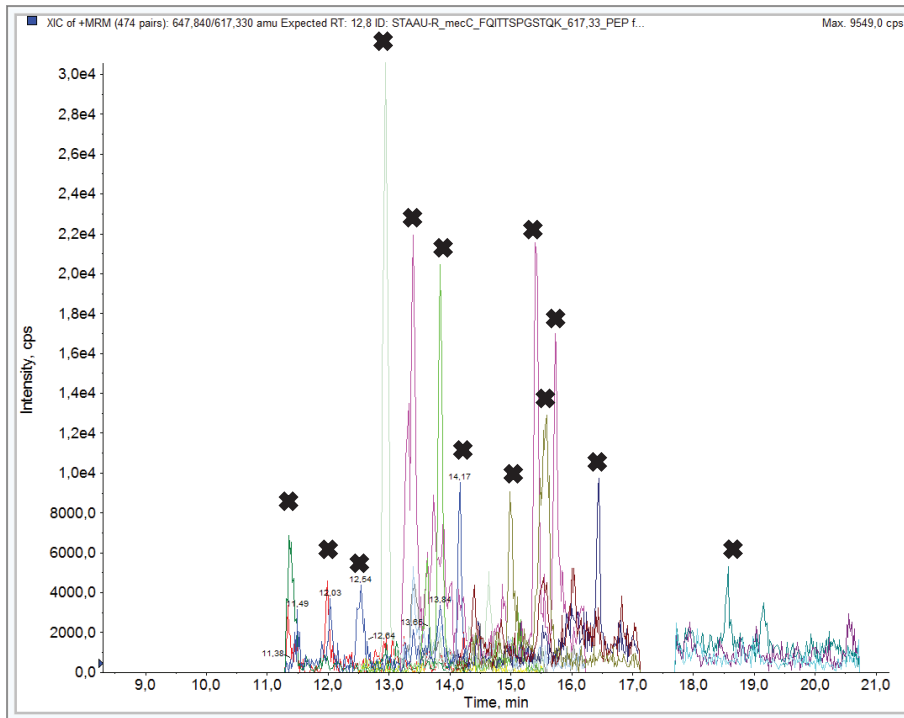


Supplementary figure 2.b: Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from *mecA*

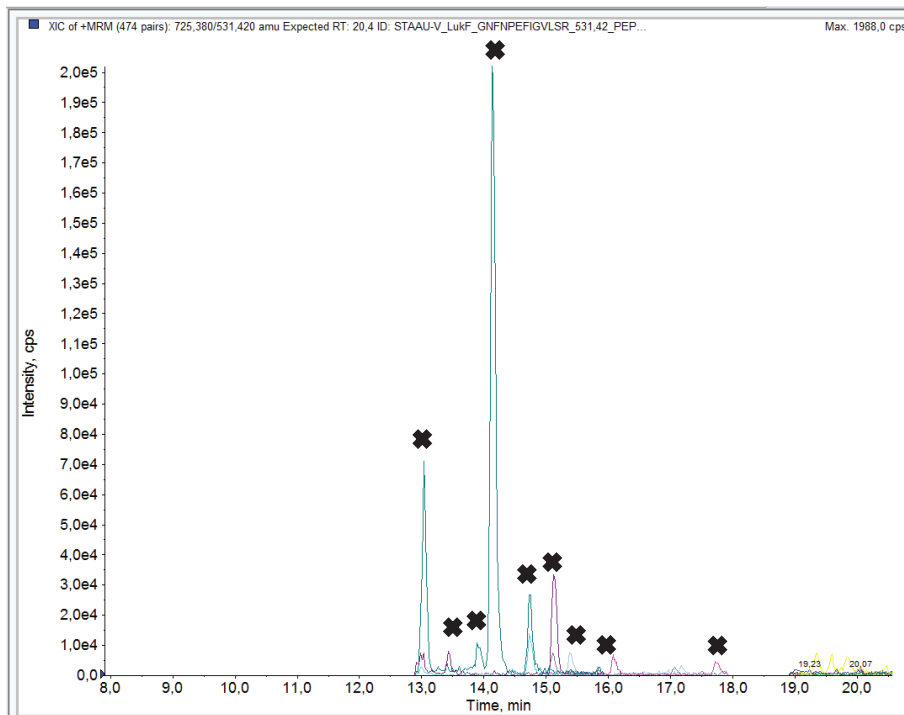




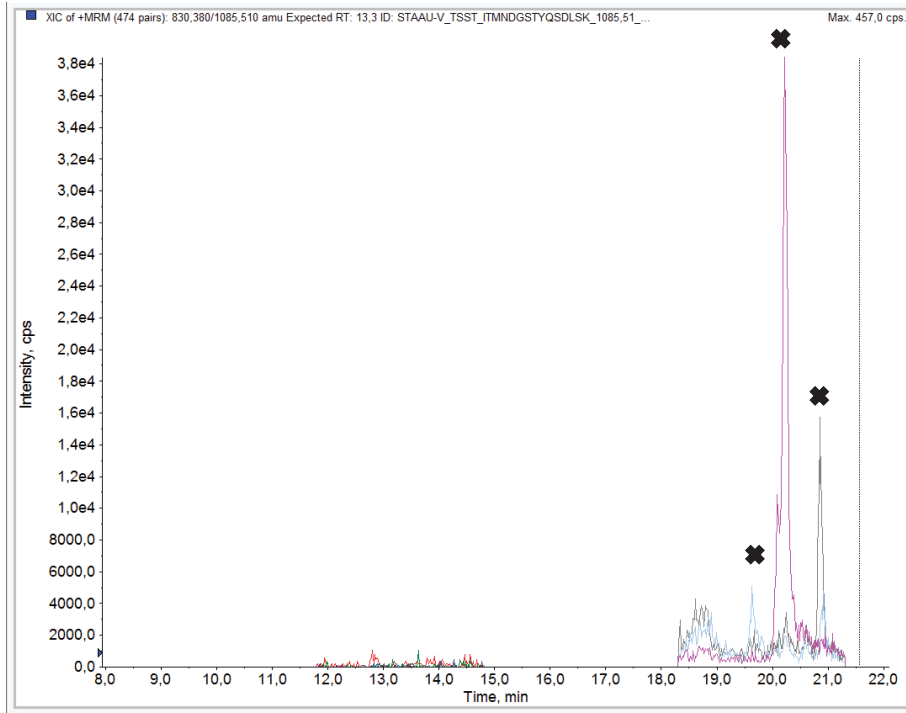
Supplementary figure 2.c: Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from mecC



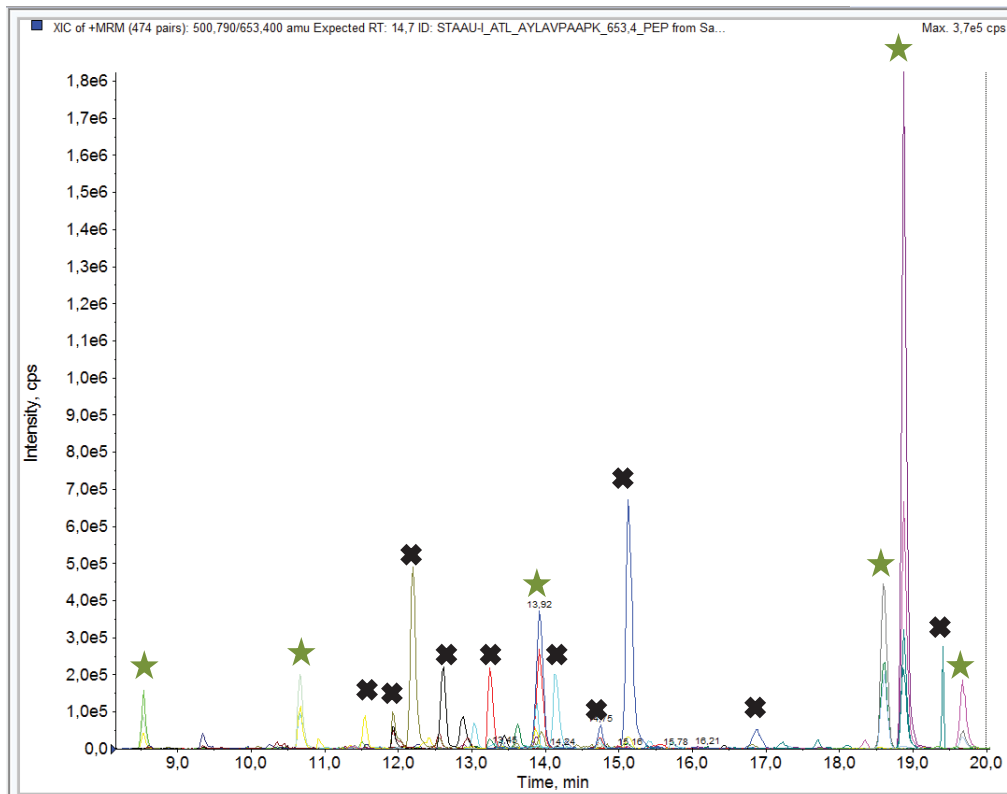
Supplementary figure 2.d: Extracted Ion chromatogram of peptide from PVL



Supplementary figure 2.e: Extracted Ion chromatogram of peptide from TSST

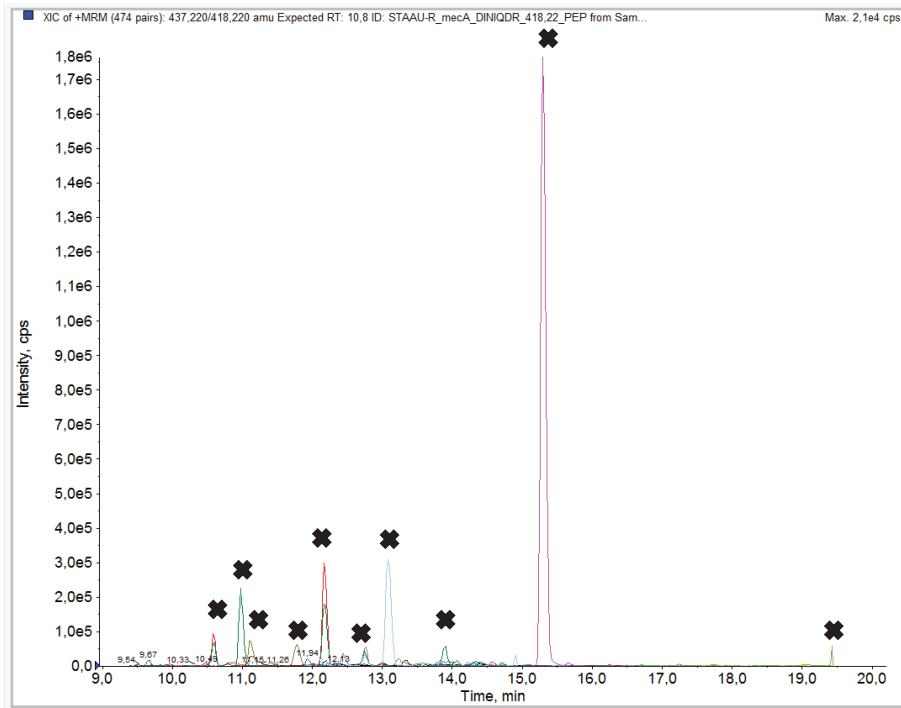


Supplementary figure 2.f: Total Extracted Ion chromatogram

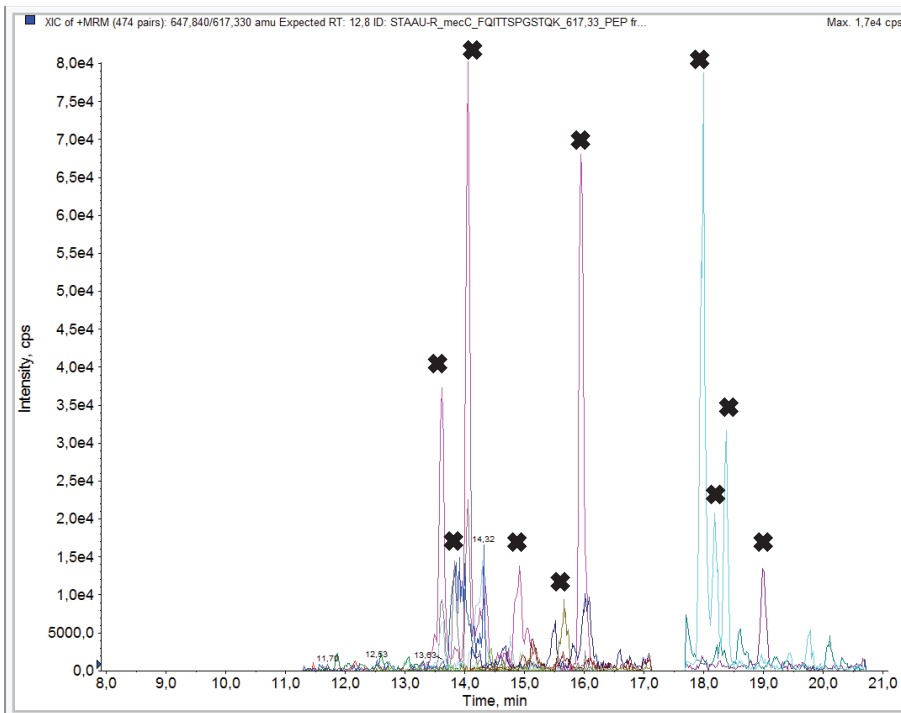


**Supplementary figure 3: Screenshot of sample 040 identified as *S.hominis* harboring neither *mecA*, *mecC*, PVL nor TSST**

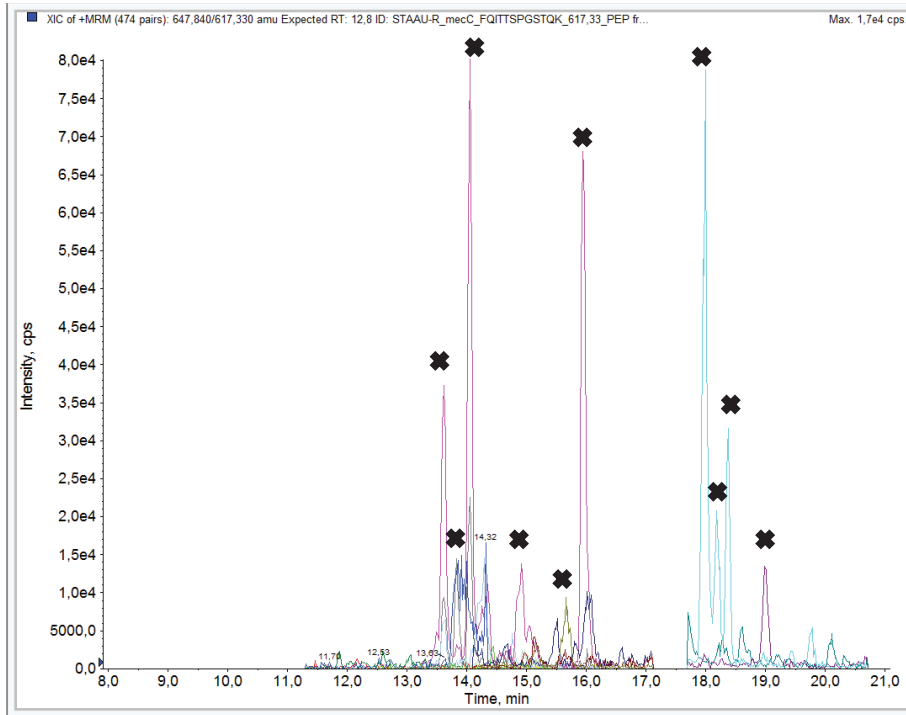
Supplementary figure 3.a: Extracted Ion chromatogram of peptide for identification



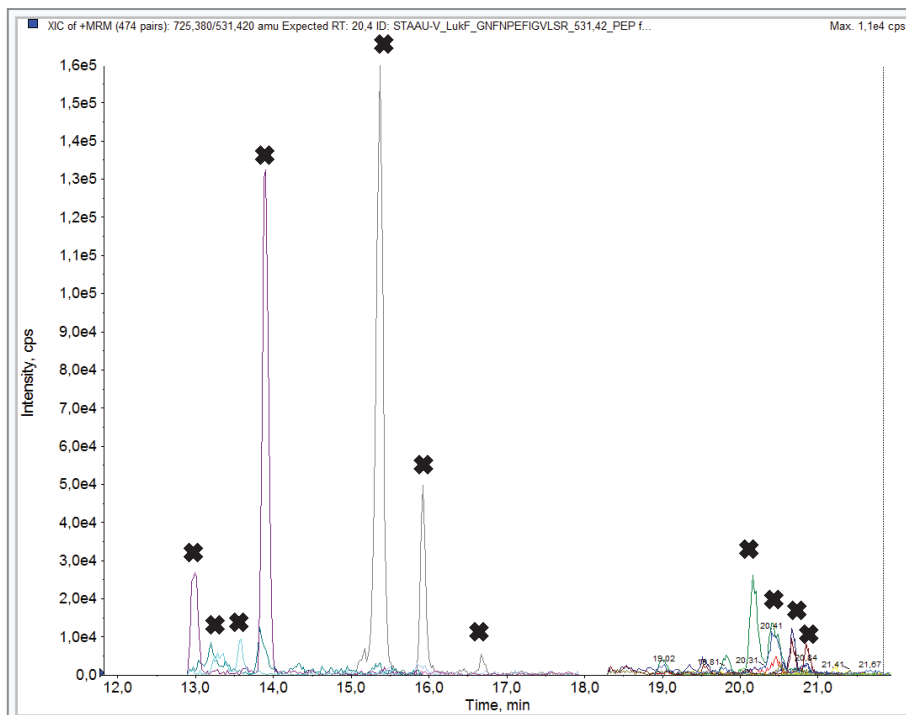
Supplementary figure 3.b: Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from *mecA*



