



HAL
open science

Développement d'une nouvelle approche par spectrométrie de masse ciblée pour la caractérisation de la virulence et des résistances aux antibiotiques chez les bactéries

Nicolas Mouton

► **To cite this version:**

Nicolas Mouton. Développement d'une nouvelle approche par spectrométrie de masse ciblée pour la caractérisation de la virulence et des résistances aux antibiotiques chez les bactéries. Chimie analytique. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1283 . tel-03779595

HAL Id: tel-03779595

<https://theses.hal.science/tel-03779595>

Submitted on 17 Sep 2022

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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1283

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206

(Ecole Doctorale de Chimie de Lyon)

Spécialité de doctorat :
Discipline : Chimie analytique

Soutenue publiquement le 16/12/2020, par :

Nicolas Mouton

Développement d'une nouvelle approche par spectrométrie de masse ciblée pour la caractérisation de la virulence et des résistances aux antibiotiques chez les bactéries.

Devant le jury composé de :

Dr. Jean ARMENGAUD, CEA Marcoule

Rapporteur

Dr. Virginie BRUN, CEA Grenoble

Rapporteur

Pr. Marie-Cécile PLOY, CHU Limoges

Examinatrice

Pr. François VANDENESCH, CHU de Lyon

Examineur

Dr. Fabien CHIROT, ISA Lyon

Directeur de thèse

Dr. Sophie AYCIRIEX, ISA Lyon

Co-directrice de thèse

Université Claude Bernard–LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

Composante Santé

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice: Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne: Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud-Charles Mérieux	Doyenne: Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen: M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur: M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice: Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice: Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur: M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur: Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur: M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur: M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur: M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice: Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur: Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice: Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur: M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur: M. Bruno ANDRIOLETTI

Remerciements

Parmi les nombreuses personnes à remercier, je souhaiterais commencer par mes enseignantes Mme Blanc et Mme Beard qui ont su m'insuffler la vocation de la chimie et de la biologie pendant mes années de lycée. Je ne pourrais pas être là où j'en suis aujourd'hui sans elles, merci.

Je remercie également mes deux rapporteurs le Dr. Virginie Brun et le Dr. Jean Armengaud ainsi que mes examinateurs le Prof. Marie-Cécile Ploy et Prof. François Vandenesch pour avoir étudié ce manuscrit.

Je remercie vivement le Prof. F. Vandenesch pour ce projet mené en étroite collaboration avec son équipe de recherche *Pathogénie des Staphylocoques* du Centre International de recherche en Infectiologie (CIRI) et son équipe du Centre National de Référence des Staphylocoques (Institut des Agents infectieux, Hôpital de la Croix Rousse). Merci François pour votre grande disponibilité et toutes les discussions et échanges scientifiques qui ont permis d'aboutir à ce travail.

Je remercie également Olivier Dauwalder et Jean-Philippe Rasigade pour toute l'aide apportée sur le travail des hémocultures à l'hôpital de la Croix Rousse, votre disponibilité et les discussions des résultats.

Je tiens à remercier toute l'équipe *Pathogénie des Staphylocoques* en particulier Mariane Pivard, Florence Couzon, Sylvère Bastien pour toute leur aide et travail sur la collection de souches cliniques de *S. aureus*, les échanges scientifiques et toute l'aide apportée pour la partie bioinformatique et statistique sur les analyses de protéomique ciblée.

Merci à Jérôme Lemoine de m'avoir fait aimer la spectrométrie de masse durant le Master et m'avoir accueilli dans son équipe et accompagné dans mes réussites comme dans mes échecs. Merci à ses conseils avisés, spécialement pour les présentations. Je le remercie de m'avoir confié ce travail de thèse et de m'avoir impliqué dans les discussions scientifiques du projet RHU. Bien évidemment, je remercie mes directeurs de thèse, Fabien Chirot et Sophie Ayciriex pour m'avoir aidé tout au long de la thèse, et m'avoir transmis autant de leurs connaissances. Je les remercie pour s'être démenés au quotidien pour moi et pour m'avoir supporté durant ces 3 années. Je tiens particulièrement remercier Sophie pour avoir cru en moi en Master et m'accompagner durant toutes les péripéties du concours de l'école doctorale, sans toi je ne serais pas ici aujourd'hui. Enfin, je les remercie pour le travail de correction qu'ils ont réalisé sur ce manuscrit qui fût conséquent et appréciable pendant cette année 2020 très particulière. Merci à Fabien de m'avoir oublié sur le pas de la porte en Allemagne pendant plus de 2 heures en pleine nuit (le paillason était très inconfortable).

Ensuite, ma pensée va vers Romain Carrière. Tu m'as formé, tu m'as accompagné, tu ne m'as jamais laissé gagner au badminton, tu as été le collègue dont tout le monde rêve, tu as fait de ces trois ans une expérience inoubliable et j'espère te revoir très rapidement après ma thèse.

Merci à l'ensemble de mes partenaires particuliers avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Mon bon Nour avec toutes nos blagues. Julien, ma crevette crédule préférée, on s'est bien marré pendant ces trois ans. Numa pour nos travaux conjoints. JV, car depuis un cours d'anglais c'est spécial entre nous. Aurélien pour les geekeries et tes corrections. Mais aussi les petits nouveaux Valérian et Eva bon courage à vous. Merci à l'ensemble des stagiaires (master, pharmacie et médecine) pour le travail que vous avez accompli et pour votre volonté de bien faire. Les manipulations à 3 heures du matin à l'hôpital seront des souvenirs que je garderais très longtemps. Merci à Julie, Francis, Maude et Tiphaine pour votre aide. Merci aux personnes côtoyées au cours de ces années, Sylvain, Marion, Clothilde, Claire, Vincent, Florence, Jean-Marc et Agnès ainsi que tous ceux que j'oublie.

Un grand merci à mes parents et mon frère qui m'ont soutenu durant la thèse, durant les années difficiles de ma vie et sans qui je n'aurais jamais fait d'étude au-delà de mon DUT.

La meilleure arrive toujours à la fin, ma chérie, je te remercie pour tout ton soutien, tout ton amour et ta patience pour ces 3 ans qui ont été parfois très durs pour moi. Tu m'as permis de tenir, tu as fait et fait de moi une meilleure personne chaque jour. Si j'ai réussi à aller jusqu'au bout de ce projet c'est grâce à toi. Je t'aime, et merci d'avoir supporté ton mouton ronchon.

Mon directeur de thèse est un homme sage qui aime beaucoup les citations (plus ou moins farfelus)

La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !

Albert Einstein

Table des abréviations et acronymes

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMBIC	: Bicarbonate d'ammonium
API	: Appareils et Procédés d'Identification
AQUA	: Absolute quantification
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ASMS	: American Society for Mass Spectrometry
AST	: Profil de résistance aux antibiotiques
BHI	: Brain Heart Infusion
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BLSE	: β -lactamases à spectre étendu
BMR	: Bactéries Multirésistantes
C3G	: Céphalosporine de 3 ^{ème} génération
CCY	: Casein hydrolysate and yeast extract medium
CE	: Collision Energy
(c)	: Concentration critique basse
(C)	: Concentration critique haute
CIRI	: Centre International de Recherche en Infectiologie
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CNR	: Centre National de Référence
CV	: Coefficient de variation
DDA	: Data Dependant Acquisition
DIA	: Data Independant Acquisition
DNEM	: Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
DP	: Declustering Potential
ETD	: Transfert d'électron dissociatif
FISH	: Hybridation fluorescente <i>in situ</i>
FN	: Faux négatif
FP	: Faux positif

Gram- : Bactérie à Gram négatif

Gram+ : Bactérie à Gram positif

HILIC : Chromatographie à interaction hydrophile

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HR : Haute résolution

ICAT : Isotope-Coded Affinity Tag

ID : Identification

[I] : Intermédiaire

iRT : Temps de rétention indexés

ITRAQ : Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification

K : Lysine

LC : Chromatographie liquide

LOS : Durée de séjour à l'hôpital

M : Méthionine

m/z : Rapport masse sur charge

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization –Time of Flight

MRM : Multiple Reaction monitoring

MS : Spectrométrie de masse

OCDE : Organisation de coopération et de développement économique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBP2a : Penicillin-binding protein 2 a

PFT : Pore-Forming Toxins

PQ : peptide quantifieur

PRM : Parallel Reaction Monitoring

PRSA : Staphylococcus aureus résistant à la pénicilline

PVL : Panton Valentine Leukocidin

QC : Contrôles qualité

Q-Orbitrap : Quadripôle – Orbitrap

QQQ : Triple quadripôle

Q-TOF : Quadripôle – Time of flight

R : Arginine

(R) : Résistance

[R] : Résistant

RPM : rotation par minute

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

S/B : Rapport signal sur bruit

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

[S] : Sensible

SCT : Syndrome de choc toxique

SILAC : Stable Isotope Labeling with Amino acids in cell culture

SPE : Solid Phase Extraction

SRM : Selected Reaction Monitoring

SWATH : Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment ions

T/E : Ratio trypsine échantillon

TVA : Transition Validation Area

UFC : Unité formant colonie

(V) : Virulence

VN : Vrai négatif

VP : Vrai positif

VRSA : Staphylococcus aureus résistant à la vancomycine

W : Tryptophane

Table des matières

Introduction générale.....	1
I. Contexte général	2
II. Résistance aux antibiotiques chez les bactéries	5
A. Les antibiotiques	5
1. La découverte des antibiotiques	5
2. Mode d'action des antibiotiques	6
3. Structure et synthèse de l'enveloppe bactérienne.....	7
4. Quelques grandes familles d'antibiotiques.....	10
B. Historique : Évolution de la résistance.....	12
C. Notions de CMI, résistance et sensibilité aux antibiotiques	14
D. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques	15
E. La résistance à la classe des bêtalactamines	17
III. <i>S. aureus</i> - un cas de virulence complexe	20
A. Protéines de surfaces	23
B. Protéines sécrétées	23
C. Résistance aux antibiotiques.....	24
IV. Diagnostic des infections bactériennes.....	26
A. Enjeux.....	26
B. Méthodes de routine pour l'identification bactérienne	28
1. Hémoculture.....	28
2. Coloration de Gram et microscopie	29
3. Croissance sur milieux solides.....	29
4. Identification	30
5. Antibiogramme.....	30

C.	Méthodes émergentes	31
1.	Tests moléculaires	31
2.	Tests immunochromatographiques	33
3.	Accelerate Pheno System	34
4.	Spectrométrie de masse : MALDI-TOF	35
D.	Conclusion sur les techniques actuelles et émergentes	39
V.	Spectrométrie de masse : Protéomique	42
A.	Approche <i>bottom-up</i>	43
1.	Digestion enzymatique	43
2.	Préparation d'échantillons	44
B.	Analyse protéomique sans <i>a priori</i>	45
C.	Approche ciblée	48
1.	Modes d'acquisitions : MRM / PRM	49
2.	Multiplexage en mode MRM	50
3.	Mode acquisition MRM par fenêtres de temps de rétention	52
D.	La quantification	54
1.	La quantification par marquage d'isotope	55
2.	Quantification absolue des protéines (AQUA)	57
3.	La quantification Label free	57
4.	Fragmentation peptidique	58
E.	Application à la microbiologie	61
1.	Approches sans <i>a priori</i>	61
2.	La protéomique sans <i>a priori</i> conjointe à l'analyse ciblée	63
3.	Analyses ciblées	66
4.	Etude de la virulence	68

5.	Complexité et temps d'analyse	69
6.	Conclusion	71
VI.	Objectif de la thèse	72
Chapitre 1 : Développement de la méthode		74
I.	Introduction.....	75
II.	Sélection des facteurs de virulences chez <i>S. aureus</i>	77
III.	Sélection et validation des peptides	79
A.	Caractéristiques d'un peptide rapporteur	79
B.	Bases de données et choix des séquences protéiques	81
1.	Digestion <i>In-silico</i>	81
2.	Spécificité des peptides.....	83
3.	Limitations des bases de données	84
C.	Validation expérimentale des peptides présélectionnés.....	85
1.	Vérification des peptides in-silico <i>via</i> l'analyse d'échantillons bactériens	85
2.	Vérification des transitions sélectionnées par l'analyse des peptides de synthèse	86
3.	Sélection finale des peptides suivis.....	89
IV.	Préparation des échantillons bactériens.....	91
A.	Conditions de culture des souches cliniques	93
B.	Lyse des bactéries : choix de la méthode de lyse	94
C.	Optimisation de la digestion trypsique	96
1.	Optimisation des temps de digestion	96
2.	Influence de la température sur la digestion	98
3.	Optimisation : utilisation de billes de verres	101
D.	Conclusion sur la préparation d'échantillon	103

V.	Analyse LC-MS-MS.....	103
VI.	Récapitulatif de la méthode	106
A.	Réactifs	106
B.	Souches bactériennes et conditions de culture	106
C.	Préparation d'échantillon.....	106
D.	Analyse en ligne SPE LC-MS-MS	107
VII.	Validation post-analyse	109
A.	Nombre et alignement des transitions	109
B.	Ratios de transitions.....	111
C.	Aire minimale de détection	115
D.	Conservation du ratio de peptide	117
VIII.	Étape de quantification	120
A.	Quantification relative	120
B.	Utilisation de normalisateurs internes.....	120
1.	Protéines ribosomiques	121
2.	Caractéristiques et choix des normalisateurs	121
C.	Quantification relative en MRM.....	123
1.	Calcul de quantification d'un peptide	123
2.	Différents cas observables	124
D.	Paramètres impactant la quantification	125
1.	Temps de digestion	125
2.	Ratio trypsine/échantillon.....	126
E.	Ratio des peptides ribosomiques	128
F.	Profil d'expression de facteurs de virulence	129
G.	Conclusion	130

IX. Logiciel de traitement automatique	132
A. Description de la méthode de retraitement	132
B. Limitations et évolutions.....	135
Chapitre 1 : Validation à grande echelle	139
I. Validation de méthode.....	140
A. Comparaison génomique/protéomique	140
B. Vérification de la spécificité	141
C. Robustesse de la méthode	142
D. Limitations observées de l’approche	144
II. Validation à plus grande échelle	147
A. Conditions préanalytiques : optimisations et impacts.....	147
1. Milieux de culture	148
2. Qualité du milieu de culture.....	149
3. Temps de croissance bactérienne.....	152
4. Paramètres expérimentaux annexes	152
5. Conclusion sur les conditions pré analytiques	153
B. Validation de la justesse de la méthode	153
1. Matrice de confusion	153
2. Spécificité de la méthode	154
3. Sensibilité de la méthode.....	156
4. Précision de la méthode.....	157
5. Évolution de la méthode et conclusion.....	159
C. Validation de la quantification	160
1. Échantillon de contrôle qualité	160
2. Cohérence de la quantification sur l’ensemble de la cohorte	161

3.	Encrassement de l'appareil	162
4.	Robustesse de quantification des facteurs de virulences.....	163
5.	Cohérence entre robustesse et variation d'expression	167
6.	Corrélation entre l'expression de certains facteurs de virulences	171
D.	Conclusion de la validation	172
III.	Conclusion	173
Chapitre 2 :	177
I.	Contexte	178
II.	Création de la méthode multiplexée	180
A.	Identification bactérienne à partir des protéines ribosomales	180
1.	Spécificité et validation	181
2.	Cas des entérobactéries	184
B.	Mécanismes de résistances aux antibiotiques.....	186
C.	Mutations et mécanismes d'actions : conséquences sur le multiplexage.....	187
D.	Méthodes ciblées hautement multiplexées.....	190
1.	Limitations de la méthode Scheduled-MRM	190
2.	Scout-MRM : une nouvelle méthode hautement multiplexée indépendante des temps de rétention.....	193
E.	Présentation de la méthode complète : de la préparation d'échantillons à l'analyse LC-MS/MS.....	196
1.	Matrices sanguines et hémocultures	196
2.	Préparation d'échantillons	196
a.	Prises d'essais	199
b.	Étape de centrifugation	199
c.	Lyse des composants du sang.....	200
d.	Lavage	200

3.	Vérification de la détection	200
4.	Évaluation des paramètres pour l'étape de lyse/digestion	203
a.	Cinétiques de digestion	203
b.	Impact des billes de verres	206
c.	Robustesse de la quantification en hémoculture.....	207
III.	Matériels et méthodes	209
A.	Réactifs	209
B.	Souches bactériennes et conditions de culture	209
C.	Préparation d'échantillons	210
D.	Analyse LC-MS-MS avec dessalage en ligne	211
IV.	Analyse Scout-MRM : Essais préliminaires	212
A.	Contexte de l'étude	212
B.	Résultats de la méthode Scout-MRM	213
C.	Limites de la méthode	217
1.	Préparation d'échantillons	217
2.	Virulence.....	220
a.	Cinétique de croissance.....	220
b.	Impact des billes de résines.....	222
c.	Impact milieu de culture.....	224
V.	Évolution et perspective de la méthode	226
A.	Adaptation en temps réel de la méthode Scout-MRM.....	226
1.	Principe de fonctionnement.....	226
2.	Précision dans l'architecture de la méthode	228
B.	Preuve de concept.....	229
VI.	Conclusion et perspectives.....	233

Conclusion générale	236
Valorisation	241
Bibliographie	243

Liste des figures

- Figure 1 :** Graphique de l'OCDE montrant l'incidence et l'évolution du nombre de décès et des coûts associés actuellement et en 2050 (prévision). 4
- Figure 2 :** Cibles thérapeutiques des antibiotiques. Les différentes classes d'antibiotiques sont représentées en bleu et les cibles sont en jaune. Avec par exemple les pénicillines comprenant les β lactamines, et céphalosporines agissant contre la synthèse de la paroi bactérienne. D'après : Lewis K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. Nat Rev Drug Discov 12:371–387 6
- Figure 3 :** Schéma de la paroi bactérienne pour les Gram + à gauche et les Gram - à droite. Pour les Gram+, présence d'une membrane de phospholipide et d'une épaisse couche de peptidoglycane laissant un espace périplasmique. Chez les Gram- on note la présence d'une double membrane avec une fine couche de peptidoglycane. D'après : http://stl_bjb.ac-dijon.fr/microbio/mparoiibacterienne.html 7
- Figure 4 :** Schéma de la synthèse et de la réticulation du peptidoglycane en 5 étapes. D'après Michael T. Madigan et John M. Martinko, Brock. Biology of Microorganisms, Pearson, 2012, ISBN 978-8871927756..... 8
- Figure 5 :** Illustration des différences entre une PBP sensible et résistante. D'après Michael T. Madigan et John M. Martinko, Brock. Biology of Microorganisms, Pearson, 2012, ISBN 978-8871927756. 9
- Figure 6 :** Structure du cycle β -lactame 10
- Figure 7 :** Structures des différentes classes de β lactamines et du dipeptide D-Ala-D-Ala. On retrouve la présence du cycle β -lactame caractéristique, avec différents groupements secondaires procurant une activité antibiotique spécifique. Adapté de Tulane University, School of medicine. 11
- Figure 8 :** Relation entre l'introduction d'un antibiotique et l'apparition des résistances associées.²² L'apparition des résistances est concomitante avec l'utilisation de l'antibiotique. D'après Iredell et al. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. 2017, The British Medical journal 12
- Figure 9 :** Classification clinique des souches en fonction de leur CMI. Si la CMI est inférieur à la concentration critique basse (c) alors la souche est sensible et le traitement possède une forte probabilité de succès. A contrario, si la CMI est supérieur à la concentration critique haute (C) alors la souche sera dite résistante. D'après la Lettre d'information n°33, Laboratoire Biosphère. 14
- Figure 10 :** Schéma des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques. L'antibiotique (représenté par la boule orange) est mis en situation avec ces divers mécanismes. On retrouve la modification de sa cible, son impossibilité de pénétrer la cellule (sous expression des porines associées) ou bien son évacuation massive via une surexpression des pompes d'efflux. Mais aussi sa modification par le biais d'enzymes (Ex: B-lactamase). Adapté de Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010..... 15
- Figure 11 :** Les β -lactamases chez les Entérobactéries séparées en 4 classes (A,B,C,D) selon Amber avec la discrimination entre intrinsèque et acquise. On retrouve les mécanismes de résistance prioritaires qui sont les carbapénèmases (KPC, VIMP, IMP, NDM et Oxa-48) ainsi que les ESBL (TEM, SHV et CTX-M) et AmpC. D'après Ruppé et al. 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. Ann Intensive Care 5..... 17

- Figure 12 :** Incidence de *K. pneumoniae* résistante aux C3G (en % des *K. Pneumoniae* total) dans les bactériémies entre 2003 et 2015. On remarque une évolution très rapide et une prolifération de la souche résistante en Europe jusqu'à atteindre dans certains pays plus de 50 %. D'après European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenemase-producing bacteria in Europe: interim results from the European Survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) project. Stockholm: ECDC; 2013. 19
- Figure 13 :** Pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* avec les produits structuraux et sécrétés jouant un rôle de facteur de virulence. En A (gris) des exemples de produits structuraux avec la protéine A et des adhésines, et en jaune des produits sécrétés avec l'alpha toxine et le super antigène TSST. En B et C on retrouve des exemples de protéines transmembranaires avec la présence des protéines associées à la résistance aux antibiotiques, bêta-lactamase et la protéine de liaison à la pénicilline issue de *MecA*. Figure de Massachusetts Medical Society. Copyright 1998 Massachusetts Medical Society/ Tous droits réservés 20
- Figure 14 :** Schéma du mode d'action d'une Pore-forming-toxin. La PFT se lie à un récepteur, s'en suit une oligomérisation puis d'une insertion dans la membrane et la formation d'un pore. D'après Los, Ferdinand C. O. et al "Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77.2 (2013): 173-207. Web. 11 Oct. 2020..... 24
- Figure 15:** Graphique représentant le taux de survie (courbe bleue) d'un patient (en cas de choc septique) en fonction du temps avant l'attribution d'une antibiothérapie effective. On observe une décroissance rapide, avec seulement 50 % de chance de survie après 5h et 0% après 36h. D'après Kumar A, et al. *Crit Care Med.* 2006 ; 34(6) :1589-96 27
- Figure 16 :** A) Représentation schématique d'un antibiogramme montrant plusieurs seuils de résistance aux antibiotiques. Les zones grises représentent la présence et le développement bactérien et en blanc l'absence de bactérie. Les cercles de couleurs correspondent aux pastilles d'antibiotiques autour desquelles l'antibiotique diffuse. Plus la distance avec le centre de la pastille est grande, moins l'antibiotique est concentré dans la gélose. Plus le cercle blanc autour de la pastille est grand, plus la bactérie sera sensible à cet antibiotique. En, opposition, l'absence de cercle blanc démontre la résistance de la bactérie à l'antibiotique. B) Exemple de photographie d'un antibiogramme sur boîte de Petrie. Adapté de cours personnelles en microbiologie Université Lyon 1. 31
- Figure 17 :** Principe d'un test immunochromatographique. La détection consiste à déposer l'échantillon à tester dans la zone de dépôt. Si l'antigène recherché est présent, il se lie avec un anticorps marqué le plus souvent à l'or colloïdal. Sous l'effet d'un tampon lyse-migration, les complexes antigènes-anticorps migrent et sont arrêtés par des anticorps de capture fixés sur la membrane. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une ligne colorée, l'accumulation du surplus de complexes colorés entraîne l'apparition d'une ligne de contrôle qui valide le bon fonctionnement de la réaction. En cas de réaction négative, seule la ligne contrôle est colorée. L'apparition des bandes est rapide en 15 à 20 mn. Généralement présentés sous forme de cassette, ils comportent une bandelette spécifique à une enzyme. Usuellement, des bactéries issues d'une croissance sur gélose sont utilisées, même si certains tests donnent des résultats directement avec la

solution issue de l'hémoculture ¹³⁵ . D'après Koczula et al. 2016. Lateral flow assays. Essays In Biochemistry Jun 30, 60(1) 111-120.	34
Figure 18 : Identification bactérienne par MALDI-TOF Croxatto et al. ¹³⁸	36
Figure 19 : Empreintes spectrales obtenues lors de l'analyse par MALDI TOF de colonies entières de 5 espèces bactériennes différentes. D'après Carbonnelle, É., & Nassif, X. (2012). Implantation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie : quels changements pour les cliniciens ? Réanimation, 21(3), 351–361. doi:10.1007/s13546-012-0480-y.	37
Figure 20 : Spectre de masse (MALDI TOF) montrant la présence à m/z 300 du pic correspondant à une molécule d'antibiotique (Imipénème) ainsi que son produit d'hydrolyse à m/z 254 dans une souche de <i>K. pneumoniae</i> . D'après Kempf et al. 2012, PLoS ONE 7:e31676.....	38
Figure 21 : Aperçu des techniques mises en place dans les hôpitaux en fonction du temps nécessaire pour l'obtention de l'ID et de l'AST avec le coût par patient associé. ID seulement : T2 biosystems : T2Dx ; ThermoFisher : Acron ; Biofire : FilmArray ; Luminex : Verigen ; Genmark : ePlex ; BioMérieux : Vitek MS ; Bruker : BioTyper. AST Seulement : Q linea : ASTar ; Quantamatrix : dRAST ; EUCAST : RAST. AST et ID : Accelerate Diagnostics : Accelerate Pheno System; BioMérieux : Vitek2 ; Beckman coulter : Microscan ; BD : Phoenix.	40
Figure 22 : Différentes étapes d'une stratégie bottom-up. Les protéines sont extraites de l'échantillon puis digérées via l'action d'une enzyme spécifique et choisie pour l'obtention de peptide. Il s'en suit une ou plusieurs étapes essentielles de préparation d'échantillons off-line (SPE, purification...) et/ou en ligne (SPE : solide phase extraction, LC : Liquid chromatography). Cet extrait de peptides est analysé par spectrométrie de masse en tandem. Les spectres ainsi réalisés sont alors analysés afin d'extraire l'information recherchée (présence/absence de protéine, et possible quantification de ces marqueurs).	43
Figure 23 : Principe de l'approche "Shotgun" selon le mode DDA (Data Dependant Acquisition). On réalise une analyse LC-MS/MS à partir d'un mélange de peptides rapporteurs issu de la digestion des protéines par une enzyme. À chaque instant de la séparation chromatographique, un spectre de masse est effectué, ainsi qu'un spectre secondaire sur les fragments des n précurseurs les plus intenses ; on parle de Top n. Ces spectres de fragmentation expérimentaux sont alors compilés dans des bases de données afin d'obtenir une identification des protéines.....	46
Figure 24 : Principe d'acquisition de la DIA. D'après Ludwig et al., Mol Sys Biol 2018.	47
Figure 25 : Représentation schématique d'une analyse en Mode MRM et PRM. Dans les deux cas, les composés ioniques désolvatés au niveau de l'électrospray sont, dans un premier temps, filtrés par le premier quadripôle. Cela permet de sélectionner l'ion parent que l'on souhaite détecter. Les ions sont alors guidés dans un second quadripôle utilisé comme une cellule de collision (accélération des ions et collision avec gaz inerte) où ils sont fragmentés (création d'ions fils). Dans le cas de la PRM, un spectre de fragmentation haute résolution est réalisé, permettant l'analyse de l'ensembles des fragments du peptide. Dans le cas de la MRM, certains ions fils sont alors filtrés successivement dans le troisième quadripôle. On obtient alors un chromatogramme reconstitué avec les différentes transitions (couple ion parent / ion fils) suivies. ...	49

Figure 26 : A) En MRM classique, les transitions sont suivies sur l'ensemble de la séparation chromatographique, avec un temps de cycle et un dwell time fixés. Cela permet la bonne description du pic LC (à droite). La largeur des barres vertes indique le dwell time et l'espace entre deux barres vertes représente le temps de cycle de la méthode. B) Cas où la capacité de multiplexage est augmentée en réduisant le dwell time. Le pic LC est toujours bien décrit mais le temps passé à suivre le composé est plus faible (ligne verte plus mince), ce qui entraîne un rapport signal/bruit (S/B) plus faible. C) La quantité de transitions suivies est multipliée par 3 ce qui entraîne une augmentation du temps de cycle, et le pic LC n'est plus défini que par 3 points. D'après Christie Hunter, SCIEX, USA The Scheduled MRM™ Algorithm Pro.	51
Figure 27 : Exemple de cas de figures pour une analyse avec 10 points par pic chromatographique à gauche et 6 points par pic à droite. En pointillé, est représenté l'aire déterminé lors de l'analyse avec 10 points par pic. Une différence significative entre les deux expériences est observable.....	52
Figure 28 : Comparaison entre la MRM classique et la MRM « Scheduled ». Dans le schéma classique, chaque transition est suivie sur l'ensemble de l'analyse. Cela entraîne une balance entre sensibilité, multiplexage et précision. Dans le cas de la Scheduled, chaque transition n'est suivie que sur une fenêtre de temps, ce qui permet de déséquilibrer la balance, offrant un gain global dans les trois paramètres.....	54
Figure 29: Stratégie de quantification en protéomique. Le bleu et le rouge correspond aux deux échantillons à comparer. Les lignes pleines représentent le stade où les échantillons sont combinés. Lors d'une ligne pointillée, le traitement est fait en parallèle et des erreurs de quantification peuvent être introduites. SILAC: stable isotope labelling by amino acids in cell culture; ICAT: isotope coded affinity tags; iTRAQ: isobaric tag for relative and absolute quantification.....	55
Figure 30 : Schéma représentant la nomenclature des fragments peptidiques. On retrouve une chaîne de 4 acides aminés avec les localisations des possibles fragmentations en rouge, bleu et vert. Les groupements R1, R2, R3, R4 représentent les chaînes latérales des différents acides aminés.	59
Figure 31 : Exemple d'un spectre de fragmentation du peptide DLVGDAGVNVLR. En bleu les fragments de type b, en rouge les fragments de type y et en vert la présence d'un fragment y dichargé.....	60
Figure 32: Figure récapitulative de l'approche développé par Chang et al. Diagnosis of β -Lactam Resistance in <i>Acinetobacter baumannii</i> Using Shotgun Proteomics and LC-Nano-Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry	61
Figure 33 : Chromatogramme reconstitué des peptides spécifiques à <i>S. aureus</i> . D'après : Discovery of species-unique peptide biomarkers of bacterial pathogens by tandem mass spectrometry-based proteotypin. ...	62
Figure 34 : Chromatogramme LC-MS/MS des échantillons positifs (93) et négatifs(94) des deux peptides pour l'OXA. La ligne supérieure de chaque peptide correspond au peptide non marqué et la ligne inférieure au peptide marqué utilisé comme contrôle interne. Issu de : Identification of the OXA-48 Carbapenemase Family by Use of Tryptic Peptides and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	63
Figure 35 : Chromatogrammes LC-MS/MS du peptide de OXA-48 ANQAFLPASTFK dans Skyline pour un échantillon positif de OXA-48 (A) et un échantillon négatif de OXA-48 échantillon (B). D'après Accurate Detection of the Four Most Prevalent Carbapenemases in <i>E. coli</i> and <i>K. pneumoniae</i> by High-Resolution Mass Spectrometry	65

- Figure 36** : Exemple des chromatogrammes reconstitués pour les 3 peptides de KPC suivis. A gauche pour une souche positive, et à droite pour une souche négative. Pour l'ensemble des peptides de la souche positive, un grand nombre de transitions sont retrouvées, alors qu'une absence de signal est bien observée pour la souche négative. D'après Wang, Peptide Markers for Rapid Detection of KPC Carbapenemase by LC-MS/MS. *Sci Rep* 2017, 7 (1), 2531. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02749-2>. **66**
- Figure 37** : Graphique représentant le signal acquis en spectrométrie de masse pour l'expression de la protéine AdeB en fonction du signal en RT-qPCR pour l'ARNm correspondant à la protéine AdeB. Aucune corrélation n'est observée. D'après Cecchini et al¹⁴⁹. **68**
- Figure 38** : FASTA de la protéine MecaA, récupérée sur UniprotKB, numéro d'accèsion : P60184. En vert sont représentés les peptides candidats correspondant aux normes souhaitées. En jaune est représenté un peptide en limite d'acceptabilité (petite taille) et en rouge l'ensemble restant de la séquence ne comportant aucun peptide candidat. **82**
- Figure 39** : Alignement des séquences protéiques de LukE, HlgA, LukS, et HlgC avec la séquence de la protéine LukG présente dans la souche MSHR1132. En vert sont représentés les 4 peptides spécifiques analysables pour la protéine HlgC. En rouge des exemples de peptides non spécifiques. **83**
- Figure 40** : chromatogramme reconstitué sur Skyline® d'un bon peptide candidat. Peptide LLLVDTPETK rapporteur de la protéine NUC (thermonucléase). On détecte la présence de 5 transitions alignées, correspondant aux fragments caractéristiques y5, y6, y7, y8 et y9. Le pic est parfaitement défini, et les fragments retrouvés correspondent à des fragments de haute masse. **85**
- Figure 41** : Chromatogramme reconstitué du peptide endogène SYANLIGK de la protéine MecaA lors de l'analyse d'une souche de *S. aureus*. **87**
- Figure 42** : En A. Le chromatogramme reconstitué du peptide DTSTPAAF GK (transition y8/y7/y6) lors de l'analyse d'une souche bactérienne. En B. le chromatogramme reconstitué du peptide DTSTPAAF GK (transition y8/y7/y6) pour l'analyse du peptide de synthèse seul. **88**
- Figure 43** : Le workflow ci-dessus représente l'intégralité des étapes réalisées, de la culture bactérienne au retraitement des données de l'analyse. La totalité des étapes est détaillée dans les différentes parties indiquées en bleu foncé. Premièrement la culture bactérienne, avec le milieu et le temps de culture. Ensuite, le choix réalisé pour la lyse bactérienne et les optimisations associées (ajout de billes) ainsi que les paramètres de la digestion trypsique (temps, température, quantité de trypsine). L'analyse LC-MS/MS est réalisée en 25 minutes, portant l'ensemble de la préparation d'échantillon à 50 minutes. **92**
- Figure 44** : Schéma représentatif d'un exemple de courbe de croissance bactérienne. Les temps indiqués sont fournis à titre d'exemples. On retrouve la phase de latence, suivie d'une accélération vers la phase exponentielle avant d'atteindre un palier lors de la phase stationnaire. Puis à confluence, on observe un déclin du nombre de cellules bactériennes dans la culture. **93**
- Figure 45** : Graphique explicitant l'impact du temps de digestion (en min) sur l'intensité brute du signal MS pour 4 exemples représentatifs (i.e. sommes des aires des 3 transitions d'un peptide caractéristique). En A, la toxine HLA avec une évolution rapide puis un plateau. En B, la protéine LukD avec une montée progressive

puis un plateau. En C, une protéine ribosomique avec une montée rapide, puis une décroissance. En D, la toxine HLGB avec une décroissance rapide.....	97
Figure 46 : Exemple de 4 protéines pour évaluer l'impact de la température sur l'efficacité de la digestion. Pour 2 températures (37° gris, 50°C bleu), 4 temps de lyse/digestion sont testés (2, 5, 10, 15 min) sur des triplicats techniques. L'intensité brute correspond ici à la somme des aires des trois transitions du peptide majoritaire caractérisant la protéine. Sur l'axe des ordonnées est représenté l'intensité normalisé par la valeur de la condition 2 min à 37°C. La quantité de trypsine est de 50 µg pour 200 µL d'échantillon.	100
Figure 47 : La figure montre l'impact de l'utilisation des billes de verre lors de l'étape de lyse/digestion. On représente pour 18 protéines l'intensité relative entre la présence de billes (noir) et l'absence de billes (bleu). On observe dans l'ensemble des cas que l'ajout de billes engendre une augmentation du signal avec un maximum de 30 % pour la protéine 1 et un minimum de 10 % pour la protéine 13. La moyenne de gain en signal est de 20 %.	102
Figure 48 : Exemple d'une analyse avec l'utilisation de la méthode pour une souche bactérienne avec l'ajout des peptides de synthèse. L'ensemble des peptides est élué en moins de 20 minutes.....	105
Figure 49 : Représentation schématique de la reconstitution des pics chromatographiques de trois transitions issues de l'analyse d'un peptide. À gauche le cas valide, où l'apex de chaque pic est bien aligné avec une marge de 0,015 minute. À droite, un exemple présentant un décalage en temps de rétention avec la transition bleu ciel.	109
Figure 50 : Représentation de deux chromatogrammes reconstitués A. et B. pour un même peptide (SNFNPEFLSVLSHR) dans deux souches de <i>S. aureus</i> différentes (Logiciel Skyline®).	110
Figure 51 : Représentation schématique pour trois exemples, d'un chromatogramme reconstitué pour illustrer le critère TVA. À gauche, le peptide synthétique, avec l'intensité correspondant aux trois transitions du peptide, et une TVA associée de 0,555. Au milieu l'analyse d'une souche avec une intensité brute plus faible, mais une TVA toujours égale à 0,555 conduisant à la validation de l'identité du composé. À droite, l'analyse d'une seconde souche avec une même intensité maximale, mais un ordre et une TVA qui diffèrent, conduisant à l'invalidation du peptide.	111
Figure 52 : Graphique représentant la valeur de la TVA du peptide n° 1 (NSGLPTTLGK) de la protéine CHP pour 183 souches de <i>S. aureus</i> . En orange les souches considérées comme positives pour la protéine CHP et en bleu les souches négatives. La zone verte représente une variation de 15 % autour de la valeur cible de 0,79 pour la TVA.	113
Figure 53 : Droite de corrélation entre les aires brutes des 2 transitions majoritaires du peptide n° 1 de la protéine CHP. Le R ² associé à la droite est de 0,9893.	114
Figure 54 : Box plot de la valeur de TVA en fonction des souches positives ou des souches négatives. Pas de recouvrement observé.	114
Figure 55 : Graphique représentant la valeur de la TVA du peptide n° 1 (NSGLPTTLGK) de la protéine CHP pour 183 souches de <i>S. aureus</i> . Les souches à 0 sont les souches ne validant pas le filtre d'aire minimale. En vert, on retrouve les souches avec une valeur de TVA valide, mais qui ne valident pas le filtre d'aire minimale. En bleu, les souches ayant une TVA invalide, mais ayant une valeur en aire minimale suffisante.	116