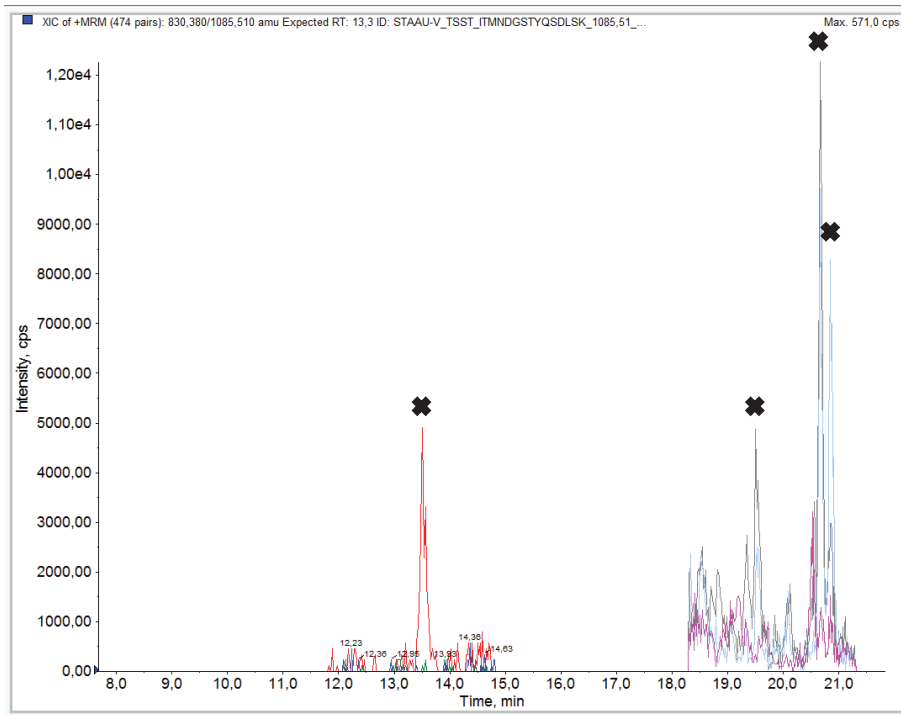
Supplementary figure 3.c: Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from mecC



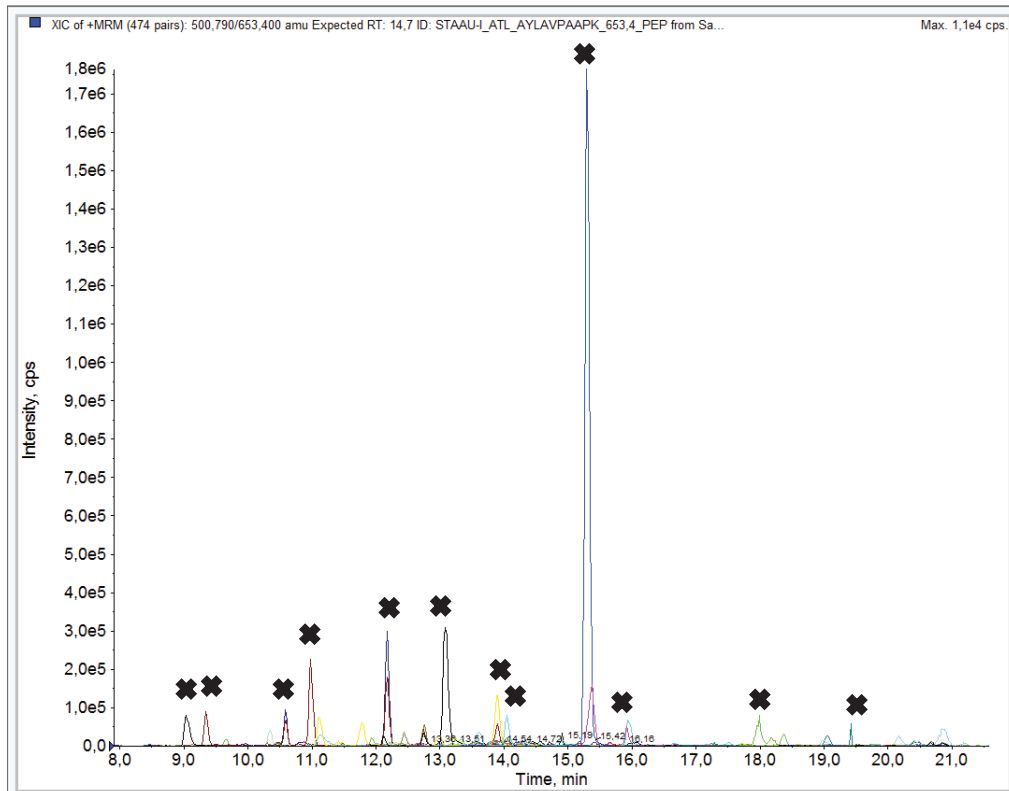
Supplementary figure 3.d: Extracted Ion chromatogram of peptide from PVL



Supplementary figure 3.e: Extracted Ion chromatogram of peptide from TSST

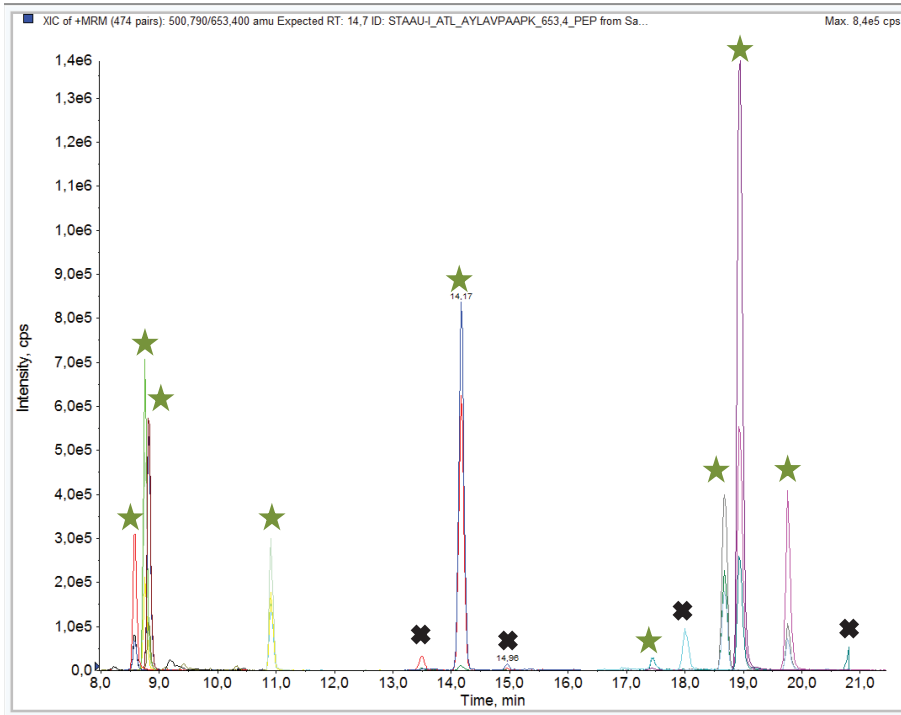


Supplementary figure 3.f: Total Extracted Ion chromatogram

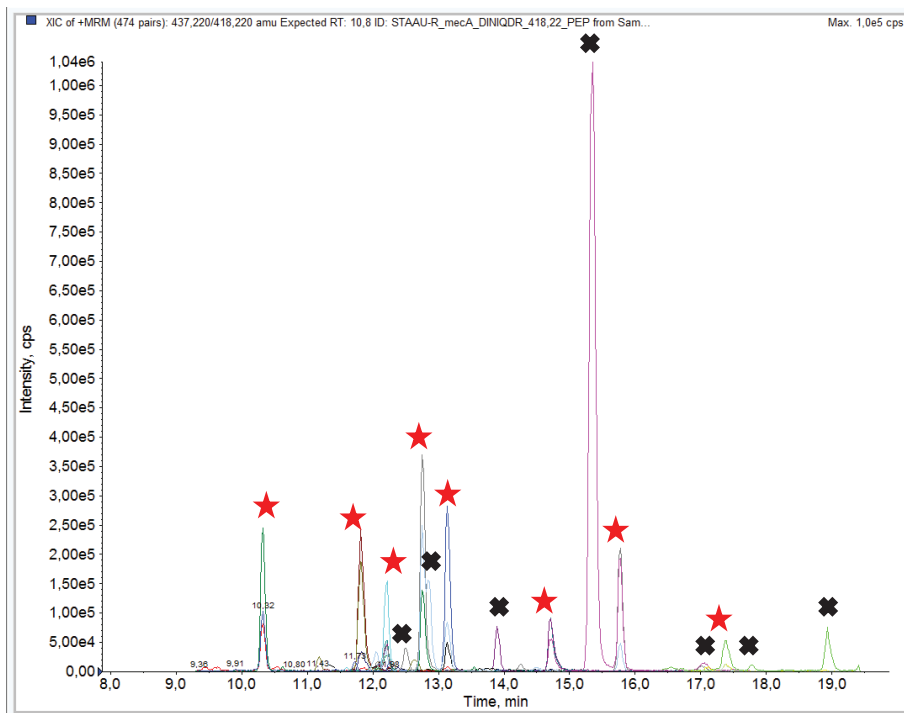


**Supplementary figure 4: Screenshot of blind Sample 071 identified as *S.aureus* harboring *mecA* and TSST**

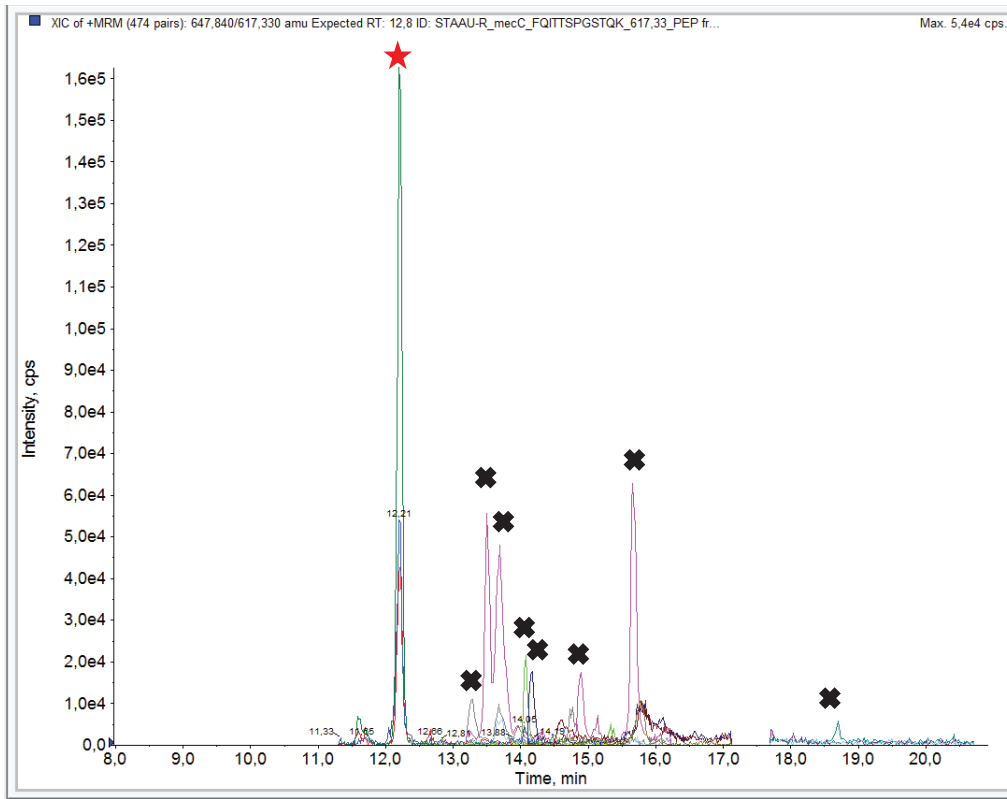
Supplementary figure 4.a: Extracted Ion chromatogram of peptide for identification



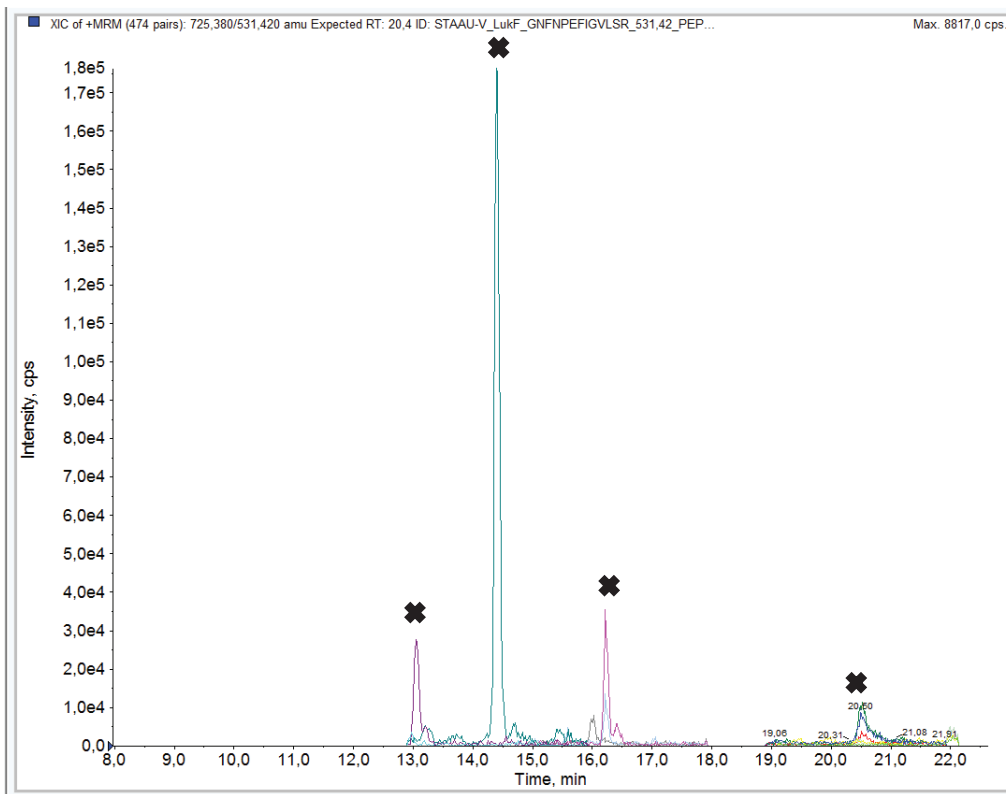
Supplementary figure 4.b: Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from *mecA*



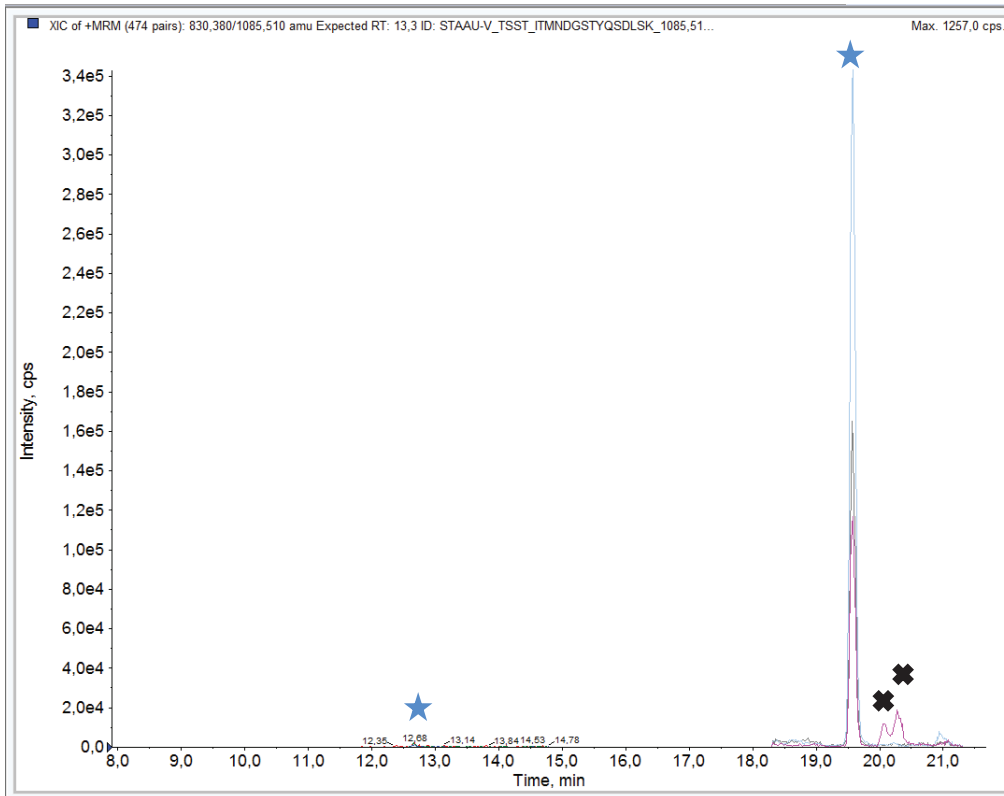
Supplementary figure 4.c: Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from mecC



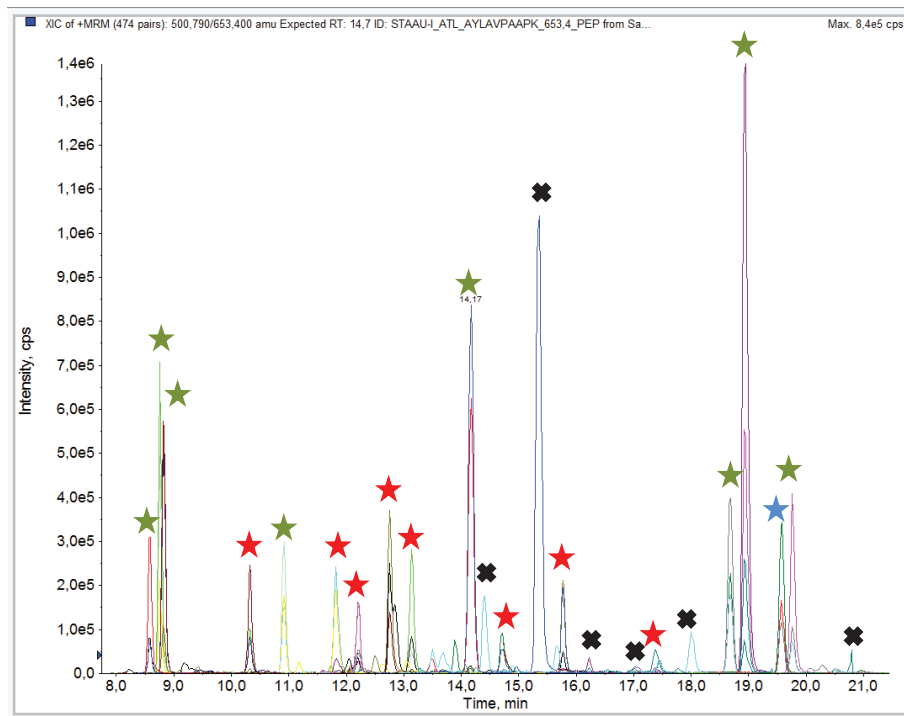
Supplementary figure 4.d : Extracted Ion chromatogram of peptide from PVL



Supplementary figure 4.e : Extracted Ion chromatogram of peptide from TSST



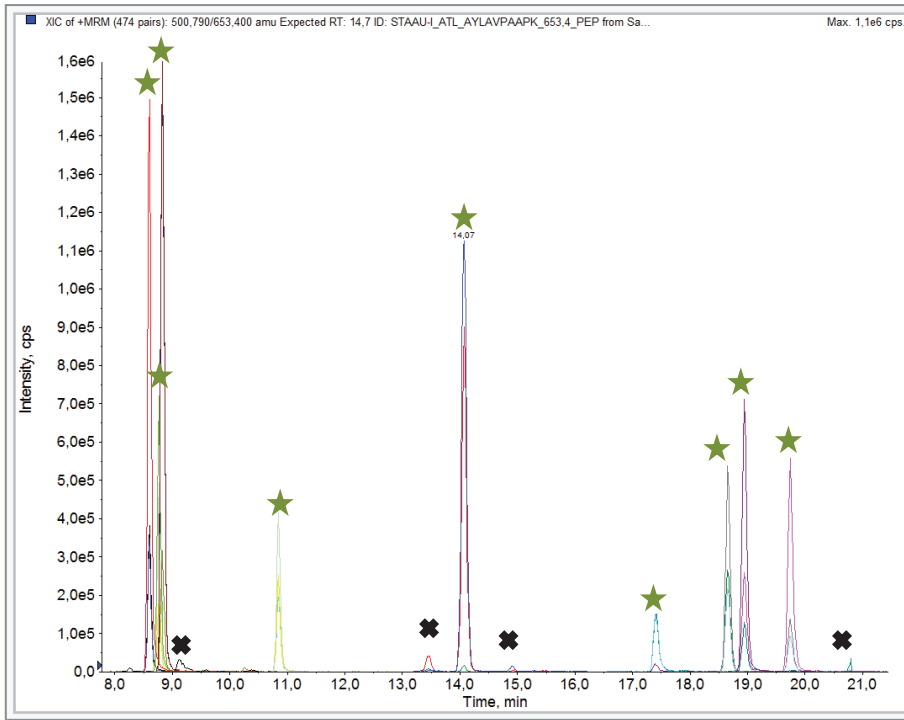
Supplementary figure 4.f : Total Extracted Ion chromatogram



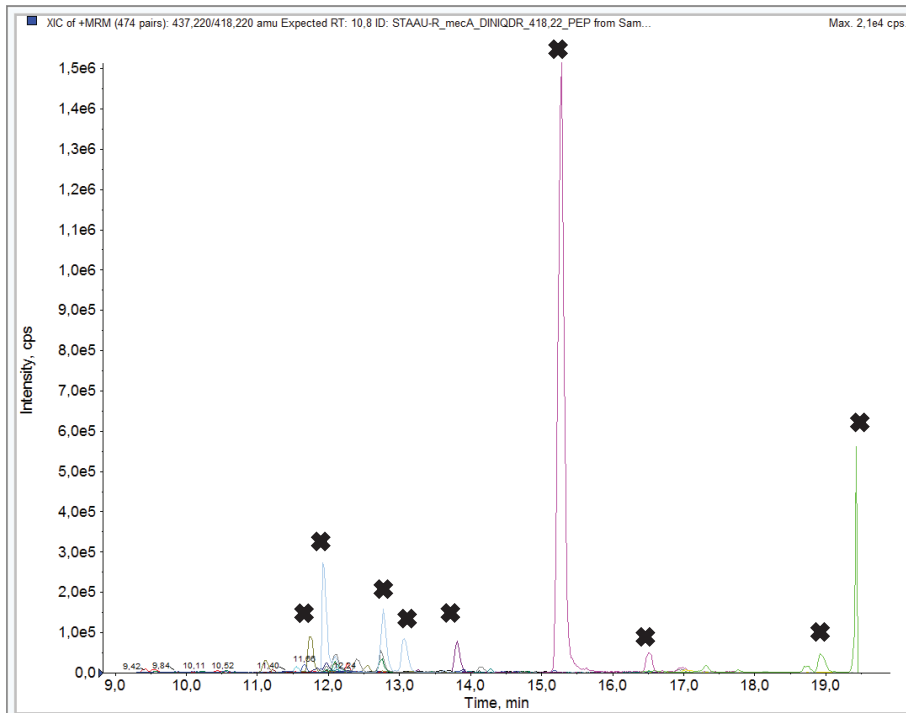


Supplementary figure 5: Screenshot of blind blind sample 078 identified as *S.aureus* harboring only mecC

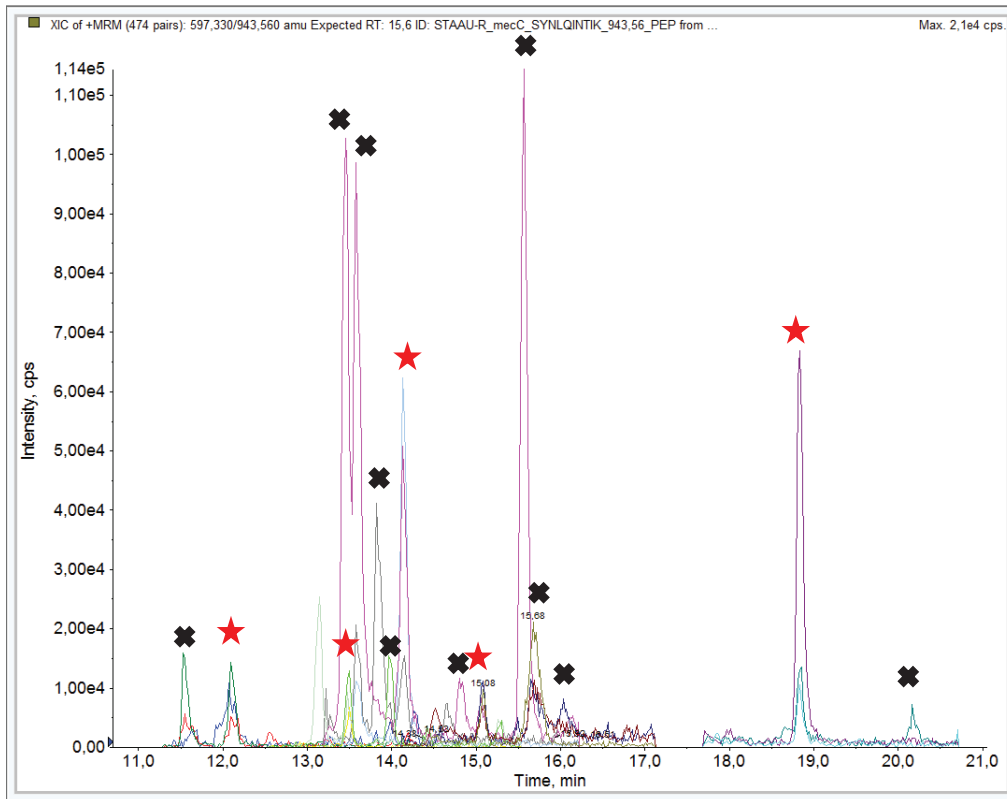
Supplementary figure 5.a: Extracted Ion chromatogram of peptide for identification



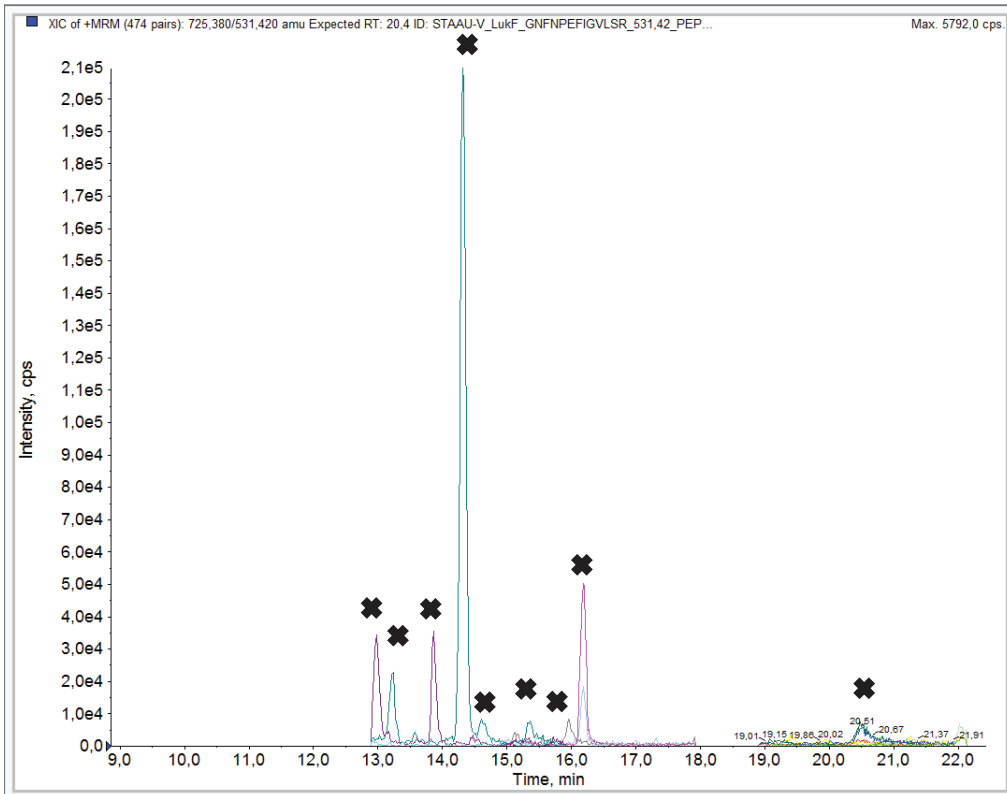
Supplementary figure 5.b: Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from mecA



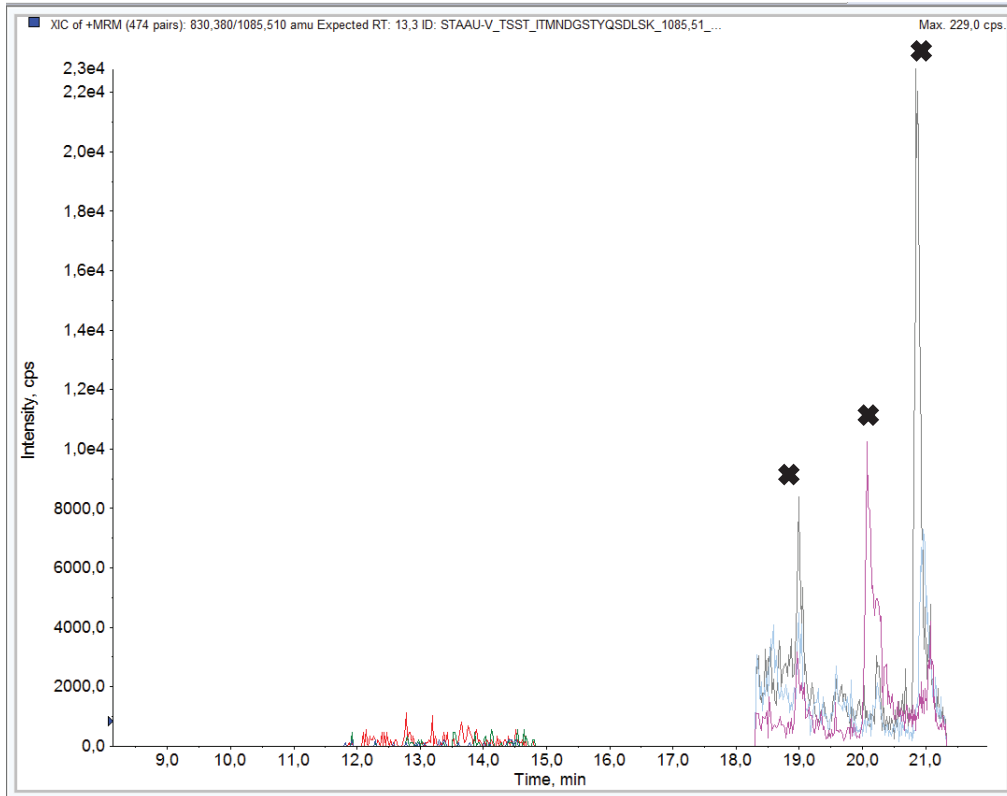
Supplementary figure 5.c : Extracted Ion chromatogram of peptide for PBP2a peptide from mecC