- Figure 56 :** Représentation schématique, pour trois exemples, d'un chromatogramme reconstitué pour illustrer le critère du ratio entre les peptides. Les valeurs au-dessus des peptides sont des valeurs arbitraires représentant la somme des aires des trois transitions du peptide. À gauche, l'analyse référence, avec les valeurs de références entre les peptides. Au milieu l'analyse d'une souche avec une intensité brute supérieure, mais un ratio entre les peptides bien conservé à la validation de l'identité du composé. À droite, l'analyse d'une seconde souche avec une même intensité maximale, mais une incohérence dans le ratio, avec le peptide minoritaire (vert) qui devient majoritaire dans cette analyse. **117**
- Figure 57 :** Droite de corrélation entre la somme des aires des transitions du peptide 1 et du peptide 2 de la protéine CHP, avec un R^2 associé de 0,9173. **119**
- Figure 58 :** Droite de corrélation entre l'aire des peptides ribosomiques utilisés comme normalisateur et le nombre de bactéries (en CFU/mL). En A, les droites indépendantes pour les peptides rapporteurs des protéines ribosomiques. En bleu le peptide IYPGENVGR : 30S ribosomal protein S11. En orange le peptide EMSVLELNDLVK : 50S ribosomal protein L7/L12. En vert le peptide ALQSAGLEVTAIR : 50S ribosomal protein L27. En B est représentée la moyenne des 3 peptides en fonction du nombre de bactéries dans l'échantillon. **122**
- Figure 59 :** Représentation schématique pour la réalisation de la quantification. À gauche, les trois normalisateurs internes décrits préalablement. À droite, le peptide à quantifier. La quantification est alors réalisée en utilisant la somme des aires des 3 transitions du peptide *i* divisées par la moyenne des sommes des aires des 3 transitions de chaque normalisateur. **123**
- Figure 60 :** Chromatogrammes reconstitués représentant les différences d'expression possibles. En A, la protéine a une valeur de quantification de 100 et plus (très forte expression -> aucun problème de retraitement). En B, est représentées les protéines du même niveau d'expression que les protéines ribosomiques (valeur entre 0,5 et 10). La majorité des protéines dans la méthode sont dans le cas de la figure C avec une expression de l'ordre de 1 à 10 % des protéines ribosomiques. Les protéines dans le cas D sont au niveau de la limite de quantification avec des valeurs proches de 0,05 % de l'expression des protéines ribosomiques. **124**
- Figure 61 :** Diagramme représentatif pour 3 protéines de l'impact du ratio quantité de trypsine/quantité de bactéries sur l'intensité brute observée. Pour la protéine SplB on observe une augmentation puis un plateau. Dans le cas de Nuc est représenté le cas de deux peptides, en orange (GLAYIYADGK) et en bleu (YGPEASAFTK). L'orange est caractérisée par une décroissance avant un plateau alors que le bleu reste constant. Le bleu sera donc un meilleur choix de peptide quantifieur afin d'assurer une robustesse maximale. Ce cas de peptides quantifieur optimum est représenté également pour la protéine SSPA. . **128**
- Figure 62 :** Diagramme représentant le ratio des 3 peptides normalisateurs entre eux pour 70 souches analysées. En bleu des souches issues d'une analyse récente, en gris des souches analysées 6 mois auparavant et en orange d'une analyse datant d'un an. L'ordre des points a été réparti de manière aléatoire. **129**
- Figure 63 :** Heat map pour 3 souches de *S. aureus* sur certaines protéines, selon une échelle logarithmique afin de faciliter la comparaison dans cet exemple. La valeur 0 correspond à l'absence d'expression et le **100 000**

est l'équivalent des protéines du cas A. de la figure 60, soit 100 fois supérieure à l'expression des protéines ribosomiques.	130
Figure 64 : Schéma récapitulatif du traitement des données. La première étape (en bleu) est la réalisation de l'intégration des pics et la récupération des données via MultiQuant. En second, l'ouverture du fichier d'entrée par KNIME pour faire le retraitement. Les données sont alors divisées entre la partie identification et la partie quantification. Chaque peptide est alors retraité de façon spécifique avec différents filtres (en haut à droite de la figure) dont les valeurs sont inscrites dans une base de données (en vert). Une fois les protéines validées, elles sont alors quantifiées selon les étapes décrites précédemment. Pour finir, un fichier de sortie (texte, CSV, Excel) est créé pour chaque échantillon où sont inscrites les protéines présentes ainsi que leur quantification.	134
Figure 65 : Évolution de la logique de retraitement avec l'ajout d'un score de peptide. Les traits verts correspondent à la validation de la condition. Les traits orange montrent une différence entre la valeur cible et celle obtenue, ce qui entraîne une pénalité. Les traits rouges sont associés aux conditions éliminatoires du peptide.	137
Figure 66 : Diagramme de recouvrement des résultats entre la génomique (puce à ADN) et la protéomique (MS) pour 20 souches génotypés sur 28 protéines. En bleu, les résultats comprenant l'ensemble des entérotoxines. En orange, les résultats sur un panel restreint d'entérotoxines. La non-concordance n'est dans aucun cas la présence d'un faux positif, mais bien la présence du gène alors que la protéine n'est pas détectée.	140
Figure 67 : Chromatogrammes reconstitués pour 4 souches de <i>S. aureus</i> . Sur chaque ligne, sont représentées, à gauche, une souche où le gène correspondant à l'expression de HLGc est supprimé et à droite la souche sans suppression. Dans les deux cas où la suppression a été réalisée (Δ HLGc), le peptide n'est pas détecté contrairement au cas de l'homologue non muté.	141
Figure 68 : Coefficient de variation associé aux facteurs de virulence en fonction de leur intensité relative (en log). L'analyse est réalisée sur un triplicat technique d'un mélange de trois souches de <i>S. aureus</i> . Les valeurs de CV importantes sont retrouvées pour les plus faibles expressions, avec un maximum de 27 %. La moyenne est de 8 % (indiqué en orange).	142
Figure 69 : Quantification relative pour HLA (a) et HLD (b). Les résultats présentés sont issus de la réalisation de triplicats techniques pour 3 souches différentes. En bleu est décrite la première expérience, et en orange la même expérience avec un jour d'écart et un cycle de congélation/décongélation supplémentaire. Les barres grises représentent la moyenne des deux.	143
Figure 70 : Diagramme présentant l'impact du temps et du milieu de culture sur l'expression de certains facteurs de virulence. Les deux conditions d'étude pour le temps sont : une croissance sur 8 heures (fin de phase exponentielle) (Bleu clair) et une croissance sur la nuit (plateau) (Bleu foncé). Le niveau d'expression est indiqué en pourcentage relatif par rapport à l'expérience où le facteur est majoritaire. Deux milieux de culture ont été testés, le milieu CCY et le milieu classique BHI (bouillon cœur-cervelette).	145
Figure 71 : Représentation pour l'ensemble des facteurs de virulences étudiés de la spécificité par rapport aux résultats issus des puces à ADN.	154

Figure 72 : Représentation pour l'ensemble des facteurs de virulence étudiés de la sensibilité par rapport aux résultats issus des puces à ADN.....	156
Figure 73 : Représentation pour l'ensemble des facteurs de virulence étudiés de la précision par rapport aux résultats issus des puces à ADN.....	158
Figure 74 : Rapport des intensités des 3 peptides normalisateurs pour l'ensemble des 300 souches analysées (En bleu) et pour les QC (en orange). La valeur cible est de 0,68. La valeur moyenne obtenue est de 0,69 avec un CV de 5 %.....	161
Figure 75 : En bleu est représenté l'intensité brute moyenne, répartie de façon chronologique, des peptides normalisateurs pour chaque QC analysé. Une décroissance forte est observée au bout de 10 QC analysé qui s'aggrave après 16 QC soit 170 échantillons. Le lavage réalisé permet de retrouver l'intensité brute initiale, et la décroissance est à nouveau observée. En orange est représenté pour les mêmes QC les valeurs des rapports entre les peptides normalisateurs. Les rapports restent constants malgré la décroissance observée.	162
Figure 76 : Schéma descriptif du Qtrap 6500 Sciex. (1) Plaque de l'orifice ; (2) Qjet guide d'ion ; (3) Région du Q0 ; (4) Q1 ; (5) Q2 ; (6) Q3 ; (7) Détecteur.....	163
Figure 77 : Diagramme de type boîte à moustache pour chacune des protéines étudiées exprimées dans les échantillons QC. Elles représentent l'écart à la moyenne pour chaque QC, permettant d'évaluer la robustesse et les coefficients de variation associés à chaque facteur de virulence en tenant compte de la variabilité interjours et interindividu. Aucun CV > 20 % n'est observé sur l'ensemble des paramètres. Certaines protéines comme CoA, HlgC, SAK montrent des échantillons hors gammes qui demeurent inférieurs à 30 % de variation.....	165
Figure 78 : Boîtes à moustaches pour 24 facteurs de virulences sur une échelle en log 10 d'intensités relatives pour chacune des protéines. Pour chaque boîte est représenté l'ensemble des valeurs en fonction de la valeur minimale observée sur les 300 souches de <i>S. aureus</i> analysés.....	169
Figure 79 : Boîtes à moustaches pour 24 facteurs de virulences sur une échelle en log 10 d'intensités normalisées. Pour chaque boîte sont représenté les intensités normalisées observées sur les 300 souches de <i>S. aureus</i> analysés. Une différence de plus de 5 log est observable entre le facteur le plus intense (HLD) et le plus faible (Sbi).....	170
Figure 80 : Représentation de l'intensité relative de facteurs de virulences situés sur un même opéron ou liés dans leurs régulations deux à deux. Les valeurs de corrélation obtenue entre l'expression des protéines sont indiquées en dessous de chaque graphique. Toutes les P-value obtenues sont inférieures à 0,01 et indiquent une corrélation importante entre chaque duo de protéines étudiées.	171
Figure 81 : Chromatogrammes reconstitués illustrant en A l'analyse d'une souche <i>E. coli</i> avec le suivi des peptides ribosomiques spécifiques de <i>E. coli</i> . Ces peptides sont identifiés sur le chromatogramme par la présence d'une étoile bleue. En B, l'analyse d'une souche de <i>P. aeruginosa</i> avec le suivi des peptides ribosomiques de <i>E. coli</i> . Aucun peptide ribosomique n'est détecté.....	181
Figure 82 : Chromatogrammes reconstitués pour l'analyse de 4 souches bactériennes pour le peptide ALQSAGLEVTAIR, rapporteur de 30S ribosomal protein S11 de <i>S. aureus</i>	182

- Figure 83** : Répartition des 48 peptides ribosomiques spécifiques de *P. aeruginosa* sur le gradient de séparation de la méthode (entre 4 et 12,5 minutes). **183**
- Figure 84** : Représentation d'une portion d'alignement de séquence de 15 sur 237 variants de la protéine TEM. Les mutations indiquées en rouge impliquent un changement de mécanismes pour la protéine. Les mécanismes BLSE et pénicillinase, avec ou sans résistance aux inhibiteurs, sont retrouvés. **188**
- Figure 85** : Représentation d'une portion de l'alignement de séquences pour 13 variants sur 220 de la protéine CTX-M. Un grand nombre de mutations est observable sur cette partie de la protéine, ce qui entraîne la nécessité de suivre de nombreux peptides pour caractériser cette résistance. **189**
- Figure 86** : Représentation de deux chromatogrammes reconstitués issus de l'analyse de 2 souches différentes de *S. aureus* pour le peptide EMSVLELNDLVK rapporteur d'une protéine ribosomique. Le temps de rétention dans la première souche est de 13,4 minutes pour 14,6 dans la seconde souche, soit un décalage de 1,2 minute. **191**
- Figure 87** : Représentation de l'évolution du dwell-time en fonction de la largeur des plages de détections. La méthode utilisée comprend 500 transitions réparties sur le gradient entre 5 et 20 minutes. En orange la plage de détection a été fixée à 1,5 min, et 1 min pour la courbe bleue. La limite fixée pour le dwell-time de 5 ms est représentée par une ligne rouge. L'utilisation de plages étendues engendre un franchissement de la limite par deux fois. **192**
- Figure 88** : Schéma de fonctionnement du mode d'acquisition Scout-MRM. La figure représente un chromatogramme reconstitué lors de l'analyse en mode Scout-MRM. Les composés scouts sont associés à un groupe de transition. Le scout n° 1 avec le groupe n° 1 (bleu). Lorsque le scout est détecté : 2 transitions dépassant un seuil fixé, le groupe associé est déclenché et le spectromètre commence le suivi des transitions du groupe. Si un nouveau scout est déclenché (scout n° 2) alors le suivi du groupe 1 est stoppé et remplacé par le groupe du nouveau scout. Ce processus est répété pour chaque scout dans la méthode. Ce mode d'acquisition permet de s'affranchir des décalages en temps de rétention lors des analyses. . **194**
- Figure 89** : Représentation globale du workflow pour l'analyse en une heure d'une hémoculture positive par LC-MS/MS. L'échantillon issu de l'hémoculture est prélevé puis centrifugé. Le surnageant est séparé du culot, et soit éliminé, soit gardé en vue d'une analyse ultérieure. Le culot est alors lysé par l'ajout d'un tampon. Le culot bactérien est alors récupéré après centrifugation et une étape de lavage est réalisée. Des billes sont ajoutées à 200 µL de l'échantillon reconstitué. La lyse et la digestion trypsique sont réalisées à 50 °C dans un bain à ultrason pendant 10 min. L'analyse LC-MS/MS peut alors être réalisée. **198**
- Figure 90** : Chromatogrammes reconstitués pour l'analyse de 3 espèces bactériennes issues d'hémocultures fraîchement positives. Les étoiles bleues représentent les peptides associés au mécanisme de résistance présent dans la souche. **202**
- Figure 91** : Histogramme des intensités brutes en fonction du temps de lyse/digestion pour 2 températures (37 °C gris et 50 °C bleus) pour les peptides rapporteurs des protéines ribosomiques de *E. faecium*, *P. aeruginosa*, ainsi que pour les entérobactéries. L'intensité est représentée en pourcentage par rapport à la condition 2 minutes de lyse/digestion à 37 °C. Une augmentation moyenne du signal est observée avec le temps avec un palier atteint très rapidement pour *P. aeruginosa*. La température consiste à une

augmentation importante de l'intensité obtenue. La condition 10 minutes et 50 °C reste la condition avec le meilleur compromis en termes de temps, sensibilité et robustesse..... **204**

Figure 92 : Histogramme des intensités brutes en fonctions du temps de lyse digestion pour 2 températures (37 °C gris et 50 °C bleus) pour les peptides rapporteurs des mécanismes de résistances : TEM, AmpC, VIM, KPC, CTX-M, Oxa-48. L'intensité est représentée en pourcentage par rapport à la condition 2 minutes de lyse/digestion à 37 °C. Une augmentation moyenne du signal est observée lors de l'augmentation du temps de lyse/digestion pour la plupart des mécanismes. Un palier est cependant atteint très rapidement pour AmpC et VIM dès 5 minutes de lyse/digestion. Lorsque le palier n'est pas atteint, la température engendre une augmentation importante de l'intensité obtenue par exemple avec Oxa-48 (100 % supplémentaire). La condition 10 minutes et 50 °C reste la condition avec le meilleur compromis en termes de temps, sensibilité et robustesse pour l'ensemble **205**

Figure 93 : Histogramme des intensités brutes en fonction de l'ajout de billes (Orange) ou non (bleu) pour une digestion lyse de 10 minutes pour les peptides rapporteurs des protéines ribosomiques de *E. faecium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. albicans* ainsi que pour les entérobactéries. L'impact sur les bactéries Gram- est négligeable (5 à 10 % d'augmentation) alors que l'augmentation sur les Gram+ est très importante (de 50 % à 110 %). **206**

Figure 94 : Histogrammes des intensités des peptides rapporteurs de mécanismes de résistances pour des triplicats en hémoculture. La barre d'erreur représente plus ou moins un CV avec des valeurs maximales de variation de 10 %. La robustesse observée pour *S. aureus* est donc conservée pour des mécanismes de résistances sur d'autres bactéries dans les futures conditions analytiques..... **208**

Figure 95 : Comparaison de 4 protocoles de lyses. Saponine 2 % finale – 3 % final, tampon de lyse ACK et Kit Sepsityper de Bruker ©. En A. les résultats obtenus pour une souche *E. coli*. Le Sepsityper entraîne une aire normalisée supérieure dans l'ensemble des cas, aux protocoles basés sur l'utilisation de la saponine. Le tampon ACK semble être bien moins efficace que les autres solutions proposées. En B. les résultats obtenus pour une souche de *S. epidermidis*. Le Sepsityper engendre une aire normalisée supérieure dans l'ensemble des cas. En revanche, aucune différence significative entre l'utilisation du tampon et de la saponine n'est observée..... **219**

Figure 96 : Chromatogrammes reconstitués et histogrammes pour l'analyse de la souche ST20150295 dans des hémocultures réalisées dans des flacons BacT/Alert FAN Plus®. Le temps 0 h correspond à l'instant où l'hémoculture est considérée comme positive. En A. sont représentées les données pour un peptide ribosomique, montrant que la croissance continue après le temps 0 h. En B. C. et D. sont présentés respectivement les résultats pour les protéines HLD, HLA et Psm1. Aucune détection n'est observée pour le temps 0 h. À partir de 1 h 30, l'expression est détectée, et augmente d'un facteur 10 entre 1 h 30 et 8 h de croissance supplémentaire..... **221**

Figure 97 : Chromatogrammes reconstitués et histogrammes pour l'analyse de la souche ST20150295 dans des hémocultures réalisées dans des flacons BacT/Alert FAN Plus®. 6 conditions sont présentées pour l'analyse du peptide WIIDTVNK rapporteur de la protéine HLD. 3 pour l'analyse du culot bactérien à 0 h, 1 h 30 et 8 h et 3 pour l'analyse du lavage des billes de résines contenues dans le flacon d'hémoculture pour de

même durée de culture. En A. le chromatogramme reconstitué pour le lavage des billes à 1 h 30 est présenté sur lequel, le pic correspondant au peptide WIIDTVNK est observé à 7,7 min. En B. le chromatogramme reconstitué pour le lavage des billes à 0 h montre l'absence du pic du peptide WIIDTVNK. En C. les histogrammes des aires des trois transitions du peptide pour chacune des conditions sont présentés. **223**

Figure 98 : Comparaison des flacons d'hémocultures BacT/ALERT® et BacT/ALERT FAN Plus® pour la protéine HLGB et un peptide ribosomique. En A. et B. sont représentés les chromatogrammes reconstitués pour les deux flacons. Une absence d'expression est observée pour les flacons BacT/ALERT FAN Plus®. En C. Les histogrammes des aires des transitions du peptide rapporteur d'une protéine ribosomique démontrent une plus grande quantité de bactéries dans les flacons BacT/ALERT FAN Plus®. **225**

Figure 99 : Schéma de fonctionnement du nouveau principe d'acquisition. La première partie du gradient de séparation est réservé à la présence de peptides rapporteurs des protéines ribosomiques. Ces peptides sont considérés comme des scouts qui lorsqu'ils seront détectés déclencheront une sous-méthode associée à la bactérie. Dans le cas présenté, au moment de la détection de la combinaison de peptides (minimum 2) de la bactérie Y (rouge), la méthode associée est à ce moment-là lancée. Celle-ci permet par la suite le suivi sous plusieurs groupes de peptides permettant la confirmation de l'identification, ainsi que la caractérisation des mécanismes de virulence de la souche bactérienne (Adaptée du brevet n° FR2000471, « Procédé d'identification et de caractérisation d'une population microbienne par spectrométrie de masse »). **227**

Figure 100 : Récapitulatif des analyses réalisées pour la preuve de concept. À gauche est représentée la partie identification de l'analyse qui s'effectue entre 4.5 et 7 minutes. En fonction des peptides détectés, l'identification est réalisée. Dans les 4 premières analyses, les peptides VVMTADAVK et AQLQEIAQTK permettent de déterminer l'appartenance à la famille des entérobactéries. L'identification fine est alors réalisée dans la seconde partie de l'analyse avec la présence de peptides spécifiques à l'espèce (étoiles rouges). **230**

Liste des tableaux

- Tableau 1 : 1** - Facteurs de virulences de *S. aureus* : Toxines. 2 - Facteurs de virulences de *S. aureus* : Adhésion aux cellules de l'hôte. 3 - Facteurs de virulences de *S. aureus* : Enzymes et autres protéines **21**
- Tableau 2** : Facteurs de virulences de *S. aureus* : Evasion du système immunitaire de l'hôte. (Activité des phagocyte et leucocyte). Facteurs de virulences de *S. aureus* : Evasion du système immunitaire de l'hôte. (Activité du complément). Facteurs de virulences de *S. aureus* : Evasion du système immunitaire de l'hôte. (Peptide antimicrobien) Facteurs de virulences de *S. aureus* : Evasion du système immunitaire de l'hôte. (Immunoglobulines) **22**
- Tableau 3** : Liste des facteurs de virulence intéressants pour la caractérisation du virulome de *S.aureus*. **78**
- Tableau 4** : Liste finale des facteurs de virulence gardés dans la méthode, après différents filtres et sélections approfondies **90**
- Tableau 5** : Tableau récapitulatif des méthodes testées pour lyser les bactéries afin d'extraire les protéines. L'échelle correspond pour + pour un apport moyen, ++ pour très correct, et +++ pour la meilleure des solutions. **95**
- Tableau 6** : Récapitulatif des caractéristiques pour les 4 milieux de cultures étudiés. La sensibilité correspond à la capacité de détection globale des protéines d'intérêts. L'expression des facteurs de résistances est principalement liée à l'expression de *MecA* et *BlaZ*. **148**
- Tableau 7** : Tableau récapitulatif de la quantification sur 5 réplicats techniques pour plusieurs conditions. À gauche les valeurs pour la souche de référence ST80 et à droite pour l'USA 300. Dans chacun des cas, la comparaison entre un milieu ancien (1 mois) et nouveau est réalisée. Les cases surlignées en jaune et bleu correspondent aux protéines impactées significativement par la fraîcheur du milieu. **151**
- Tableau 8** : Tableau récapitulatif de la quantification sur 2 réplicats techniques (culture comprise) pour 2 souches bactériennes. À gauche les valeurs d'intensités normalisées pour le premier réplicat et les CV associés aux diverses protéines détectées, et à droite pour le second réplicat avec également les valeurs de CV associées. **166**
- Tableau 9** : Représentation des peptides permettant l'identification de différents genres ou espèces au sein de la famille des entérobactéries. Les peptides sont marqués en vert si les peptides sont retrouvés pour la bactérie et en rouge si ces derniers sont absents. **184**
- Tableau 10** : Tableau récapitulatif des bêtalactamases selon Ambler, avec les activités associées ainsi que quelques exemples d'enzymes. **186**
- Tableau 11** : Tableau récapitulatif des mécanismes de résistances suivis et des différentes espèces pour les analyses complémentaires. **213**
- Tableau 12** : Tableau récapitulatif des résultats pour les 62 souches analysées. La caractérisation des mécanismes de résistance est représentée par un code à 4 couleurs. Blanc : absence du mécanisme (séquençage) et non détection. Vert : Présence du mécanisme et détection. Orange : Absence du mécanisme et détection. Rouge : Présence du mécanisme et non détection. L'identification a été juste dans l'ensemble des cas. Les

cases orange représentent des cas où une erreur a été commise lors de la culture. Ces souches ont été identifiées par MALDI-TOF et ont confirmé la nouvelle identification..... **215**

Résumé

L'incidence des résistances multiples aux antibiotiques est un problème de santé publique mondial qui peut conduire à une impasse thérapeutique lors du traitement des infections bactériennes. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi une liste de pathogènes prioritaires (ESKAPE) du fait de l'apparition de souches multi-résistantes. Cette liste a été dressée dans le but d'orienter et de promouvoir la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques pour lutter contre la résistance aux antibiotiques. L'identification de la bactérie et la caractérisation de son profil de résistance sont des informations essentielles pour la mise en place la plus rapide possible d'une antibiothérapie ciblée. L'objectif global de ce travail de thèse mené au sein de l'équipe ANABIO-MS de l'Institut des Sciences Analytiques était d'évaluer les potentialités de l'analyse protéomique ciblée ascendante (« bottom-up ») pour identifier un pathogène et/ou caractériser ses mécanismes de virulence et de résistance aux antibiotiques.

La première partie des travaux de la thèse, réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), a été dédiée au développement d'une méthode de dosage relatif des facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* à l'aide du mode d'acquisition ciblé, MRM (Multiple Reaction Monitoring). L'optimisation du temps requis pour la préparation d'échantillon a été un des objectifs principaux de ce développement. Notamment grâce à l'utilisation d'un système à ultrasons modifié afin d'effectuer simultanément la lyse des bactéries et l'hydrolyse enzymatique par la trypsine des protéines, à une température thermo régulée. La température, le temps de lyse/digestion ainsi que l'influence de microbilles de verre ont été évalués pour aboutir à un protocole optimisé de 10 min de lyse/digestion à 50°C. Un grand nombre de paramètres influençant la quantification et le retraitement des données ont également été évalués dans le but d'assurer une robustesse maximale à la méthode. La méthode a ensuite été déployée pour quantifier 50 facteurs de virulence au sein d'une cohorte de 300 souches cliniques de *S. aureus* (Cohorte VIRSTA et PHRC, investigateur Pr. F. Vandenesch) afin d'identifier des marqueurs prédictifs de la sévérité de l'infection.

La seconde partie des travaux de thèse s'est focalisée sur l'exploitation d'un tout nouveau mode d'acquisition ciblée appelé Scout-MRM, pour concevoir un arbre de décision

en temps réel du suivi des transitions spécifiques des peptides rapporteurs nécessaires à l'identification (ID) du pathogène ainsi qu'à la caractérisation de son profil de résistance aux antibiotiques. Afin de réaliser cette première preuve de concept, une méthode Scout-MRM a été développée utilisant dans un premier groupe de transition les peptides ribosomaux spécifiques du genre ou de l'espèce (groupe ESKAPE) des bactéries comme nœuds d'orientation déclenchant de nouveaux groupes de transitions intégrant des peptides rapporteurs de mécanismes de résistances (MecA ; VIM ; NDM ; Oxa-48 ; TEM ; KPC ; CTX-M ; OXA-10 ; AmpC) et d'autres permettant la confirmation du genre et de l'espèce. Par ailleurs, une attention particulière a été portée à l'optimisation d'un protocole de préparation de l'échantillon et d'analyse qui soit tout à la fois rapide et robuste pour procéder en moins d'une heure à un diagnostic exhaustif, et ce directement à partir d'un aliquot d'hémoculture positive. Les résultats obtenus montrent un score de spécificité de 100 % pour l'identification de l'espèce et du genre ainsi que de 95 % pour les différents mécanismes de résistances aux antibiotiques.

Les résultats prometteurs issus de ces travaux de thèse combinés à ceux obtenus par d'autres membres de l'équipe se poursuivent dans la perspective de pouvoir disposer, d'ici mi-2021, d'une méthode Scout-MRM ciblant les espèces les plus fréquentes dans les infections du sang ainsi que les mécanismes de résistance aux antibiotiques associés les plus critiques. L'intérêt de la méthode proposée en vue du diagnostic (spécificité, sensibilité, classification du niveau de résistance) sera évalué vis à vis des méthodes standardisées en analysant les échantillons de routine hospitalière.

Mots clés : ESKAPE, *Staphylococcus aureus*, Résistance aux antibiotiques ; Protéomique, Spectrométrie de masse ciblée, Scout-MRM; Virulence ; hémoculture.

Abstract

The incidence of multiple antibiotic resistance is a global public health threat that can lead to a therapeutic impasse in the treatment of bacterial infections. The World Health Organization (WHO) has established a list of priority pathogens (ESKAPE) due to the emergence of multi-resistant strains. This list was designed to guide and promote the research and development of new antibiotics to counter antibiotic resistance. The identification of the bacterium and the characterization of its resistance profile are essential informations in order to set up as quickly as possible a targeted antibiotic therapy. The overall objective of this thesis work, carried out within the ANABIO-MS team of the Institute of Analytical Sciences, was to evaluate the potential of bottom-up targeted proteomic analysis to identify a pathogen and/or characterize its virulence and antibiotic resistance mechanisms. The first part of the thesis work, conducted in the framework of a collaboration with the Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), was dedicated to the development of a method for the relative quantification of *Staphylococcus aureus* virulence factors using the targeted acquisition mode, MRM (Multiple Reaction Monitoring).

The optimization of the time required for sample preparation was one of the main objectives of this development. In particular, by using a modified ultrasound system to simultaneously perform bacterial lysis and enzymatic trypsin hydrolysis of proteins at a thermo-regulated temperature. The temperature, the lysis/digestion time and the influence of glass microbeads were evaluated in order to obtain an optimized protocol of 10 min lysis/digestion at 50°C. A large number of parameters influencing the quantification and reprocessing of the data were also evaluated in order to ensure maximum robustness of the method. The method was then deployed to quantify 50 virulence factors in a cohort of 300 clinical strains of *S. aureus* (VIRSTA and PHRC cohort, investigator Pr. F. Vandenesch) in order to identify predictive markers of infection severity.

The second part of the PhD work was focused on the exploitation of a brand new targeted acquisition mode called Scout-MRM, to design a real-time decision tree for the monitoring of specific transitions of reporter peptides necessary for the identification (ID) of the pathogen as well as for the characterization of its antibiotic resistance profile.

In order to achieve this first proof of concept, a Scout-MRM method has been developed using in a first transition group the genus or species specific ribosomal peptides (ESKAPE group) of bacteria as orientation nodes triggering new transition groups integrating reporter peptides of resistance mechanisms (MecA; VIM; NDM; Oxa-48; TEM; KPC; CTX-M; OXA-10; AmpC) and others allowing the confirmation of the genus and species. In addition, particular attention was paid to the optimization of a rapid and robust sample preparation and analysis protocol to provide a complete diagnosis in less than one hour, directly from a positive blood culture aliquot. The results obtained show a specificity score of 100% for species and genus identification and 95% for the different antibiotic resistance mechanisms.

The promising results from this thesis work combined with those obtained by other members of the team are being pursued with a view to having, by mid-2021, a Scout-MRM method targeting the most frequent species in blood infections as well as the most critical associated antibiotic resistance mechanisms. The interest of the proposed method for diagnosis (specificity, sensitivity, classification of the level of resistance) will be evaluated against standardised methods by analysing routine hospital samples.

Key words : ESKAPE, Staphylococcus aureus, Antibiotic resistance; Proteomics, Targeted Mass Spectrometry, Scout-MRM; Virulence; Blood culture.

Introduction générale

I. Contexte général

Les maladies infectieuses (provoquées par la transmission d'un micro-organisme comme une bactérie, un virus parasite ou encore des champignons) sont responsables de plus de 17 millions de morts par an. La pathogénicité (capacité d'un organisme à causer une maladie) ainsi que la létalité importante des bactéries ou des virus peuvent engendrer des répercussions économiques et sociales très importantes, comme lors de la pandémie de Grippe A ou encore avec le coronavirus SARS-CoV-2, qui a fortement impactée l'économie mondiale en 2020¹.