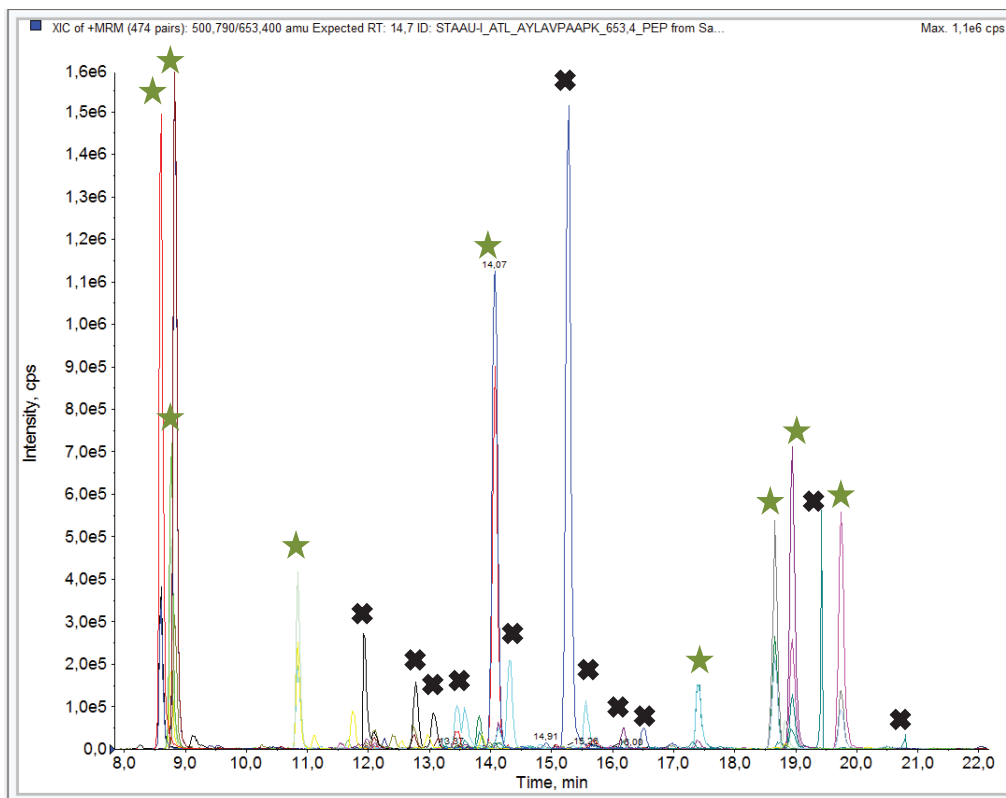
Supplementary figure 5.d : Extracted Ion chromatogram of peptide from PVL



Supplementary figure 5.e : Extracted Ion chromatogram of peptide from TSST



Supplementary figure 5.f : Total Extracted Ion chromatogram



### Supplementary figure 6: "Identity peptide" evaluation based on peptide ratio conservation

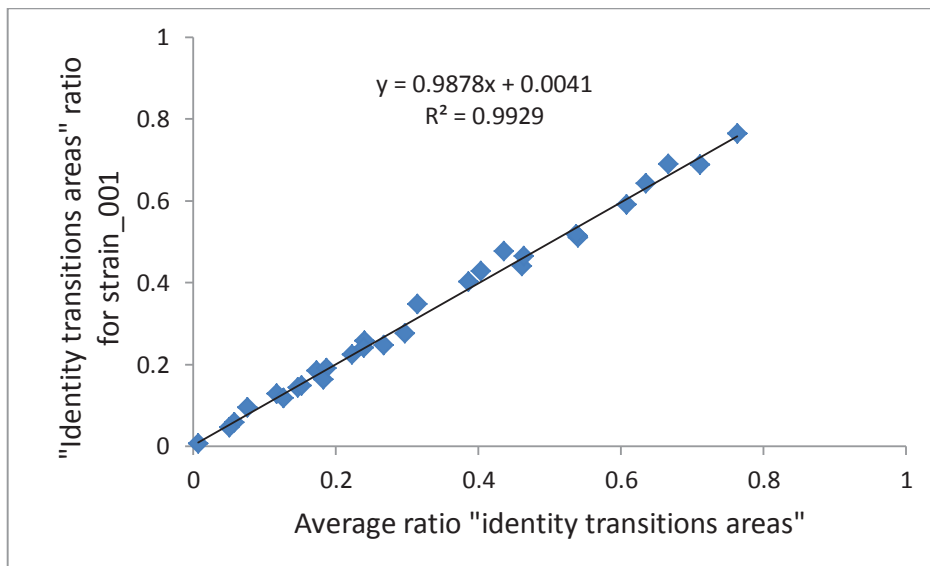
First of all, specific peptides uniquely identifying *S. aureus* were selected. Each peptide was included when:

- transitions retention time standard deviation were lower than 0.02
- transitions areas were higher than 3000

If one of the criteria is not respected for one transition, this peptide is considered as undetected. Considering each peptide with 3 transitions called T1, T2 and T3. For each transition a proportion can be calculated in each sample.

$$\text{Area ratio}(T1) = \frac{\text{Aire } T1}{(\text{Aire } T1 + \text{Aire } T2 + \text{Aire } T3)}$$

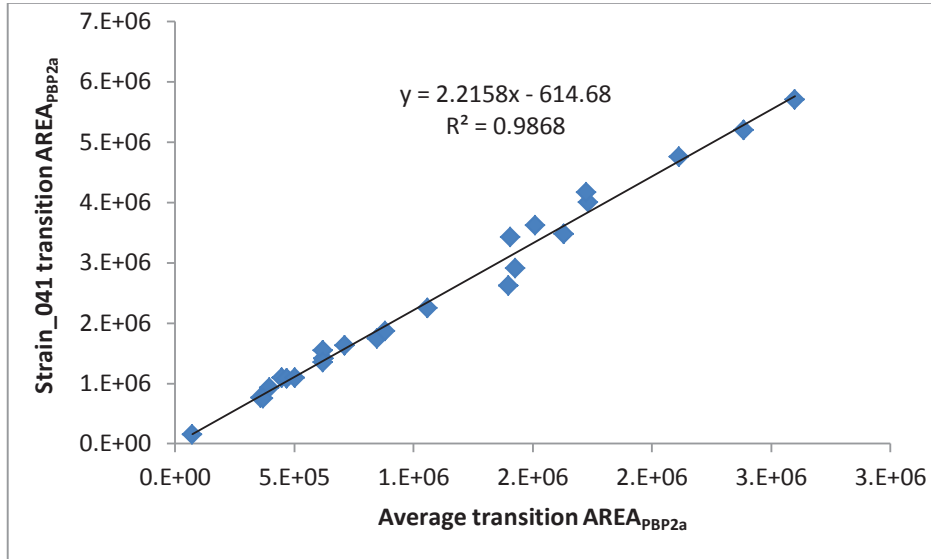
An average area for each transition can be calculated based on positive samples from train set and an average ratio for each transition can be deduced. Sample ratio can be compared to average ratio for each sample:



Strain\_001 ratio compared to average ratio for "Identity transitions areas". Slope of the linear regression and  $R^2$  can be deduced from this graph.

**Supplementary figure 7: “PBP2a peptide” and “PVL peptide” evaluation based on transitions conservation**

For each protein (PBP2a and PVL), transitions areas can be compared to average transitions area based on positive samples from train set.



Strain\_041 transition AREA<sub>PBP2a</sub> compared to average transitions AREA<sub>PBP2a</sub>.  $R^2$  can be deduced from this graph and slope from logarithmic values can be also deduced. An identity slope after logarithmic transformation indicates a zero origin of the linear regression curve.

References

1. Ito, T. et al. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4997-4999 (2012).

## 5 DISCUSSION GENERALE

---

La détection des mécanismes majeurs de résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux glycopeptides a été démontrée par LC-ESI-SRM à partir de colonies isolées dans le chapitre 4. La détection de la PLP2a a été démontrée à partir d'hémoculture dans le paragraphe 4.5. La détection de  $\beta$ -lactamase de type TEM a été démontrée à partir d'urines cliniques dans le paragraphe 4.1.2.4. Simultanément aux mécanismes de résistance aux antibiotiques, l'identité du micro-organisme a été confirmée de même que la présence de facteurs de virulence. La détection de la toxine du choc toxique, de la toxine nécrosante LPV (paragraphe 4.5) ou encore de la toxine Shiga (paragraphe 4.1.2.2) ont ainsi été démontrées à partir de colonies isolées.

Suite à cette preuve de concept, la discrimination rapide d'espèces multi-résistantes (OPC, SARM, ERV...) ou fortement pathogènes (STEC, *S. aureus* producteur de LPV ou TSST-1) par LC-ESI-SRM apparaît possible. Les questions de l'implémentation et du positionnement de cette technologie dans un laboratoire de microbiologie clinique se posent. Dans cette optique, il convient d'aborder le contexte actuel et futur du laboratoire de microbiologie puis de voir à quels types d'applications cliniques la technologie LC-ESI-SRM pourrait s'adresser. En fonction du type d'échantillon, le flux d'analyse, les performances, la cadence et la praticabilité de l'approche seront étudiés. La compétitivité de l'approche proposée sera évaluée. Enfin, l'implémentation de l'approche sera mise en perspective avec les évolutions technologiques attendues dans les 5 années à venir.

### 5.1 Atouts majeurs de l'approche :

---

L'approche LC-ESI-SRM présente de nombreux atouts. Le double niveau de filtrage des ions augmente la sélectivité de la méthode *a fortiori* dans les matrices complexes. N'étant pas un balayage en soi, la nature du filtrage favorise un fort rapport signal-bruit pour les analytes d'intérêt. La capacité de multiplexage de la technique offre la possibilité de détecter de nombreuses protéines dans la même analyse. La facilité de développement des méthodes et la non-exigence de réactifs spécifiques sont des atouts qui favorisent la praticité d'utilisation.

Enfin, le dernier atout est la mesure directe, qualitative ou quantitative de protéines, c'est à dire d'un caractère phénotypique parfois difficile à appréhender par PCR en cas de régulation de l'expression des gènes.

## 5.2 Applications cliniques :

---

Depuis les travaux précurseurs de Pasteur, Koch, Gram ou Petri, la procédure classique pour l'analyse des échantillons est l'isolement sur un milieu de culture approprié, l'identification du micro-organisme et enfin le test de sensibilité aux antimicrobiens. L'ensemble de ces étapes est réalisé au sein du laboratoire de microbiologie clinique. La voie de la microbiologie rapide s'est ouverte avec l'automatisation de ces trois piliers de la microbiologie [178,179]. La technologie MALDI-TOF s'inscrit dans cette voie. Sa rapidité, sa précision et son coût par identification l'impose rapidement comme la technologie de choix pour l'identification microbienne. Dans cette quête d'automatisation, le dépôt des micro-organismes avant l'analyse par MALDI-TOF est la dernière étape à automatiser. Bien que le temps pour identifier se soit réduit grâce au MALDI-TOF, l'antibiogramme suit toujours une procédure classique et reste une étape longue. Or le délai du temps de réponse est un facteur majeur de l'utilisation des antibiotiques à bon escient. Réduire ce temps permettrait d'améliorer la prise en charge des patients et de prolonger l'efficacité des antibiotiques. C'est pourquoi proposer une technologie telle que l'ESI-MS, permettant un dépistage rapide des résistances microbiennes apparaît important.

### 5.2.1 Intérêt clinique de l'ESI-MS

---

Les infections peuvent être classées en infections critiques, en infections chroniques ou en infections aiguës. Une infection critique est une infection dont le risque de mortalité est très élevé. Pour la démarche diagnostique et thérapeutique en pratique clinique courante, il est important de distinguer les infections chroniques des infections aiguës. Lorsque l'infection implique la persistance du micro-organisme dans l'organisme hôte, on parlera d'infection chronique. Le risque de mortalité est faible à modéré et l'infection peut être incapacitante. Une infection aiguë est une infection qui associe un risque faible de mortalité.

L'approche LC-ESI-SRM permet de confirmer l'identité du micro-organisme et de mettre en avant les mécanismes majeurs de résistance aux antibiotiques en moins de deux heures. L'information sera rassurante pour le clinicien si la pertinence du traitement probabiliste engagé avant tout résultat biologique est confirmée par la nature du micro-organisme et des mécanismes de résistance associés. En cas de prise en charge inadaptée, un nouveau traitement pourra rapidement être mis en œuvre. Gagner en rapidité d'identification des micro-organismes et surtout gagner en rapidité sur le choix des antibiotiques est fondamental pour les infections critiques. En revanche, gagner en rapidité d'analyse pour les infections chroniques ou aiguës est non vital pour le patient. L'approche ne semble économiquement possible que si le coût par test est similaire au coût actuel ce qui semble encore difficile aujourd'hui. Il apparaît donc probable que l'approche ESI-MS soit réservée aux infections critiques.

Cependant, il pourrait y avoir un bénéfice sociétal à sélectionner rapidement l'antibiotique adapté. L'utilisation d'antibiotiques larges spectres crée une pression qui peut conduire à la sélection de bactéries multi-résistantes (BMR). Les BMR sont redoutées pour la survie du patient et peuvent nécessiter la fermeture et le transfert d'une unité de soins intensifs par mesure de contrôle [180,181]. Il est ainsi attendu que raccourcir le délai avant l'utilisation d'une antibiothérapie appropriée conduise à des bénéfices cliniques et économiques. En cas d'infection nosocomiale, cela devrait également réduire le temps pour identifier la source d'infection, réduisant les coûts d'investigation [182]. Enfin, les capacités de typage de la technique devraient améliorer le suivi des mesures de prophylaxie réalisées par les hygiénistes.

### 5.2.2 Hémocultures :

---

L'article illustre la détection de souches de *S. aureus* et la différenciation du statut SARM moins de deux heures après que l'hémoculture devienne positive. L'information importante à retenir est que la sensibilité de la spectrométrie de masse est suffisante pour déterminer l'identité et les principaux mécanismes de résistance de micro-organismes tels que *S. aureus*. Le procédé peut sans doute être étendu à l'ensemble des espèces couramment identifiés dans les hémocultures ainsi qu'aux principaux mécanismes de résistance. Le pronostic vital est souvent engagé en cas de bactériémies, et encore plus en cas de choc septique.



Le bénéfice médical est à démontrer formellement mais est largement attendu. L'étude de Kumar *et al* sur les chocs septiques indique que l'initiation d'une thérapie inappropriée induit une réduction d'un facteur 5 de la survie [11]. Une thérapie appropriée est administrée dans seulement 80% des cas de chocs septiques. Les nouvelles méthodes d'identification rapide devraient donc améliorer le délai et le taux de thérapies appropriées. Si, par exemple un *E. coli* est identifié, il sera possible de savoir si il est producteur de céphalosporinase de type AmpC, de BLSE ou encore de carbapénémase. Les patients reçoivent actuellement une antibiothérapie large spectre avec le risque de créer une pression de sélection conduisant à l'émergence de BMR. Une désescalade du traitement serait envisageable en utilisant des antibiotiques à spectre plus étroit. Cependant, pour que cela puisse fonctionner, il faut une parfaite communication entre le laboratoire de microbiologie et le clinicien. En conclusion, l'approche proposée semble parfaitement adaptée aux infections critiques et à l'analyse des hémocultures.

### 5.2.3 Urines et infections du tractus urinaire

---

L'interprétation d'une infection du tractus urinaire est réalisée au regard de la présence de signes cliniques, de leucocyturie et de bactériurie. L'interprétation dépend du contexte, communautaire ou relatif aux services de santé, de l'âge et du sexe du patient. On parle généralement d'infections du tractus urinaire à partir de  $10^5$  UFC/mL (UFC pour unité formant colonie) mais aussi à partir de  $10^3$  UFC/mL en cas de signes cliniques et de leucocyturie ou même à partir de 10 UFC/mL pour les aspirations sus-pubiennes. En grande majorité, les infections du tractus urinaire ne sont pas critiques. Elles peuvent être liées à une cystite, une prostatite ou à une pyélonéphrite selon si la vessie, la prostate ou les reins sont touchés. Ce dernier cas est urgent car il peut entraîner une septicémie. La prévalence est faible de l'ordre de 5% dans la population féminine [183]. Si les signes cliniques sont présents, la pratique médicale est d'initier une monoantibiothérapie probabiliste dirigée contre *E. coli*, l'espèce la plus prévalente, et d'adapter le traitement secondairement, suite à l'antibiogramme. L'approche proposée permet d'identifier les micro-organismes et de mettre en évidence les mécanismes de résistance en moins de deux heures, pour des urines avec une concentration de bactéries supérieure à  $10^5$  UFC/mL. Les études conduites en parallèle au travail de thèse montrent que la sensibilité actuelle de la spectrométrie de masse est insuffisante en dessous de  $10^5$  UFC/mL.

Pour résoudre ce manque de sensibilité, un temps court d'enrichissement des urines pourraient être envisagé.

Mais sans impact clinique considérable et avec un coût supplémentaire, il apparaît difficile de modifier la pratique médicale établie. En conclusion, seules les urines critiques (suspicion de pyélonéphrite, aspirations sus-pubiennes) pourraient être analysées par l'approche LC-ESI-SRM bien qu'une approche systématique pourrait favoriser l'utilisation des antibiotiques à bon escient.

#### 5.2.4 Autres infections critiques

---

Pour les autres infections critiques telles que les méningites, les péritonites ou les pneumonies, la charge bactérienne est insuffisante actuellement pour un diagnostic direct de l'agent étiologique par ESI-MS. En revanche, l'approche proposée pourrait être envisagée à partir des isollements sur milieu de culture appropriés de manière à réduire le délai d'une antibiothérapie appropriée.