Même si elles touchent majoritairement les pays en voie de développement, les pays industrialisés n'en sont pas exempts, notamment avec la recrudescence des infections bactériennes. Celles-ci avaient subi une phase de forte régression (époque pastorienne) grâce aux antibiotiques, mais malheureusement la survenue de l'antibiorésistance devient un problème majeur de santé publique (troisième cause de décès en France devant l'infarctus du myocarde). Des projections à moyen terme estiment plus de 50 millions de morts à travers le monde en 2050.

En 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publie un rapport sur la résistance aux antibiotiques comme une menace d'ampleur mondiale sur les citoyens. Ce rapport met en évidence la prescription automatique et excessive ainsi que la mauvaise utilisation des antibiotiques qui engendre l'apparition et la prolifération inquiétante de la résistance des bactéries aux antibiotiques « de dernier recours » dans toutes les régions du monde ².

En conséquence, l'OMS a publié une liste pour essayer d'orienter et de promouvoir la recherche et développement sur les agents pathogènes prioritaires les plus dangereux et présentant des résistances aux antibiothérapies courantes. Cette liste énumère les 12 familles de bactéries les plus menaçantes tout en se focalisant sur un groupe de bactéries associées à une grande prévalence des infections nosocomiales³ (en particulier les bactéries à Gram négatif) défini par l'acronyme ESKAPE qui comprend les familles suivantes :

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*

Ce groupe est étroitement surveillé car il est composé de bactéries pouvant se révéler très virulentes. La virulence représente la capacité du micro-organisme pathogène à se développer au sein de l'hôte (pouvoir invasif) ainsi que son impact destructif au sein de celui-ci (pouvoir toxique). Cette virulence est possible *via* l'expression de facteurs de virulences qui sont majoritairement des protéines, comme des adhésines (pouvoir invasif) ou des toxines (pouvoir toxique). La résistance aux antibiotiques est comprise dans la virulence globale d'une souche bactérienne. Elle est mise particulièrement en avant ces dernières années car elle représente une menace directe. Cependant, la résistance aux antibiotiques ne représente seulement qu'une partie de la virulence des bactéries. En fonction des différentes espèces et genres, les bactéries possèdent un véritable arsenal d'invasion, qui leur permet d'échapper au système immunitaire, de le combattre (grâce à l'expression de toxines), ou encore de se fixer sur certains tissus spécifiques (adhésine). Et c'est cette diversité dans les facteurs de virulence qui rend difficile la prévision de la sévérité d'une souche au sein d'un hôte.

Le groupe ESKAPE est par ailleurs composé en majorité de bactéries à Gram négatif, fortement résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques, ainsi que de bactéries à virulence complexe comme *S. aureus* ou *E. coli* (présence de nombreuses toxines et d'un grand nombre de facteurs de virulence). Devant cette capacité d'adaptation multifactorielle, il est important de disposer de méthodes de diagnostic qui permettent de caractériser de manière précise, rapide, sensible et spécifique les souches bactériennes afin de proposer une antibiothérapie adéquate⁴. De plus en plus fréquemment, les médecins se retrouvent dans une impasse thérapeutique, du fait de micro-organismes exprimant des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques^{5,6}.

Les infections causées par ces souches multi résistantes impliquent une morbidité et une mortalité élevée. Une étude menée en Europe sur les bactériémies à SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) et à entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération, a montré une augmentation de 80 à 150% de la mortalité à J30 après l'infection⁵. Les coûts des traitements des infections à bactéries multirésistantes (BMR) sont plus élevés et requièrent des durées d'hospitalisation plus longues⁶. Ainsi, en Europe les surcoûts liés aux journées d'hospitalisations supplémentaires et à la prise en charge des patients étaient estimés à 900 millions d'euros en 2007. En milieu communautaire, la prise en charge des

infections à BMR représentait déjà en 2009 près de 10 millions d’euros (European Centre for Disease Prevention and Control, 2009). On estime ainsi que 670 000 cas d’infection ont été diagnostiqués en 2015 en Europe, et que 33 000 décès sont associés à des bactéries multi résistantes. Ces évènements ont engendré un total de 2,9 millions de jours d’hospitalisation supplémentaires. Selon les projections de l’OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) (Figure 1), la mortalité et les coûts associés augmentent exponentiellement, jusqu’à devenir ingérables pour un grand nombre de pays à l’horizon 2050. Ils estiment à près de 200 000 morts par an en France en 2050 en conséquence des infections à BMR. La figure ci-dessous présente en parallèle la mortalité (nombre de morts pour 100 000 personnes), ainsi que les coûts (en millier de Dollars pour 100 000 personnes) associés aux infections à BMR.

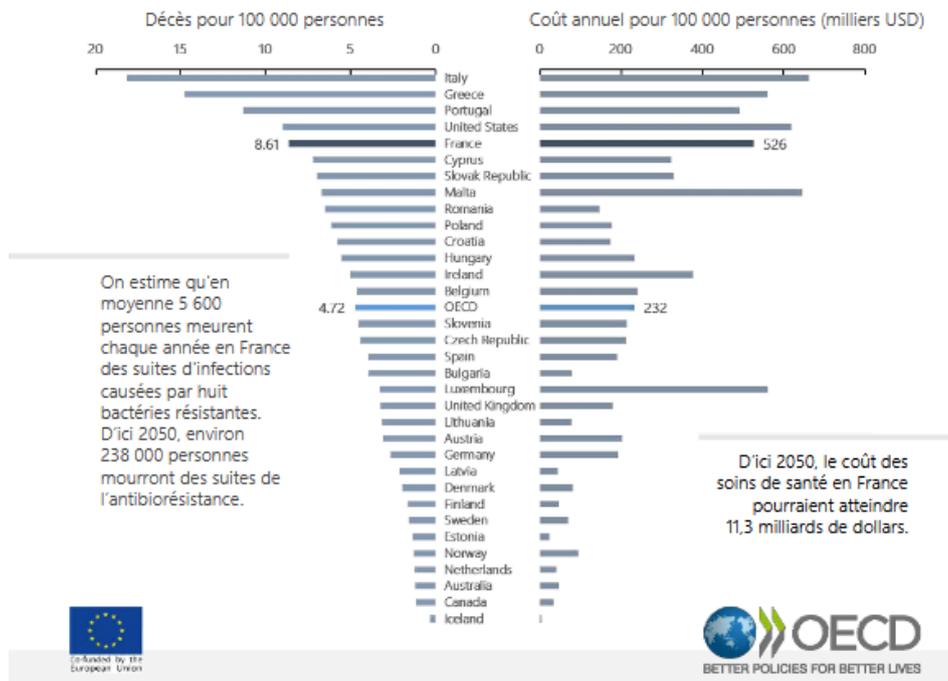


Figure 1 : Graphique de l’OCDE montrant l’incidence et l’évolution du nombre de décès et des coûts associés actuellement et en 2050 (prévision).

II. Résistance aux antibiotiques chez les bactéries

Érigés en médicaments miracles, les antibiotiques ont permis de transformer des infections graves en infections bénignes. Pendant la seconde moitié du 20^{ème} siècle, le rythme de découverte et de mise à disposition de nouvelles molécules pour l'antibiothérapie a toujours permis de passer outre cette adaptation. Mais depuis une trentaine d'années, l'adaptation des bactéries à ces nouveaux médicaments semble de plus en plus rapide. Il n'est plus rare d'être en présence de souches multi résistantes pour lesquelles il n'y a parfois plus aucune solution thérapeutique.

A. Les antibiotiques

1. La découverte des antibiotiques

En 1877, Louis Pasteur écrit « la vie empêche la vie », alors qu'une compétition bactérienne pour de l'oxygène est observé pour la première fois. En 1909, Paul Ehrlich lauréat du prix Nobel de médecine⁷, met au point le premier médicament de synthèse, un dérivé de l'arsenic pour soigner la syphilis (*Treponema pallidum*). S'en suivent diverses observations de compétition ou d'inhibition de croissance en présence d'une moisissure, notamment avec les premières hypothèses mettant en avant les possibilités thérapeutiques des moisissures par Ernerst Duschene. Il fût récompensé par le prix Nobel de médecine conjointement avec Alexander Fleming⁸ qui mit en évidence en 1928 l'action inhibitrice du champignon *Penicillium notatum* sur une culture de *Staphylococcus aureus*, découvrant la pénicilline. Ces recherches ont ouvert la voie à de nombreux chercheurs comme le chimiste Gherard Domagk qui montra le potentiel anti-streptococcique d'un colorant couplé à un sulfonamide, commercialisé en tant que Prontozil[®] qui lui valut le prix Nobel de médecine en 1939⁹.

L'industrie pharmaceutique commercialise la pénicilline en 1944 permettant de juguler les infections à Gram positif, ainsi que la syphilis. Ce n'est que 10 ans plus tard que E. P. Abraham et G. G. F. Newton isolent une molécule dont l'activité est plus étendue que celle de la pénicilline : la céphalosporine C¹⁰. À partir de ces recherches, de nombreux antibiotiques semi-synthétiques furent développés avec l'ajout de groupements chimiques sur le cycle bêta-lactame, permettant de maintenir une action thérapeutique sur les bactéries devenues

résistantes aux premiers antibiotiques. L'apparition d'antibiotiques à spectre large comme la streptomycine ou le chloramphénicol a permis de traiter des formes multi résistantes de la tuberculose. S'en suit l'apparition de nouvelles familles d'antibiotiques, comme les quinolones ou les céphalosporines de deuxième et troisième génération (CG2, CG3). Cependant, le rythme de développement a subi un ralentissement notable au cours des 30 dernières années.

2. Mode d'action des antibiotiques

Depuis la découverte de la pénicilline, plus de 6000 substances antibiotiques ont été découvertes. Elles restent cependant majoritairement toxiques pour l'homme, ce qui ne laisse qu'une centaine de molécules utilisables à des fins thérapeutiques ¹¹. La figure 2 illustre les différents modes d'action et les différentes cibles des molécules d'antibiotiques. L'objectif principal est d'inhiber des fonctions essentielles à la croissance bactérienne.

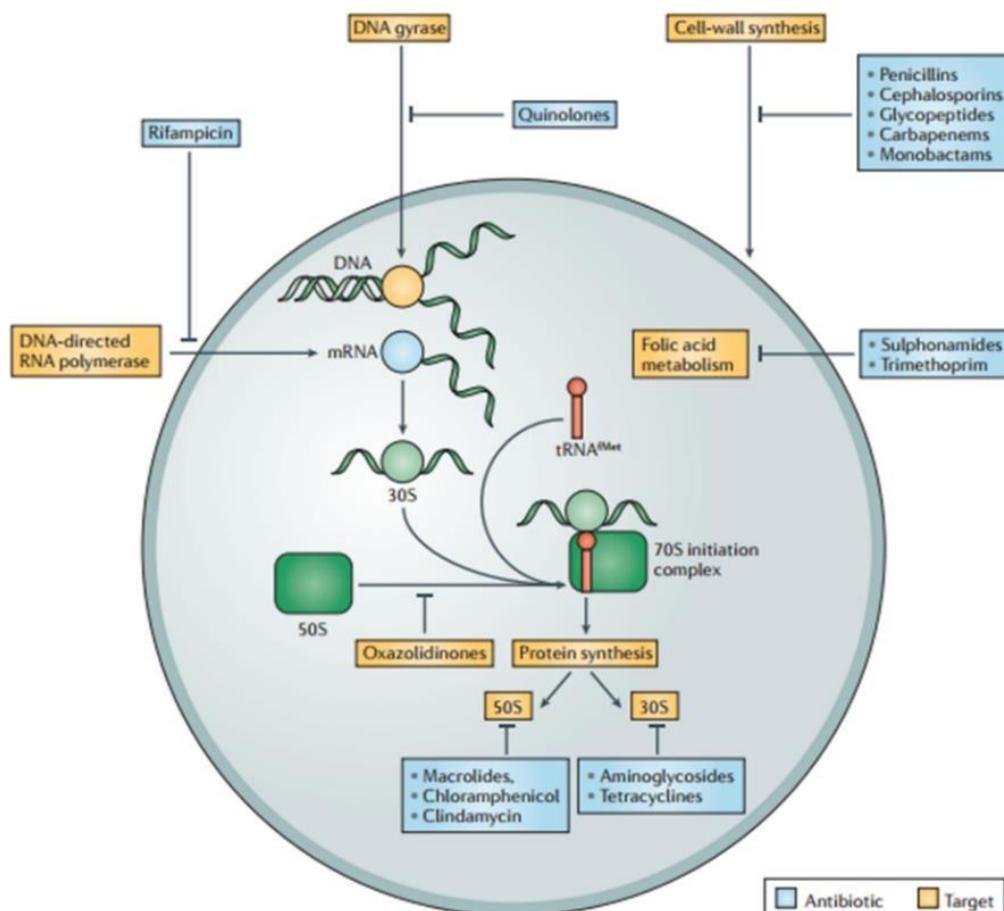


Figure 2 : Cibles thérapeutiques des antibiotiques. Les différentes classes d'antibiotiques sont représentées en bleu et les cibles sont en jaune. Avec par exemple les pénicillines comprenant les β lactamines, et céphalosporines agissant contre la synthèse de la paroi bactérienne. D'après : Lewis K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. Nat Rev Drug Discov 12:371–387

La grande majorité des antibiotiques utilisés a pour action une inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. C'est pourquoi l'OMS, dans son rapport, se focalise sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques de type : pénicillines, céphalosporines, glycopeptides, carbapénèmes et monobactames. Ces résistances représentent les cibles principales à suivre dans le contexte de la multi résistance pour plus de 90% des cas. Il existe d'autres classes d'antibiotiques avec des modes d'action et des cibles différentes. Ils peuvent agir directement sur la réplication des gènes (quinolones), l'expression des gènes (rifampicine) ou bien la biosynthèse des protéines (oxazolidinones, macrolides) en inhibant le complexe d'initiation de la traduction ou bien la synthèse des sous-unités ribosomiques 50S et 30S ¹².

3. Structure et synthèse de l'enveloppe bactérienne

La cible des familles d'antibiotiques principaux est la synthèse de la paroi bactérienne. Cette paroi provient des pressions de sélections environnementales qui ont conduit les cellules bactériennes à ériger des barrières physiques supplémentaires à une simple membrane. Le bactériologiste danois Hans Christian Joachim Gram a mis au point, en 1984, une méthode de coloration¹³ des bactéries spécifique de l'enveloppe bactérienne, appelée coloration de Gram (ou colorant de Gram), qui permet l'identification et la classification de deux grandes familles de bactéries : les bactéries à Gram positif (Gram+) et les bactéries à Gram négatif (Gram-) (Figure 3).

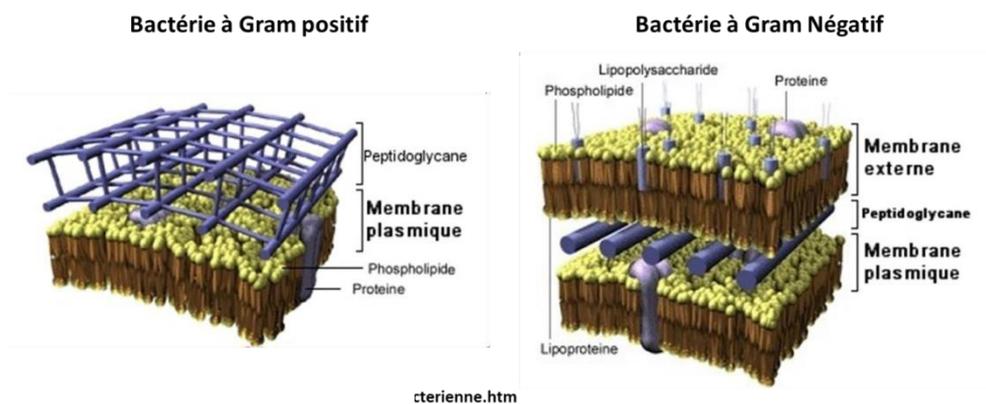


Figure 3 : Schéma de la paroi bactérienne pour les Gram + à gauche et les Gram - à droite. Pour les Gram+, présence d'une membrane de phospholipide et d'une épaisse couche de peptidoglycane laissant un espace périplasmique. Chez les Gram- on note la présence d'une double membrane avec une fine couche de peptidoglycane. D'après : http://stl_bjb.ac-dijon.fr/microbio/mparoibacterienne.html

L'enveloppe bactérienne permet de structurer la bactérie ainsi que de protéger le cytoplasme. La composition de cette enveloppe différencie les bactéries à Gram+ des bactéries à Gram-.

Les deux types d'enveloppe bactérienne sont constitués d'une membrane plasmique interne à laquelle est associée une paroi cellulaire. Dans le cas des bactéries à Gram-, cette dernière est constituée de quelques couches de peptidoglycane puis d'une membrane externe. A l'inverse, la paroi cellulaire des bactéries à Gram+ est constituée uniquement d'une épaisse couche de peptidoglycane formant une structure homogène et rigide restant cependant perméable aux petites molécules. Dans le cas des bactéries à Gram-, la membrane externe supplémentaire renforce le caractère imperméable et résistant de la cellule à de nombreuses drogues et antibiotiques.

Le peptidoglycane est essentiel pour la viabilité de la cellule bactérienne. Sa structure (Figure 4) comporte une partie glucidique (polysaccharide) et une partie peptidique. Le polysaccharide est composé d'un enchainement d'unités de N-acétylglucosamine (NAG)(turquoise) et d'acide N-acétylmuramique (NAM)(vert). La macrostructure est formée par la liaison de deux chaînes de polysaccharides par des ponts peptidiques situés au niveau des NAM. La composition exacte des chaînes peptidiques peut varier, cependant les deux alanines (rouge) distales sont généralement des D-ala. De plus, ces chaînes sont elles aussi liées à des chaînes de 5 glycines (jaune) utilisées pour la réticulation (*cross-linking*).

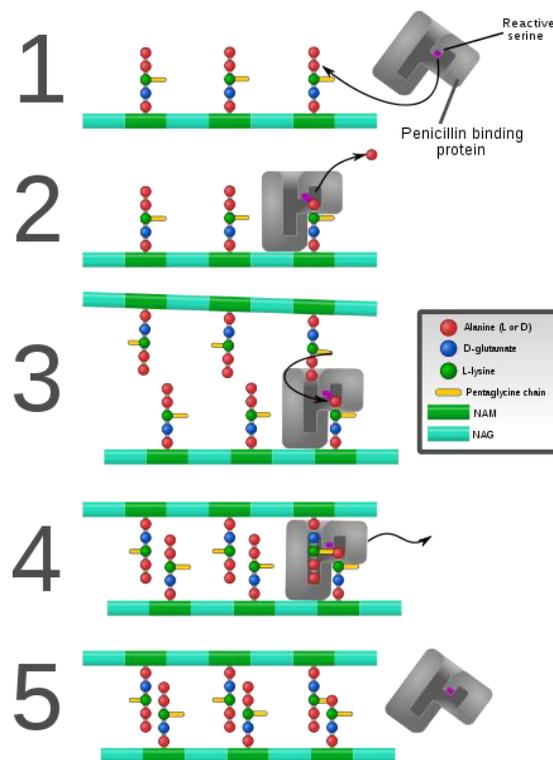


Figure 4 : Schéma de la synthèse et de la réticulation du peptidoglycane en 5 étapes. D'après Michael T. Madigan et John M. Martinko, Brock. Biology of Microorganisms, Pearson, 2012, ISBN 978-8871927756.

Lors de la synthèse du peptidoglycane, la PBP (Penicillin Binding Protein) crée une liaison avec la chaîne latérale peptidique au niveau de la seconde D-ala éliminant ainsi la première (étape 2). L'étape suivante est la liaison avec une seconde chaîne de polysaccharide. L'extrémité libre de l'une des chaînes de pentaglycine se lie avec l'alanine terminale de l'autre chaîne (étape 3) ce qui libère la PBP (étape 4 et 5).

Les antibiotiques comme les pénicillines, céphalosporines, glycopeptides, carbapénèmes vont directement agir sur la synthèse du peptidoglycane par leurs analogies structurales avec la D-ala - D-ala. La Figure 5 illustre la différence entre un cas où l'enzyme PBP est sensible à un antibiotique et un second cas où elle est résistante.

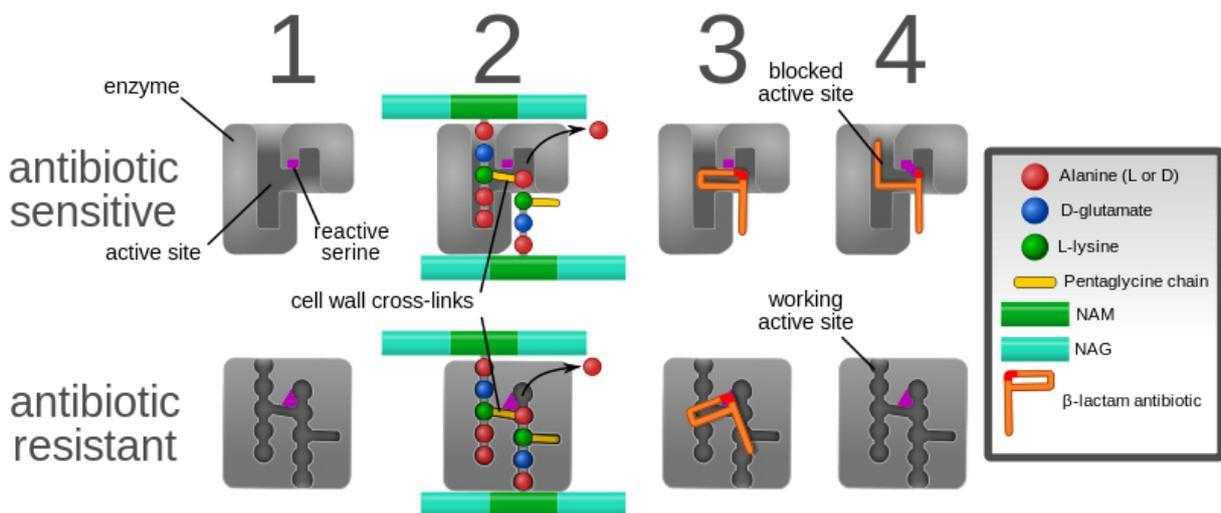


Figure 5 : Illustration des différences entre une PBP sensible et résistante. D'après Michael T. Madigan et John M. Martinko, Brock. Biology of Microorganisms, Pearson, 2012, ISBN 978-8871927756.

Les deux enzymes sont structurellement similaires, mais différent par le type de molécule pouvant réagir avec leur site actif respectif (1). Les enzymes exercent toutes les deux leurs fonctions, dans ce cas la réticulation des chaînes de polysaccharides qui est crucial pour la survie et la réplication de la bactérie (2). Cependant, en présence d'un antibiotique, celui-ci pourra réagir avec le site actif de l'enzyme sensible, ce qui sera impossible pour l'enzyme résistante. Une fois lié au site actif, le cycle bêta-lactame s'ouvre, ce qui inactive de façon permanente l'enzyme. En revanche, l'enzyme résistante continue à jouer son rôle sans être affectée. Il est possible au sein d'une même bactérie de retrouver plusieurs PBP, comme chez certaine souche de *S. aureus* où la présence du gène MecA conduit à l'expression de la PBP2a, rendant la bactérie insensible à la méticilline et à l'ensemble des bêta-lactamases.

4. Quelques grandes familles d'antibiotiques

Les **bêta-lactamines** (β lactamines) sont considérées comme une famille d'antibiotiques à large spectre de faible toxicité. De plus, la production de ces molécules est facilement réalisable à moindres coûts.¹⁴ Toutes ces caractéristiques en font la famille d'antibiotiques la plus utilisée en antibiothérapie^{15,16}.

Le cycle β -lactame (Figure 6), est la structure de base de toutes les molécules de cette famille et conditionne l'activité antibiotique spécifique. Cependant, l'environnement électronique du cycle est instable, le rendant sensible aux bêta lactamases¹⁷ qui entraînent une dégradation et une perte d'activité de l'antibiotique.

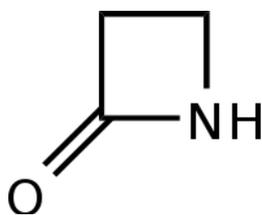


Figure 6 : Structure du cycle β -lactame

On distingue 4 sous-familles aux β lactamines : les pénicillines, les carbapénèmes, les céphalosporines et les monobactames (Figure 7). Les différences entre ces sous-familles proviennent des chaînes latérales et des différents cycles associés au noyau, induisant des spectres d'activité spécifiques.

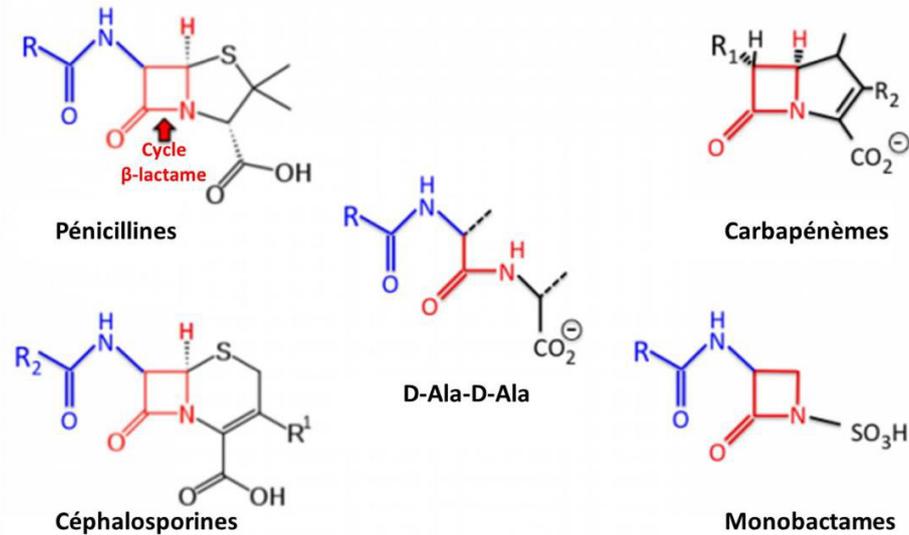


Figure 7 : Structures des différentes classes de β lactamines et du dipeptide D-Ala-D-Ala. On retrouve la présence du cycle β -lactame caractéristique, avec différents groupements secondaires procurant une activité antibiotique spécifique. Adapté de Tulane University, School of medicine.

Les pénicillines sont les premiers antibiotiques qui ont été synthétisés de manière industrielle¹⁸. Leurs structures caractéristiques proviennent de l'association d'un cycle thiazolidine au cycle β -lactame.

Les céphalosporines quant à elles se différencient par la présence d'un cycle dihydrothiazine et ont été découvertes à partir du champignon *Cephalosporium acremonium*.

Pour cette classe d'antibiotiques, on parle d'antibiotiques de dernière génération, qui marque l'apparition de nouvelles molécules avec de nouvelles propriétés, afin de s'adapter aux apparitions de résistances chez les bactéries. Ce sont des antibiotiques utilisés essentiellement dans la cadre des infections nosocomiales, si possible en dernier recours. A l'heure actuelle, les céphalosporines utilisées sont dites de 4^{ème} génération, avec des résistances observées pour les céphalosporines de 2^{ème} et 3^{ème} génération.

Les carbapénèmes sont les β lactamines avec un spectre d'activité très large couvrant les Gram positifs et négatifs. Elles permettent un traitement efficace contre les bactéries produisant des pénicillinases et céphalosporinases (chromosomiques ou plasmidiques) ainsi que des β lactamases à spectre étendu (BLSE). Elles sont donc une solution efficace contre les bactéries dites « résistantes ». Il y a encore quelques années, ces antibiotiques de dernier recours étaient exclusivement prescrits et utilisés en milieu hospitalier pour des infections

nosocomiales graves. Cependant, l'évolution de la résistance et l'arrivée massive des entérobactéries produisant des BLSE (SHV, TEM, CTX-M et Oxa) et des carbapénèmases (KPC, VIM, IMP, NDM et OXA 48) entraînent une forte augmentation de leur utilisation. Ces familles seront détaillées plus amplement dans une partie dédiée aux bêta-lactamases (page : 17). Cette utilisation massive engendre par la même occasion l'apparition de nouvelles souches cliniques résistantes aux carbapénèmes dans toutes les régions du globe^{19,20}.

B. Historique : Évolution de la résistance

Depuis la découverte des antibiotiques, de nombreuses résistances sont apparues. De plus, la pression de sélection induite permet la prolifération et la dissémination de ces bactéries résistantes (Figure 8), qui sont majoritairement découvertes en premier lieu en milieu hospitalier, puis dans la population, chez les animaux d'élevage et dans l'environnement. Par ailleurs, les phénomènes de résistance étaient déjà présents chez les bactéries, par exemple avec les sulfamides, repérées dès les années 30 avant même l'utilisation massive des antibiotiques.²¹

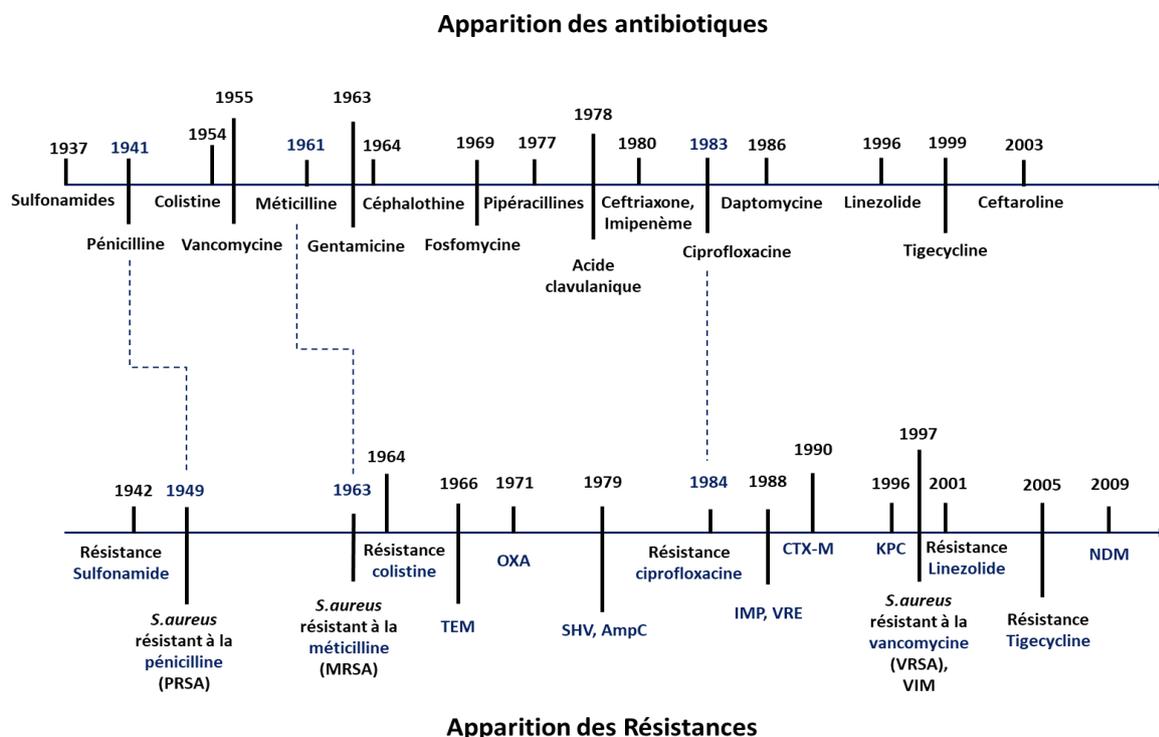


Figure 8 : Relation entre l'introduction d'un antibiotique et l'apparition des résistances associées.²² L'apparition des résistances est concomitante avec l'utilisation de l'antibiotique. D'après Iredell et al. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. 2017, The British Medical journal

La Figure 8 met en évidence la rapidité avec laquelle les résistances aux antibiotiques apparaissent dès que les antibiotiques sont produits et utilisés industriellement. Il n'aura fallu que 2 ans après la commercialisation de la pénicilline pour observer l'apparition des premières souches MRSA. Cette adaptation s'accélère avec l'apparition de résistances moins d'un an après la mise sur le marché, par exemple avec la ciprofloxacine.

La résistance aux antibiotiques peut avoir deux origines : intrinsèque et acquise. La première est directement reliée aux caractéristiques génétiques de l'espèce bactérienne et la seconde est un phénomène fréquent, fortement favorisé par la plasticité du génome bactérien qui se transmet horizontalement entre les souches d'une même espèce et inter-espèce.

Ces deux origines renseignent sur la présence ou non de mécanismes de résistance aux antibiotiques. La **résistance intrinsèque** représente une caractéristique génomique globale associée aux différentes espèces bactériennes. Celle-ci ne provient pas des différentes pressions sélectives ou des transferts horizontaux de gènes²³, mais est directement reliée au génome de l'espèce. Cela représente une part importante des différences au sein des espèces. Par exemple, les deux grandes familles (Gram+ et Gram-) de bactéries sont fortement différenciées par leurs résistances intrinsèques. En effet, les bactéries Gram- vont être caractérisées par de multiples résistances, dues à la présence de la membrane externe qui va rendre les bactéries imperméables à certaines molécules, mais aussi grâce à la présence de pompes d'efflux qui limite une surconcentration de ces molécules au sein de la bactérie^{24,25}, caractéristique moins représentée chez les Gram+. L'identification de la bactérie permettra d'obtenir directement les résistances intrinsèques à celle-ci.

La résistance acquise : plasticité du génome. En réponse à une pression sélective, les bactéries peuvent développer des mécanismes d'adaptation et acquérir de nouvelles résistances qui complètent les résistances innées. Les mutations, l'acquisition d'ADN libre (transformation)²⁶, par le biais d'un phage (transduction), ou encore l'échange d'information génétique entre différentes espèces bactériennes (plasmide)²⁷, sont les mécanismes principalement retrouvés.

Cette résistance acquise permet une combinatoire très importante des différents mécanismes de résistances aux antibiotiques. Elle doit être caractérisée pour chaque souche afin d'obtenir

l'ensemble de l'information sur la résistance de la bactérie. Par conséquent, un grand nombre d'antibiotiques est testé systématiquement afin d'évaluer la sensibilité de la bactérie.

C. Notions de CMI, résistance et sensibilité aux antibiotiques

Afin d'évaluer la résistance et la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique, la principale approche est de déterminer sa **concentration minimale inhibitrice** (CMI). Cela correspond à la concentration la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne n'est plus observable. La valeur de la CMI est donc dépendante du couple antibiotique / souche bactérienne et rend compte du degré de résistance ou de sensibilité envers l'antibiotique. Pour chaque souche, des référentiels de microbiologie sont utilisés, définissant ainsi la CMI (comité de l'antibiogramme de la Société Française de microbiologie).

Ces référentiels ont pour rôle de définir une concentration critique basse (c) qui correspond à la posologie d'usage et une concentration critique haute (C) pour la posologie maximale tolérée. On peut alors comparer ces valeurs de référence à la CMI obtenue afin de pouvoir classer la souche selon 3 catégories cliniques, et ainsi prédire l'issue thérapeutique du traitement (Figure 9).