Dans le cas de patients multi-colonisés par des levures avec un risque de fongémie non négligeable, le diagnostic rapide et précoce en vue d'un traitement préemptif est attendu. D'autant plus que les tests de sensibilité aux antifongiques sont longs et encore imparfaits. Pour éviter le traitement probabiliste, l'approche pourrait permettre de cibler les résistances aux antifongiques avant fongémie ou d'adapter le traitement en cas d'échec thérapeutique.

### 5.3 Critères de performances :

---

#### 5.3.1 Identification par profil protéique:

---

Parallèlement à mon travail de thèse, l'identification par profil protéique obtenu en ESI-MS a été démontrée au sein du projet. Avant l'hydrolyse à la trypsine, les protéines des échantillons sont faiblement séparées sur une courte colonne chromatographique. Les résultats préliminaires montrent que l'identification est possible dans un temps comparable à la procédure MALDI-TOF et avec une précision similaire. L'identification par profil ESI-MS a sans doute la même efficacité que le profil MALDI-TOF puisque que les marqueurs sont similaires.

Par ailleurs, la petite séparation des protéines en amont et la faculté de la source à analyser des ions multichargés offrent une profondeur de résultat plus importante. La méthode peut être considérée comme une méthode universelle car elle permet d'identifier tout micro-organisme présent dans la base de spectres.

### 5.3.2 Confirmation de l'identification par SRM

---

L'identification est confirmée par la détection ciblée en mode SRM de peptides spécifiques des espèces recherchées. Des peptides spécifiques des espèces *C. albicans*, *E. coli* et *S. aureus* ont pu être identifiés. Une validation *in silico* de ces peptides a été effectuée pour les trois espèces. Cependant, les séquences protéiques bactériennes ne sont pas toutes référencées dans les bases de données. Par exemple, *E. coli* est une espèce bien représentée avec 36 souches différentes dans la base SwissProt dont la souche K12 (MC4100) qui a 765 séquences protéiques référencées. (UniProt Release 2012\_11) Alors que l'espèce *E. aerogenes* qui est également un membre des entérobactéries est représentée par une seule souche (ATCC13048) et n'a que 12 séquences protéiques référencées. (UniProt Release 2012\_11) Ainsi, une étude *in silico* est limitée par la richesse des bases de données. Pour *S. aureus*, les peptides ont pu être évalués expérimentalement à l'aide d'un jeu de souches de staphylocoques dorés ou non. Pour ce genre bien représentée dans les bases, l'étude *in silico* semble suffisamment stringente, elle a permis de retenir 15 cibles spécifiques des staphylocoques dorés. La spécificité de ces 15 peptides a été confirmée par l'étude expérimentale. Dans un premier temps, la sélection des cibles possibles a été faite à l'aide d'un instrument de faible résolution (triple quadripôle). Un instrument hybride à haute résolution de type quadripôle-TOF a permis dans un second temps d'identifier 50 fois plus de cibles en moyenne pour *E. coli*. Cette problématique n'a été abordée que de façon superficielle dans ma thèse, elle sera à reprendre avec un instrument de haute résolution qui offrira un choix plus vaste avec cinquante fois plus de cibles potentielles en moyenne. La sélection de peptide confirmant l'identité des espèces est sans doute possible pour l'ensemble des espèces cliniquement pertinentes. Elle demandera le développement d'une méthode permettant de pallier à l'insuffisance des bases de données actuelles.

### 5.3.3 Résistance et virulence par SRM

---

Quatre familles d'antimicrobiens ont été étudiées. La détection de  $\beta$ -lactamases, de ligases, de la PLP2a et de la lanostérol déméthylase a été démontrée. La détection de toxines telles que TSST-1, la toxine PVL ou encore la Toxine Shiga a également été démontrée à partir de colonies isolées. Les protocoles proposés permettent aussi bien de détecter des enzymes cytoplasmiques ou périplasmiques que des protéines membranaires. Le protocole rapide de lyse-digestion développé semble améliorer l'extraction des protéines associées à la membrane sans dégrader la détection des protéines de ménage. L'automatisation de ce protocole a d'ailleurs été accompli pour une durée totale de 37 minutes et validé à l'aide de souches de *C. albicans*, *E. coli* et *S. aureus*.

Deux difficultés principales, attendues, sont à surmonter. La détection de mécanismes de résistance qui s'expriment uniquement en présence d'antimicrobiens (les mécanismes inductibles) et les mécanismes où certaines positions de mutations traduisent ou expliquent le degré de résistance. Pour la ligase VanB, des méthodes alternatives sont à rechercher soit pour favoriser la détection de la cible si un niveau constitutif existe ou soit pour cibler les produits des gènes de régulation de l'opéron. Pour les résistances naturelles de type AmpC dont l'expression est induite par l'antibiotique, la connaissance du spectre d'hydrolyse propre à l'espèce permet de choisir un antibiotique adapté. Pour les variants des mécanismes TEM ou SHV, le taux d'expression de ces enzymes peut être pris en compte et la prévalence des enzymes de phénotype de résistance étroit est probablement faible.

Pour chaque protéine ciblée en SRM, plusieurs peptides sont généralement détectés. Même si les protéines mutent, il y a de fortes chances pour qu'un des peptides marqueurs ne soit pas modifié. En ce sens, une méthode multiplexant plusieurs peptides peut être considérée comme une méthode robuste, peu sensible à l'évolution à venir des micro-organismes.

### 5.3.4 Cadence d'analyse :

---

La rapidité de l'analyse est un paramètre important. L'identification par profil protéique a été démontrée en une minute dans le projet. La détection de mécanismes de résistance et de

toxines est démontrée en 25 minutes à l'aide de particules de 3.5µm de diamètre pour la séparation chromatographique. (HPLC) En utilisant des particules de diamètre inférieur à 2µm, le temps de séparation pourra aisément être inférieur à 8-10 minutes sans détériorer la qualité de séparation. (UPLC) La cadence d'analyse serait alors de 5 à 7 échantillons par heure soit 120 à 168 échantillons par jour. Cette cadence semble compatible avec les besoins en analyses critiques d'un gros centre hospitalier régional.

### 5.3.5 Capacité de multiplexage :

---

La capacité à multiplexer permet d'évaluer la potentialité du menu. Imaginons que la méthode de séparation HPLC soit transposée en une méthode UPLC de 8 minutes et que le temps pour cibler une transition soit de 10ms en prenant en compte le temps pour adapter les tensions. Typiquement, un pic en UPLC s'élue en 6 secondes. Pour avoir environ 10 points par pic, un temps de cycle de 0.6 secondes peut être appliqué. Dans ces conditions, il est possible d'analyser, simultanément, 20 peptides à l'aide de 3 transitions par peptide. Si la fenêtre pour cibler un peptide donné encadre le temps de rétention attendu de 30 secondes. Il serait possible de cibler 160 peptides dans une seule méthode SRM à condition que les peptides soient répartis uniformément sur le chromatogramme. Il apparaît raisonnable d'estimer que les méthodes SRM détecteront au moins 100 peptides par analyse. Pour la famille des  $\beta$ -lactamines, le nombre de mécanisme de résistance enzymatique à détecter peut paraître important pour les BGN et semble dépasser les capacités de multiplexage. Mais nous avons vu dans les paragraphes 4.2.3 et 4.3.3 que le nombre de peptides minimum est de 29 pour couvrir à la fois les  $\beta$ -lactamases acquises majeures de type AmpC, les BLSE et les carbapénémases. Il est donc possible de suivre dans la même méthode l'ensemble des  $\beta$ -lactamases majeurs à l'aide de 3 peptides par enzyme ainsi qu'une dizaine de peptides propres à l'espèce en présence. La capacité de multiplexage du mode SRM semble adaptée aux questions cliniques posées en microbiologie.

### 5.3.6 Reproductibilité :

---

La reproductibilité d'une approche est un critère crucial. L'ensemble des méthodes développées devront être validées analytiquement et cliniquement. Nous avons vu qu'hormis quelques peptides non répétables (oxydation des méthionines, cyclisation, défaut de digestion, faible hydrophobicité), la majorité des peptides sont détectés de manière répétable. Ainsi, les comparaisons de détection de la même protéine dans des échantillons différents ont démontré l'absence d'interférence. L'évaluation clinique de staphylocoques dorés en aveugle a montré des résultats en parfait accord avec les méthodes phénotypiques usuelles ou les méthodes de biologie moléculaire.

### 5.3.7 Interprétation des résultats

---

Sans nul doute, le retraitement des données sera une étape clé de la réussite du projet. Cette tâche est longue et fastidieuse car elle nécessite actuellement une étape visuelle. L'idée serait de remplacer tous les critères établis au fil des analyses dont l'étape visuelle par un processus automatisé. Actuellement, le prétraitement des chromatogrammes est conduit par des algorithmes de retraitement développés par les constructeurs de spectromètre de masse. L'extraction des pics est validée visuellement à l'aide de plusieurs transitions par peptide, en s'assurant du respect de critères établis à l'aide des peptides de synthèse analysés dans l'eau. Pour schématiser, la méthode 3 de retraitement développée pour cette étude associe chaque transition à un bâtonnet dont les caractéristiques sont sa position sur le chromatogramme et sa taille. Sa position correspond au temps d'élution du pic supposé et sa taille correspond à l'aire du pic supposé. Le fait de suivre trois transitions par peptide permet de contrôler le temps de rétention et le fait de suivre, préalablement, le peptide de synthèse avec la même méthode permet de contrôler la proportion entre les pics des transitions. Demain, ces trois étapes devront être automatisées de manière à faciliter le retraitement, à le rendre plus objectif et de manière à favoriser la détection des signaux faibles. Pour la validation des pics, cela passera par une analyse de la forme des pics en apprenant la forme du signal d'un peptide de synthèse analysé dans une matrice proche de la matrice biologique, ou le cas échéant dans une matrice aqueuse. Par ailleurs, le choix de suivre trois transitions par peptide fut principalement guidé par le retraitement manuel des données. Si les outils de retraitement sont automatisés et à

condition que l’empreinte soit validée, le choix de l’empreinte recherché pourra favoriser les transitions les plus intenses sans se soucier d’un nombre de transitions fixé arbitrairement.

## 5.4 Modalités d’analyse :

---

### 5.4.1 Flux d’analyse

---

Pour que l’implémentation de l’approche puisse être une réussite, le flux hospitalier devra être optimisé. Les différentes étapes seraient :

- l’ensemencement des flacons dans les services de soins ;
- la mise en culture, selon l’organisation de l’hôpital : délocalisée dans les services de soins, centralisée dans le laboratoire de microbiologie ou encore dans le laboratoire central ;
- le transport entre les services et le laboratoire d’analyse est à prévoir avant ou après la mise en culture selon l’organisation adoptée ;
- l’analyse des flacons positifs pourra être semi-automatisée avec un transfert manuel entre l’incubateur et l’automate de préparation d’échantillon et entre l’automate et le système LC-ESI-MS-MS ou encore complètement automatisé ;
- un système d’alerte automatique envoyé dans les services de soins avec une mise en garde du fait de la nature automatique du résultat sera réalisé. Le résultat sera validé par le biologiste en journée.

A noter que l’approche prendrait tout son sens avec un fonctionnement en continu pour l’analyse des échantillons critiques. Cette contrainte organisationnelle peut inciter à implémenter l’instrument dans un laboratoire central fonctionnant jour et nuit, y compris les week-ends à condition que le microbiologiste assure le rendu du résultat et ait toujours la maîtrise de la technologie.

### 5.4.2 Praticité d’utilisation

---

Une solution facile à utiliser est envisageable mais de nombreux points sont à résoudre. L’automatisation de la préparation d’échantillon du flacon d’hémoculture au spectromètre de

masse sera nécessaire. A ce jour, le prélèvement de l'échantillon dans le flacon d'hémoculture est manuel. En revanche, les étapes de collection des micro-organismes, de lyse et de digestion sont automatisées. Après l'identification du micro-organisme, la sélection de la méthode SRM devra être automatique en fonction de l'espèce ou de la sous-espèce identifiée et du tableau clinique du patient. Le retraitement du chromatogramme devra être automatisé grâce à des algorithmes appropriés.

Enfin, le résultat de l'analyse devra aussi être transféré immédiatement au système d'information de l'hôpital pour favoriser la prise en charge du patient dans le délai le plus court possible. Si les étapes pour rendre pratique la technologie sont résolues, la technologie sera très simple car les décisions seront prises par l'instrument sans intervention humaine et sans réactif spécifique. Si un mécanisme de résistance préjudiciable au traitement du patient est identifié, un message d'alerte pourra être envoyé automatiquement au service clinique. Ce résultat devra toutefois être validé par un microbiologiste avant le rendu définitif.

Il sera également possible de développer le dosage d'un nouveau mécanisme de résistance et de l'implémenter à distance par une simple mise à jour des méthodes SRM. Aucun achat de réactif spécifique ne sera nécessaire. La grande facilité avec laquelle il est possible de développer et de déployer des méthodes SRM semble particulièrement adaptée pour suivre l'évolution du monde microbien.

### 5.4.3 Accessibilité de l'instrument

---

L'accessibilité de l'instrument va dépendre du stade d'automatisation de la technologie et de l'organisation des hôpitaux. Si le souhait est de répondre à un besoin d'urgence, il faudra que l'accès à l'instrument soit possible à tout moment. Il ne semble pas opportun de traiter les échantillons par groupe. Au sein du projet, le prototype d'automatisation de la préparation d'échantillon a été mis au point pour traiter par groupe de 30 échantillons. Il conviendrait d'adapter le protocole pour analyser un échantillon unique dès qu'un flacon d'hémoculture positif est détecté.

## 5.5 Coûts

---



Cette approche vient en complément des instruments semi-automatisés d'identification et d'antibiogramme. De toute évidence, l'implémentation de l'approche LC-ESI-SRM entrainera un coût supplémentaire au moins dans un premier temps. Ce coût ne pourra être justifié que si l'intérêt médical est démontré.

Le coût technologique est un paramètre décisif. Il est important de dissocier le cout de l'instrument du cout des réactifs. Le cout de l'instrument sera sans doute assez élevé mais le coût des réactifs devrait être raisonnable. Aucun réactif spécifique n'est utilisé, le coût réactif est essentiellement lié aux consommables de lyse-digestion et aux colonnes chromatographiques utilisées. Il devrait être inférieur à 10-15€ par test. Les coûts liés à l'installation et à la maintenance des spectromètres ne sont pas négligeables non plus et devront être intégré dans le coût par test.

En résumé, la réussite économique de l'approche va dépendre du nombre d'applications cliniques prises en charge par l'instrument et du cout par test.

## 5.6 Compétitivité de l'approche LC-ESI-MS/MS

---

Le succès de l'implémentation sera fonction de la compétitivité de l'approche vis-à-vis des autres technologies possibles. L'ESI-MS-MS sera une technique complémentaire du MALDI-TOF et de l'antibiogramme. Le MALDI-TOF tel qu'il est utilisé dans les laboratoires de microbiologie pourrait permettre d'identifier les pathogènes par analyse directe des hémocultures [184-186]. Cependant, les échantillons polymicrobiens qui concernent environ 15% des hémocultures, de 10% chez les enfants à 30% chez les patients immunodéprimés ne sont pas encore correctement adressés par MALDI-TOF et surtout la résistance ne peut, au mieux, être prédite que par typage des lignées résistantes ou sensibles (uniquement si la résistance est clonal). Un système de purification des protéines ou des peptides cibles seraient nécessaires pour adresser la résistance de manière reproductible et sensible avec un MALDI-TOF. Parmi les systèmes les plus spécifiques, la capture par anticorps a fait ses preuves. Cependant, la diversité du monde microbien est tellement complexe et évolutive, en particulier pour les BGN, que le nombre de protéines ou de peptides cibles est immense pour couvrir ne serait-ce que les  $\beta$ -lactamases [187]. Le coût de développement des méthodes de capture de

l'ensemble des cibles serait considérable, le multiplexage serait tout de même limité [188,189] et l'implémentation de la détection d'un nouveau mécanisme de résistance serait moins aisée et plus longue que par LC-ESI-MS.

L'identification moléculaire de gènes cibles par PCR a aussi fait ses preuves mais cette méthode n'est pas encore implémentée en méthode de routine. Des tests de PCR sont approuvés pour le diagnostic *in vitro* de SARM et de staphylocoques à coagulase négative directement dans les hémocultures positives [190] (<http://www.cepheid.com/>). Malgré la démonstration des bénéfices cliniques et économiques sur les bactériémies à staphylocoques dorés [182], l'utilisation n'est pas systématique. Deux facteurs limitent l'utilisation massive de ces tests PCR : le coût par test qui incombe aux hôpitaux et la praticité de la technologie qui monopolise du personnel hautement qualifié. A l'inverse la technologie LC-ESI-MS ne nécessite pas de réactifs spécifiques et elle pourrait être suffisamment automatisée pour ne pas nécessiter un personnel qualifié. La PCR bénéficie toutefois d'un avantage majeur : sa sensibilité. Il n'est pas possible d'amplifier les protéines comme les acides nucléiques. Ainsi, des tentatives de détection de l'ADN bactérien dans le sang total par PCR ont été entreprises. Mais des problèmes de sensibilité dus à la présence de sels ou d'inhibiteurs ou la surinterprétation possible de la présence d'ADN [191] sont actuellement rédhibitoires. L'utilisation d'une amplification par croissance bactérienne (hémoculture) avant PCR est nécessaire. Elle est également suffisante pour les tests ESI-MS. La PCR n'a donc actuellement pas d'avantage compétitif de sensibilité par rapport à l'ESI-MS pour l'analyse des hémocultures.