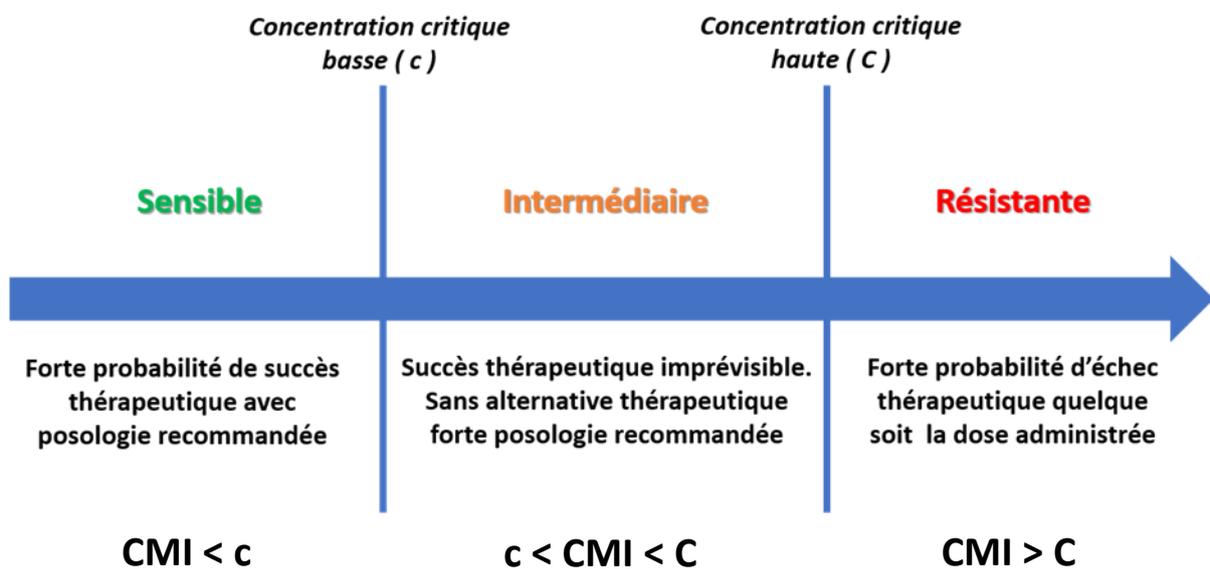


Figure 9 : Classification clinique des souches en fonction de leur CMI. Si la CMI est inférieure à la concentration critique basse (c) alors la souche est sensible et le traitement possède une forte probabilité de succès. A contrario, si la CMI est supérieure à la concentration critique haute (C) alors la souche sera dite résistante. D'après la Lettre d'information n°33, Laboratoire Biosphère.

D. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

La notion de résistance ou de sensibilité provient de l'accumulation de mécanismes permettant à la bactérie de se défendre contre les divers modes d'action des antibiotiques²⁸ (Figure 10).

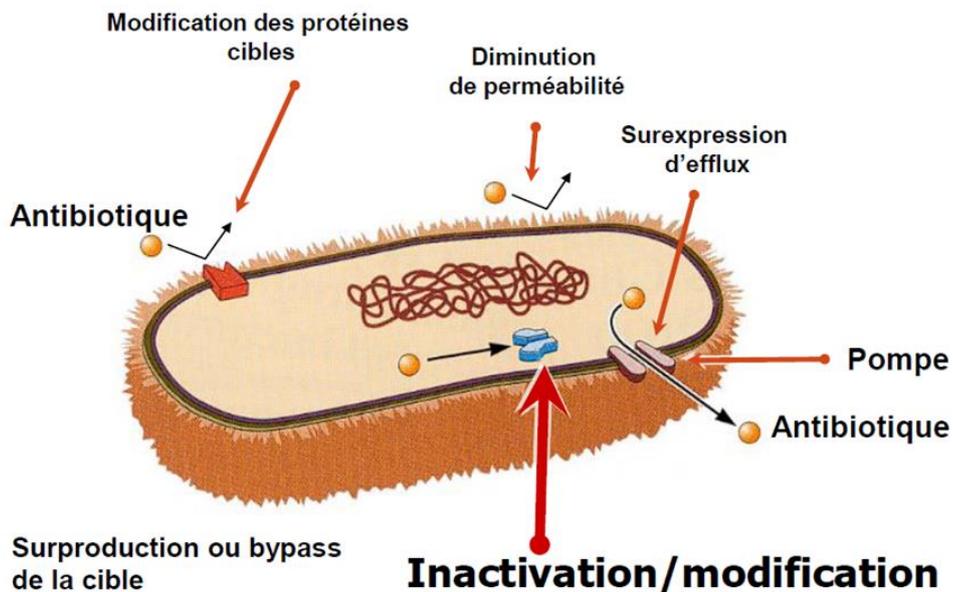


Figure 10 : Schéma des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques. L'antibiotique (représenté par la boule orange) est mis en situation avec ces divers mécanismes. On retrouve la modification de sa cible, son impossibilité de pénétrer la cellule (sous expression des porines associées) ou bien son évacuation massive via une surexpression des pompes d'efflux. Mais aussi sa modification par le biais d'enzymes (Ex: β -lactamase). Adapté de Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010.

Imperméabilité de la membrane aux antibiotiques : Majoritairement, la cible thérapeutique des antibiotiques est intracellulaire. Des mécanismes pour bloquer cette diffusion sont mis en place, majoritairement chez les Gram -, où les β lactamines nécessitent la présence de porines pour pouvoir inhiber la synthèse de la paroi bactérienne²⁹. Plusieurs mécanismes sont observés, comme un changement dans le type de porines exprimées, un changement dans le niveau d'expression (sous expression), ou encore une mutation de ces porines (*Mycobacterium tuberculosis*), qui entrainera dans chaque cas une inefficacité de l'antibiotique.

L'efflux des molécules d'antibiotique : Naturellement les pompes à efflux permettent d'expulser les déchets métaboliques de la cellule bactérienne ou de limiter l'accumulation de molécules létales comme les antibiotiques. Ces pompes peuvent être spécifiques ou non à

certaines familles d'antibiotiques (multi résistantes).³⁰ Dans certains cas, la surexpression des pompes permet l'obtention d'un caractère résistant ou multi résistant à la bactérie³¹.

La modification de la cible thérapeutique : Chaque famille d'antibiotiques agit spécifiquement sur des cibles. L'antibiotique se retrouve donc inefficace s'il ne peut atteindre sa cible, si elle est protégée ou encore si sa cible est suffisamment modifiée pour engendrer une perte d'affinité.

Dans la plupart des cas, c'est une modification de la cible, comme par exemple une méthylation du ribosome procurant une résistance aux macrolides³², mais l'on peut avoir le cas d'une protéine qui se fixe sur le ribosome, changeant sa conformation et empêchant ainsi l'action de l'antibiotique³³.

La modification des molécules d'antibiotiques : Généralement par le biais de sécrétion d'enzymes qui vont directement agir sur la molécule d'antibiotique en la modifiant chimiquement. Différents mécanismes de dégradation de l'antibiotique peuvent être observés, très présents dans la famille des entérobactéries avec l'expression de β lactamases ou de carbapénèmases³⁴. Ces mécanismes de résistance sont les plus prévalents et sont particulièrement ciblés par l'OMS.

Cas particulier de la PBP2a : Les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) sont porteurs du gène MecA codant la PBP2a. Cette PBP particulière est totalement insensible à l'action des bêta-lactamine. De plus, MecA est porté par un élément chromosomique qui contient également d'autres gènes de résistances aux métaux lourds et à d'autres antibiotiques, ceci expliquant le profil de multi résistance des SARM³⁵.

E. La résistance à la classe des bêtalactamines

L'utilisation fréquente des antibiotiques de type bêta-lactamines a engendré une sélection des souches multi-résistantes produisant des enzymes de type bêta-lactamases^{36,37}. Ces enzymes se sont multipliées et modifiées au cours du temps afin de s'adapter aux nouvelles molécules mises sur le marché³⁸.

Les principales bêta-lactamases rencontrées sont présentées dans la Figure 11 et décrites succinctement dans les paragraphes suivants^{39,40}.

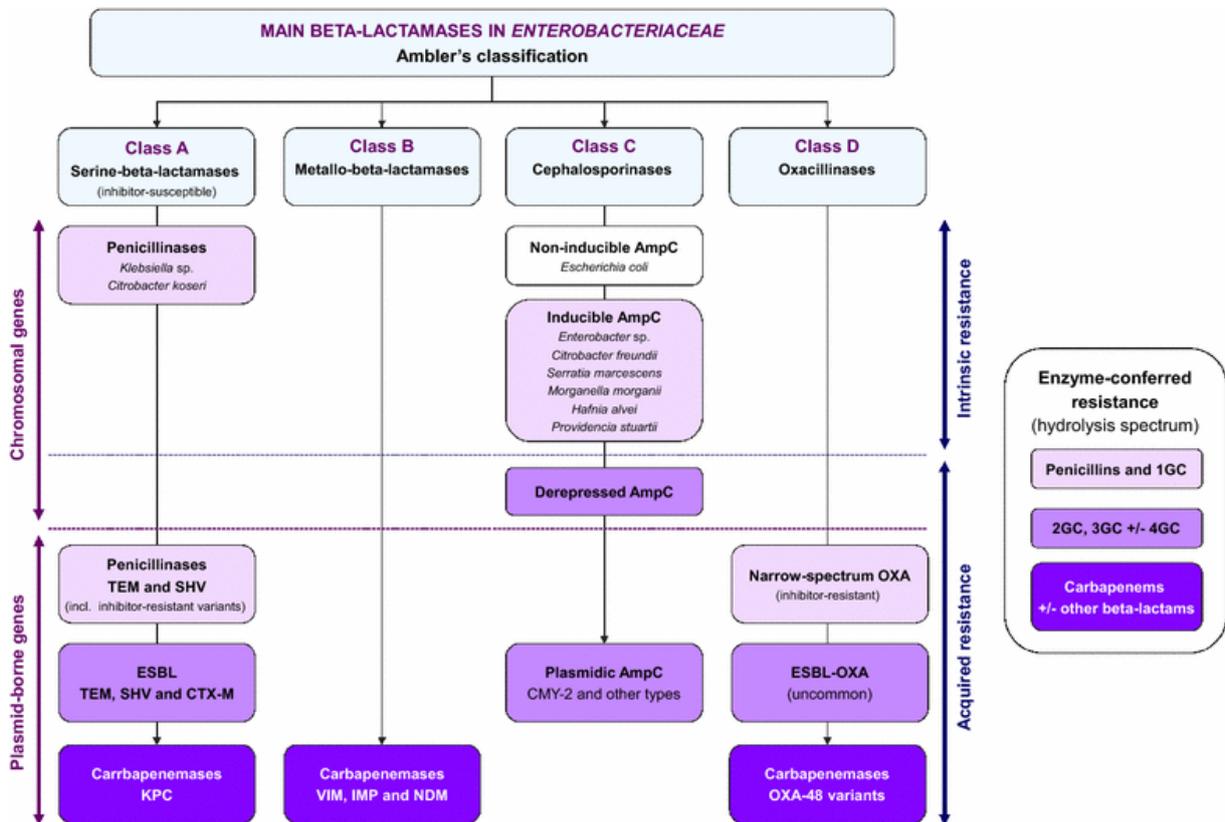


Figure 11 : Les β -lactamases chez les Entérobactéries séparées en 4 classes (A,B,C,D) selon Amber avec la discrimination entre intrinsèque et acquise. On retrouve les mécanismes de résistance prioritaires qui sont les carbapénèmases (KPC, VIMP, IMP, NDM et Oxa-48) ainsi que les ESBL (TEM, SHV et CTX-M) et AmpC. D'après Ruppé et al. 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. Ann Intensive Care 5.

Les bêta-lactamases à sérine sont des enzymes ayant pour mode d'action l'hydrolyse du cycle lactame entraînant la perte d'activité de l'antibiotique⁴¹. Parmi de nombreuses souches de *E. coli* ou *K. pneumoniae* responsables d'infections nosocomiales graves, les enzymes de type SHV et TEM sont fréquemment retrouvées⁴¹. Rapidement, la prévalence de souches exprimant ces enzymes a augmenté considérablement, forçant l'utilisation de nouvelles

générations de céphalosporines. En réponse, on retrouve un élargissement du spectre de SHV et TEM ainsi que l'apparition de la famille des CTX-M^{42,43}. Les CTX-M sont une grande famille de bêta-lactamases comportant plusieurs groupes issus de nombreux mutants ce qui rend son identification parfois complexe⁴⁴.

Les gènes responsables de cette famille de résistances sont majoritairement plasmidiques⁴⁵ et souvent associés à d'autres types de résistances. C'est cette association qui a conduit à leur dissémination à l'échelle mondiale⁴⁶. Les CTX-M ont un impact clinique notable, avec un fort taux de mortalité en cas de septicémie⁴⁷⁻⁵⁰, et sont souvent retrouvés chez *K. pneumoniae* et *E. coli*. Afin de soigner ces cas graves, des antibiothérapies sont mises en place *via* l'utilisation de carbapénèmes, qui ont de bons taux de réussite thérapeutiques⁵¹. Le variant avec la plus grande prévalence de la famille est CTXM-15. Il confère de nouvelles résistances⁵² (β-lactamases à spectre étendu) ainsi qu'une résistance ou perte de sensibilité aux carbapénèmes chez *K. pneumoniae*⁵³.

Les carbapénémases à sérine : KPC est l'enzyme avec la prévalence la plus importante et qui a le plus d'impact en Europe actuellement. Elle permet d'être résistant à l'ensemble des carbapénèmes, aux céphalosporines de 3^{ém} génération (C3G) ainsi qu'aux inhibiteurs de bêta-lactamases⁵³⁻⁵⁶.

La propagation de ces mécanismes de résistance est parfaitement représentée par l'évolution des souches KPC en Europe (Figure 12). En moins de 12 ans, une colonisation totale des pays d'Europe par des souches KPC⁵⁷ est observée, ce qui fait de l'enzyme un fort challenge thérapeutique, alors que sa présence entraîne un taux de mortalité important dans les infections nosocomiales⁵⁸⁻⁶⁰.

Les métallo-bêta-lactamases : cette famille regroupe principalement VIM, NDM et IMP⁶¹. Ces enzymes utilisent un cofacteur métallique, principalement du zinc²⁸, et possède une activité sur les carbapénèmes, les céphalosporines et les pénicillines⁶².

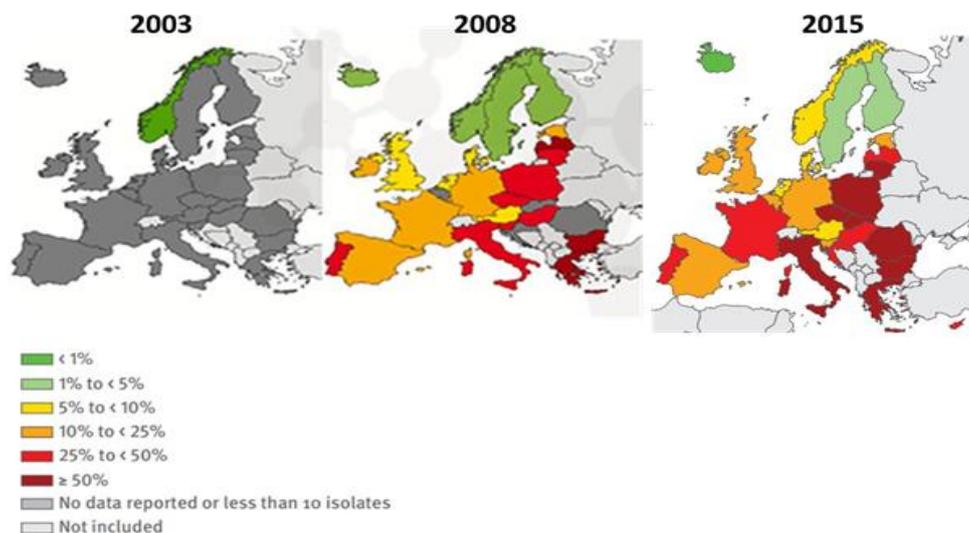


Figure 12 : Incidence de *K. pneumoniae* résistante aux C3G (en % des *K. Pneumoniae* total) dans les bactériémies entre 2003 et 2015. On remarque une évolution très rapide et une prolifération de la souche résistante en Europe jusqu'à atteindre dans certains pays plus de 50 %. D'après European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenemase-producing bacteria in Europe: interim results from the European Survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) project. Stockholm: ECDC; 2013.

Les bêta-lactamases de classe C : connues sous le nom AmpC, ce sont des céphalosporines à large spectre⁶³. Initialement, elles étaient décrites comme une résistance chromosomique, avec une expression induite, en présence d'antibiotique de type β -lactamines⁶⁴. Cependant, elles sont de plus en plus retrouvées sur des plasmides chez la famille des *Klebsiella* ou *E. coli*^{65,66}. Le traitement concernant les bactéries présentant ces résistances est de plus en plus compliqué, et une infection nosocomiale conduisant à un sepsis induit un taux de mortalité de plus de 25 %⁶⁷.

Les bêta-lactamases de classe D représentent la dernière classe de résistances. Leur capacité à hydrolyser l'oxacilline leur a octroyé l'appellation d'OXA⁶⁸. Ces enzymes sont retrouvées principalement chez une bactérie du groupe ESKAPE : *Acinetobacter baumannii*. Il existe de nombreux variant à l'enzyme, mais le plus prévalent (en Europe) est OXA-48, présent chez les entérobactéries⁶⁸ qui possèdent une activité carbapénémase.

Les bactéries du groupe ESKAPE sont particulièrement concernées par l'évolution rapide de ce type de résistances. Certaines souches de ces bactéries possèdent des résistances à un grand nombre d'antibiotiques comprenant notamment les carbapénèmes et les céphalosporines de troisième génération, qui sont à l'heure actuelle les meilleures molécules pour traiter les bactéries multi résistantes⁶⁹.

III. *S. aureus* - un cas de virulence complexe

Staphylococcus aureus est un pathogène opportuniste responsable de maladies nosocomiales et d'infections communautaires à forte morbidité et mortalité ⁷⁰, engendrant des milliards de dollars de coûts associés chaque année aux États-Unis ⁷¹. Cette bactérie Gram+ est capable de contourner toutes les défenses de l'hôte grâce à un large spectre de facteurs de virulence⁷² et un éventail de résistances aux antibiotiques ⁷³. Même si *S. aureus* fait partie de la flore microbienne de l'Homme, il est capable de coloniser l'ensemble des tissus⁷⁴. En terme d'incidence, les infections à *S. aureus* touchent préférentiellement les tissus cardiaques (11%) avant les tissus pulmonaires (8%) ⁷⁵.

Les facteurs impliqués dans la virulence des souches de *S. aureus*, peuvent être rangés en plusieurs catégories. On retrouve les protéines de surfaces, les protéines sécrétées ainsi que celles situées au niveau de la membrane.

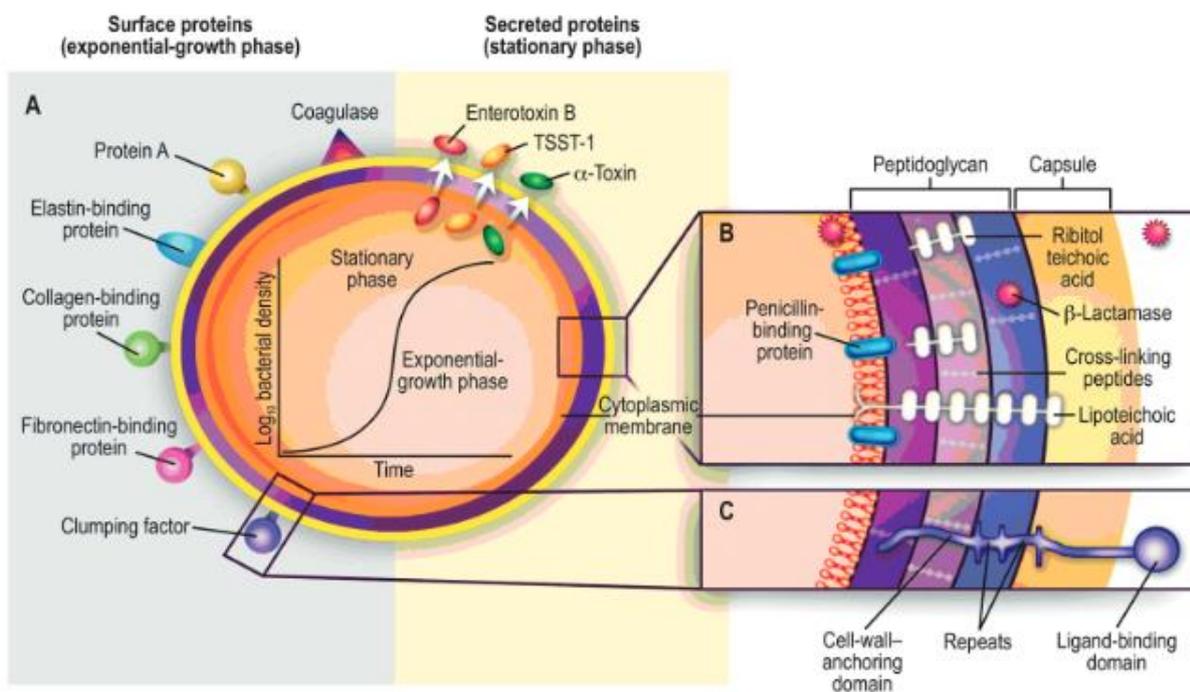


Figure 13 : Pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* avec les produits structuraux et sécrétés jouant un rôle de facteur de virulence. En A (gris) des exemples de produits structuraux avec la protéine A et des adhésines, et en jaune des produits sécrétés avec l'alpha toxine et le super antigène TSST. En B et C on retrouve des exemples de protéines transmembranaires avec la présence des protéines associées à la résistance aux antibiotiques, bêta-lactamase et la protéine de liaison à la pénicilline issue de MecA. Figure de Massachusetts Medical Society. Copyright 1998 Massachusetts Medical Society/ Tous droits réservés

De nombreuses revues générales^{76,77} recensent les différents facteurs de virulence avérés et supposés de *S. aureus*, ce qui permet de créer des listes reflétant cette diversité d'acteurs de la virulence. Les tableaux suivants exposent un aperçu de la diversité des acteurs de la virulence tiré de la revue général de Zecconi, A., & Scali, F. (2013).

Name it	Abbreviation	Function
β toxin	Hlb	Sphingomyelinase with cytolytic activity
α toxin	Hla	Cytolytic pore-forming toxin
Leukocidins D, E and M	LukD/E/M	Kill leukocytes; bi-component pore-forming leukotoxins
PSM peptides	PSMs	Pore-forming toxins or detergent activity
Exfoliative toxins A, B and D	ETA/B/D	Exotoxins with superantigen activity; gluamate-specific serine proteases that digest desmoglein 1
Enterotoxins	SEs	Gastroenteric toxicity; immunomodulation via superantigen activity
SE-like proteins	SEIs	Unknown/No gastroenteric toxicity; immunomodulation via superantigen activity
Toxic shock syndrome toxin-1	TSST1	Endothelial toxicity (direct and cytokine-mediated); superantigen activity
Formylpeptides	fMLPs	Ligands for formyl peptide receptor

Name	Abbreviation	Function
Fibronectin binding proteins A, B	FnBPA,B	Adhesins for fibrinogen (FnBPA only), fibronectin and elastin
Collagen-binding adhesin	Cna	Adhesin for collagen (type I and IV)
Serin-aspartate repeat proteins C, D and E	Sdrs	Adhesins
Bone sialoprotein-binding protein	Bbp	Adhesin for bone sialoprotein (SdrE allelic variant), binds fibrinogen
Elastin-binding protein	EbpS	Transmembrane adhesin for elastin and tropoelastin
Polysaccharide intercellular adhesin	PIA	Adhesin for aggregation; involved in biofilm formation
Iron-regulated surface determinant A	IsdA	Binds fibronectin, fibrinogen, transferrin, hemoglobin, hemin and fetuin (expressed in iron-restricted environments)
Iron-regulated surface determinant B	IsdB	Binds hemoglobin and hemin
Iron-regulated surface determinant C	IsdC	Binds hemin
Iron-regulated surface determinant H	IsdH	Binds haptoglobin and haptoglobin-hemoglobin complex
<i>S. aureus</i> surface proteins	Sass	Bind to the extracellular matrix
<i>S. aureus</i> surface protein G	SasG	Binds to the extracellular matrix; involved in biofilm formation
Serine-rich surface protein	SraP	Binds platelets
Extracellular matrix protein-binding protein	Emp	Binds extracellular matrix of host cells; involved in biofilm formation
Extracellular adherence protein	Eap/Map	Impairs angiogenesis and wound healing; stimulates production of TNFα and IL-6
Emp homologue	Ebh	Binds extracellular matrix of host cells
Plasmin-sensitive protein	Pls	Binds lipids of host cells; adhesion to nasal epithelial cells
Second immunoglobulin-binding protein	Sbi	Binds Fc domain of immunoglobulin; binds complement protein C3 and promotes C3-C3b conversion
Von Willebrand factor binding protein	vWbp	Binds and activates prothrombin; binds fibrinogen and vW factor
Extracellular adherence protein	Eap/Map	MHC-II analog protein; adhesion to <i>S. aureus</i> cells and host cells; involved in biofilm formation

Name	Abbreviation	Function
Coagulase	Coa	Binds and activates prothrombin; promotes conversion of fibrinogen to fibrin
V8 protease	-	Serine protease
Glycerol ester hydrolases	lip, geh, beh,	Triacylglycerols degradation
Fatty acid-modifying enzyme	FAME	Fatty acids modification
O-acetyltransferase	OatA	Peptidoglycan O-acetylation
PtdIns-phospholipase C	Plc	Phosphatidylinositol-specific lipase activity
Enolase	Eno	Catalyzes phosphor-glycerate to phosphoenol-pyruvate; binds to laminin
Arginine catabolic mobile element (3 types)	ACME I/-II/-III	Unclear role (aids colonization); seems to contain several enzyme and proteins (arginine deaminase system, oligopeptide permease, zinc-containing alcohol dehydrogenase, spermine/spermidine acetyltransferase and others)
FPR-like 1 inhibitory protein	FLIPr	Binds formyl peptide receptor

Tableau 1 : 1 - Facteurs de virulences de *S. aureus* : Toxines. 2 - Facteurs de virulences de *S. aureus* : Adhésion aux cellules de l'hôte. 3 - Facteurs de virulences de *S. aureus* : Enzymes et autres protéines

Introduction générale : *S. aureus* - un cas de virulence complexe

Effector mechanism	<i>S. aureus</i> evasion factor	Abbreviation	Function
Neutrophil migration	Staphylococcal superantigen-like 5	SSL5	Specific binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 blocking PMN rolling
	Staphylococcal superantigen-like 11	SSL11	Binds to chemokine receptors Blocks C5a receptor and formyl peptide receptors Binds to the Fc region of IgA and block recognition by neutrophils
	Staphylococcal superantigen-like 1	SSL10	
	Chemotaxis inhibitory protein	CHIIPS	
	Staphylococcal superantigen-like 7	SSL7	
Neutrophils lysis	γ toxin	Hlg	Bicomponent leukocidin; hemolysis
	δ toxin	Hld	Cytolytic toxin; binds neutrophils and monocytes
	Panton-Valentine leukocidin	PVL	Bicomponent leukocidin; pore-forming toxin; kills leukocytes
	Leukocidins A and B (alt. names H and G)	LukAB/-HG	Bi-component pore-forming leukotoxin that kills PMNs
Resistance to oxidative burst	Staphyloxanthin	-	Carotenoid (protects against ROS)
	Catalase and alkylhydroxide reductase	CatA, AhpC	Inactivate hydrogen peroxide; pivotal for nasal colonization
	Thioredoxin and thioredoxin reductase	-	Inactivates ROS

Effector mechanism	<i>S. aureus</i> evasion factor	Abbreviation	Function
Complement inactivation	Capsular polysaccharides	CPSs	Alter C3 (CPS5 and 8) or C3b (CPS1) deposition Plasminogen activator (plasminogen-serine protease plasmin conversion)
	Staphylokinase	Sak	
	Staphylococcal complement inhibitor	SCIN	Inhibits convertase
	Extracellular complement-binding protein	Ecb	Inhibits convertase
	Clamp factor A	ClfA	Platelets adhesion (fibrin-mediated); binds complement regulator factor I
	<i>Staphylococcus aureus</i> surface protein E	SdrE	Binds complement regulator factor H
	Extracellular fibrinogen-binding protein	Efb	Binds fibrinogen; inhibits C3 and C5 convertases; binds complement C3

Effector mechanism	<i>S. aureus</i> evasion factor	Abbreviation	Function
Alteration of cell wall components	Antimicrobial peptide sensor	ApsS/R/X	Binds and impairs antimicrobial peptides
	Gra regulatory system	GraR/S	Impairs phagocytosis and LL-37
	Multiple peptide resistance factor F	MprF	Inserts lysine into teichoic acids
	Dlt operon	DltA/B/C/D	Inserts D-alanine into teichoic acids
Lysozyme resistance	OatA gene	OatA	Changes in N-acetylmuramic acid
Cathelicidin resistance	Staphylokinase	Sak	A-defensine binding
	Aureolysin	Aul	LL-37 clivage
	Methicillin resistance	Mec	Correlation between methicillin resistance and cathelicidin resistance, mechanism to be identified

Effector mechanism	<i>S. aureus</i> evasion factor	Abbreviation	Function
Degradation of immunoglobulins	Protein A	SpA	Binds Fc domain of immunoglobulin, von Willibrand factor and TNFR-1; Binds complement protein C3 and promotes C3-C3b conversion
	Staphylokinase	Sak	Plasminogen activator (plasminogen-serine protease plasmin conversion)
Cloaking of opsonins	Serotypes 5,8 PNAG	ClfA	Platelets adhesion (fibrin-mediated); binds complement regulator factor I Platelets adhesion (fibrin-mediated); binds cytokeratin 10.
	Clamp factor A	ClfA	
	Clamp factor B	ClfB	

Tableau 2 : Facteurs de virulences de *S. aureus* : Evasion du système immunitaire de l'hôte. (Activité des phagocyte et leucocyte).
 Facteurs de virulences de *S. aureus* : Evasion du système immunitaire de l'hôte. (Activité du complément).
 Facteurs de virulences de *S. aureus* : Evasion du système immunitaire de l'hôte. (Peptide antimicrobien)
 Facteurs de virulences de *S. aureus* : Evasion du système immunitaire de l'hôte. (Immunoglobulines)

A. Protéines de surfaces

La membrane externe de la paroi comprend des protéines qui permettent l'adhésion aux différentes cellules de l'hôte et donc sa colonisation. Un grand nombre d'adhésines⁷⁸ ainsi exprimées se retrouvent à la surface de *S.aureus* (*Partie A grise* – Figure 13). Certaines vont être spécifiques à différentes matrices, comme pour le collagène ou la fibronectine⁷⁹. En plus des adhésines, des protéines essentielles pour l'infection du sang sont présentes, comme une coagulase (CoA) et des facteurs d'agglutination (ClfA). De plus, diverses protéines sont retrouvées comme la protéine A (SPA) qui permet à la bactérie d'échapper à la réponse du système immunitaire⁸⁰. Ces différentes protéines ont toutes un rôle très spécifique pour permettre à la bactérie de survivre et de proliférer. La plupart sont exprimées dès la phase exponentielle de croissance de la bactérie.

B. Protéines sécrétées

Le staphylocoque doré possède de multiples protéines impliquées dans la destruction des cellules de l'hôte et l'attaque du système immunitaire afin de faciliter sa prolifération⁸¹. On retrouve différentes catégories de protéines sécrétées (*Partie A jaune*-Figure 13), avec principalement les toxines formant des pores (Figure 14) sur les membranes des différentes cellules cibles (*Pore-Forming Toxins*, PFT). Les PFT vont se lier à certains récepteurs situés sur la membrane. Des étapes d'oligomérisations s'enchainent, créant une structure qui s'insère dans la membrane formant ainsi un pore.

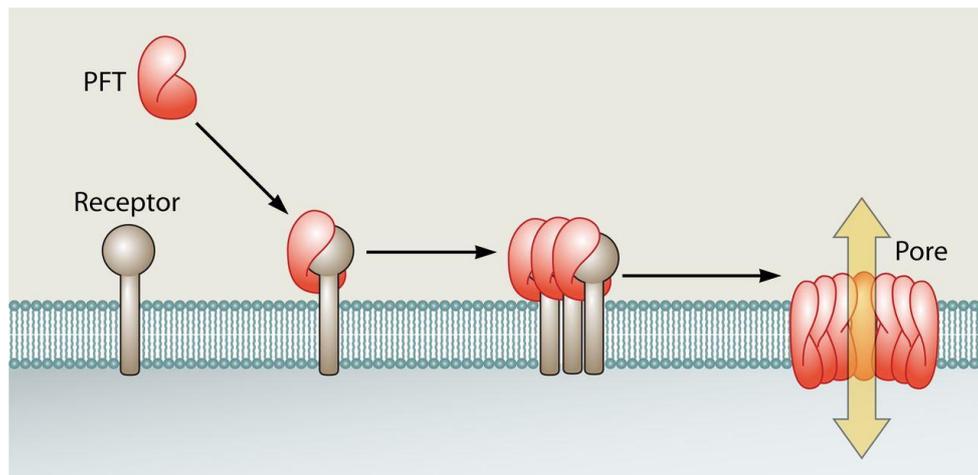


Figure 14 : Schéma du mode d'action d'une Pore-forming-toxin. La PFT se lie à un récepteur, s'en suit une oligomérisation puis d'une insertion dans la membrane et la formation d'un pore. D'après Los, Ferdinand C. O. et al "Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77.2 (2013): 173-207. Web. 11 Oct. 2020.

Il existe aussi les super antigènes comprenant la toxine TSST responsable du syndrome de choc toxique (SCT). Le SCT est une complication aiguë et potentiellement létale, causée par la pénétration de la toxine dans la circulation sanguine.

Parmi les PFT, l'alpha toxine (HLA) est un facteur de virulence fortement caractérisé⁸² et qui est très important pour le développement du pathogène⁸³ dans l'hôte. Plus récemment, plusieurs PFT suscitent un intérêt grandissant pour la compréhension de la sévérité des infections liées à *S.aureus*, notamment la Delta-hémolysine (HLD)⁸⁴, les gamma-hémolysines (HLGA/B/C)⁸⁵ et les PVL (*Panton Valentine Leukocidin*)⁸⁶.

C. Résistance aux antibiotiques

Aujourd'hui, les infections causées par des souches résistantes de *S. aureus* ont atteint des proportions épidémiques à l'échelle mondiale⁸⁷ avec une prévalence supérieure à 25% aux Etats-Unis. La problématique provient du grand nombre de mécanismes de résistance possibles dans les différentes souches, notamment avec la présence de bêta-lactamase (BLAI / BLAZ)⁸⁸. (Partie B – Figure 13). Cependant, la plus importante et problématique des résistances est induite par l'expression de la protéine PBP2a (penicillin-binding protein 2 a) *via* le gène *MecA*⁸⁹. Ce gène confère la résistance à la méticilline qui engendre de grandes difficultés en cas d'infection⁹⁰. L'expression de cette protéine entraîne une résistance à l'ensemble des antibiotiques de type bêta-lactame, céphalosporines et érythromycines⁹¹ ce

qui limite grandement les solutions thérapeutiques possibles. De plus, le gène *MecA* est associé à de nombreuses résistances, notamment pour les métaux lourds.

Bien que des progrès considérables aient été réalisés dans la compréhension du pouvoir pathogène de *S. aureus*, un grand nombre d'interrogations demeurent, notamment sur la différence de sévérité de l'infection observé entre certaines souches bactériennes, ayant pourtant des génomes similaires. Ces différences pourraient s'expliquer par des différences notables dans l'expression de ces différents facteurs de virulence. Selon Rachel J. Gordon et Franklin D. Lowy⁹², il est nécessaire d'obtenir le maximum d'information sur les facteurs de virulence pour pouvoir dans l'avenir comprendre l'ensemble des impacts et des actions de ces protéines. Selon eux, de nombreuses questions demeurent sans réponse, comme la capacité de certains clones de s'établir dans le monde entier et de persister.

IV. Diagnostic des infections bactériennes

A. Enjeux

Devant l'ampleur du phénomène de la propagation de la résistance et la difficulté dans le développement de nouvelles molécules d'antibiotiques, il est nécessaire de mettre en place de nouvelles approches pour combattre les infections bactériennes. Deux grandes stratégies sont possibles.

D'un côté, l'établissement de méthodes permettant d'accroître la compréhension des mécanismes impliqués dans la virulence. Comme il a été détaillé dans le cas de *S. aureus*, la virulence d'une souche repose sur de multiples facteurs. Il est donc important de mettre en place des méthodes les plus exhaustives possibles pour caractériser la virulence d'une souche. De plus, pour une caractérisation complète, l'établissement de profils d'expression des protéines impliquées dans la virulence pour les différentes souches serait un véritable atout. Ce genre de caractérisation permettrait l'obtention d'un diagnostic plus spécifique et donc permettrait un traitement ciblé. Ces points sont importants dans le contexte de l'administration d'un traitement adapté pour diminuer la propagation des résistances.

De l'autre côté, il est nécessaire de mettre en place dans une approche clinique des tests diagnostiques rapides. Ces tests doivent permettre d'obtenir le plus rapidement possible une information précise sur l'infection bactérienne, comme son identification (ID) (espèce, genre), ainsi que le profil de résistance aux antibiotiques et la CMI associée (qui sera défini par le terme AST dans la suite du rapport) de la souche bactérienne^{4,93}. Ce besoin de rapidité dans le diagnostic provient du fait qu'une infection bactérienne est une course contre la montre. Il est montré que dans le cas d'un choc septique (défaillance circulatoire aiguë), à chaque heure où l'administration d'une antibiothérapie ciblée et spécifique est retardée, le taux de survie du patient diminue drastiquement (Figure 15)^{94,95}. Pour la suite de l'introduction générale nous nous limiterons aux techniques d'analyse utilisées pour les infections du sang. Les tests spécifiques associés aux infections urinaires ou pulmonaires ne seront donc pas présentés.

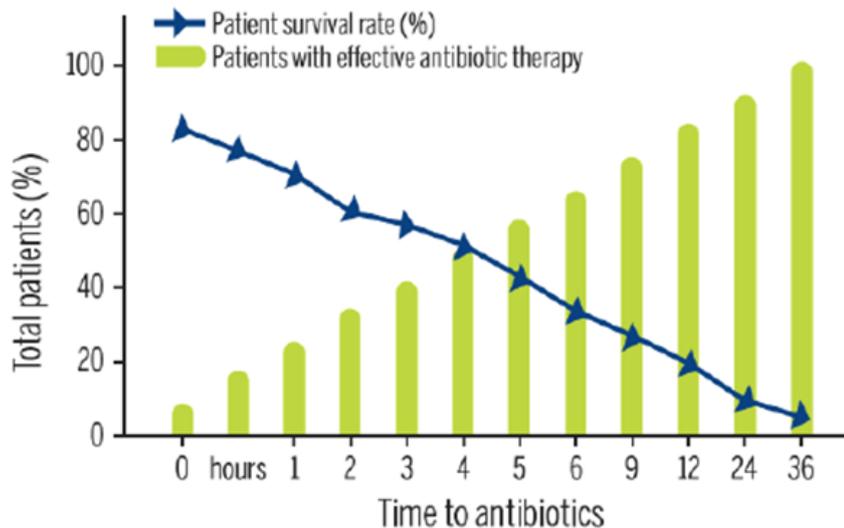


Figure 15: Graphique représentant le taux de survie (courbe bleue) d'un patient (en cas de choc septique) en fonction du temps avant l'attribution d'une antibiothérapie effective. On observe une décroissance rapide, avec seulement 50 % de chance de survie après 5h et 0% après 36h. D'après Kumar A, et al. Crit Care Med. 2006 ; 34(6) :1589-96

Malheureusement, les méthodes de routine ne sont pas assez rapides pour guider l'intervention thérapeutique dans le cas d'une bactériémie avérée. C'est pourquoi l'antibiothérapie empirique à large spectre est couramment utilisée, alors qu'il s'agit d'une approche coûteuse pouvant s'avérer inefficace et dangereuse. Elle peut provoquer des effets nocifs pour le patient par le biais de la toxicité antimicrobienne, ce qui allonge la durée du séjour à l'hôpital (LOS). En plus de contribuer à l'évolution constante de la multi résistance aux antibiotiques, cela entraîne des coûts supplémentaires pour les patients ainsi que pour le système de santé. ^{4,93,96-100}

C'est pourquoi la mise en place de méthodes les plus exhaustives possibles est un enjeu pour le futur. Malheureusement, il est toujours difficile d'allier rapidité, simplicité et exhaustivité dans une approche. Dans la plupart des approches mises en place, le compromis est généralement réalisé en faveur de la rapidité, qui demeure actuellement la priorité des approches cliniques.

B. Méthodes de routine pour l'identification bactérienne

Les techniques microbiologiques dites classiques comme la coloration de Gram, la croissance sur milieu solide ou encore l'antibiogramme sont toujours d'actualité. Elles ont cependant été améliorées et automatisées, pour la mise en œuvre ou encore la lecture et le rendu de résultats¹⁰¹⁻¹⁰³.

Il est à noter que, même en présence d'une bactériémie avérée, on ne retrouve qu'un faible nombre de bactéries viables dans le sang. En moyenne, chez un adulte, on retrouve quelques bactéries par mL de sang jusqu'à, dans certains cas, une seule bactérie pour 10 mL¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Malheureusement, il n'existe pas de méthode actuellement capable d'une telle sensibilité pour l'identification de micro-organismes, qui plus est dans un milieu extrêmement complexe tel que le sang. Celui-ci est constitué de globules blancs, rouges, de protéines, de plaquettes ainsi que d'autres composés, qui selon les techniques sont susceptibles de perturber et ralentir la caractérisation du pathogène^{107,108}. Il est donc impératif d'avoir recours à un enrichissement de l'échantillon sanguin par le biais d'une hémoculture.

1. Hémoculture

Lors d'une suspicion d'infection bactérienne, une hémoculture est alors réalisée. C'est le test de routine obligatoire pour affirmer le cas d'une bactériémie. Le test est largement réalisé à l'hôpital, comme le montrent certaines études, rapportant qu'il est réalisé pour près de 30 % des patients¹⁰⁹.

Une hémoculture est un mélange d'un milieu de culture et d'un prélèvement veineux du patient, qui permettra de confirmer ou d'infirmer la bactériémie. Une fois le flacon rempli avec le sang, celui-ci sera incubé à 35°C dans des incubateurs automatisés qui permettent le suivi en temps réel d'un grand nombre d'hémocultures.

On retrouve majoritairement 3 systèmes commerciaux dans le monde :

- BD Bactec™ (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France)
- BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)
- VersaTREK® (TREK Diagnostics Systems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis).

Pour les 3 systèmes, c'est l'activité respiratoire des bactéries qui permet de détecter la multiplication bactérienne, soit *via* l'apparition d'un changement de pression (VersaTREK), soit *via* le dégagement de dioxyde de carbone¹¹⁰ (BacT/ALERT et BD Bactec). Le suivi est automatique avec une lecture toutes les 10 minutes. Le dépassement de la valeur seuil permet de valider que l'hémoculture est positive et donc qu'un pathogène s'est multiplié dans le milieu. Dans plus de 90 % des cas, il suffit de moins de 24h d'incubation pour que la présence de la bactérie soit détectée par l'automate¹¹¹. Les hémocultures sont incubées dans l'automate jusqu'à 5 jours ; une fois ce temps dépassé l'hémoculture est alors considérée comme négative. La concentration en bactérie d'une hémoculture positive à la détection est comprise entre 10^7 et 10^8 UFC.mL⁻¹ ^{112,113}.

2. Coloration de Gram et microscopie

La première étape post détection consiste en une coloration de Gram suivie d'une observation microscopique. Ces 2 tests permettent d'éliminer d'éventuels faux positifs en confirmant la présence de bactéries, et confèrent un premier palier d'identification (Gram+/Gram-, coque, bacille ...) en moins d'une heure. Ces informations permettent d'orienter l'antibiothérapie pour le patient, ainsi que la suite de la caractérisation de la souche bactérienne. En effet, les types de résistance observés entre les Gram+ et les Gram- sont différents.

3. Croissance sur milieux solides

Pour un grand nombre de techniques, travailler directement sur le sang représente un défi de taille tant le milieu biologique est complexe. De plus, la présence de multiples souches bactérienne est possible, ce qui force la réalisation d'un isolement bactérien sur un milieu solide. Cette étape nécessite entre 12h et 24h à 35°C, en fonction de la bactérie. Généralement, une gélose très riche (gélose sang) est utilisée pour permettre aux bactéries les plus exigeantes de se développer rapidement. Parallèlement, il est possible d'utiliser des géloses sélectives (choix orienté avec les résultats de la coloration de Gram) qui seront spécifiques de certaines bactéries. Par exemple, une gélose Chapman permet d'isoler les staphylocoques grâce à une forte concentration en chlorure de sodium (NaCl) dans le milieu ¹¹⁴.

4. Identification

Comme dans le cas de géloses spécifiques, l'identification finale peut se faire par la mise en évidence de caractéristiques biochimiques spécifiques, avec par exemple l'utilisation de galeries API (Appareils et Procédés d'Identification), miniaturisées et automatisées. Les 3 modèles sont le Vitek® 2 (bioMérieux), le BD Phoenix (Becton Dickinson) et le Micro-Scan WalkAway® (Beckman Coulter, Brea, Etats-Unis). Ils permettent, pour un grand nombre d'isolats cliniques, une identification au niveau du genre et de l'espèce¹¹⁵, avec seulement des erreurs pour certains pathogènes rares¹¹⁶. En quelques heures, la quarantaine de puits réactionnels, inoculés avec une solution d'environ $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, permettent l'identification du pathogène¹¹⁷.

La technique principalement utilisée pour l'identification bactérienne est dorénavant le MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization –Time Of Flight)¹¹⁸ qui sera détaillée ultérieurement.

5. Antibiogramme

Une fois l'identification obtenue, une part de l'information critique reste manquante : le profil de résistance aux antibiotiques. Même si l'identification permet d'obtenir le profil de résistance inné de la bactérie, l'ensemble de la résistance acquise et la valeur de la CMI restent à déterminer. Parallèlement à l'identification, on réalise donc un antibiogramme (Figure 16)¹¹⁹ qui reste le test de référence (Gold standard).

Celui-ci peut être réalisé directement par un automate¹¹⁹, avec l'utilisation de cartes d'antibiotiques comportant des puits réactionnels avec des concentrations décroissantes en antibiotiques. Grâce à un système de multiplexage, l'automate est capable de déterminer la CMI pour plusieurs antibiotiques. Le résultat dépend de la vitesse de croissance du pathogène et nécessite entre 6 et 24 h. Certaines études montrent une possibilité de gain de temps en travaillant directement avec un prélèvement de l'hémoculture^{120,121}. Malheureusement, des différences notables lors de l'analyse de Gram+ et dans certains cas d'infection polymicrobienne ont fait que cette approche n'a pas été validée en routine clinique.

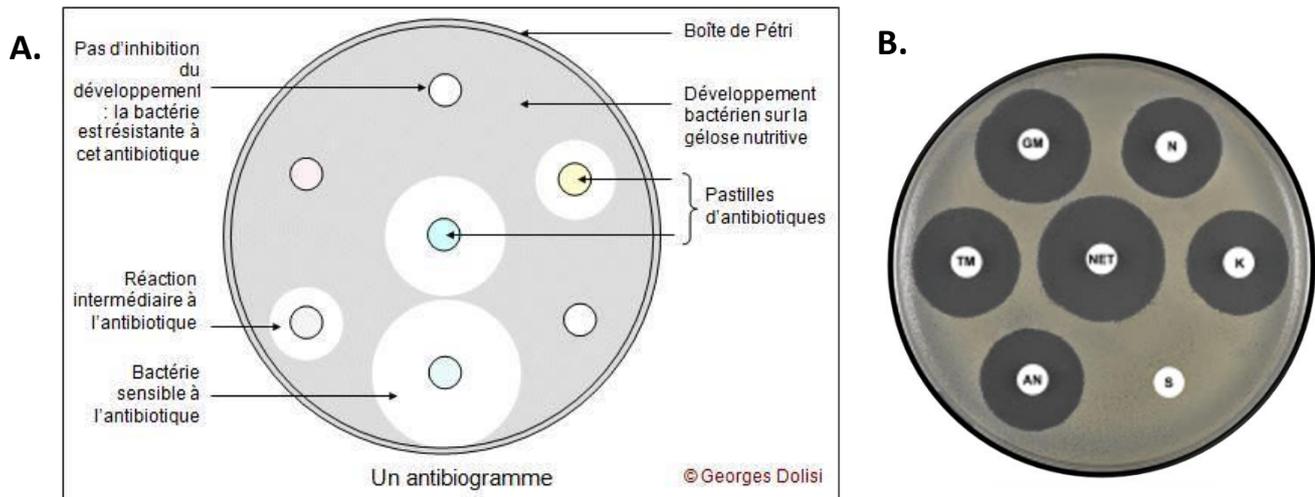


Figure 16 : A) Représentation schématique d'un antibiogramme montrant plusieurs seuils de résistance aux antibiotiques. Les zones grises représentent la présence et le développement bactérien et en blanc l'absence de bactérie. Les cercles de couleurs correspondent aux pastilles d'antibiotiques autour desquelles l'antibiotique diffuse. Plus la distance avec le centre de la pastille est grande, moins l'antibiotique est concentré dans la gélose. Plus le cercle blanc autour de la pastille est grand, plus la bactérie sera sensible à cet antibiotique. En, opposition, l'absence de cercle blanc démontre la résistance de la bactérie à l'antibiotique. B) Exemple de photographie d'un antibiogramme sur boîte de Pétri. Adapté de cours personnelles en microbiologie Université Lyon 1.

Comme l'on peut voir sur la Figure 16, un autre moyen est l'utilisation de milieux solides avec des disques d'antibiotiques (Etest®, bioMérieux) diffusant différents antibiotiques au sein de la gélose. Le milieu est préalablement ensemencé avec une solution issue de l'isolement bactérien. La CMI est déterminée à l'aide de tables révisées annuellement par des organismes publics¹²², qui fournissent également des informations pour aider l'interprétation du test.

Ces méthodes phénotypiques basées sur la croissance bactérienne sont les seules à ce jour à pouvoir fournir cette valeur de CMI, qui est critique pour avoir une antibiothérapie spécifique au patient. Cependant, des méthodes alternatives ont été proposées, basées sur des marqueurs de la résistance (gènes, ARN : Acide ribonucléique, protéines). L'intérêt de pouvoir détecter des marqueurs de résistance tels que des gènes ou les protéines qui y sont associées est d'envisager une identification plus précoce des résistances.

C. Méthodes émergentes

1. Tests moléculaires

Depuis quelques années, des tests moléculaires, comme les techniques d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) et les «microarrays» (ou puce à ADN), ont émergé.

Les techniques FISH reposent sur l'utilisation de sondes complémentaires à une séquence

cible marquée à l'aide d'un marqueur fluorescent, ce qui permet de mettre en évidence une molécule d'ADN ou d'ARN précise.

Les tests FISH sont réalisables directement à partir d'hémocultures positives et seulement avec quelques dizaines de microlitres de solution. Ils nécessitent quand même une coloration de Gram afin d'orienter le test (différentes gammes entre Gram+ et Gram-).

On retrouve plusieurs fabricants :

- hemoFISH (Miacom Diagnostics, Dusseldorf, Allemagne)
- PNA FISH®, QuickFISH™ (OpGen, Gaithersburg, Etat-unis)
- XpressFISH® (AdvanDx, Vedbaek, Danemark)

Les 3 tests permettent une identification en quelques heures pour les pathogènes les plus fréquents, avec une spécificité de plus de 90 %^{123,124}. De plus, certains tests permettent la détection de certains mécanismes de résistances spécifiques comme la détection du gène MecA pour le test XpressFISH®.

Les puces à ADN, quant à elles, sont des biotechnologies permettant d'analyser le niveau d'expression d'un gène transcrit. Le principe repose également sur l'utilisation de sondes spécifiques (fragment d'ADN synthétique) à une cible (ARNm) mais permettent un fort taux de multiplexage, avec la présence d'un grand nombre de sondes sur une biopuce. Le test Verigene® (Luminex Corporation, Nanosphere, Northbrook, Etats-Unis) nécessite lui aussi une différenciation Gram+/-, mais permet une identification en 3 h ainsi que la détection de la résistance à la vancomycine en plus de la méticilline, très pratique pour les infections à *S.aureus*¹²⁵.

Il existe aussi des tests se basant sur la PCR en temps réel, qui nécessitent une amplification de l'ADN *via* des sondes spécifiques¹²⁶. Ils possèdent la même spécificité et sensibilité que les tests phénotypiques et permettent l'identification de la bactérie. De plus, il est possible de rechercher spécifiquement la présence de certains gènes de résistance^{127,128}. Ces tests nécessitent 4 h, et l'utilisation de Multitests est possible, permettant un multiplexage de la technique pour pouvoir détecter simultanément plusieurs mécanismes de résistance.

Malheureusement, seuls les gènes recherchés peuvent être détectés, et une multiplication des cibles entraîne une hausse du coût qui est déjà non négligeable. De plus, une simple mutation au niveau de l'amorce entraînera l'apparition d'un faux négatif¹²⁹. Ces paramètres

empêchent une utilisation systématique de ces méthodes, mais elles restent très efficaces dans un second temps pour affiner l'analyse, par exemple après l'identification d'un *S.aureus* que l'on suspecte d'être MRSA ¹³⁰.

2. Tests immunochromatographiques

Le principe de la méthode (Figure 17) repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre certaines enzymes, dans notre cas des enzymes reliées à la résistance aux antibiotiques. La méthode est ciblée (détection seulement de ce qui est recherché) et très spécifique. Contrairement aux méthodes génétiques, on détecte directement l'enzyme responsable de la résistance, ce qui n'entraîne pas de biais lors de la présence de gènes muets ^{131,132}.

Ces tests sont simples d'exécution et de manipulation, et comprennent un contrôle positif et un négatif inclus directement dans le test. De plus, la spécificité et la sensibilité sont supérieures à 95 %. Par ailleurs, le temps de formation du personnel est réduit à quelques heures.

Le principal inconvénient de l'approche est que chaque mécanisme recherché requiert des anticorps spécifiques. Une mutation au niveau du site de reconnaissance entraînera alors un faux négatif. On peut ajouter qu'un résultat positif n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes et qu'un résultat négatif n'exclut pas la présence de l'agent pathogène. En effet, de nombreux paramètres influencent le test comme la précocité de la réalisation ainsi que la variabilité interindividuelle.

Actuellement, ces tests ne couvrent pas tous les mécanismes, et seuls les variants principaux sont couverts. Cependant, la technique est en plein essor et les cibles se multiplient. Parmi les mécanismes prioritaires pointées par l'OMS, des tests pour Oxa-48, NDM, KPC et IMP ^{133,134} (principales carbapénémases) sont retrouvés. Pour citer certains de ces tests : RESIST-3 O.K.N ; KPC-K-SeT®. De plus, des tests ont aussi été développés afin de caractériser très rapidement les souches MRSA de *S. aureus* avec par exemple le Clearview™ PBP2a SA Culture Colony Test.

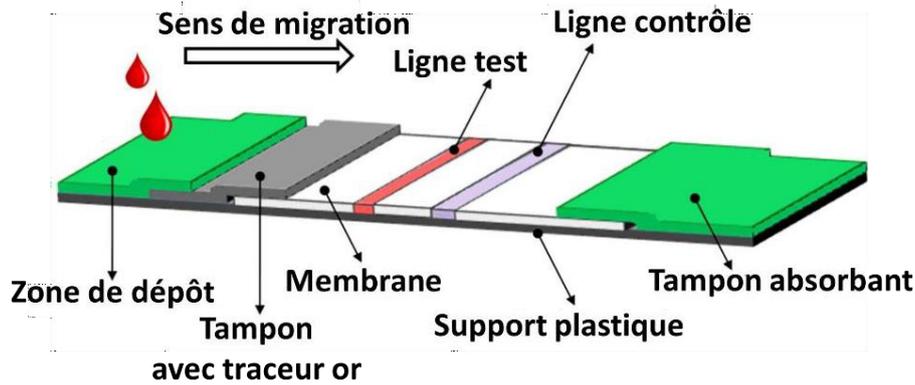


Figure 17 : Principe d'un test immunochromatographique. La détection consiste à déposer l'échantillon à tester dans la zone de dépôt. Si l'antigène recherché est présent, il se lie avec un anticorps marqué le plus souvent à l'or colloïdal. Sous l'effet d'un tampon lyse-migration, les complexes antigènes-anticorps migrent et sont arrêtés par des anticorps de capture fixés sur la membrane. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une ligne colorée, l'accumulation du surplus de complexes colorés entraîne l'apparition d'une ligne de contrôle qui valide le bon fonctionnement de la réaction. En cas de réaction négative, seule la ligne contrôle est colorée. L'apparition des bandes est rapide en 15 à 20 mn. Généralement présentés sous forme de cassette, ils comportent une bandelette spécifique à une enzyme. Usuellement, des bactéries issues d'une croissance sur gélose sont utilisées, même si certains tests donnent des résultats directement avec la solution issue de l'hémoculture¹³⁵. D'après Koczula et al. 2016. *Lateral flow assays. Essays In Biochemistry Jun 30, 60(1) 111-120.*

3. Accelerate Pheno System

Accelerate Pheno™ system (AXDX) est un automate qui combine l'utilisation de plusieurs technologies pour fournir l'identification ainsi qu'une information sur les mécanismes de résistance de la bactérie de façon concomitante. L'automate utilise une technologie d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) entièrement automatisée, pour une identification génomique rapide des agents pathogènes les plus courants à l'origine d'infections du sang. Grâce à différentes combinaisons de sondes d'identification FISH (ID), il permet la détermination de l'espèce et du genre dans la quasi-totalité des cas. Seules des distinctions déjà difficiles en MALDI-TOF persistent (comme les *Citrobacter*), mais celles-ci ne représentent pas une limitation pour les cliniciens. L'appareil est aussi capable de distinguer les infections mono et polymicrobiennes¹³⁶. Après cette identification, l'appareil permet d'établir un profil de résistance phénotypique, grâce à une analyse cellulaire morpho cinétique. Cela consiste à étudier la croissance à l'échelle microscopique d'une colonie bactérienne en temps réel à l'aide d'une caméra.

Dans chaque cas, une concentration unique d'antibiotiques est utilisée afin de fournir une valeur de CMI conforme aux normes et recommandations en vigueur (sensible [S], intermédiaire [I] ou résistant [R])¹³⁷.

Ce système permet en une seule technique de fournir une identification après hémoculture en 90 min avec 95 % de sensibilité et spécificité, ainsi que l'information quant aux résistances aux antibiotiques en seulement 7 h supplémentaires. Cela permet une réduction totale du temps nécessaire (20 h) pour l'obtention des informations cruciales aux cliniciens pour adapter le traitement aux antibiotiques.

Malgré ces avantages cliniques, le coût important des consommables (400 €), du système ainsi que l'utilisation d'une nouvelle technologie constitue un frein à sa mise en place dans le milieu clinique. De plus l'appareil ne suit qu'un seul échantillon à la fois, ce qui nécessite une multiplication des appareils. À cela se rajoute une limitation pour les cas d'infections pluri bactériennes qui engendre des biais dans la caractérisation¹³⁶. Il reste cependant très utile pour des cas graves nécessitant une réponse très rapide et peut servir d'appoint pour le diagnostic de routine.

4. Spectrométrie de masse : MALDI-TOF

Récemment, l'arrivée d'une nouvelle technique par spectrométrie de masse a permis de révolutionner l'identification bactérienne en raccourcissant drastiquement le temps nécessaire à sa réalisation (près de 10 h). L'approche MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization –Time Of Flight)¹¹⁸ (Désorption Laser Assistée par Matrice- temps-de-vol) (Figure 18) permet d'obtenir, en quelques minutes, un spectre de masse correspondant aux protéines bactériennes issues de colonies ou de matrices biologiques avant d'être comparé à des spectres de référence pour identifier le micro-organisme.

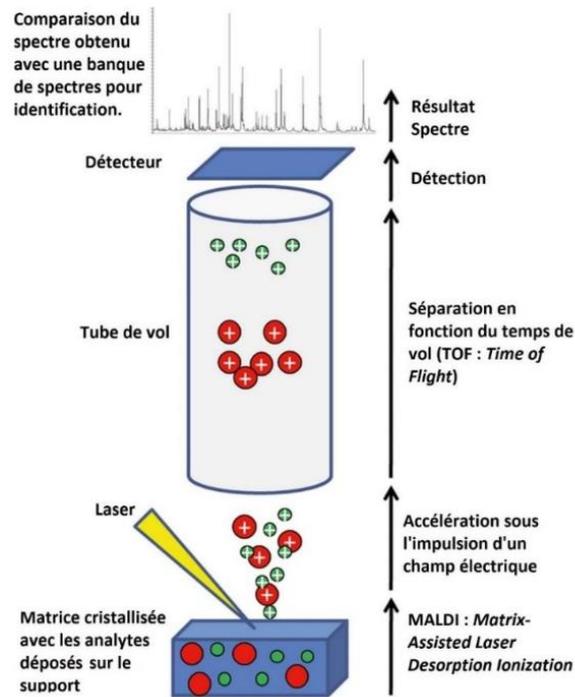


Figure 18 : Identification bactérienne par MALDI-TOF Croxatto et al. ¹³⁸.

Les bactéries issues de colonies bactériennes sont déposées sur une plaque. Une matrice composée de divers acides organiques est ajoutée au lysat. Des pulsations laser spécifiques (337 nm) sont alors utilisées afin de désorber les protéines et permettre leur ionisation. Les ions sont alors accélérés avant d'entrer dans l'analyseur : analyseur à temps de vol. Les ions sont tous accélérés par un champ électrique de valeur connue, il en résulte une accélération dépendant de la charge de l'ion. La vitesse de l'ion dépend du rapport masse sur charge, et l'on mesurera alors le temps que mettra la particule chargée pour atteindre le détecteur qui est à une distance connue. On pourra alors déterminer le rapport masse sur charge de l'ion et générer ainsi un spectre de masse sur une plage choisie de rapport masse sur charge (m/z).

Le principe repose sur l'irradiation par laser d'un dépôt cristallin composé d'un mélange de bactéries (l'échantillon) et d'une matrice organique donneuse de protons (acide sinapinique ou DHB, 2,5-dihydroxybenzoïque) co-cristallisés. Cette irradiation s'effectue à l'aide d'un laser pulsé à une longueur d'onde donnée ($\lambda=337$ nm), ce qui entraîne la désorption du mélange matrice/analyte co-cristallisés. Les analytes (protéines bactériennes) sont ionisées *via* transfert de protons depuis la matrice. Les ions formés sont accélérés et se déplacent à travers un analyseur à temps de vol libre de champs dans lequel règne un vide poussé de l'ordre de $\sim 10^{-7}$ mbar et à une vitesse dépendant de leur rapport masse/charge (m/z).

Dans le cadre de l'identification bactérienne, cette approche est rapide et facile à mettre en œuvre.

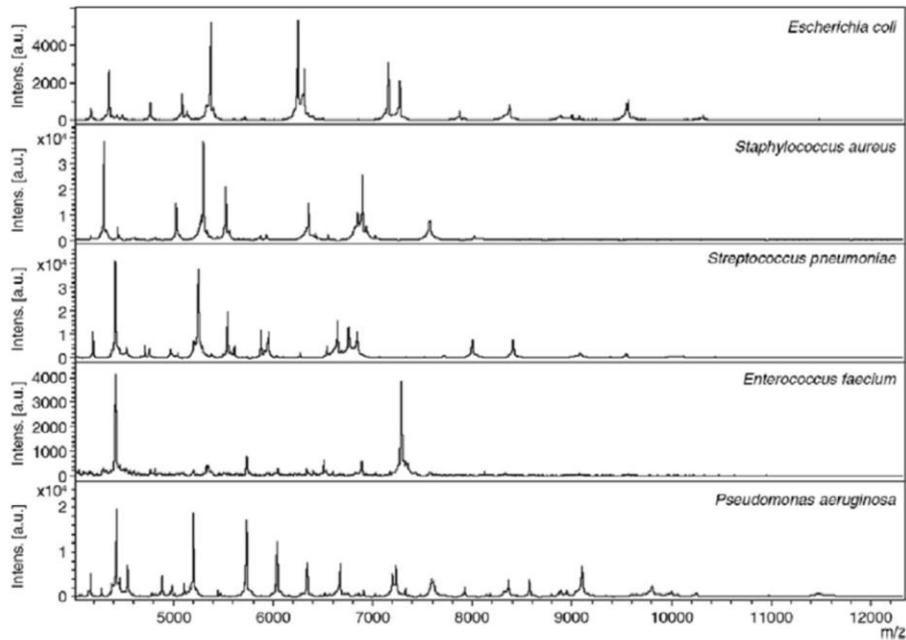


Figure 19 : Empreintes spectrales obtenues lors de l'analyse par MALDI TOF de colonies entières de 5 espèces bactériennes différentes. D'après Carbonnelle, É., & Nassif, X. (2012). Implantation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie : quels changements pour les cliniciens ? *Réanimation*, 21(3), 351–361. doi:10.1007/s13546-012-0480-y.

Les spectres obtenus (Figure 19) sont l'équivalent d'une empreinte de la bactérie et sont majoritairement composés des pics correspondant aux protéines ribosomales¹³⁹. Ces protéines sont très abondantes, fortement conservées (très peu de mutations) et très spécifiques des espèces et genres bactériennes. C'est pourquoi chaque spectre présent sur la Figure 19 est caractéristique de l'espèce analysée.

L'identification s'appuie sur l'utilisation de bases de données comprenant des spectres de référence. Cela permet, grâce à un processus de comparaison, une identification rapide et très précise¹¹⁸ (98 % de spécificité) d'un très grand nombre d'espèces. De plus, les bases de données évoluent et sont enrichies en fonction des expériences, permettant ainsi d'améliorer le processus d'identification des nouvelles souches bactériennes.

Par ailleurs, il est possible d'obtenir une information sur la résistance aux antibiotiques. Pour cela, un antibiotique faiblement dosé est mis en contact avec la souche bactérienne suspectée d'être résistante. Si la bactérie est résistante, elle possède alors un moyen de dégrader l'antibiotique. Cela se traduit, sur le spectre MALDI par l'apparition d'un pic ou plusieurs pics correspondant au produit de dégradation de l'antibiotique. Sur la Figure 20, le spectre de masse montre la disparition du pic à un m/z 300 correspondant à l'ion de l'antibiotique

imipénème et l'apparition d'un ion à m/z 254 correspondant au métabolite produit de l'hydrolyse^{140,141}, ce qui implique que la bactérie possède l'enzyme permettant l'hydrolyse de l'antibiotique. Afin d'évaluer la sensibilité, il est alors nécessaire de réaliser des incubations avec des concentrations croissantes en antibiotiques. Cette approche n'est cependant limitée qu'à la recherche de quelques résistances précises et requiert une multiplication des tests. Récemment, Bruker a développé un test MBT STAR-Carba IVD Kit permettant la détection des résistances aux carbapénèmes. Les résultats obtenus montrent des sensibilités et spécificités proches de 100 % à partir de souches isolées.

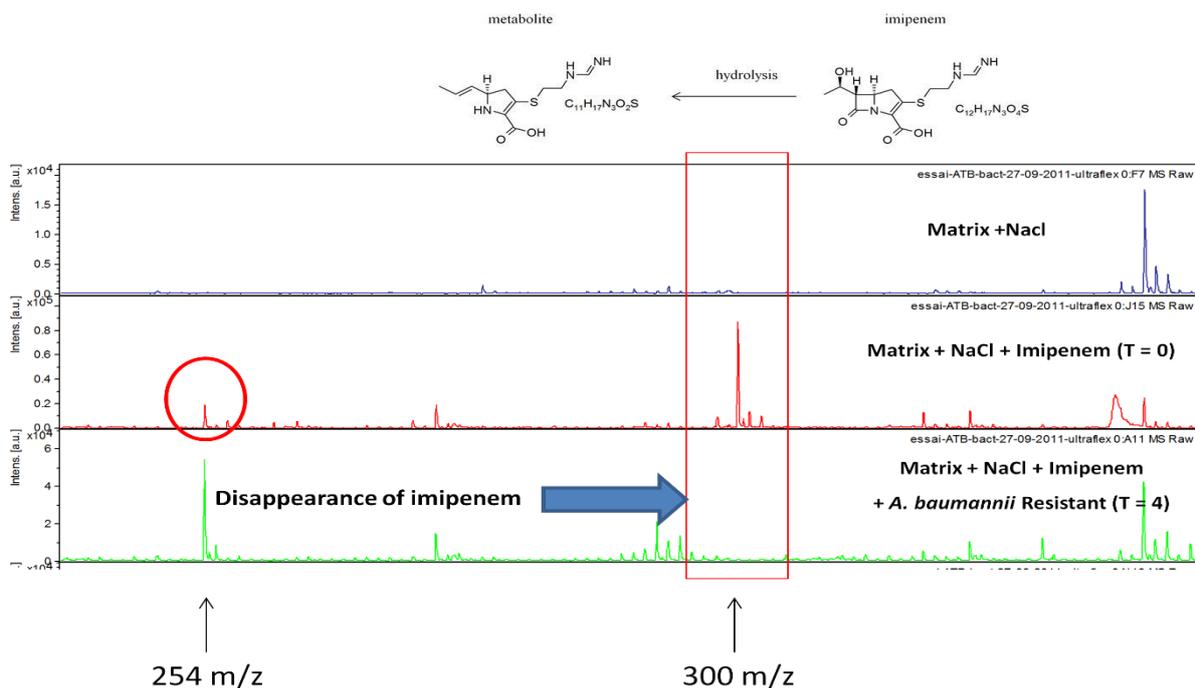


Figure 20 : Spectre de masse (MALDI TOF) montrant la présence à m/z 300 du pic correspondant à une molécule d'antibiotique (Imipénème) ainsi que son produit d'hydrolyse à m/z 254 dans une souche de *K. pneumoniae*. D'après Kempf et al. 2012, PLoS ONE 7:e31676.