Le PLEX-ID est un instrument qui permet de résoudre certaines des problématiques soulevées dans cette thèse. Il s'agit d'un système qui associe des PCR large gamme à une détection ESI-MS et une interprétation par triangulation pour identifier semi-quantitativement tous les micro-organismes présents dans l'échantillon. L'instrument est automatisé pour l'étape ESI-MS mais n'est pas entièrement automatisé pour la préparation d'échantillon et la purification des produits de PCR. Des sondes spécifiques peuvent aisément être ajoutées pour cibler les principaux mécanismes de résistance ou facteurs de virulence. Cependant, cet instrument vient d'être retiré de la vente à visée diagnostic *in vitro* par Abbott [192]. La lourdeur des étapes de préparation d'échantillon en amont du spectromètre de masse rendait

l'approche irréaliste en routine. Même si le retrait de la vente n'exclut pas le développement d'un instrument plus petit, plus rapide et plus économique, ceci démontre toute la complexité de transformer une réussite scientifique en un succès commercial.

Paradoxalement, la concurrence la plus importante de l'approche ESI-MS pourrait venir des antibiogrammes biochimiques traditionnels tels que ceux pratiqués avec l'automate Vitek-2 (bioMérieux). La technologie est maintenant largement éprouvée et reconnue. Elle est peu coûteuse (quelques euros par test) et présente l'avantage d'un vrai test phénotypique. Le microorganisme est mis en contact avec différentes concentrations d'antimicrobiens et une croissance ou une absence de croissance est mesurée pour déterminer si il y a résistance ou sensibilité à l'antimicrobien. Contrairement à notre approche ESI-MS, ces tests ne nécessitent pas de connaître *a priori* l'origine du mécanisme de résistance et peuvent détecter des mécanismes inconnus. Leur seul défaut est le temps d'analyse : de 8 à 12h pour Vitek-2 et d'une nuit pour les tests sur boîte de Pétri avec disques ou bandelettes d'antibiotiques. L'ESI-MS ne sera compétitif par rapport aux tests phénotypiques que lorsque le temps d'analyse sera important, c'est à dire essentiellement pour les infections critiques. Pour des besoins d'épidémiologie, l'ESI-MS permettra également d'identifier *a posteriori* la nature du mécanisme de résistance détecté phénotypiquement. Cela facilitera le suivi des épidémies communautaires ou nosocomiales.

## 5.7 Evolutions attendues dans les 5 années à venir

---

Les éléments discutés sont à mettre en relief face aux améliorations technologiques attendues à moyen terme. Les fabricants de spectromètre de masse commencent à développer des spectromètres pour des applications cliniques avec des contraintes de coût. Une baisse du coût de fabrication des instruments est attendue ainsi qu'une diminution de la complexité instrumentale. Il est fort probable que la complexité de l'instrument soit comparable à terme à celle d'un MALDI-TOF ou à celle d'un automate de biochimie par exemple. De plus, les performances des instruments ne cessent de s'améliorer. La sensibilité est augmentée en moyenne d'un facteur 3 tous les ans depuis six ans. Des capteurs ayant une sensibilité suffisante

pour détecter une molécule unique sont déjà décrits dans la littérature [193] Les vitesses de balayage augmentent aussi. Le temps de cycle de 10ms pour cibler une transition pourra raisonnablement être réduit à 1ms à moyen terme, augmentant la capacité de multiplexage d'un facteur 10. Par exemple, la société Shimadzu commercialise déjà un instrument dont le temps de cycle est de 2ms pour cibler une transition. Des systèmes haute cadence sont déjà présents sur le marché pour le suivi de métabolites en temps réel grâce à des sources permettant une analyse en 6 à 10 secondes par échantillon [194].

D'autres méthodes d'analyse seront également envisageables. La méthode SWATH [195] consiste à fragmenter systématiquement tous les ions présents dans le spectromètre de masse. Elle offre la possibilité de séquencer l'ensemble des ions détectés. Le principe est simple. Des fenêtres successives de 25 Da sont ciblées, fragmentées et détectées pour une durée de 100ms par fenêtre. Pour couvrir, par exemple, la gamme de masse de 400 à 1200 Th, 32 fenêtres sont nécessaires. La spécificité des ions est apportée par la précision de l'analyse des ions fragments, de l'ordre de 10 ppm, à l'aide d'un tube de vol. La requête de l'information se fait à l'aide d'une librairie contenant les ions théoriques ciblés. L'avantage considérable de cette approche est d'utiliser une information *a priori* pour cibler *a posteriori* les données. Ainsi, le multiplexage est seulement limité par la connaissance *a priori*. Actuellement, les facteurs limitant de cette approche sont le temps de cycle typiquement de 3.2 secondes et le retraitement des données qui n'est pas encore automatisé.

Parallèlement, la séparation des analytes est le point critique pour l'analyse d'échantillon complexe. Cette étape peut être facilitée par des dimensions séparatives additionnelles dans le spectromètre de masse. La mobilité ionique, la MRM<sup>3</sup> ou la haute résolution peuvent permettre de réduire les besoins chromatographiques en amont [196]. Le système chromatographique peut être intégré au spectromètre de masse de manière à réduire l'empreinte au sol de l'instrument et de manière à simplifier son utilisation. Enfin, la miniaturisation des instruments a été initiée par les travaux de Cooks [197].

L'universalité, la flexibilité et le coût par test sont les atouts supposés de l'approche LC-ESI-MS-MS tandis que la sensibilité, la simplification de l'instrument et son implémentation au

sein de l'hôpital sont les défis à relever pour que l'approche soit une réussite et devienne une technologie de routine au sein du laboratoire de microbiologie clinique du future.

## 6 MATERIEL ET METHODES

---

### 6.1 Traitement des échantillons

---

#### 6.1.1 Prétraitement des urines

---

5mL d'urines cliniques sont centrifugés à 2000g pendant 30 secondes. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 15000 g pendant 15 minutes. Le culot, remis en suspension avec 3mL d'eau distillée, est centrifugé à 15000g pendant 15 minutes. Le culot, remis en suspension en présence de solvant en dilution au 1/10 est maintenu à -20°C pendant une heure. La suspension est centrifugée à 15000g pendant 5 minutes. Cette étape est reproduite une seconde fois. Enfin le culot est préservé pour l'étape de digestion.

#### 6.1.2 Prétraitement des hémocultures

---

Les flacons d'hémocultures cliniques, détectés positifs par l'incubateur automatique, ont été conservés à 2-8°C jusqu'à leur traitement. Remis à température ambiante, chaque flacon est homogénéisé avec précaution. 0.8 mL de sang cultivé sont prélevés dans un tube et 0.4mL de tampon de lyse (CAPS 0.3M ; Brij 97 0.45%, pH11.4) sont ajoutés. Après mélange, la lyse dure exactement deux minutes. Pendant ce temps, la solution est filtrée sur une membrane 0.2µm en PES à l'aide d'un montage maison. A la fin de ce temps, le vide est coupé et le volume résiduel est éliminé. La membrane est lavée avec 200µL de tampon 1 (NaCl 0.45% ; Brij 97 0.005%). L'étape est répétée deux fois supplémentaires. Un rinçage final est réalisé avec 200µL de tampon 2 (Brij 97 0.005%). A la fin, les micro-organismes collectés sur la membrane sont récupérés avec 200µL de bicarbonate d'ammonium par 25 à 30 cycles d'aspiration/refoulement. La suspension récupérée est centrifugée à 15000g pendant 15 minutes. Le culot est préservé pour l'étape de lyse et de digestion.

#### 6.1.3 Traitement des culots bactériens ou des colonies

---

Tous les micro-organismes sont conservés à -80°C dans une solution contenant du glycérol. Une première culture est réalisée sur gélose COS pour les bactéries ou sur gélose SDA pour les levures à 37°C pendant 18 heures. Une seconde culture est réalisée de la même manière avant de procéder au traitement des échantillons.

### *6.1.3.1 Protocole standard de digestion :*

---

Un culot de micro-organismes (quantité équivalente à 4McF pour la partie  $\beta$ -lactamase) ou plusieurs colonies sont repris dans 100 $\mu$ L de tampon d'hydrochlorure de guanidine 6M, 50mM Tris-HCl, dont le pH est ajusté à 8. Le dithiothréitol est ajouté pour obtenir une concentration finale de 5mM. La réduction des protéines est réalisée à 60°C pendant 40 minutes. Les échantillons sont ensuite refroidis à température ambiante. L'iodoacétamine est ajouté pour obtenir une concentration finale de 12.5 mM et l'alkylation est réalisée à l'obscurité pendant 40 minutes. Les échantillons sont dilués d'un facteur 6 dans du tampon bicarbonate d'ammonium 50mM dont le pH est ajustée à 8. La trypsine est ajoutée de sorte à obtenir un ratio protéase/protéine de 1/20. Un dosage des protéines avec la méthode de Bradford est, préalablement, réalisée à l'aide d'une gamme étalon d'albumine de sérum bovin. La période de digestion dure 18 heures à 37°C. La digestion est stoppée en ajoutant de l'acide formique pour obtenir un volume final de 0.5%.

### *6.1.3.2 Protocole rapide de digestion*

---

Un culot de micro-organismes (quantité équivalente à 10<sup>9</sup> CFU pour la partie glycopeptide) ou plusieurs colonies sont repris dans 100 $\mu$ L de tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM, 5mM DTT dont le pH est ajusté à 8. La suspension est introduite dans un tube eppendorf contenant des billes de zirconium et de silicium. Le tube est placé sur une sonde à ultra-sons. Le mélange est lysé pendant 5 minutes. Le mélange est refroidi dans la glace. L'iodoacétamine est ensuite ajoutée pour obtenir une concentration finale de 12.5 mM et l'alkylation est réalisée à l'obscurité pendant 5 minutes. 10  $\mu$ g de trypsine sont ajoutés aux échantillons. La période de digestion dure 15 minutes à 50°C. La digestion est stoppée en ajoutant de l'acide formique pour obtenir un volume final de 0.5%.

### *6.1.3.3 Protocole de digestion en présence de méthanol*

---

Cinq colonies sont reprises dans 100 $\mu$ L de tampon d'hydrochlorure de guanidine 6M, 50mM Tris-HCl, dont le pH est ajusté à 8. La suspension est lysée dans un bain à ultrasons pendant 10

minutes et mélangée au vortex. La suspension est centrifugée pendant 10 minutes à 15 000g. Le culot est repris dans 400µL de tampon bicarbonate. 600µL de méthanol est ajouté à la suspension. Le dithiothréitol est ajouté pour obtenir une concentration finale de 5mM. La réduction des protéines est réalisée à 60°C pendant 40 minutes. Les échantillons sont ensuite refroidis à température ambiante. L'iodoacétamine est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 12.5 mM et l'alkylation est réalisée à l'obscurité pendant 40 minutes. Les protéines sont dosées avec la méthode de Bradford à l'aide d'une gamme étalon d'albumine de sérum bovin. La trypsine est ajoutée de sorte à obtenir un ratio protéase/protéine de 1/20. La période de digestion dure 18 heures à 37°C. La digestion est stoppée en ajoutant de l'acide formique pour obtenir un volume final de 0.5%.

Tous les échantillons ont été concentrés par extraction sur phase solide (SPE) à l'aide de cartouche rempli d'un copolymère, de divinylbenzène fonctionnalisé par des groupements de vinylpyrrolidone, hydrophile-lipophile. Les cartouches de SPE sont équilibrées par 1ml de méthanol puis 1 ml d'eau avec 0,1 % d'acide formique. L'échantillon est déposé, en totalité, sur les cartouches. Après une étape de lavage avec 1ml d'eau à 0,1 % d'acide formique, l'élution est réalisée par 1 ml d'un mélange eau/méthanol (80/20, v/v). Les échantillons sont ensuite séchés par centrifugation sous vide puis repris dans 200 µL d'eau contenant 0,5 % d'acide formique avant les analyses en LC-MS/MS.

## 6.2 Mise au point de méthode

---

La mise au point de méthode reprend les différentes étapes décrites dans le chapitre 3.3.2

-Choix des protéines, des peptides et des transitions « I » :

La voie privilégiée pour identifier les peptides permettant de confirmer l'identité du micro-organisme est le séquençage peptidique de type ESI-MS/MS en mode DDA. Les analyses ont été conduites sur le même système que dans la partie 6.3. Les peptides éluant ont été sélectionnés pour une fragmentation CID par le spectromètre de masse en alternant un balayage MS et trois spectres de fragmentation. Les ions précurseurs sont exclus après 4 occurrences pendant 10 secondes. L'énergie de collision est prédite par les équations empiriques. Les données des



spectres MS/MS sont analysées en utilisant MASCOT comme outil de recherche. La base de données est l'espèce ou le groupe d'espèce représentant le plus précisément l'espèce analysée provenant de SwissProt. L'analyse est restreinte au clivage spécifique de la trypsine. Un site de clivage est autorisé. L'analyse est aussi restreinte aux précurseurs di et tri-chargés. La tolérance sur les ions précurseurs est de 1.2Da, la tolérance sur les ions fragments est 0.2Da. La spécificité des peptides à l'espèce confirmée *in silico* par BLAST (165) permet de sélectionner les cibles sur l'ensemble des peptides dont le score MASCOT est supérieur à 30. D'après les spectres de fragmentation, les trois ions ayant l'intensité la plus forte et de préférence dont le m/z est supérieure à l'ion précurseur sont sélectionnés pour les méthodes SRM.

-Choix des protéines, des peptides et des transitions T, R ou V :

Le choix des cibles protéiques est basé sur la littérature scientifique. Un outil développé au sein de l'entreprise permet de sélectionner les peptides d'intérêt. L'outil permet d'établir la liste des peptides protéotypiques potentiels à partir des séquences des protéines recherchées sur Expasy ou obtenues sur des sites spécialisés. L'analyse est restreinte au clivage spécifique de la trypsine. Aucun site de clivage raté n'est toléré. La taille des fragments est restreinte de 7 à 21 acides aminés sauf pour certains modèles de  $\beta$ -lactamases où la taille des peptides est étendue de 6 à 25 acides aminés. La sélection peut privilégier les peptides consensuels ou les peptides spécifiques d'un phénotype selon les modèles étudiées.

Les peptides cibles ont été synthétisés grâce à une chimie de type FMOC à l'aide d'un multi-synthétiseur de type MultiPepRS. Les analyses ont été conduites sur le même système que dans la partie 6.3. Deux voies ont été utilisées pour sélectionner les peptides et les transitions. Soit trois transitions par peptide ont été analysées par DDA. Les spectres de fragmentation ont permis de sélectionner les trois ions ayant l'intensité la plus forte et de préférence dont le m/z est supérieure à l'ion précurseur. Soit l'ensemble des ions fragments attendus ont été analysés. Les combinaisons des ions précurseurs  $\gamma$  di-chargés ou tri-chargés et des ions fragments de type  $\gamma$  ou b mono-chargés et di-chargés ont été ciblés. De même, les trois transitions ayant l'intensité la plus forte et de préférence dont le m/z des fragments est supérieure à l'ion précurseur ont été retenus. Pour les protéines nécessitant la plus haute sensibilité, tous les potentiels ont été

optimisés un à un en injectant une solution contenant quelques peptides. Ainsi, les potentiels d'orifice, d'entrée avant Q0, d'énergie de collision et de sortie de cellule de collision ont été optimisés manuellement.