Le MALDI-TOF est un outil qui a révolutionné l'identification bactérienne pour la plupart des pathogènes d'intérêt médical. Sa fiabilité et son évolution perpétuelle constituent l'alternative préférentielle aux anciennes techniques (identification sur gélose, galerie API automatisé) et aux approches moléculaires. Elle est devenue indispensable en routine même si elle nécessite d'être couplée avec la réalisation d'antibiogrammes pour obtenir l'AST. Néanmoins, des limitations persistent encore, comme la nécessité de travailler sur des échantillons mono-microbiens¹⁴² car la présence d'interfèrent bactérien diminue la spécificité de l'analyse. Il est également préférable de travailler sur échantillon issu de culture artificielle et non pas directement d'une hémoculture¹⁴³⁻¹⁴⁵ qui engendre encore trop d'interférences.

Certain test comme le Sepsityper permet de travailler directement à partir d'hémoculture mais la fiabilité obtenue est inférieure à celle obtenue pour des cultures sur boîte. De plus, il est encore très difficile avec la technique d'obtenir une information exhaustive sans *a priori* sur la résistance aux antibiotiques.

D. Conclusion sur les techniques actuelles et émergentes

De nombreuses solutions sont à la disposition des cliniciens afin de réduire le délai d'obtention des données essentielles pour fournir une antibiothérapie spécifique aux patients. L'utilisation conjointe en routine de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification et des tests de croissance (antibiogrammes) pour déterminer le profil de résistance aux antibiotiques^{146,147} constitue désormais le standard. Cela permet ainsi de cibler plus spécifiquement le choix de l'antibiothérapie la plus adaptée pour les patients (baisse de la mortalité¹⁴⁸), réduisant ainsi les durées d'hospitalisation¹⁴⁶. Dans le cas où l'hémoculture nécessite 8 h pour être considérée comme positive, l'identification est réalisée après 1 à 7 h en fonction de la nécessité de réaliser une sous culture rapide ou de travailler directement dans le sang. La sous culture est toutefois nécessaire pour la réalisation de l'antibiogramme qui requiert environ 12 h. Pour les patients dans des cas critiques, des tests de biologie moléculaire ou immunochromatographique peuvent également être réalisés afin de gagner du temps. Cependant, ces tests supplémentaires ne peuvent être utilisés de façon systématique, car cela entraînerait des coûts trop importants. Pour obtenir l'ID et les mécanismes de résistance présents par ces techniques, il est encore nécessaire de multiplier les tests. Or, les techniques émergentes restent pour la plupart très coûteuses à la mise en place ou à l'utilisation et demandent un savoir-faire conséquent pour éviter toute erreur. Par ailleurs, l'absence de techniques de routines permettant une caractérisation des facteurs de virulence comme les toxines est remarquable, notamment pour *S. aureus* et *E. coli*, qui sont des bactéries dont de nombreux facteurs de virulence hors résistances aux antibiotiques sont étudiés à des niveaux plus fondamentaux. La Figure 21 offre un aperçu des techniques actuellement employées à l'hôpital pour le diagnostic bactérien, positionnées en fonction du temps nécessaire pour l'obtention de l'information pertinente (ID, AST ou les deux) ainsi que le coût de la technique par patient.

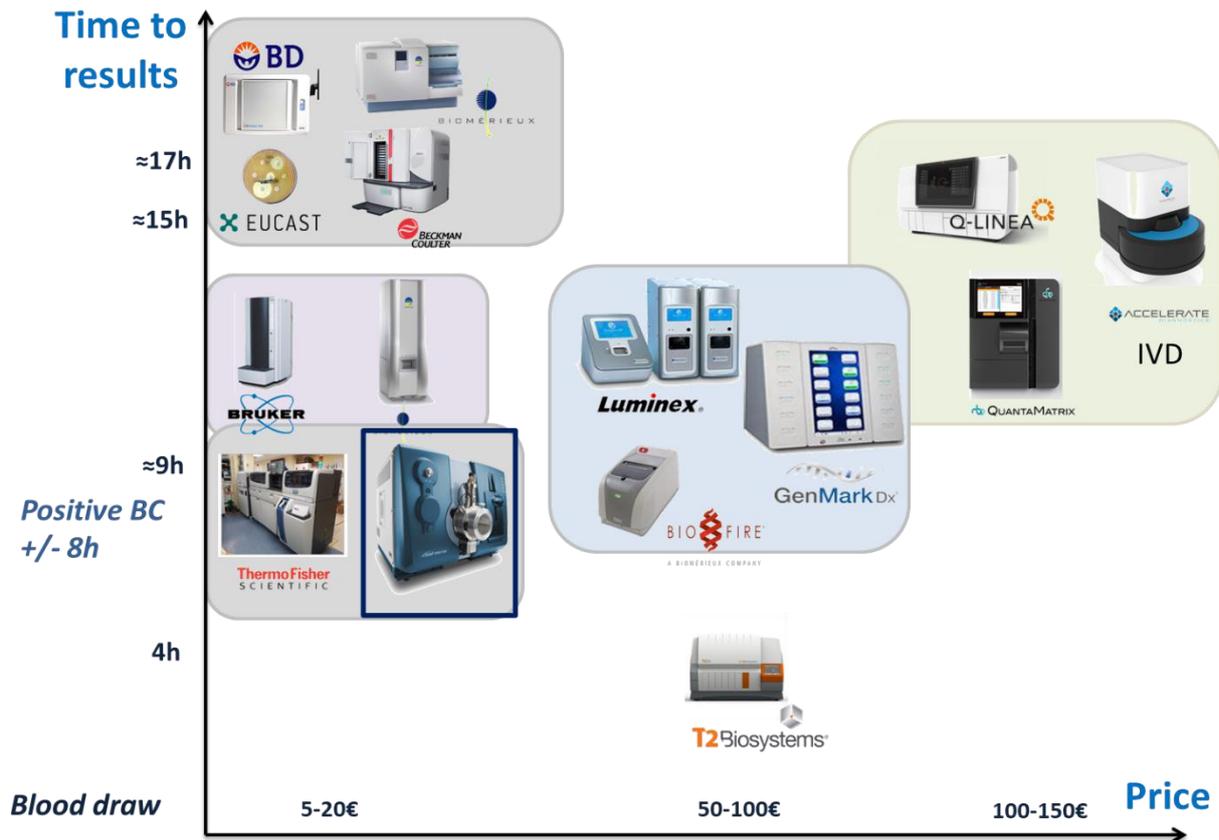


Figure 21 : Aperçu des techniques mises en place dans les hôpitaux en fonction du temps nécessaire pour l'obtention de l'ID et de l'AST avec le coût par patient associé. **ID seulement** : T2 biosystems : T2Dx ; ThermoFisher : Acrion ; Biofire : FilmArray ; Luminex : Verigen ; Genmark : ePlex ; BioMérieux : Vitek MS ; Bruker : BioTyper. **AST Seulement** : Q linea : ASTar ; Quantamatrix : dRAST ; EUCAST : RAST. **AST et ID** : Accelerate Diagnostics : Accelerate Pheno System ; BioMérieux : Vitek2 ; Beckman coulter : Microscan ; BD : Phoenix.

Parmi les solutions mises en places, certaines permettent l'obtention de l'ID seulement (T2 biosystems : T2Dx ; ThermoFisher : Acrion ; Biofire : FilmArray ; Luminex : Verigen ; Genmark : ePlex ; BioMérieux : Vitek MS ; Bruker : BioTyper), alors que d'autres ne se focalisent que sur les résistances aux antibiotiques (Q linea : ASTar ; Quantamatrix : dRAST ; EUCAST : RAST) et quelques solutions sont capables de fournir les deux types d'informations (Accelerate Diagnostics : Accelerate Pheno System ; BioMérieux : Vitek2 ; Beckman coulter : Microscan ; BD : Phoenix).

Une méthode adaptée dans une optique d'application clinique serait alors :

1] Une méthode unique, permettant l'identification (espèce et genre) ainsi que la caractérisation de la virulence de la souche. Cela englobe la résistance aux antibiotiques mais aussi des facteurs de virulence liés à la sévérité de l'infection, par exemple avec les toxines principales comme HLA, HLD, les PVL et TSST dans le cas d'une infection à *S. aureus*. La

technique doit permettre l'analyse d'un grand nombre de composés simultanément (capacité de multiplexage importante). Une technique quantitative est également un plus, pour avoir l'information quant aux niveaux d'expression des protéines d'intérêt.

2] Une méthode permettant de travailler directement avec une hémoculture positive, car à l'heure actuelle l'hémoculture est le seul moyen utilisé pour conclure à une bactériémie. Il faut donc pouvoir travailler dans un milieu très complexe et donc avoir une grande gamme dynamique d'analyse afin de pouvoir acquérir les signaux minoritaires pouvant être cruciaux. Très souvent dans le cas de matrices complexes, c'est la préparation de l'échantillon qui permet la réalisation de l'analyse dans de bonnes conditions. Cette étape préalable se doit d'être, dans ce cas, simple et rapide afin d'être en accord avec les besoins du milieu clinique.

3] Une méthode phénotypique. Elle se rapproche le plus des cas "réels", en prenant en compte que l'expression de la protéine peut être absente malgré la présence du gène. Il a été montré des différences entre les données génomiques et des phénotypes bactériens pathogènes spécifiques¹⁴⁹. Il est important pour une meilleure compréhension de l'infection et de l'évolution de l'état du patient d'avoir les données sur les effecteurs, et donc de savoir si la protéine est exprimée ou absente ainsi que son niveau d'expression. Parmi les méthodes possibles, la protéomique semble être un bon candidat pour l'obtention de ces informations.

4] Rapide, robuste, simple et économique. Le temps est le facteur clé, il faut donc une méthode la plus rapide possible (moins d'une heure après l'hémoculture positive). Afin qu'elle soit adaptée pour une utilisation en routine, la méthode doit être simple d'utilisation (automatisable ou très peu de manipulations), robuste et à moindre coût.

L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem offre des possibilités intéressantes pour l'identification des bactéries, la mise en évidence des protéines impliquées dans la résistance ainsi que dans la virulence^{140,150}, par des approches quantitatives ou semi-quantitatives. Pour répondre à ces conditions, nous proposons dans la suite une stratégie protéomique s'appuyant sur la spectrométrie de masse de type *Bottom-up*.

V. Spectrométrie de masse : Protéomique

La protéomique a pour objectif d'identifier, et de quantifier, de manière exhaustive ou limitée à un panel restreint ciblé, les protéines contenues dans un échantillon biologique.¹⁵¹ La spectrométrie de masse¹⁵² a toujours été utilisée pour les applications biologiques, excellant dans l'analyse de petites molécules. L'arrivée des techniques d'ionisation douces (source MALDI¹⁵³ et electrospray¹⁵⁴) a permis de faire évoluer la technique par l'analyse des protéines. La spectrométrie de masse est alors devenue un outil de référence pour la recherche en protéomique¹⁵⁵. L'évolution de l'appareillage (précision en masse, sensibilité) et le développement de nouveaux spectromètres de masse ont ouvert de nouvelles applications en protéomique. La technique a alors été transformée d'un simple outil d'identification à une solution complète de caractérisation des protéines dans un échantillon biologique (identification, quantification, mesure des changements d'expression, interactions, modifications)¹⁵¹. Deux stratégies d'analyse protéomique peuvent être mises en œuvre, dites descendante (*top-down*)^{156,157} ou ascendante (*bottom-up*) selon qu'elles impliquent l'analyse de protéines entières ou bien des peptides obtenus par digestion enzymatique de la protéine. Les approches protéomique en *top-down* sont particulièrement utilisées pour de la caractérisation structurale. Parmi les approches *bottom-up*, certaines sont plus adaptées à des études exhaustives visant à identifier systématiquement l'ensemble des protéines présentes, tandis que d'autres se focaliseront sur certaines protéines d'intérêt. De plus, ces approches permettent facilement la mise en place de méthodes quantitatives, notamment avec l'utilisation de méthodes ciblées^{158,159}. Lors d'une analyse en protéomique de type *bottom-up*, les échantillons biologiques renferment un grand nombre de peptides qu'il est nécessaire de différencier ; il est donc primordial que les analyses mises en place possèdent une grande spécificité. Pour gagner en spécificité, il est nécessaire d'utiliser un couplage entre la chromatographie liquide et un spectromètre de masse (MS) en tandem (MS/MS). Le principe de la MS/MS consiste dans un premier temps à sélectionner un ion parent, à le fragmenter, puis à analyser les fragments (ions fils) ainsi générés. Le couple ion parent / ion fils est appelé « transition ».

A. Approche *bottom-up*

L'approche de type *bottom-up* est une méthode permettant l'identification et la caractérisation de la séquence en acides aminés des protéines, préalablement digérées en peptides, avant leur analyse en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)^{157,160}. L'identification des protéines dans un échantillon est réalisée *via* l'analyse des peptides rapporteurs spécifiques de la protéine. En effet, la taille importante des protéines les rend difficilement analysables en MS, *a contrario* des peptides qui peuvent être plus facilement détectés. En revanche, la simple mesure de la masse exacte d'un peptide dans un échantillon complexe n'est pas suffisamment spécifique pour identifier la protéine. C'est pourquoi, la spectrométrie de masse en tandem est utilisée afin de gagner en spécificité *via* l'analyse des fragments spécifiques du peptide.

L'approche *bottom-up* est une méthode de protéomique simple et directe pour l'analyse des protéines d'un échantillon complexe, qui se décline en plusieurs étapes (Figure 22).

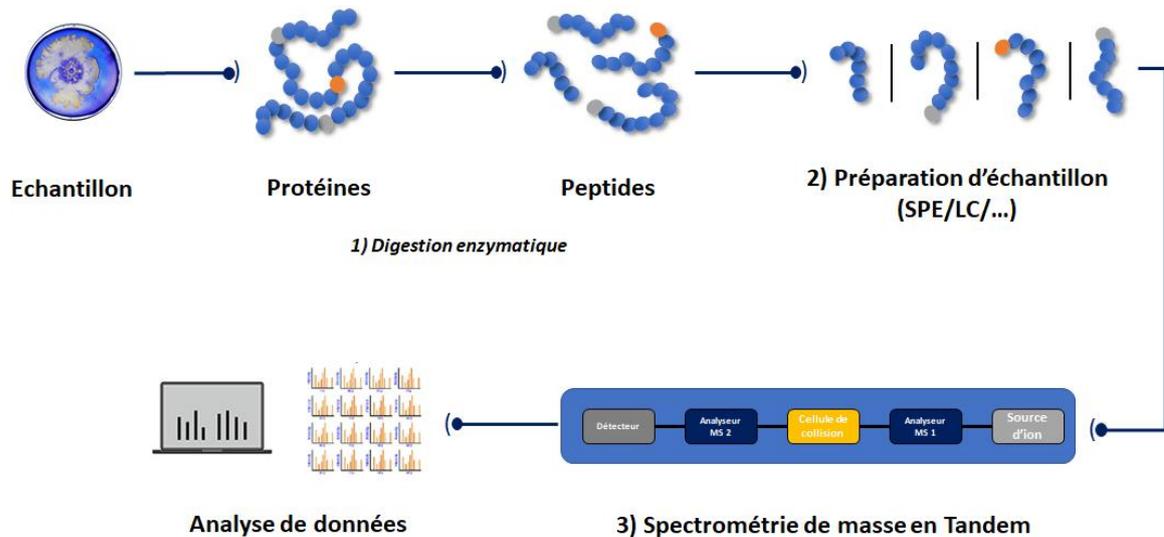


Figure 22 : Différentes étapes d'une stratégie *bottom-up*. Les protéines sont extraites de l'échantillon puis digérées via l'action d'une enzyme spécifique et choisie pour l'obtention de peptides. Il s'en suit une ou plusieurs étapes essentielles de préparation d'échantillons *off-line* (SPE, purification...) et/ou *en ligne* (SPE : solide phase extraction, LC : Liquid chromatography). Cet extrait de peptides est analysé par spectrométrie de masse en tandem. Les spectres ainsi réalisés sont alors analysés afin d'extraire l'information recherchée (présence/absence de protéine, et possible quantification de ces marqueurs).

1. Digestion enzymatique

La première étape consiste en l'extraction des protéines, ce qui se traduit dans le cas d'échantillons bactériens par la lyse des membranes. C'est une étape très importante et

primordiale pour la bonne réalisation de l'analyse notamment lors de l'analyse de protéines membranaires.

Comme l'approche bottom-up se fonde sur l'analyse de peptides, une étape de digestion enzymatique des protéines est donc nécessaire. Celle-ci est généralement réalisée par des endoprotéases comme la trypsine¹⁵¹. Cette enzyme est très couramment utilisée car elle possède une grande spécificité de clivage, une très bonne efficacité ainsi qu'une stabilité importante dans une grande variété de conditions. La trypsine permet un clivage spécifique¹⁵¹ *via* l'hydrolyse des liaisons peptidiques du côté C-terminal d'un résidu de lysine (K) ou d'arginine (R). Certains enchainements d'acides aminés conduisent néanmoins à l'absence ou la mauvaise hydrolyse de la liaison peptidique^{161,162}.

Un autre avantage de la trypsine concerne la fragmentation des peptides obtenus après digestion. La présence des résidus hautement basiques à l'extrémité C-terminale des peptides tryptiques permet généralement d'obtenir des séries d'ions Y de masse élevée ce qui rend les spectres de masse en tandem plus facilement interprétables¹⁶³.

2. Préparation d'échantillons

La préparation d'échantillons est une étape essentielle à optimiser, qui plus est dans une optique clinique. Cette étape peut être limitante car elle est consommatrice de temps et impactera la sensibilité de la méthode, en particulier si les étapes du protocole se multiplient.

Au préalable ou à la suite de la digestion enzymatique, il est courant d'avoir recours à des étapes de dénaturation, de réduction et d'alkylation pour réduire les liaisons disulfures et empêcher qu'elles ne se reforment par la suite¹⁶⁴.

Il est aussi possible d'effectuer une première étape de purification de l'échantillon *via* des extractions en phase solide ou des dialyses, pour simplifier et dessaler les matrices souvent très complexes (sang/plasma/tissus). Ces étapes peuvent également permettre une préconcentration de l'échantillon ainsi qu'un changement de solvant, afin d'être dans des conditions optimales pour l'analyse chromatographique.

La chromatographie liquide (LC) en phase inverse couplée à la source electrospray est la référence dans l'analyse de protéines en bottom-up, même si l'HILIC (chromatographie à

interaction hydrophile) est utilisée comme une solution alternative dans certaines applications. L'utilisation de la LC permet d'obtenir une dimension de séparation efficace, réduisant ainsi les effets matrices et la suppression d'ionisation¹⁶⁵, nécessaire dans l'analyse d'échantillons comportant une grande gamme dynamique de concentrations.

Les analyses bottom-up utilisent des HPLC (chromatographie liquide haute performance) standard et en mode nano. La nano-HPLC, en opposition à l'utilisation classique, se définit par l'utilisation de débit de phase mobile de l'ordre de la centaine de nanolitres par minute au lieu d'une centaine de microlitres par minute. Le choix de l'utilisation d'une méthode plutôt qu'une autre dépend de l'approche que l'on souhaite mener. La nano-HPCL offrira une meilleure sensibilité, et sera plus économe en terme de quantité d'échantillon, mais sera moins robuste et plus difficile à mettre en place¹⁶⁶. En effet, la stabilité du spray de la nano-LC engendre des variations importantes du signal observé, et les capillaires très fins s'obstruent facilement.

Les approches bottom-up se divisent en deux grandes catégories en fonction de l'objectif de l'étude. Dans les cas où l'on souhaite identifier le maximum de protéines présentes dans l'échantillon sans objectif précis, les approches *sans a priori* de type *Shotgun proteomics* seront utilisées. Dans les cas où l'on sait ce que l'on cherche précisément au milieu d'un échantillon complexe, il est nécessaire d'utiliser des méthodes ciblées.

B. Analyse protéomique sans *a priori*

L'utilisation d'approches sans *a priori* permet, grâce à la spectrométrie de masse, d'étudier l'ensemble de l'échantillon dans le but d'identifier le plus grand nombre possible de protéines^{167,168} en une seule analyse. Parmi les différentes approches *sans a priori*, on distingue la Data dependent Acquisition (DDA) (Figure 23) et la Data Independent Acquisition (DIA).

Le mode d'acquisition DDA est une analyse LC-MS/MS haute résolution. À chaque instant de la séparation chromatographique, un spectre de masse exacte est enregistré. L'appareil enregistre dans un second temps des spectres de fragmentation individuels des *n* précurseurs les plus intenses : on parle de Top *n*. Généralement, les analyses réalisées sont en Top 10 à Top 20. Ces spectres de fragmentation expérimentaux sont alors compilés dans des bases de

données et comparés à des spectres théoriques. Cela permet alors de remonter à l'identification de ces protéines grâce à des algorithmes de recherche.

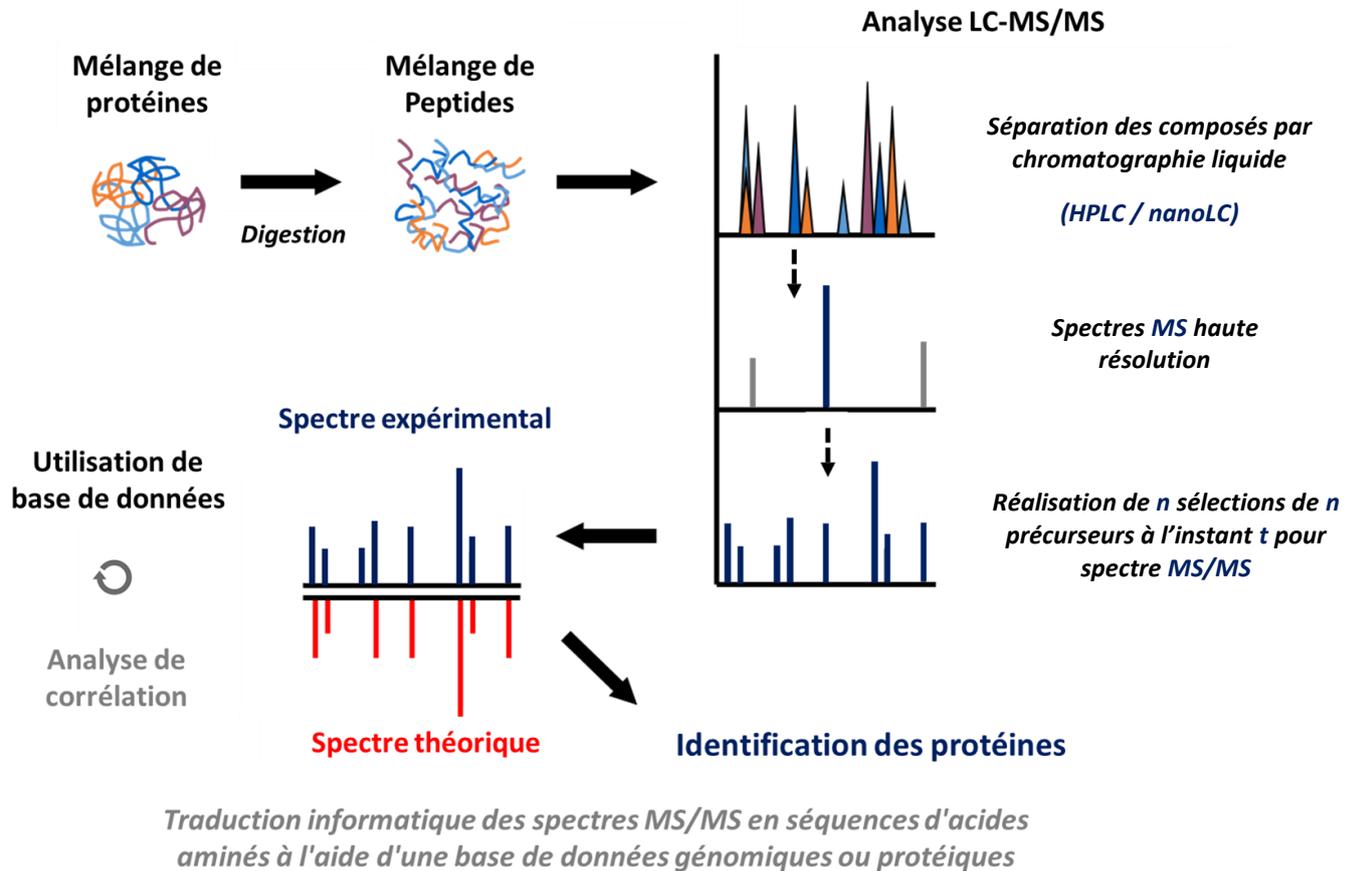


Figure 23 : Principe de l'approche "Shotgun" selon le mode DDA (Data Dependent Acquisition). On réalise une analyse LC-MS/MS à partir d'un mélange de peptides rapporteurs issu de la digestion des protéines par une enzyme. À chaque instant de la séparation chromatographique, un spectre de masse est effectué, ainsi qu'un spectre secondaire sur les fragments des n précurseurs les plus intenses ; on parle de Top n . Ces spectres de fragmentation expérimentaux sont alors compilés dans des bases de données afin d'obtenir une identification des protéines.

Un second mode d'acquisition est disponible, le DIA (Figure 24) (Data Independent Acquisition). Contrairement au mode DDA, la fragmentation des peptides est alors réalisée sans sélection précise des précurseurs mais par la réalisation de multiples fenêtres de détection. Le mode d'acquisition DIA est aussi retrouvée sous l'appellation SWATH (Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment ions), développée par Gillet et al. En SWATH, les données MS/MS sont enregistrées sur des plages de masse de précurseurs consécutives pour couvrir une gamme de masse souhaitée. L'utilisation de cette approche permet de limiter la perte d'information qui survient lors de la sélection des précurseurs, car

l'intégralité des précurseurs est fragmentée, et non pas seulement les n plus intenses. Cela permet donc d'obtenir une meilleure couverture analytique et une identification d'un maximum de protéines. En revanche, les spectres de fragmentation ainsi générés sont bien plus complexes car ils correspondent à un mélange de tous les composés présents dans la fenêtre de détection. Des algorithmes poussés sont nécessaires pour le retraitement de ces spectres complexes, avec de récentes innovations *via* l'utilisation d'intelligence artificielle permettant une analyse de plus en plus exhaustive.

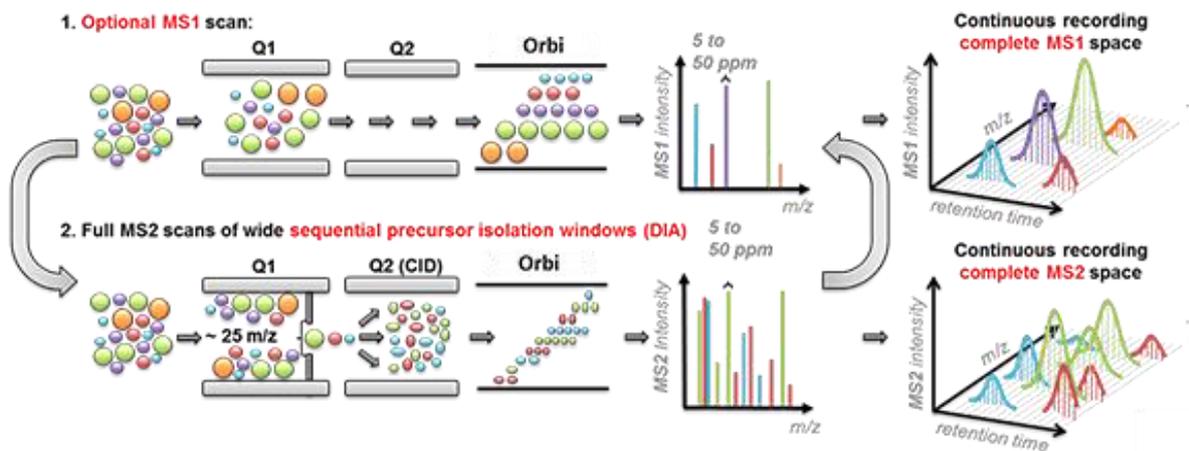


Figure 24 : Principe d'acquisition de la DIA. D'après Ludwig et al., Mol Sys Biol 2018.

Les mélanges complexes peuvent générer un grand nombre de peptides. Il est indispensable d'utiliser dans une approche de type shotgun un spectromètre de masse capable de fournir une discrimination des masses exactes la plus fine possible. C'est pourquoi les spectromètres en tandem avec un analyseur haute résolution (Q-TOF : *Quadripôle – Time of flight*, ou Q-Orbitrap) sont utilisés. Ces appareils fournissent une précision de mesure de l'ordre du ppm, permettant la discrimination de 99 % des peptides qui présentent la même masse nominale mais de composition différente en acides aminés.

La DIA est une approche sans *a priori* permettant l'acquisition d'un grand nombre d'informations sur le contenu de l'échantillon. De plus, il est possible d'analyser *a posteriori* des échantillons en interrogeant à nouveau les bases de données mises à jour, parfois des années plus tard, ce qui est impossible en mode ciblé. Il existe toutefois certaines limitations à l'approche : celle-ci demande généralement des temps de gradient longs pour permettre de séparer au maximum les composés présents dans l'échantillon. La gamme dynamique de concentration analysable avec un Orbitrap en mode sans *a priori* est de l'ordre de 2 à 4

décades, ce qui reste plutôt faible en comparaison aux 4 à 6 décades atteignables en MRM (Multiple Reaction Monitoring) avec un triple quadripôle (QQQ). Cet aspect peut être problématique lors de l'analyse d'échantillons complexes, où des composés de la matrice très intenses peuvent masquer des protéines d'intérêt de très faible intensité. La dernière limitation provient du fait que l'ensemble de l'analyse dépend des bases de données et des spectres de référence pour l'identification des protéines. La présence de variants, d'organismes mal ou non séquencés, entrainera une identification partielle, voire erronée. Pour ces problématiques les approches de protéogénomiques, se révèlent être les plus adaptées.

C. Approche ciblée

Par opposition aux méthodes sans *a priori* (Shotgun proteomics) où l'on se focalise sur une détection la plus exhaustive possible des protéines présentes dans l'échantillon, la spectrométrie de masse ciblée a pour but de suivre quelques protéines d'intérêt avec une grande sensibilité, reproductibilité et spécificité. De plus, les méthodes ciblées permettent de créer simplement des approches quantitatives pour de multiples protéines sur une grande gamme dynamique de concentrations.

Cependant, les approches ciblées sont des méthodes avec *a priori* pour lesquelles l'analyste doit faire un choix des composés qu'il souhaite suivre. De ce fait, elle est aussi très dépendante de l'information contenue dans les bases de données nécessaires à sa construction. Une séquence protéique incomplète, ou erronée, entrainera une sélection inadaptée des peptides candidats. La quantification des protéines requiert également un choix judicieux des peptides pour permettre une analyse juste et robuste.

Différentes géométries de spectrométries de masse permettent d'effectuer des approches ciblées. La géométrie de type triples quadripôles (QQQ) est encore à ce jour la référence pour la quantification de protéines. Ils s'avèrent particulièrement adaptés pour la réalisation d'approches ciblées car l'objectif est d'analyser ici des transitions et non des spectres complexes. Par ailleurs, ce sont des appareils robustes et peu coûteux (en comparaison avec des analyseurs haute résolution). Ils permettent, *via* différents modes d'acquisition, de couvrir un panel varié d'analyses. Les appareils haute résolution (Q-Orbitrap et Q-TOF), *via* le mode

d'acquisition PRM (Parallel Reaction Monitoring), sont de plus en plus utilisés pour la réalisation d'analyses ciblées rivalisant avec les capacités des triples quadripôles. Le mode d'acquisition privilégié pour la réalisation d'analyses quantitatives^{169,170} avec un triple quadripôle est le mode SRM (Selected Reaction Monitoring)^{171,172} ou MRM. Les deux appellations désignent le même mode d'acquisition, et le terme « MRM » sera privilégié pour la suite de ce manuscrit.

1. Modes d'acquisitions : MRM / PRM

Les deux modes d'acquisition (MRM/PRM) (Figure 25) sont fortement utilisés pour les analyses en protéomique et appliqués à de multiples domaines⁷¹. Ce sont les références pour le dosage ciblé de protéines en spectrométrie de masse. Pour les 2 approches, la première étape consiste en la sélection de l'ion précurseur (ion parent) d'intérêt par le 1^{er} quadripôle, agissant en filtre des cibles choisies. Dans un second temps, l'ion parent est fragmenté dans le quadripôle n°2 en un ensemble d'ions fils spécifiques. Pour rappel, le couple ion parent/ ion fils est appelé transition. La distinction entre la MRM et la PRM se situe après l'étape de fragmentation.

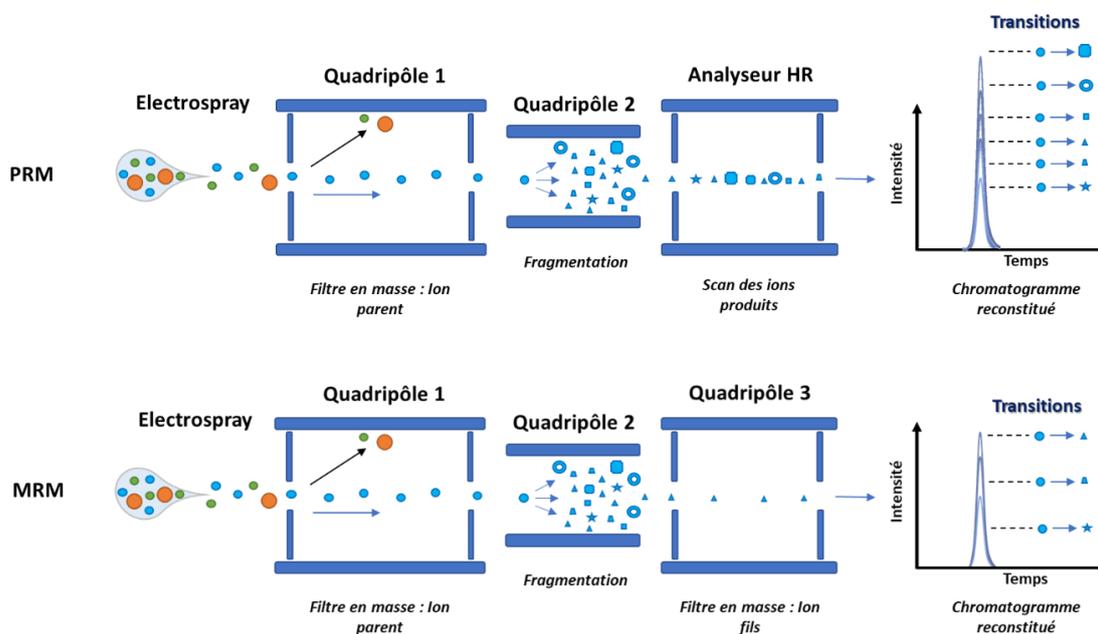


Figure 25 : Représentation schématique d'une analyse en mode MRM et PRM. Dans les deux cas, les composés ioniques désolvatés au niveau de l'électrospray sont, dans un premier temps, filtrés par le premier quadripôle. Cela permet de sélectionner l'ion parent que l'on souhaite détecter. Les ions sont alors guidés dans un second quadripôle utilisé comme une cellule de collision (accélération des ions et collision avec gaz inerte) où ils sont fragmentés (création d'ions fils). Dans le cas de la PRM, un spectre de fragmentation haute résolution est réalisé, permettant l'analyse de l'ensemble des fragments du peptide. Dans le cas de la MRM, certains ions fils sont alors filtrés successivement dans le troisième quadripôle. On obtient alors un chromatogramme reconstitué avec les différentes transitions (couple ion parent / ion fils) suivies.

Dans le cas de la MRM, le dernier quadripôle filtre un nombre choisi de fragments (3) qui seront analysés. *A contrario* pour la PRM, l'utilisation d'un analyseur haute résolution (Orbitrap- TOF) permet l'analyse de l'ensemble des fragments du précurseur.

Dans les matrices complexe, la présence d'un grand nombre de peptides engendre une multitude d'interférences possibles ce qui peut entraîner des erreurs d'identification. Le suivi de plusieurs transitions par peptide limite ces possibilités d'erreurs, et donc augmente la spécificité de la méthode. Le nombre de transitions suivies pour un composé varie selon les études. Dans le tutoriel de Lange et al.¹⁷³, il est conseillé d'utiliser au minimum 3 transitions pour confirmer la présence du peptide dans un échantillon complexe. Suivre un plus grand nombre de transitions augmentera la spécificité de la méthode pour ce composé. Dans le cadre du mode PRM, l'ensemble des transitions est analysé, ce qui fait que la PRM est le mode ayant la plus grande spécificité intrinsèque. Il serait possible théoriquement de suivre l'ensemble des fragments en MRM, cependant cela impactera la capacité en multiplexage de la méthode. Le mode d'acquisition permet une approche quantitative hautement sélective sur une large gamme dynamique de concentration, et a fait ses preuves récemment dans le dosage de divers mécanismes de résistance¹⁷⁴. Les deux modes procurent une sensibilité très importante, légèrement supérieure pour la MRM, mais compensée par la plus haute sélectivité de la PRM pouvant abaisser les limites de quantification en dessous de celles atteintes en MRM.

2. Multiplexage en mode MRM

Les méthodes d'analyse ciblées sont tout de même limitées dans le nombre de composés suivis en une seule analyse (capacité de multiplexage). En général, il est possible de suivre simultanément 100 à 150 transitions dans une analyse MRM. La capacité de multiplexage dépend de la vitesse d'acquisition du spectromètre de masse et de différents paramètres comme le *dwell time* et le temps de cycle. Le *dwell time* correspond au temps alloué au spectromètre de masse pour le suivi d'une transition. Dans une certaine limite, plus la valeur du *dwell time* sera grande, plus le rapport signal sur bruit (S/B) sera important, et par conséquent plus la sensibilité sera grande. Les valeurs du *dwell time* généralement observées sont de l'ordre de 5 à 100 ms selon les applications.

Le temps de cycle correspond au temps nécessaire pour le suivi de l'ensemble des transitions

enregistrées à un temps t . Plus le temps de cycle est faible, plus grand est le nombre de points d'acquisition pour définir le pic chromatographique associé à une transition. En général, la largeur d'un pic chromatographique est comprise entre 10 et 30 s. Dans une approche quantitative, le nombre minimum de points d'acquisition nécessaires est compris entre 10 et 12, ce qui impose un temps de cycle compris entre 1 et 3 secondes. À cela est rajouté un temps appelé *inter-scan* (généralement compris entre 1 et 4 ms). C'est le temps nécessaire à l'instrument pour vider le deuxième quadripôle entre deux transitions MRM.

$$\text{Temps de cycle} = \text{Nombres de transitions} \times (\text{Dwell time} + \text{Inter scan time})$$

↓
↓
↓
↓

Le plus court possible
Dépend des conditions chromatographiques

Valeur fixe
Dépend du nombre de peptides suivis dans la méthode

Le plus long possible
En accord avec les autres paramètres

Valeur fixe

L'optimisation d'une analyse LC-MRM requiert de trouver un juste équilibre entre le *dwell time*, le temps de cycle, et le nombre de transitions analysées. (Figure 26)

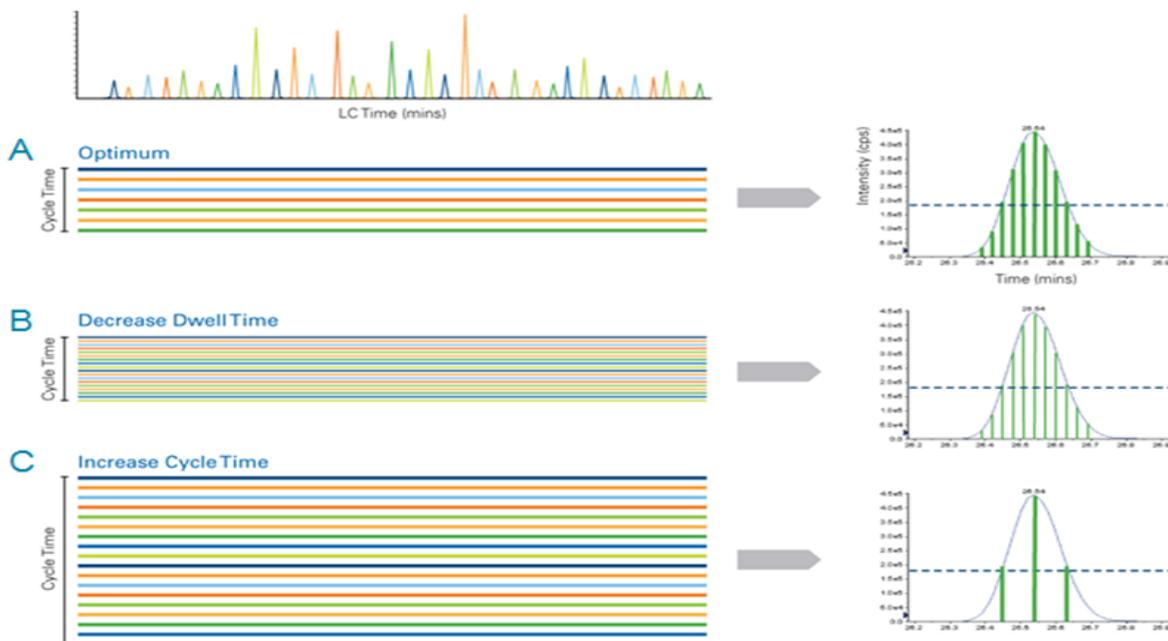


Figure 26 : A) En MRM classique, les transitions sont suivies sur l'ensemble de la séparation chromatographique, avec un temps de cycle et un dwell time fixés. Cela permet la bonne description du pic LC (à droite). La largeur des barres vertes indique le dwell time et l'espace entre deux barres vertes représente le temps de cycle de la méthode. B) Cas où la capacité de multiplexage est augmentée en réduisant le dwell time. Le pic LC est toujours bien décrit mais le temps passé à suivre le composé est plus faible (ligne verte plus mince), ce qui entraîne un rapport signal/bruit (S/B) plus faible. C) La quantité de transitions suivies est multipliée par 3 ce qui entraîne une augmentation du temps de cycle, et le pic LC n'est plus défini que par 3 points. D'après Christie Hunter, SCIEX, USA The Scheduled MRM™ Algorithm Pro.

Le cas A décrit une situation optimale où un nombre de transitions (barres multicolores) limité va être suivie, avec un temps de cycle permettant la description du pic chromatographique par 12 points de mesure (nombres de barres vertes sous le pic chromatographique). Dans ce cas, le *dwell time* est adapté et permet une accumulation du signal sur une grande partie du pic chromatographique (largeur des barres vertes), ce qui se traduira par un rapport signal sur bruit conséquent. En revanche, si l'on veut pour la même analyse augmenter le nombre de transition suivies (B) sans perdre de points de mesure, alors le *dwell time* sera diminué, entraînant une perte de rapport S/B. Dans le cas où l'on ne voudrait pas perdre de rapport S/B pour suivre l'ensemble des composés, il sera nécessaire d'augmenter le temps de cycle (C), ce qui réduira le nombre de points de mesure pour un pic chromatographique (dans l'exemple en C, ce nombre de points serait réduit à 3). En revanche, une réduction du nombre de points par pic entraîne un biais dans la quantification des composés d'intérêt (Figure 27). L'ajustement de ces paramètres est un compromis à réaliser en fonction des objectifs de la méthode.

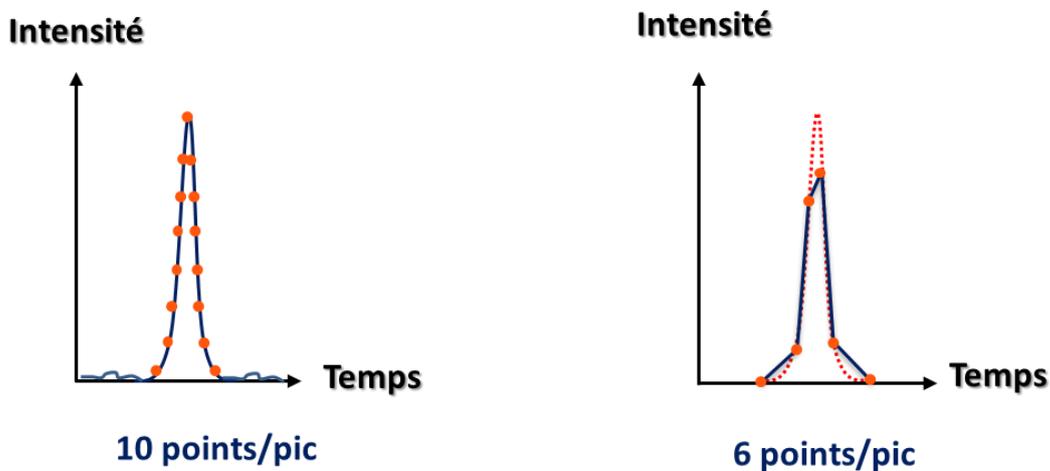


Figure 27 : Exemple de cas de figures pour une analyse avec 10 points par pic chromatographique à gauche et 6 points par pic à droite. En pointillé, est représenté l'aire déterminé lors de l'analyse avec 10 points par pic. Une différence significative entre les deux expériences est observable.

3. Mode acquisition MRM par fenêtres de temps de rétention

Dans une méthode MRM classique, le temps de cycle est de l'ordre d'une seconde avec un *dwell time* de 5 ms, ce qui permet de suivre 120 transitions en une seule analyse. Afin d'être suffisamment spécifique, 3 transitions par peptide au minimum sont suivies, ce qui permet d'analyser 40 protéines cibles par analyse. Afin de couvrir le grand nombre de facteurs

d'intérêt nécessaires pour une caractérisation de souches bactériennes, il est crucial d'augmenter cette capacité de multiplexage. Avec l'arrivée d'instruments plus rapides et *via* le développement de modes d'acquisition innovants (Scheduled-MRM, Scout-MRM), la capacité de multiplexage peut être augmentée significativement (Figure 28).

Le mode MRM par fenêtre de temps de rétention (Scheduled-MRM). Pour la suite du manuscrit, la dénomination « MRM par fenêtre de temps de rétention » sera simplifiée en « scheduled ». La scheduled consiste en l'enregistrement des signaux des transitions seulement dans une fenêtre de temps autour de son temps de rétention.

Par exemple, les trois transitions du premier peptide élué, illustrées en Figure 28 (transitions en bleu, violet et rouge), ne sont enregistrées que sur une fenêtre de temps court encadrant son temps de rétention. Le nombre total de transitions suivies dans l'analyse est augmenté. Cette approche permet d'augmenter la sensibilité par l'augmentation du *dwell time* et la diminution du temps de cycle.

Cependant, l'utilisation de cette approche oblige à connaître les temps de rétention de chacun des composés, à obtenir des conditions séparatives répétables et donc à avoir une méthode très robuste. En effet, cette approche est sensible aux variations de pression, de débit, de température de la colonne et de volume mort de l'appareil, qui impactent les temps de rétention. Un décalage suffisant des temps de rétention pour que le composé ne soit plus compris dans sa fenêtre de détection entrainera la non-détection du composé.

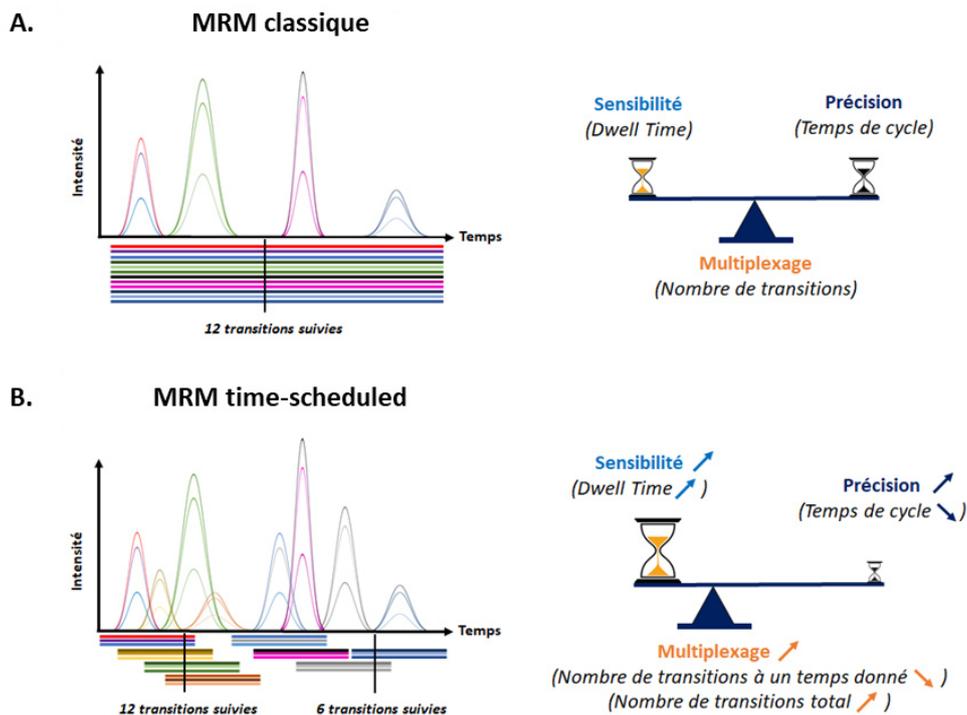


Figure 28 : Comparaison entre la MRM classique et la MRM « Scheduled ». Dans le schéma classique, chaque transition est suivie sur l'ensemble de l'analyse. Cela entraîne une balance entre sensibilité, multiplexage et précision. Dans le cas de la Scheduled, chaque transition n'est suivie que sur une fenêtre de temps, ce qui permet de déséquilibrer la balance, offrant un gain global dans les trois paramètres.

L'utilisation de telles méthodes a permis la réalisation de multiplexes très importants^{175,176}, comme l'analyse de 2400 transitions en une seule analyse scheduled MRM, ou encore la caractérisation de 500 peptides issus d'un lysat de levures par PRM.

D. La quantification

Les approches MRM sont adaptées pour la quantification des protéines dans des matrices biologiques au regard de leur robustesse, sensibilité et capacité de multiplexage. Mais la complexité des échantillons, la grande gamme dynamique de concentrations et les fortes variations possibles d'expression inter échantillons font que l'obtention de ces informations reste un défi. Chaque méthode requiert une optimisation et une adaptation en fonction de la nature de l'échantillon, du nombre de protéines d'intérêts ainsi que du coût et du temps.

Majoritairement, 2 types de quantifications en protéomique ciblée sont retrouvées : la quantification absolue et relative. La quantification absolue a pour objectif de déterminer la

quantité précise des protéines dans l'échantillon. La quantification relative permet de comparer l'expression des différents marqueurs d'intérêts entre plusieurs échantillons à un échantillon de référence. Pour réaliser ces méthodes de quantifications, de nombreuses stratégies peuvent être mises en place, séparées en deux familles : avec ou sans marquage. (Figure 29)

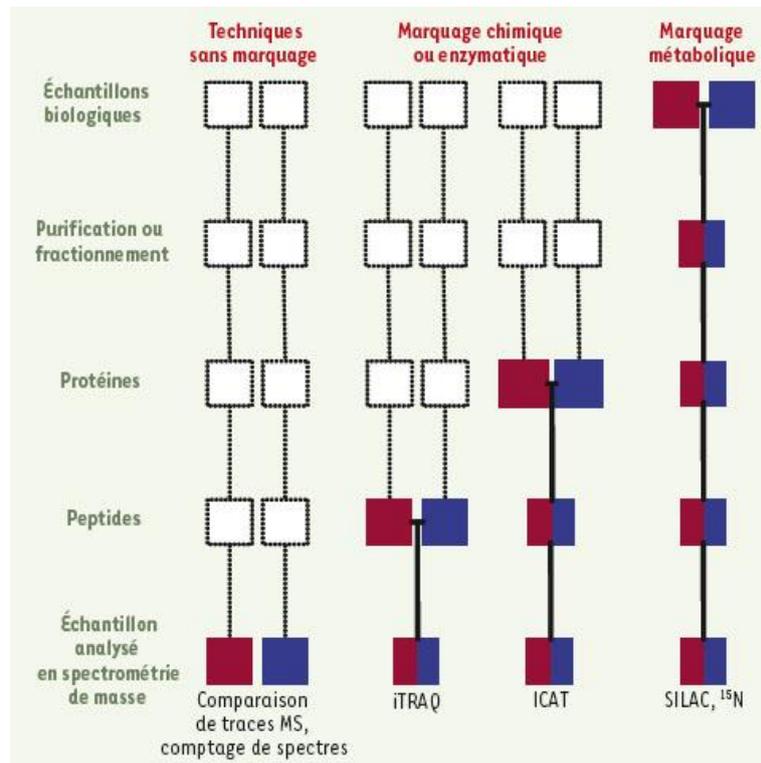


Figure 29: Stratégie de quantification en protéomique. Le bleu et le rouge correspondent aux deux échantillons à comparer. Les lignes pleines représentent le stade où les échantillons sont combinés. Lors d'une ligne pointillée, le traitement est fait en parallèle et des erreurs de quantification peuvent être introduites. SILAC: stable isotope labelling by amino acids in cell culture; ICAT: isotope coded affinity tags; iTRAQ: isobaric tag for relative and absolute quantification.

1. La quantification par marquage d'isotope

La majorité des techniques de protéomique quantitative avec marquage utilisent des isotopes stables pour une analyse différentielle. Pour comparer deux échantillons, les protéines de l'un sont marquées avec des isotopes lourds (protéines « lourdes ») alors que les protéines du deuxième échantillon sont marquées avec des isotopes légers (protéines « légères »). L'analyse en spectrométrie de masse permet de repérer des paires de peptides lourds et légers, car les propriétés physico-chimiques restent sensiblement les mêmes, seule la masse change.

De nombreuses méthodes de quantification par marquage d'isotopes sont possibles. Les 3 qui sont principalement rencontrées sont SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture), ITRAQ (Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification) et ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) (Figure 29).

Chaque méthode est unique et intervient à différents stades de l'analyse, ce qui engendre des avantages et des inconvénients. Toutefois, plus le marquage est introduit de façon précoce dans la préparation, plus les erreurs liées à la préparation seront faibles.

Pour la technique SILAC, l'étape de marquage a lieu lors de la culture des cellules où l'une des populations sera en présence de nutriments marqués par des isotopes lourds stables (^{15}N ou ^{13}C). Cette méthode a l'avantage d'être extrêmement précise mais demande une préparation en amont longue et coûteuse. De plus, il ne sera pas aisé de comparer plusieurs échantillons.

Dans le cas du marquage iTRAQ, il est possible d'identifier et de quantifier des protéines in vitro dans quatre échantillons différents par MS/MS. Le marquage intervient au niveau des peptides qui sont marqués avec une molécule tag, comportant plus ou moins d'isotopes lourds stables en fonction des échantillons à comparer.

La dernière possibilité est de marquer directement les protéines, afin de prendre en compte les étapes de digestion enzymatique (ICAT).

La quantification absolue est beaucoup plus sensible et précise que les stratégies dites globales. L'utilisation de standards permet aussi de corriger de possibles biais techniques ainsi que d'assurer une bonne reproductibilité. Malheureusement, ces genres d'approches sont extrêmement coûteuses et elles limitent le multiplexage de la méthode, car l'ensemble des transitions s'en retrouve dupliquées. Elles requièrent un développement de méthode très long, une manipulation fastidieuse ainsi qu'une rigueur importante lors de son exécution. De plus, une forte variation de niveau d'expression entre les différents facteurs d'intérêts entraîne des biais, car la méthode requiert que les concentrations de standards ajoutées soient similaires aux concentrations de l'analyte à doser. Ce type d'approche n'est donc pas adapté au milieu clinique dans la caractérisation de souches bactériennes.

2. Quantification absolue des protéines (AQUA)

La méthode AQUA (Absolute quantification) consiste à rajouter dans l'échantillon, après la digestion enzymatique, une quantité connue de peptide d'intérêt synthétique marqué avec des isotopes lourds (^{13}C ou ^{15}N) analogues au peptide endogène. Comme dans les méthodes avec marquage, les peptides marqués auront les mêmes propriétés physico-chimiques et ne vont différer que par leurs masses. Cela permet de remonter facilement à la quantité réelle du peptide et donc de la protéine dans l'échantillon. Cependant, ce genre d'approche est extrêmement coûteuse, car elle nécessite l'ajout de peptides lourds de synthèse à chaque analyse, à des concentrations parfaitement définies. Cela entraîne une manipulation fastidieuse et une rigueur importante lors de son exécution. Par ailleurs, leur utilisation limite le multiplexage de la méthode, car l'ensemble des transitions s'en retrouve dupliqué. De plus, une forte variation de niveau d'expression entre les différents facteurs d'intérêts entraîne des biais, car la méthode requiert que les concentrations de standards ajoutés soient similaires aux concentrations de l'analyte à doser.

3. La quantification Label free

Les techniques de quantification label free (sans marquage)¹⁵⁹ sont des méthodes bien moins contraignantes tant dans leur mise en place que dans leur utilisation. Elles permettent de comparer un nombre infini d'échantillons, quelle que soit leur nature. Elles incluent les techniques d'électrophorèse sur gel 2D, le spectral count (comptage des spectre MS/MS) et la comparaison de traces MS. Le gel 2D est une méthode très résolutive, mais difficilement adaptable pour de multiples cibles dans une stratégie analytique de haut débit.

La technique la plus utilisée reste la comparaison de traces. Elle consiste à comparer la quantité relative d'un peptide dans un échantillon par rapport à l'autre. Théoriquement, l'intensité d'un peptide P dans un échantillon A est proportionnelle à sa quantité réelle¹⁷⁷. Alors, dans un échantillon B, l'intensité du même peptide P est toujours proportionnelle à sa quantité réelle. Si les paramètres du spectromètre de masse et de la chromatographie sont identiques, on peut comparer les intensités du peptide P dans les 2 échantillons et en déduire une quantité relative. De ce fait, il est possible d'avoir des échantillons de référence qui permettent d'établir une base d'expression, et ainsi permettre une comparaison précise dans le niveau d'expression d'une protéine.

Il faut toutefois utiliser cette méthode de quantification avec précaution et avoir conscience de ses limites. Tout d'abord, dans le cas d'une expression très faible (proche de la limite de détection), l'erreur sur la quantité relative sera importante. Ensuite, la composition globale de l'échantillon a elle aussi son importance. Si l'échantillon A est considéré comme trop riche (forte expression de multiples protéines), on peut observer des phénomènes de compétition à l'ionisation (perte d'intensité pour certains ions), alors que dans l'échantillon B, considéré comme pauvre, le signal du peptide ne sera pas influencé. De plus, il est possible d'observer des modifications chimiques de certains acides aminés, comme l'oxydation des méthionines. Le ratio entre les formes oxydés et non oxydés peut varier, ce qui entraîne un biais dans la quantification, ou force le suivi des deux formes présentes. Ce point est crucial et c'est pourquoi, dans la création de méthodes, le choix des peptides demande une attention particulière.

Les paramètres de l'appareil et la préparation de l'échantillon influencent aussi les intensités des différentes transitions : il faut donc s'assurer de travailler avec un système et des paramètres identiques afin de pouvoir comparer deux échantillons. Il est nécessaire, lors de la mise en place de ce type d'approche, d'évaluer l'ensemble des paramètres pouvant impacter l'analyse, afin de connaître la précision de la comparaison. La robustesse est donc primordiale dans une quantification relative.

La quantification relative est parfaite pour comparer l'expression de certaines protéines entre deux échantillons au-delà d'un facteur 2 ; en revanche, il sera plus délicat de discriminer de plus fines différences ¹⁷⁸.

4. Fragmentation peptidique

Un peptide est constitué par un enchaînement d'acides aminés liés entre eux par une liaison amide. Par défaut, la séquence d'un peptide est donnée de l'extrémité N-terminale (fonction amine libre) à l'extrémité C-terminale (fonction acide carboxylique libre). L'appellation du fragment détecté va être fonction du lieu de rupture au niveau de la liaison peptidique, de la localisation de la charge et du nombre d'acides aminés restants, comme le montre la Figure 30 P. Roepstorff et J. Fohlman ont proposé cette nomenclature qui a été modifiée par la suite par K. Biemann en 1988.

Les fragments sont classés en fonction de la présence de l'extrémité N-terminale ou C-terminale :

- Les ions fragments des séries a, b et c qui vont porter une charge du côté N-terminal
- Les ions fragments des séries x, y et z qui vont porter une charge du côté C-terminal

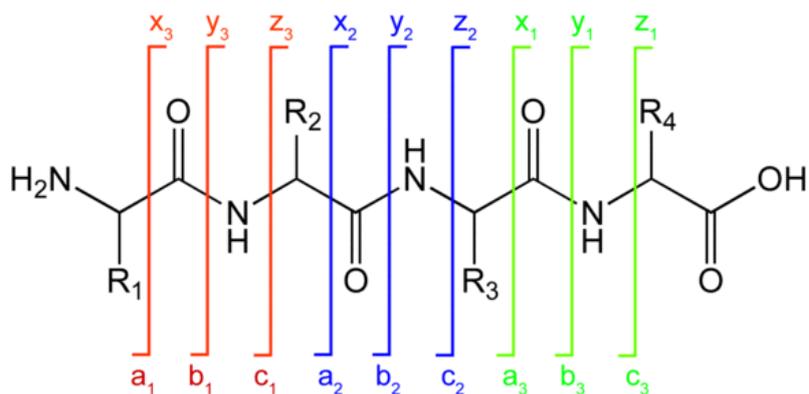


Figure 30 : Schéma représentant la nomenclature des fragments peptidiques. On retrouve une chaîne de 4 acides aminés avec les localisations des possibles fragmentations en rouge, bleu et vert. Les groupements R₁, R₂, R₃, R₄ représentent les chaînes latérales des différents acides aminés.

En dissociation induite par collisions à faible énergie (CID), les ions b et y sont générés principalement. Les ions fragments c et z sont obtenus en ETD (transfert d'électron dissociatif) ou ECD sur des appareillages de type haute résolution.

En CID, les ions parents (peptidiques) sont accélérés dans la cellule de collision afin de rentrer en collision avec un gaz inerte (généralement de l'azote, ou de l'hélium). Chaque occurrence de collision entraîne une élévation de l'énergie interne de l'ion, ce qui engendre une délocalisation d'un proton mobile le long de la chaîne peptidique.

Les mécanismes de fragmentation des peptides ont beaucoup été étudiés par les groupes de Gaskell, Boyd et Wysocki. Pour expliquer les fragments obtenus, le modèle du proton mobile a été retenu. En effet, les protons vont préférentiellement se placer au niveau des sites les plus basiques, à savoir les résidus des acides aminés des chaînes latérales histidine, arginine et lysine, au niveau des amines en position N-term ou sur les liaisons peptidiques. Après collision, les protons vont se déplacer le long du squelette peptidique, engendrant des ruptures au niveau des groupements amides produisant les ions b et y. Ces ions sont

majoritairement obtenus en CID.

Une grande quantité d'énergie est nécessaire pour délocaliser cette charge : c'est pourquoi les ions monochargés seront rarement privilégiés comme précurseurs, afin de faciliter la fragmentation.

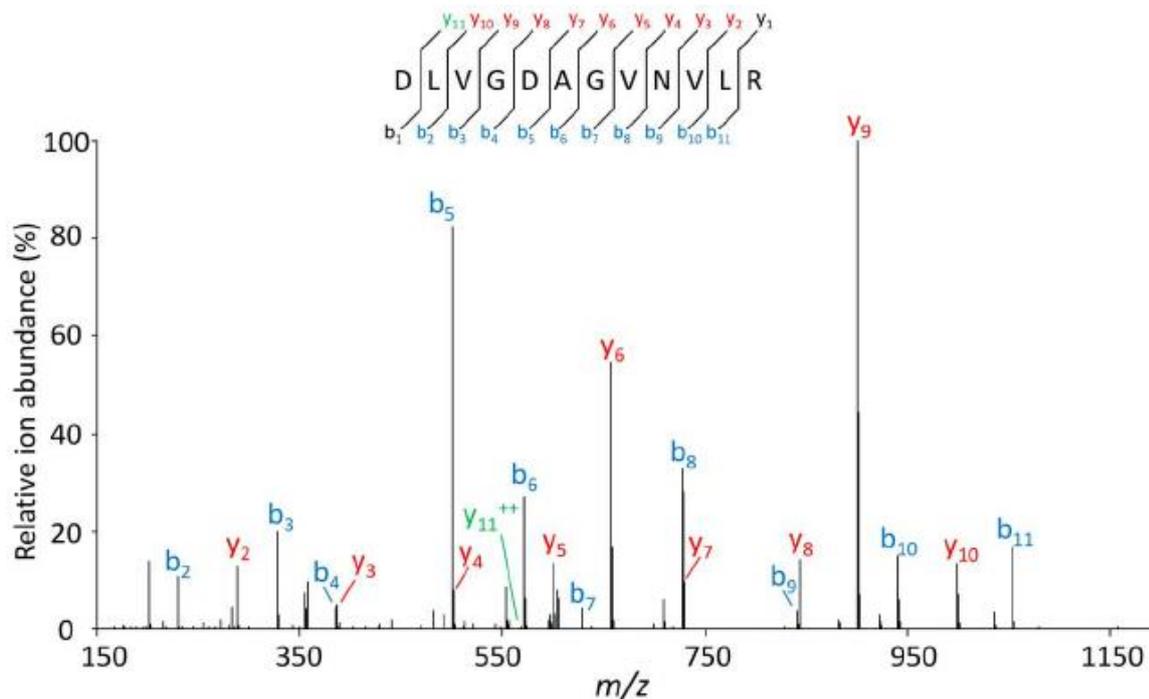


Figure 31 : Exemple d'un spectre de fragmentation du peptide DLVGDAGVNVLR. En bleu les fragments de type b, en rouge les fragments de type y et en vert la présence d'un fragment y dichargé.

En effet, dans le cas d'un peptide doublement protoné, on retrouvera généralement les charges sur les fonctions amines en position N-terminale du peptide et sur des résidus K et R. Dans ce cas il est plus facile de fragmenter le peptide, car le proton situé sur la fonction amine N-terminal est bien plus facilement transférable. Selon le modèle du proton mobile, c'est la liaison amide qui rompra préférentiellement. L'exemple du peptide DLVGDAGVNVLR de la Figure 31 montre l'ensemble des fragments identifiés lors d'une analyse MS/MS. Majoritairement, ce sont les ions fragments monochargés de type y ou b qui se retrouvent sur le spectre.

La trypsine, lors de la digestion des protéines, permet de générer des peptides dont le dernier acide aminé est la lysine ou l'arginine, assurant ainsi la présence d'un résidu basique dans chacun des peptides analysés.

On préférera généralement les précurseurs doublement protonés lors du choix des peptides. Cependant, en fonction de la taille du peptide et de la présence d'une proline dans la chaîne peptidique la forme majoritaire du précurseur peut être la forme triplement protonée.

E. Application à la microbiologie

Plusieurs études ont été publiées ces dernières années mettant en jeu des approches de protéomique globale (non ciblées) ou ciblées en vue d'applications en lien avec les infections bactériennes. Les différentes études se concentrent majoritairement sur l'identification des mécanismes de résistance, ainsi que sur l'identification bactérienne.

1. Approches sans *a priori*

Les différentes études sans *a priori* dédiées à la microbiologie sont majoritairement réalisées à l'aide de spectromètres de masse haute résolution (Q-Tof, ou Q-orbitrap), couplées avec de la nano-LC pour accroître la sensibilité de l'approche. Dans certains cas, des spectromètres basse résolution comme des trappes à ions peuvent également être utilisés.

Dans une étude publiée par Chang et al.¹⁷⁹, les auteurs ont développé une approche rapide et précise pour l'identification de souches d'*Acinetobacter baumannii* résistantes aux bêta-lactames. L'approche a été testée sur 23 souches cliniques.