### 6.3 Analyse LC-ESI-SRM

---

Les échantillons ont été analysés sur un système LC-ESI-MS/MS composé d'une HPLC Ultimate 3000 series (Agilent technologies, Walbronn, Allemagne) comprenant une pompe binaire et un injecteur automatique couplée à un spectromètre de masse de type hybride triple quadripole/trappe à ion linéaire 5500 QTRAP (AB SCIEX, Foster City, Etats-Unis) équipé d'une source de type Turbo V. Le logiciel Analyst 1.5.1 est utilisé pour contrôler l'instrument, traiter et acquérir les données. La séparation chromatographique fut réalisée sur une colonne C18 de type XBridge BEH. (100 mm \* 2.1 mm, taille des particules 3.5µm, porosité 130A°) Le débit d'élution est 300µL/min. L'éluant A est de l'eau contenant 0.1% d'acide formique (v/v), l'éluant B est de l'acétonitrile contenant 0.1% d'acide formique (v/v). Après un palier de 3 minutes à 2% d'éluant B, un gradient linéaire de 2% d'éluant B à 37% d'éluant B a été effectué en 25 minutes. Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation positif avec une tension de cône de 5500V. Préalablement, le spectromètre de masse a été réglé et calibré selon les procédures recommandées par AB SCIEX à l'aide des solutions de réserpine, de polypropylèneglycol ou de la solution « Agilent tuning mix ». La résolution des quadripôles 1 et 3 a été ajusté à 0.7 amu ce qui correspond à une résolution unitaire. Les paramètres de source ont été fixés à l'aide d'un peptide de référence. Le gaz de nébulisation et le gaz rideau ont été fixés à une pression de 50 psi. La température de la source a été fixée à 550°C et le gaz chauffant a été fixé à une pression de 40 psi.

### 6.4 Traitement de l'information

---

Comme la partie 3.3.3 le décrit, le traitement de l'information est le point central. Contrairement à l'approche traditionnelle, où l'emploi de SIS permet de s'assurer de la détection des pics, l'approche proposée sans aucun marquage ne permet pas de s'assurer

qu'une transition donnée résulte d'un seul pic représentant le signal du peptide cible. Les deux étapes de filtrage des ions à résolution unitaire peuvent laisser passer d'autres ions que les ions ciblés. Cela se produit en cas d'homologie mais aussi pour des peptides équivalents issus de protéines totalement distinctes. Il est plus que nécessaire d'établir des critères qui permettent de détecter les pics d'intérêt et de valider la présence ou l'absence de ces pics d'intérêt.

La détection des pics d'intérêt est une étape partiellement automatisée qui est exécutée par les logiciels constructeurs.

Dans l'ensemble des travaux de recherche, la détection et l'intégration des pics est réalisée à l'aide d'un algorithme nommé « Summation ». Ce dernier recherche le pic d'intérêt dans une fenêtre définie vis-à-vis d'un temps de rétention de référence et intègre de part et d'autre de l'apex du pic le plus intense de la fenêtre sur une tranche de temps prédéfinie. La fenêtre de temps où la recherche est effectuée est de 20 secondes. Chaque temps de rétention de référence est fixé grâce aux expériences préalables où l'identité des peptides et de leur temps de rétention respectif a été validée par des spectres de fragmentation. La tranche de temps est fixée à 10 secondes compte-tenu des propriétés chromatographiques. Pour limiter les erreurs dans l'attribution des pics, cette étape est contrôlée visuellement. La règle qui guide le retraitement visuel est que toutes les transitions d'un même peptide éluent au même temps de rétention et à proximité du temps de rétention de référence. En cas de coélution sur une transition, l'intégration favorisera le pic qui élue au même temps de rétention que celui des autres transitions du peptide. En cas de présence d'un pic interférent majoritaire, la fenêtre de détection est ajustée de sorte que l'intégration des transitions au même temps de rétention soit favorisée.

Pour valider la présence ou l'absence des pics d'intérêt, plusieurs méthodes ont été développées au fil de la thèse.

#### 6.4.1 Méthode 1

---

Aucun critère n'est fixé sur le temps de rétention hormis le fait que les pics sont intégrés à proximité du temps de rétention attendu pour chaque pic. Il s'agit de la méthode la plus simple, une transition est considérée comme positive lorsque l'aire de la transition dépasse un seuil de

positivité fixé arbitrairement. La positivité des échantillons est assurée en sommant plusieurs transitions de plusieurs peptides.

#### 6.4.2 Méthode 2

---

Un peptide est détecté lorsque l'ensemble des critères ci-après sont respectés pour chacune des transitions du peptide :

-Seuil de positivité : le seuil de positivité est défini arbitrairement le plus bas possible. Lorsque le signal d'une transition d'un peptide est bruité, le seuil est rehaussé pour éliminer les signaux interférents.

-Temps de rétention : Le temps de rétention entre les transitions d'un même peptide doit être identique. Le critère retenu est l'écart-type entre les temps de rétention des transitions d'un peptide. Lorsque l'écart-type est inférieur à 0.02, le temps de rétention est considéré comme identique.

#### 6.4.3 Méthode 3

---

Un peptide est détecté lorsque l'ensemble des critères ci-après sont respectés pour chacune des transitions du peptide :

Seuil de positivité : le seuil de positivité est défini arbitrairement le plus bas possible.

Temps de rétention : Le temps de rétention entre les transitions d'un même peptide doit être identique. Le critère retenu est l'écart-type entre les temps de rétention des transitions d'un peptide. Lorsque l'écart-type est inférieur à 0.02, le temps de rétention est considéré comme identique.

Conservation de la proportion entre les aires des transitions d'un peptide :

Soit un peptide analysé par trois transitions nommées T1, T2 et T3. La proportion de la transition T1 peut être définie par le calcul suivant :

$$ratio(T1) = \frac{Aire\ T1}{(Aire\ T1 + Aire\ T2 + Aire\ T3)}$$

La proportion des transitions T2 et T3 est établie de la même manière. Les calculs sont réalisés pour les peptides de synthèse et les peptides intrinsèques aux bactéries. Les proportions de peptides de synthèse sont les valeurs de référence. Chaque ratio est compris entre 0 et 1.

Le critère retenu est une différence entre les valeurs de référence et les valeurs de peptides intrinsèques inférieure à 15%.

#### 6.4.4 Méthode 4

L'ensemble des critères établis dans la méthode 3 est appliqué. Un critère supplémentaire est adopté. Un jeu d'apprentissage permet de construire les valeurs moyennes des ratios des peptides de la méthode et de comparer aux valeurs des ratios des échantillons. La pente de l'équation et le coefficient de régression linéaire peuvent être reportés et doivent être proches de 1 (figure 29).

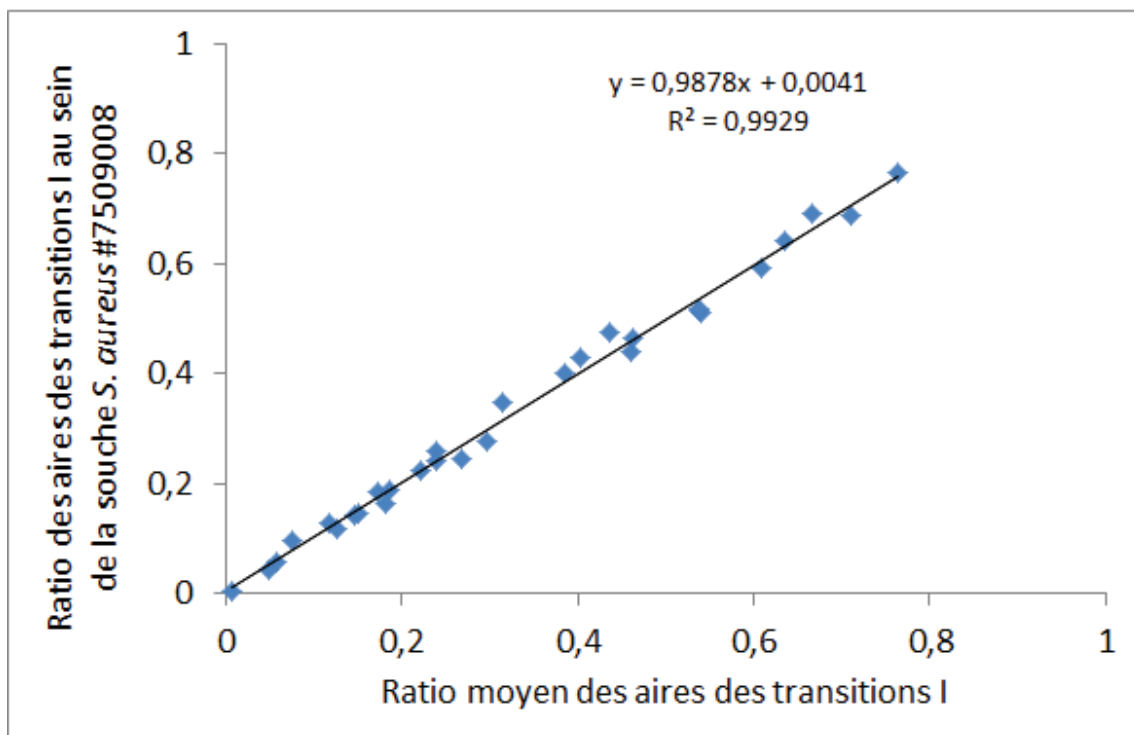
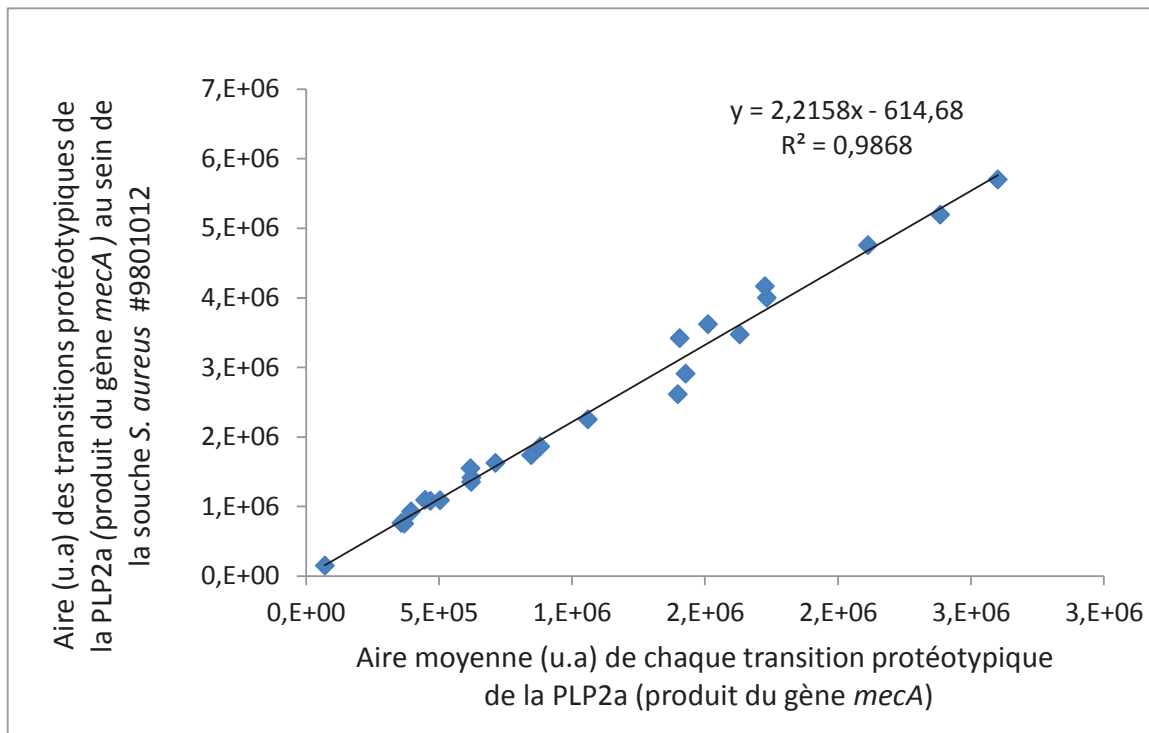


Figure 29 : Comparaison des ratios moyens des aires des transitions I aux ratios des aires des transitions I de l'échantillon *S. aureus* #7509008. L'équation qui relie les données est calculée. Le coefficient de régression linéaire est indiqué.

#### 6.4.5 Méthode 5

L'ensemble des critères établis dans la méthode 2 est appliqué. Un critère supplémentaire est adopté par protéine. Un jeu d'apprentissage permet de calculer les valeurs moyennes des aires des transitions de la protéine au sein de plusieurs échantillons. Les valeurs logarithmiques des aires des transitions d'une protéine de chaque échantillon sont comparées aux valeurs logarithmiques moyennes pré-établies. Si la protéine est présente et si les transitions ont bien été choisies, les aires des transitions de l'échantillon sont proportionnelles aux valeurs moyennes (figure 30). Le coefficient de régression linéaire peut être reporté et doit être proche de 1. La relation qui lie les aires moyennes aux aires des échantillons positifs est une équation du type  $y=ax$ . Par conséquent, en prenant les valeurs logarithmiques de cette représentation, la pente doit être également proche de 1.



**Figure 30 : Comparaison des aires des transitions protéotypiques de la PLP2a au sein de l'échantillon *S. aureus* #9801012 aux aires moyennes des transitions des échantillons. L'équation qui relie les données est calculée. Le coefficient de régression linéaire est indiqué.**

## Liste des Références

- (1) Bergey DH. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Society of American Bacteriologists-- Edition Williams&Wilkins, Baltimore, USA, 1923. ed. 1923.
- (2) Janin Pierre R, inventor; ANALYTAB PRODUCTS INC., assignee. Profile recognition method and apparatus for identifying bacteria. patent US 3936356 A.
- (3) Aldridge C, Jones PW, Gibson S, Lanham J, Meyer M, Vannest R et al. Automated microbiological detection/identification system. J Clin Microbiol 1977 October;6(4):406-13.
- (4) Soussy CJ, Cluzel R, Courvalin P. Definition and determination of *in vitro* antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria in France. The Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994 March;13(3):238-46.
- (5) Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966 April;45(4):493-6.
- (6) Gavan TL, Town MA. A microdilution method for antibiotic susceptibility testing: an evaluation. Am J Clin Pathol 1970 June;53(6):880-5.
- (7) International Organization for Standardization. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems--Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices--Part1:Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-1:2006: International Organization for Standardization. 2006.
- (8) International Organization for Standardization. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems--Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices--Part1:Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-2:2007: International Organization for Standardization. 2007.
- (9) Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2005.Bulletin de la SFM (n° spécial) disponible sur <http://www.sfm.asso.fr>. 2005.
- (10) Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev 1997 July;10(3):444-65.
- (11) Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. Chest 2009 November;136(5):1237-48.
- (12) Reiner E. Identification of bacterial strains by pyrolysis-gas-liquid chromatography. Nature 1965 June 19;206(990):1272-3.
- (13) Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem 1975 February 1;47(2):219-25.

- (14) Heller DN, Cotter RJ, Fenselau C, Uy OM. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem* 1987 December 1;59(23):2806-9.
- (15) Arcelloni C, Griffini A, Paroni R, Bonini PA. Evaluation of an automatic gas chromatographic system for the identification of bacterial infective agents. *J Automat Chem* 1989;11(5):191-200.
- (16) Macfarlane RD, Torgerson DF. Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy. *Science* 1976 March 5;191(4230):920-5.
- (17) Morris HR, Panico M, Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RD, Tyler A. Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1981 July 30;101(2):623-31.
- (18) Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988 October 15;60(20):2299-301.
- (19) Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T et al. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988;2(8):151-3.
- (20) Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989 October 6;246(4926):64-71.
- (21) Fenselau C. MALDI MS and strategies for protein analysis. *Anal Chem* 1997 November 1;69(21):661A-5A.
- (22) Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1996 November;14(11):1584-6.
- (23) Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ et al. 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.
- (24) Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996;10(15):1992-6.
- (25) Welker M. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics* 2011 August;11(15):3143-53.
- (26) Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T 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 September;4(3):221-42.
- (27) Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B. 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 December;74(24):7767-78.



- (28) Dieckmann R, Strauch E, Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *J Appl Microbiol* 2010 July;109(1):199-211.
- (29) 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 January;71(1):58-64.
- (30) Wunschel DS, Hill EA, McLean JS, Jarman K, Gorby YA, Valentine N et al. 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* 2005 September;62(3):259-71.
- (31) Wunschel SC, Jarman KH, Petersen CE, Valentine NB, Wahl KL, Schauki D et al. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005 April;16(4):456-62.
- (32) Welker M. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics* 2011 August;11(15):3143-53.
- (33) Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La SB, Fournier PE, Rolain JM et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009 August 15;49(4):543-51.
- (34) Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P et al. 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 April;48(4):1169-75.
- (35) Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2010 May;48(5):1549-54.
- (36) Gravet A, Souillard N, Habermacher J, Moser A, Lohmann C, Schmitt F et al. [Culture and susceptibility testing of mycobacteria with VersaTREK]. *Pathol Biol (Paris)* 2011 February;59(1):32-8.
- (37) Carbonnelle E, Nassif X. [Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory]. *Med Sci (Paris)* 2011 October;27(10):882-8.
- (38) Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 1988 July;10(4):677-8.
- (39) Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980 May 16;289(1036):321-31.
- (40) Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989 March;33(3):259-63.

- (41) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 June;39(6):1211-33.
- (42) Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 March;54(3):969-76.
- (43) Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990 November;34(11):2200-9.
- (44) Tzouveleki LS, Tzelepi E, Mentis AF, Tsakris A. Identification of a novel plasmid-mediated beta-lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1993 May;31(5):645-54.
- (45) Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharotayankun R, Kato N. Plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum beta-lactams, including moxalactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1993 May;37(5):984-90.
- (46) Gonzalez LM, Perez-Diaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martinez-Beltran J, Bush K et al. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 September;38(9):2150-7.
- (47) Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Wilhelm R, Chong Y. Comparative characterization of the cephamycinase blaCMY-1 gene and its relationship with other beta-lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 August;40(8):1926-30.
- (48) Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 March;41(3):563-9.
- (49) Gaillot O, Clement C, Simonet M, Philippon A. Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother* 1997 January;39(1):85-7.
- (50) Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 August;43(8):1924-31.
- (51) Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, Kaneko K, Okitsu N, Hosaka Y et al. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 April;48(4):1151-8.
- (52) Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012 July;67(7):1597-606.

- (53) Poirel L, Le T, I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 March;44(3):622-32.
- (54) Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 September;45(9):2598-603.
- (55) Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009 April;9(4):228-36.
- (56) Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 October;54(10):4201-7.
- (57) Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 1965 October 16;208(5007):239-41.
- (58) Matthew M, Hedges RW, Smith JT. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1979 June;138(3):657-62.
- (59) Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987 September;20(3):323-34.
- (60) Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993 May;37(5):962-9.
- (61) Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 March;43(3):573-81.
- (62) Labia R, Guionie M, Barthelemy M. Properties of three carbenicillin-hydrolysing beta-lactamases (CARB) from *Pseudomonas aeruginosa*: identification of a new enzyme. *J Antimicrob Chemother* 1981 January;7(1):49-56.
- (63) Nakazawa H, Mitsuhashi S. Tn2011, a new transposon encoding oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1983 March;23(3):407-12.
- (64) Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 June;38(6):1262-70.
- (65) Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 April;45(4):1151-61.

- (66) Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* 2011 May;11(5):381-93.
- (67) Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* 2011 May;11(5):381-93.
- (68) Wachino J, Yoshida H, Yamane K, Suzuki S, Matsui M, Yamagishi T et al. SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 November;55(11):5143-9.
- (69) Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD et al. FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 October 31.
- (70) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 January;38(1):71-8.
- (71) Bellais S, Leotard S, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *indologenes*. *FEMS Microbiol Lett* 1999 February 15;171(2):127-32.
- (72) Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 July;43(7):1584-90.
- (73) Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002 November;50(5):673-9.
- (74) Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 December;48(12):4654-61.
- (75) Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 November;49(11):4485-91.
- (76) Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel sub-group of metallo-beta-lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Chicago, USA; Sept 17-20, 2007. C1-1417. 2007.

- (77) Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 November;52(11):4194-7.
- (78) Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 December;53(12):5046-54.
- (79) Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Al NN, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 June;54(6):2420-4.
- (80) Oliveira DC, Tomasz A, De Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002 March;2(3):180-9.
- (81) Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004 August 1;39(3):309-17.
- (82) Ito T, Hiramatsu K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J* 1998 December;39(6):526-33.
- (83) Fortin T, Salvador A, Charrier JP, Lenz C, Lacoux X, Morla A et al. Clinical quantitation of prostate-specific antigen biomarker in the low nanogram/milliliter range by conventional bore liquid chromatography-tandem mass spectrometry (multiple reaction monitoring) coupling and correlation with ELISA tests. *Mol Cell Proteomics* 2009 May;8(5):1006-15.
- (84) Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecl, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 August;55(8):3765-73.
- (85) Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011 August;11(8):595-603.
- (86) Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de LH, Perreten V, Holden MT et al. Guidelines for reporting novel mecA gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 October;56(10):4997-9.
- (87) Holmes MA, Zadoks RN. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011 December;16(4):373-82.
- (88) Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000 August 17;406(6797):775-81.

- (89) Reynolds PE. Control of peptidoglycan synthesis in vancomycin-resistant enterococci: D,D-peptidases and D,D-carboxypeptidases. *Cell Mol Life Sci* 1998 April;54(4):325-31.
- (90) Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006 January 1;42 Suppl 1:S25-S34.
- (91) Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006 January 1;42 Suppl 1:S25-S34.
- (92) Sujatha S, Praharaj I. Glycopeptide resistance in gram-positive cocci: a review. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012;2012:781679.
- (93) Arthur M, Molinas C, Courvalin P. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 1992 April;174(8):2582-91.
- (94) Perichon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 November;53(11):4580-7.
- (95) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-June 2001, issued August 2001. *Am J Infect Control* 2001 December;29(6):404-21.
- (96) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003. *Am J Infect Control* 2003 December;31(8):481-98.
- (97) Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008 November;29(11):996-1011.
- (98) Linares J. The VISA/GISA problem: therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect* 2001;7 Suppl 4:8-15.
- (99) Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002 February;2(2):73-85.
- (100) Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010 April;66(4):373-84.
- (101) Panton PN, Valentine FCO. Staphylococcal toxin. *Lancet* 1932;(1):506-8.
- (102) WOODIN AM. Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 1960 April;75:158-65.

- (103) Miles G, Jayasinghe L, Bayley H. Assembly of the Bi-component leukocidin pore examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem* 2006 January 27;281(4):2205-14.
- (104) Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007 February 23;315(5815):1130-3.
- (105) Prevost G, Couppie P, Prevost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B et al. Epidemiological data on Staphylococcus aureus strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* 1995 April;42(4):237-45.
- (106) Gillet Y, Dohin B, Dumitrescu O, Lina G, Vandenesch F, Etienne J et al. [Osteoarticular infections with staphylococcus aureus secreting Panton-Valentine leucocidin]. *Arch Pediatr* 2007 October;14 Suppl 2:S102-S107.
- (107) Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M et al. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002 March 2;359(9308):753-9.
- (108) Vandenesch F, Lina G, Henry T. Staphylococcus aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:12.
- (109) McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:77-104.
- (110) Bernardo K, Pakulat N, Flier S, Schnaith A, Utermohlen O, Krut O et al. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce Staphylococcus aureus virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 February;48(2):546-55.
- (111) Karch H, Friedrich AW, Gerber A, Zimmerhackl LB, Schmidt MA, Bielaszewska M. New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2006 March;32(2):105-12.
- (112) Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2005 March 19;365(9464):1073-86.
- (113) Iijima K, Kamioka I, Nozu K. Management of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children. *Clin Exp Nephrol* 2008 February;12(1):16-9.
- (114) Gacser A, Stehr F, Kroger C, Kredics L, Schafer W, Nosanchuk JD. Lipase 8 affects the pathogenesis of Candida albicans. *Infect Immun* 2007 October;75(10):4710-8.
- (115) van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007 October;13 Suppl 3:1-46.

- (116) van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J et al. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 1998 June;36(6):1653-9.
- (117) Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005 September;43(9):4328-35.
- (118) Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P, Jr. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* 1992 January;42(1):166-70.
- (119) Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 March 17;95(6):3140-5.
- (120) Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 May 28;99(11):7687-92.
- (121) Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 2004 March;186(5):1518-30.
- (122) Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol* 2004 February;42(2):792-9.
- (123) Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003 December;41(12):5442-8.
- (124) Mellmann A, Friedrich AW, Rosenkotter N, Rothganger J, Karch H, Reintjes R et al. Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. *PLoS Med* 2006 March;3(3):e33.
- (125) van Belkum A, Welker M, Erhard M, Chatellier S. Biomedical mass spectrometry in today's and tomorrow's clinical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2012 May;50(5):1513-7.
- (126) Govorun Vadim Markovich, Franzen Jochen, inventors; BRUKER DALTONIK GMBH (DE)., BRUKER DALTONIK GMBH., assignees. Mass spectrometric measurement of microbial resistances. patent US 2008009029 A1. 2008 Jan.
- (127) Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, Fekkar A, Brossas JY et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* 2009 October;9(20):4627-31.



- (128) Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011 September;49(9):3222-7.
- (129) Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2011 September;49(9):3321-4.
- (130) Hooff GP, van Kampen JJ, Meesters RJ, van BA, Goessens WH, Luider TM. Characterization of beta-lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res* 2012 January 1;11(1):79-84.
- (131) Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012 March;50(3):927-37.
- (132) Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem* 1999 July 15;71(14):2732-8.
- (133) Welker M, Moore ER. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* 2011 February;34(1):2-11.
- (134) Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000 March;49(3):295-300.
- (135) Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2002 November 1;74(21):5487-91.
- (136) Shah HN, Rajakaruna L, Ball G, Misra R, Al-Shahib A, Fang M et al. 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 February;34(1):81-6.
- (137) Camara JE, Hays FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007 November;389(5):1633-8.
- (138) Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain JM. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents* 2009 November;34(5):467-70.
- (139) Dauwalder O, Carbonnelle E, Benito Y, Lina G, Nassif X, Vandenesch F et al. Detection of Panton-Valentine toxin in *Staphylococcus aureus* by mass spectrometry directly from colony: time has not yet come. *Int J Antimicrob Agents* 2010 August;36(2):193-4.

- (140) Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydiere AM, Ader F et al. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One* 2012;7(7):e40660.
- (141) Olsen JV, Ong SE, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 2004 June;3(6):608-14.
- (142) Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003 March 13;422(6928):198-207.
- (143) Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999 December;20(18):3551-67.
- (144) Becher D, Hempel K, Sievers S, Zuhlke D, Pane-Farre J, Otto A et al. A proteomic view of an important human pathogen--towards the quantification of the entire *Staphylococcus aureus* proteome. *PLoS One* 2009;4(12):e8176.
- (145) Tabb DL, Vega-Montoto L, Rudnick PA, Variyath AM, Ham AJ, Bunk DM et al. Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2010 February 5;9(2):761-76.
- (146) Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--goals for further developments. *Clin Biochem* 2008 June;41(9):649-62.
- (147) Mathieu E. Mémoire sur Le Mouvement Vibratoire d'une Membrane de forme Elliptique. *Journal des Mathématiques Pures et Appliquées* 1868;137-203.
- (148) Sweeley CC, Elliott WH, Fries I, Ryhage R. Mass spectrometric determination of unresolved components in gas chromatographic effluents. *Anal Chem* 1966 October;38(11):1549-53.
- (149) Hammar CG, Holmstedt B, Ryhage R. Mass fragmentography. Identification of chlorpromazine and its metabolites in human blood by a new method. *Anal Biochem* 1968 October 24;25(1):532-48.
- (150) Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 2006 April 14;312(5771):212-7.
- (151) Sherman J, McKay MJ, Ashman K, Molloy MP. How specific is my SRM?: The issue of precursor and product ion redundancy. *Proteomics* 2009 March;9(5):1120-3.
- (152) Tang H, Arnold RJ, Alves P, Xun Z, Clemmer DE, Novotny MV et al. A computational approach toward label-free protein quantification using predicted peptide detectability. *Bioinformatics* 2006 July 15;22(14):e481-e488.
- (153) Mallick P, Schirle M, Chen SS, Flory MR, Lee H, Martin D et al. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* 2007 January;25(1):125-31.

- (154) Fusaro VA, Mani DR, Mesirov JP, Carr SA. Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 2009 February;27(2):190-8.
- (155) Frank R, Overwin H. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* 1996;66:149-69.
- (156) Desiere F, Deutsch EW, Nesvizhskii AI, Mallick P, King NL, Eng JK et al. Integration with the human genome of peptide sequences obtained by high-throughput mass spectrometry. *Genome Biol* 2005;6(1):R9.
- (157) Craig R, Cortens JP, Beavis RC. Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data. *J Proteome Res* 2004 November;3(6):1234-42.
- (158) Vizcaino JA, Cote R, Reisinger F, Barsnes H, Foster JM, Rameseder J et al. The Proteomics Identifications database: 2010 update. *Nucleic Acids Res* 2010 January;38(Database issue):D736-D742.
- (159) Maclean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 2010 April 1;26(7):966-8.
- (160) Maclean B, Tomazela DM, Abbatiello SE, Zhang S, Whiteaker JR, Paulovich AG et al. Effect of collision energy optimization on the measurement of peptides by selected reaction monitoring (SRM) mass spectrometry. *Anal Chem* 2010 December 15;82(24):10116-24.
- (161) Abbatiello SE, Mani DR, Keshishian H, Carr SA. Automated detection of inaccurate and imprecise transitions in peptide quantification by multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Clin Chem* 2010 February;56(2):291-305.
- (162) Kirkpatrick DS, Gerber SA, Gygi SP. The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods* 2005 March;35(3):265-73.
- (163) Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M et al. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2007 December;6(12):2139-49.
- (164) Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002 May;1(5):376-86.
- (165) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990 October 5;215(3):403-10.
- (166) Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother* 2002 December;50(6):1031-4.

- (167) Cartelle M, Del Mar TM, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 June;48(6):2308-13.
- (168) Girlich D, Naas T, Bellais S, Poirel L, Karim A, Nordmann P. Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 June;44(6):1470-8.
- (169) Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010 February;16(2):112-22.
- (170) Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 January;54(1):24-38.
- (171) Zeba B, De Luca F, Dubus A, Delmarcelle M, Simpore J, Nacoulma OG et al. IND-6, a highly divergent IND-type metallo-beta-lactamase from *Chryseobacterium indologenes* strain 597 isolated in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 October;53(10):4320-6.
- (172) Bellais S, Poirel L, Leotard S, Naas T, Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamases from *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *indologenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 November;44(11):3028-34.
- (173) Kaplan W, Laing R. "Priority medicines for Europe and the world" Publication of World Health Organization, November 2004, Geneva, Switzerland. 2004.
- (174) Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 2002 October 1;35(7):819-24.
- (175) Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2009 May 15;48 Suppl 4:S238-S245.
- (176) Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011 May;49(5):1866-71.
- (177) Norrby R, Powell M, Aronson B, Monnet DL, Lutsar I, Stelian Bocsan I et al. "The bacterial challenge:time to react" ECDC/EMEA joint technical report. Stockholm, September 2009. 2009.
- (178) Mulatero F, Bonnardel V, Micolaud C. The way forward for fast microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2011 May;17(5):661-7.
- (179) Greub G, Prod'hom G. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect* 2011 May;17(5):655-60.
- (180) Markogiannakis A, Fildisis G, Tsiplakou S, Ikonomidis A, Koutsoukou A, Pournaras S et al. Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008 May;29(5):410-7.

- (181) Consales G, Gramigni E, Zamidei L, Bettocchi D, De Gaudio AR. A multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in intensive care unit: antimicrobial and organizational strategies. *J Crit Care* 2011 October;26(5):453-9.
- (182) Bauer KA, West JE, Balada-Llasat JM, Pancholi P, Stevenson KB, Goff DA. An antimicrobial stewardship program's impact with rapid polymerase chain reaction methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/S. aureus blood culture test in patients with S. aureus bacteremia. *Clin Infect Dis* 2010 November 1;51(9):1074-80.
- (183) Cornu JN, Rennard-Penna R, Rouprêt M. "Pyélonéphrite aiguë non compliquée de l'adulte: diagnostic et traitement". EMC(Elsevier Masson SAS, Paris) Urologie, 18-070-A-10 ed. 2008.
- (184) La SB, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009;4(11):e8041.
- (185) 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 April;48(4):1481-3.
- (186) Vlek AL, Bonten MJ, Boel CH. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One* 2012;7(3):e32589.
- (187) Hujer AM, Page MG, Helfand MS, Yeiser B, Bonomo RA. Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for detecting and quantifying CMY-2 and SHV beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2002 June;40(6):1947-57.
- (188) Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Measurement and quality control issues in multiplex protein assays: a case study. *Clin Chem* 2009 June;55(6):1092-9.
- (189) Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clin Chem* 2010 February;56(2):186-93.
- (190) Kelley PG, Grabsch EA, Farrell J, Xie S, Montgomery J, Mayall B et al. Evaluation of the Xpert MRSA/SA Blood Culture assay for the detection of *Staphylococcus aureus* including strains with reduced vancomycin susceptibility from blood culture specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011 July;70(3):404-7.
- (191) Schrenzel J. PCR for the diagnosis of sepsis: hope or hype? *Crit Care* 2011;15(1):111.
- (192) Havlicek V, Lemr K, Schug KA. Current Trends in Microbial Diagnostics Based on Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2012 November 21.
- (193) Naik AK, Hanay MS, Hiebert WK, Feng XL, Roukes ML. Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry. *Nat Nanotechnol* 2009 July;4(7):445-50.

- (194) Highkin MK, Yates MP, Nemirovskiy OV, Lamarr WA, Munie GE, Rains JW et al. High-throughput screening assay for sphingosine kinase inhibitors in whole blood using RapidFire(R) mass spectrometry. *J Biomol Screen* 2011 February;16(2):272-7.
- (195) Gillet LC, Navarro P, Tate S, Rost H, Selevsek N, Reiter L et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012 June;11(6):O111.
- (196) Swearingen KE, Moritz RL. High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry for mass spectrometry-based proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2012 October;9(5):505-17.
- (197) Ouyang Z, Cooks RG. Miniature mass spectrometers. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif )* 2009;2:187-214.