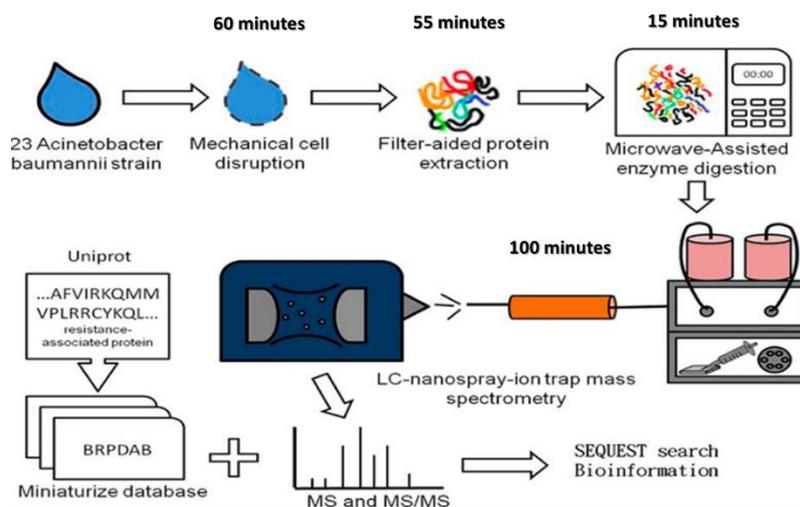


Figure 32: Figure récapitulative de l'approche développée par Chang et al. Diagnosis of β -Lactam Resistance in *Acinetobacter baumannii* Using Shotgun Proteomics and LC-Nano-Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry

La préparation d'échantillons mise en place comprend une lyse mécanique suivie d'une

filtration (60 minutes). Dans un second temps, les protéines sont dénaturées (55 minutes) avant d'être digérées très rapidement (15 minutes) par un système assisté par micro-onde. L'analyse est réalisée en 100 minutes par un appareil basse résolution LCQ Ion Trap en DDA, sur les 4 ions les plus intenses. L'approche couplée à des outils de bio-informatique permet de mettre en évidence la présence de protéines rapporteuses de mécanismes de résistance, comme les bêta-lactamases, incluant AmpC. L'objectif de l'approche est de fournir une nouvelle plateforme pour le diagnostic rapide des souches résistantes pouvant être utiles à la mise en place d'un traitement médical adapté. Cependant, les auteurs mettent en avant la problématique du temps total de l'approche qui demeure trop longue (6 h) pour le diagnostic médical en routine. De plus, la création d'une base de données spécifique aux éléments recherchés engendrerait une amélioration du retraitement des données.

Récemment, Karlson et al.¹⁸⁰ ont mis en place une méthode de découverte de peptides spécifiques de 4 espèces bactériennes impliqués dans les infections des voies respiratoires. Cette méthode emploie la nano-LC couplée à la MS/MS haute résolution, avec un pipeline bio-informatique et une base de données interne de séquences de génome de référence de haute qualité, afin d'identifier des peptides uniques à chaque espèce (*Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*). La préparation d'échantillons est simple mais très longue avec une digestion enzymatique sur 8 h à 37°C à laquelle se rajoute un gradient d'analyse de 60 minutes. Cette approche a permis de mettre en évidence des biomarqueurs spécifiques lors de l'analyse de cultures pures de souches de référence (Figure 33 – Exemple de peptides spécifiques à *S. aureus*).

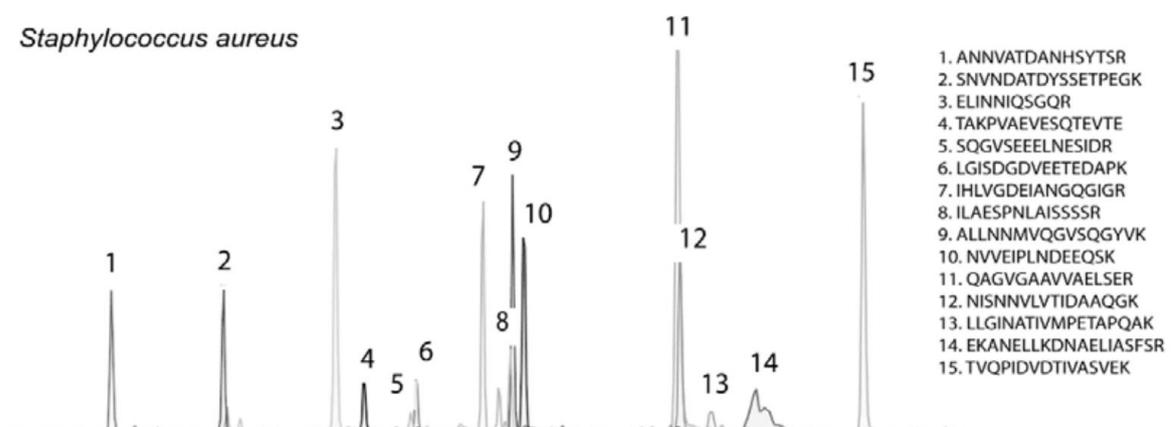


Figure 33 : Chromatogramme reconstitué des peptides spécifiques à *S. aureus*. D'après : *Discovery of species-unique peptide biomarkers of bacterial pathogens by tandem mass spectrometry-based proteotyping.*

Dans un second temps, les auteurs ont utilisé ces peptides uniques en condition clinique par une approche PRM. La preuve de concept valide le protéotypage des agents pathogènes démontrant leur potentiel pour le diagnostic clinique.

Ces deux exemples montrent bien que l'approche sans *a priori* est adaptée pour l'identification bactérienne ainsi que pour la caractérisation de la résistance aux antibiotiques. Malgré les efforts déployés au niveau de la réduction du temps de préparation des échantillons bactériens, le temps d'analyse requis pour l'obtention de l'identification, du virulome et du profil de résistances n'est pas adapté pour des études cliniques en routine à l'hôpital. En cause, une digestion et préparation d'échantillons conséquente nécessaire pour permettre une sensibilité adéquate, et un retraitement des données très complexe demandant du temps.

2. La protéomique sans *a priori* conjointe à l'analyse ciblée

Les approches sans *a priori* permettent d'obtenir l'information essentielle permettant la caractérisation de souches : les peptides signatures correspondant aux protéines d'intérêts. Cette information est la base de toute étude ciblée ; c'est d'ailleurs pourquoi une utilisation conjointe des deux techniques est très souvent utilisée, comme on peut le voir dans les études de Strich¹⁷⁴ et al et Roux Dalvai et al¹⁶⁴.

Stritch et al. ont réalisé dans un premier temps une analyse *in-silico* afin de déterminer des peptides caractéristiques de la famille des Oxa-48 (carbapénémases). Cette première étape a permis de mettre en évidence 21 peptides potentiels dont 5 étant communs à l'ensemble des

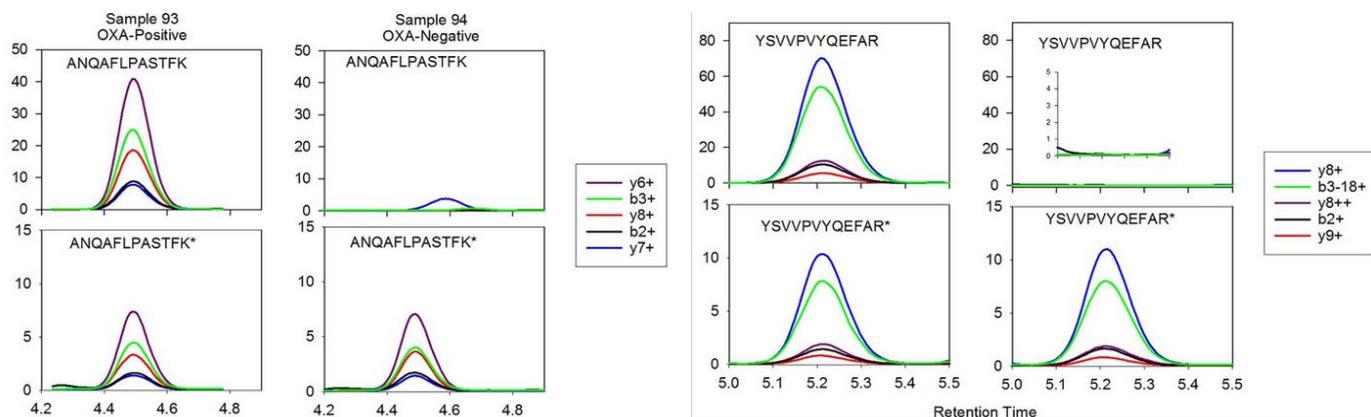


Figure 34 : Chromatogramme LC-MS/MS des échantillons positifs (93) et négatifs(94) des deux peptides pour l'OXA. La ligne supérieure de chaque peptide correspond au peptide non marqué et la ligne inférieure au peptide marqué utilisé comme contrôle interne. Issu de : *Identification of the OXA-48 Carbapenemase Family by Use of Tryptic Peptides and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*

Oxa-48. Dans un second temps, ces peptides ont été évalués lors d'une analyse en DDA (Q-Orbitrap) qui permet de maximiser le nombre de peptides détectés. Seulement 8 peptides, dont 1 seul commun à l'ensemble des familles, ont été gardés pour cause de modification ou clivage manqué par la trypsine. Une dernière analyse menée sur un Q-TOF a conduit au choix de 2 peptides signatures très spécifiques afin d'établir une base solide pour une méthode MRM sur un QQQ.

Cette méthode de 90 minutes a été testée sur 100 isolats bactériens dont 26 positifs pour Oxa-48 dans des souches de *E.coli* et *K.pneumoniae* pour des valeurs de sensibilité et spécificités de 95 % sans faux positif. Cependant, on retrouve dans la préparation d'échantillons des étapes longues et complexes, comme la lyophilisation ainsi que de la filtration sur membrane. De plus, ils ont fait le choix d'un retraitement manuel par deux opérateurs différents afin de fournir une évaluation la plus juste possible. Selon les auteurs, le retraitement constitue une limitation importante de ce genre d'approche, car il requiert un jugement d'expert avec un retraitement à l'œil.

Dans une étude, Roux Dalvai et al. ont mis en place, à partir de culture bactérienne issues de 15 espèces différentes, une bibliothèque spectrale en DDA *via* l'utilisation de nano-LC-Q-Orbitrap. Dans un second temps, des analyses DIA ont été réalisées afin d'acquérir le maximum de données sur les protéines de ces 15 espèces. A partir de méthodes d'analyse de données, ils ont établi une liste de 82 peptides signatures des différentes espèces. Ces peptides sont alors suivis par une approche ciblée en haute résolution PRM. La méthode mise en place permet l'identification en 4 heures de 15 espèces bactériennes (97 % de spécificité et sensibilité), sans culture préalable dans des urines. L'urine est une matrice moins complexe que la matrice sanguine ; cependant la concentration bactérienne y est très faible, ce qui nécessite des étapes de pré-concentration avant analyse. Selon les auteurs, la haute résolution reste compliquée à mettre en place dans le milieu clinique, et la méthode nécessite encore trop de temps pour permettre son utilisation en routine. Il faudrait automatiser et utiliser des techniques permettant la réalisation d'un grand nombre d'analyses par jour.

En 2020, l'équipe a d'ailleurs présenté un Poster à l'ASMS (American Society for Mass Spectrometry), présentant l'utilisation de la technologie Evosep¹⁸¹ (système chromatographique permettant un débit d'analyse très important) appliqué à leur méthode,

permettant de raccourcir le temps global d'une heure avec plus de 200 échantillons par jour. Ces deux études illustrent l'entre-deux des approches de *shotgun proteomics* et ciblées. Dans la plupart des cas, l'application finale est réalisée par une approche ciblée, qui présente une sensibilité et une robustesse bien plus importantes, tout en étant compatible avec une cadence d'analyse très élevée.

Foudraine¹⁸² *et al.* ont également développé une méthode ciblée en mode PRM sur un spectromètre de masse haute résolution (QExactive HF) après une recherche approfondie des peptides rapporteurs de 4 carbapénèmes impliquées dans la résistance aux antibiotiques KPC, NDM, VIM et OXA-48. La sélection des peptides a été réalisée *in silico* à partir de 900 génomes présents dans des banques de données. Pour chacune des carbapénémases, 2 peptides spécifiques ont été sélectionnés afin d'assurer une bonne détection. Les résultats obtenus lors de l'analyse de 20 souches *E. coli* et 63 souches de *K. pneumoniae* montrent par ailleurs d'excellentes valeurs de spécificité et de sensibilité (>95%) en 8 h d'analyse à partir d'isolats bactériens.

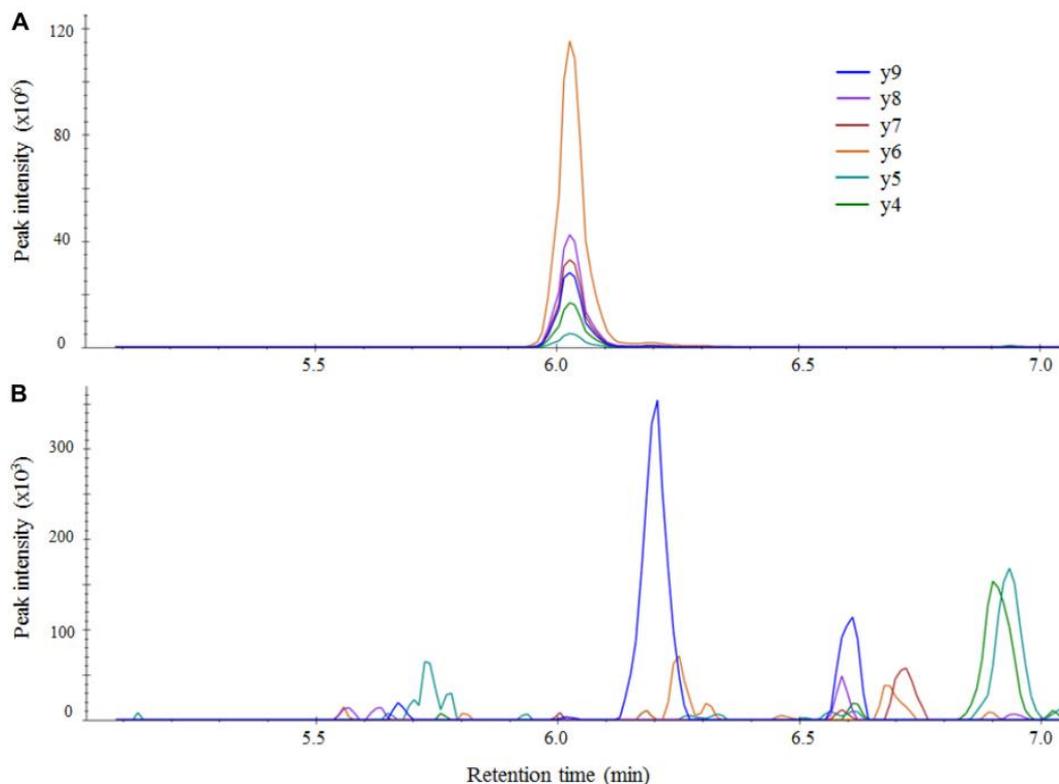


Figure 35 : Chromatogrammes LC-MS/MS du peptide de OXA-48 ANQAFLPASTFK dans Skyline pour un échantillon positif de OXA-48 (A) et un échantillon négatif de OXA-48 échantillon (B). D'après **Accurate Detection of the Four Most Prevalent Carbapenemases in *E. coli* and *K. pneumoniae* by High-Resolution Mass Spectrometry**

Le temps total de l'approche est cependant très long, avec une étape de lyse et dénaturation de plus de 60 minutes suivi de 1 à 16 h de digestion ainsi que 1 h de centrifugation. Les auteurs mettent en avant la nécessité de réduire le temps total de préparation d'échantillons en vue d'un transfert en clinique. Cependant, 2 peptides spécifiques nécessitent un minimum de 2 et 4 h de digestion pour être détectés dans 100 % des cas (pour NDM et VIM), ce qui limite grandement l'intérêt de la méthode en vue d'une application clinique.

3. Analyses ciblées

Certaines analyses ciblées se sont construites pour se focaliser sur l'étude d'un ou plusieurs mécanismes de résistance, comme dans le cas de l'étude réalisée par Wang et al¹⁸³, qui utilisent une méthode dédiée à l'analyse de la carbapénèmase KPC. Après l'analyse *in-silico* de 15 séquences de variants KPC, 3 peptides spécifiques ont été sélectionnés et validés pour la détection de la résistance.

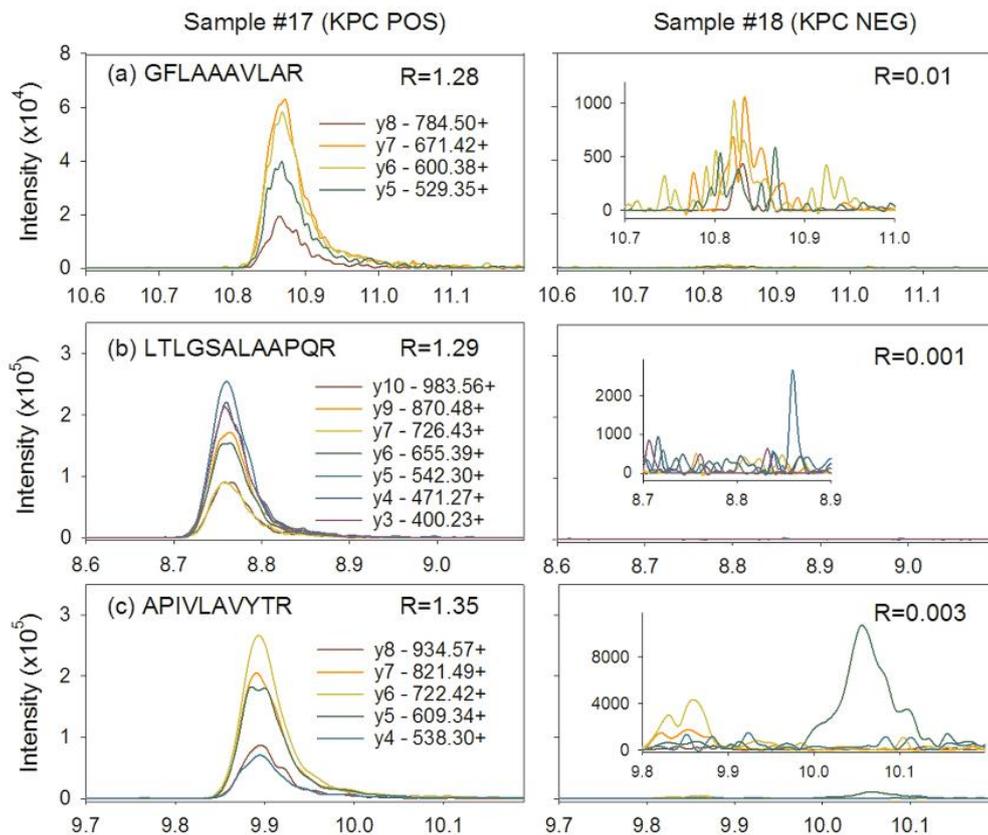


Figure 36 : Exemple des chromatogrammes reconstitués pour les 3 peptides de KPC suivis. A gauche pour une souche positive, et à droite pour une souche négative. Pour l'ensemble des peptides de la souche positive, un grand nombre de transitions sont retrouvées, alors qu'une absence de signal est bien observée pour la souche négative. D'après Wang, Peptide Markers for Rapid Detection of KPC Carbapenemase by LC-MS/MS. *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 2531. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02749-2>.

Parmi eux, un peptide protéotypique, signature de la protéine, a été identifié, permettant d'obtenir une grande spécificité et sensibilité lors de l'étude de 100 isolats bactériens. Ces isolats sont composés majoritairement d'entérobactéries, complétés avec quelques souches de *Pseudomonas* et d'*Acinetobacter*, offrant un panel varié de bactéries avec 20 souches KPC positives. L'approche nécessite 2 h avant l'obtention de l'information recherchée grâce à une préparation d'échantillon rapide. La digestion est réalisée entre 15 et 60 minutes grâce à l'utilisation d'un bain à 55°C ou d'un appareil micro-onde. Toutefois, l'étape de lyse n'est pas détaillée dans l'article et les étapes annexes à la digestion requièrent près d'une heure pour leurs réalisations. Cependant, l'approche est très limitée sur le nombre de peptides suivis pour la caractérisation de la résistance et utilise qu'une fraction de son potentiel en termes de capacité de multiplexage. Il aurait été intéressant d'ajouter un certain nombre de peptides afin de palier d'éventuelles mutations. De plus, le gain de temps du fait de la réalisation de la digestion en seulement 15 minutes est annulé par des étapes annexes de préparation qui pourraient être accélérées.

Dans l'article de Cecchini et al¹⁴⁹, les auteurs ont su mettre à profit les atouts apportés par les méthodes MRM pour identifier et couvrir la résistance aux bêta-lactames chez des isolats cliniques d'*A. baumannii*. L'étude portait sur 39 isolats bactériens dont les génomes étaient séquencés génétiquement (WGS). De plus, certains gènes ont été caractérisés en RT-qPCR. La méthode ciblée comprend 150 peptides rapporteurs de 16 protéines d'intérêt reliées à la résistance aux antibiotiques ainsi que différentes pompes d'efflux et porines. La préparation d'échantillons et l'analyse sur un LC-QQQ ne requièrent que 90 minutes pour réaliser l'identification et la quantification des protéines cibles. La quantification est réalisée avec une approche label free, en se basant sur les aires des 2 meilleures transitions des 3 meilleurs peptides. L'article met en évidence que la quantité d'ARN transcrit n'est pas toujours corrélée avec l'expression de la protéine associée.

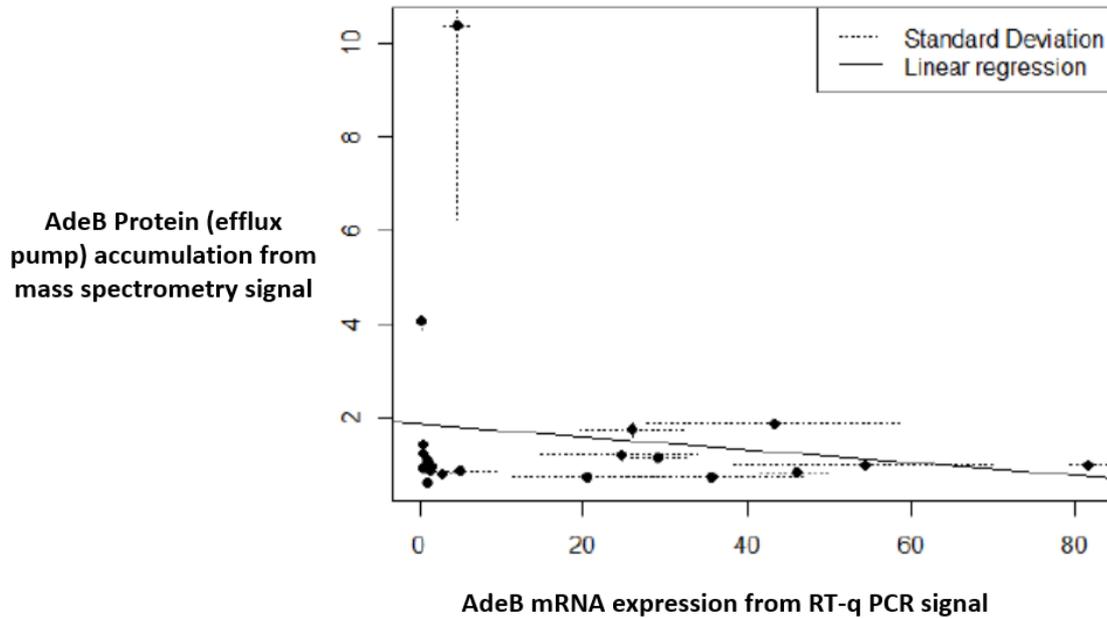


Figure 37 : Graphique représentant le signal acquis en spectrométrie de masse pour l'expression de la protéine AdeB en fonction du signal en RT-qPCR pour l'ARNm correspondant à la protéine AdeB. Aucune corrélation n'est observée. D'après Cecchini et al¹⁴⁹.

La Figure 37 illustre cette observation : aucune corrélation n'est observée entre la quantité de pompe d'efflux AdeB (protéine) exprimée et la quantité de transcrite présent (ARNm : Acide ribonucléique messager). Or, la surexpression de cette protéine procure à *A. baumannii* une résistance à certains antibiotiques. Il est donc important de souligner ici que les études basées uniquement sur l'expression des gènes peuvent conduire à des conclusions erronées, et qu'il est donc important d'avoir recours à des méthodes phénotypiques pour compléter les approches génomiques.

4. Etude de la virulence

Dans une approche plus générale de la virulence, ne se limitant pas à la caractérisation des résistances aux antibiotiques, Otto et al. ¹⁸⁴ démontrent également que les recherches uniquement centrées sur l'étude des gènes ne permettent pas de comprendre totalement la virulence chez *E. coli*. L'étude de l'expression des gènes (protéines) se révèle être primordiale pour mieux comprendre et soigner les septicémies.

Peu d'analyses en spectrométrie de masse en tandem permettent de caractériser globalement l'ensemble du virulome des bactéries. Charretier et al.¹⁵⁰ ont réalisé une preuve de concept sur l'identification (ID) et la détection de mécanismes de résistance (R) et de la

virulence (V) en MRM chez *S. aureus*. L'étude est centrée sur les mécanismes principaux comme les protéines MecA pour la résistance globale, et sur PVL et TSST pour la virulence, qui sont deux toxines très importantes qui engendrent des complications dans les infections bactériennes. La détection de ces deux toxines ainsi que de leur niveau d'expression sont des données cruciales pour les cliniciens. En 1h30, ils sont capables d'obtenir des informations ID-R-V, avec 95 % de spécificité et 95 % de sensibilité. De plus, l'étude a été étendue à l'analyse de ces protéines directement en hémoculture avec cependant des résultats mitigés.

5. Complexité et temps d'analyse

Si l'on prend les différents exemples préalablement présentés, il paraît tout à fait possible de mettre en place une méthode de spectrométrie de masse quantitative pour l'identification et la caractérisation de la résistance chez des bactéries. Cependant, il reste des points limitants dans ces approches, qui sont généralement le temps et la simplicité de la préparation d'échantillons, ainsi que l'analyse et le retraitement de données.

A titre d'exemple, Roux-Dalvai *et al.* présentent une préparation d'échantillons qui dure plus de 3 h, notamment à cause d'une lyse bactérienne fractionnée en plusieurs étapes : des étapes de centrifugation, une digestion trypsique longue et enfin une purification de l'échantillon par extraction en phase solide (SPE) hors ligne, qui ralentit l'étape de préparation. L'apport de technologies comme EvoSep permet de réduire le temps de l'analyse LC-MS/MS dans le but d'augmenter la cadence d'analyse ; cependant la préparation d'échantillons demeure une étape limitante.

La préparation de l'échantillon est très souvent l'étape la plus longue dans un protocole expérimental. Cependant, cette étape peut être accélérée et optimisée. Hayoun *et al.*¹⁸⁵ ont développé un protocole de préparation d'échantillons bactériens en 30 min en associant ultrasons et billes de verre lors de l'étape de lyse, ce qui permet d'améliorer grandement l'efficacité de la lyse. On retrouve aussi dans certains cas des digestions à plus haute température (40/50 °C), ce qui permet d'accélérer l'étape de digestion. Foudraïne¹⁸² *et al.* ont ainsi réduit de plusieurs heures cette étape, et certaines études montrent des digestions répétables pour des temps de l'ordre de 15 à 30 minutes. De plus, il est possible d'envisager de simplifier et de réduire encore ce temps en supprimant les étapes de dénaturation et

d'alkylation, tout en réalisant la lyse et la digestion en simultané, ce qui n'est proposé dans aucune de ces études.

La plupart des études en haute résolution utilisent la chromatographie liquide en configuration nano, afin de gagner grandement en sensibilité ; cependant, cela engendre d'autres limitations : les gradients utilisés sont longs, avec des temps de rééquilibrages de la colonne chromatographique et de lavages conséquents, afin de permettre d'opérer dans des conditions sans effet mémoire d'une analyse sur la suivante. De plus, ces systèmes sont généralement peu robustes et demandent une grande rigueur dans leurs utilisations et entretiens.

L'approche sans *a priori shotgun proteomics* est très puissante et parfaitement applicable en recherche en microbiologie (analyse sans *a priori* et possibilité d'analyser *a posteriori* les données), mais demeure trop restreinte en matière de rapidité et de simplicité pour couvrir les besoins du milieu hospitalier. En effet, ces types d'approche sont difficilement transférables et n'entrent pas dans une philosophie « plug and play », que ce soit au niveau des conditions séparatives de l'échantillon en amont du spectromètre de masse, ou bien à cause de l'utilisation de l'appareillage ainsi que du retraitement des données. De plus, le coût des appareils haute résolution demeure un investissement très conséquent.

Les approches de type ciblées en haute résolution (PRM) et basse résolution (MRM) ont été privilégiées dans ces études une fois que l'information d'intérêt a été parfaitement caractérisée. L'utilisation d'un mode ciblé permet une optimisation des conditions d'analyses, notamment des temps de gradient qui peuvent être raccourcis, avec dans certaines études des temps de 20 minutes, lavage et reconditionnement de la colonne compris. Le retraitement en Shotgun Proteomics requiert généralement du temps et est complexe, alors que le retraitement des méthodes ciblées se limitant seulement à une liste précise de composés s'en retrouve facilité.

L'étape limitante en temps, pour les approches ciblées, demeure la préparation d'échantillons. Il est d'ailleurs important qu'elle reste simple, afin de pouvoir automatiser cette dernière pour augmenter le débit d'analyse et rendre l'approche applicable en routine. Par ailleurs, toutes les équipes de recherche responsables des travaux présentés ont montré une volonté d'aller dans ce sens. Les différents travaux détaillés dans l'article de Charretier et

al., 2015 montrent une préparation d'échantillons de l'ordre d'une quarantaine de minutes, suivi d'une analyse en chromatographie conventionnelle¹⁸⁶ de 45 minutes.

6. Conclusion

Les analyses ciblées en mode MRM ou PRM sont la référence pour l'obtention d'informations quantitatives, ou semi quantitatives, sur une grande gamme dynamique de concentrations. Elles permettent d'atteindre une capacité de multiplexage très importante et s'adaptent parfaitement en fonction des différents types d'études envisagés (quantitative, qualitative, identification, caractérisation de la virulence, etc...). La détection de protéines précises parmi l'ensemble des composés présents permet la caractérisation des souches bactériennes, tant pour l'identification de l'espèce ou du genre que pour celle des mécanismes de résistance. De plus, cela permet d'apporter une information sur les profils d'expression des protéines en fonction des souches. Même s'il est possible de réaliser des méthodes ciblées en haute résolution, le triple quadripôle demeure *a priori* plus adapté à un transfert en vue d'une application clinique. Ce sont en effet des instruments robustes, et bien moins coûteux que des appareils haute résolution. De plus, ils sont déjà couramment employés en routine dans les hôpitaux. Enfin, seules les géométries de type QQQ bénéficient d'un marquage CEIVD.

Une approche ciblée de type MRM *via* un spectromètre de masse QQQ semble être un bon choix pour une méthode de caractérisation de bactéries. En revanche, l'utilisation de cette approche nécessite une préparation d'échantillons rapide et optimisée, une expertise instrumentale, ainsi qu'une expertise au niveau de la création de la méthode d'acquisition et du retraitement des données. Ces éléments sont à prendre doublement en compte si un transfert technologique vers le milieu hospitalier est envisagé. Le dernier point important est que les approches ciblées sont avec *a priori* et que dans le cas d'une analyse exhaustive pour permettre l'identification et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques, la capacité de multiplexage de la méthode sera une limitation conséquente. Il est en effet nécessaire de mettre en place de nouvelles approches permettant l'augmentation massive de la capacité de multiplexage.

VI. Objectif de la thèse

Le premier objectif de la thèse a été de développer une méthode multiplexée semi-quantitative, très rapide, en spectrométrie de masse ciblée, permettant l'obtention de profils de virulence chez *S. aureus*. Dans ce premier chapitre seront détaillées toutes les étapes associées à la création de la méthode, à savoir : (i) une préparation simple et rapide de l'échantillon, (ii) la création de la méthode, (iii) le retraitement et la validation automatique des données, (iiii) ainsi que la validation et l'évaluation de la méthode.

Dans une seconde partie de ce chapitre est présentée une validation à plus grande échelle avec l'étude d'une cohorte de 300 souches cliniques de *S. aureus*. Ces souches ont été fournies par le Centre National de Référence – Staphylocoques (CNR HCL Lyon Nord, dirigé par le Prof. F. Vandenesch). L'amélioration continue des paramètres de la méthode (peptides suivis, retraitement des données) est nécessaire pour les méthodes ciblées, notamment lors de la découverte de nouveaux variants. L'analyse d'un grand nombre de souches permet alors de renforcer la méthode avec de nouveaux peptides et de définir les valeurs de spécificité, sensibilité et précision de la méthode. Enfin, l'analyse d'une cohorte conséquente est aussi nécessaire afin de vérifier la cohérence de la quantification des facteurs de virulence. Par ailleurs, les données quantitatives de ces résultats pourraient permettre de mieux comprendre les différences de virulence entre les souches de *S. aureus*.

Le deuxième chapitre décrit le développement d'une méthode ciblée et innovante se basant sur un principe d'arbre décisionnel afin de pouvoir effectuer une analyse ciblée sans *a priori*. Cette approche ciblée hautement multiplexée se focalisera sur le groupe ESKAPE. En effet, l'objectif de ce travail est de fournir, en moins d'une heure après la détection d'hémocultures positives issues de patients infectés, l'identification et la caractérisation des principaux mécanismes de résistance des bactéries présentes, par une méthode de spectrométrie de masse ciblée, unique et multiplexée. Des analyses préliminaires avec le mode d'acquisition Scout-MRM seront détaillées ainsi que la preuve de concept quant au nouveau mode d'acquisition.

Chapitre 1

Développement d'une nouvelle méthode d'identification rapide et multiplexée du virulome de *S. aureus* par approche ciblée : de la préparation rapide d'échantillons (souches cliniques) à l'analyse MRM.

Partie 1 : Développement de la méthode

I. Introduction

Ce chapitre décrit la création d'une méthode semi-quantitative en protéomique ciblée par LC-MS/MS. Cette méthode vise à effectuer une caractérisation exhaustive des facteurs de virulence chez le staphylocoque doré. Il s'agit de couvrir un nombre considérable de protéines cibles sur une vaste gamme dynamique de concentration. Nous avons donc opté pour le mode d'acquisition MRM, qui est bien adapté au multiplexage et offre une grande sensibilité dans l'analyse. Nous avons d'autre part adopté une approche semi-quantitative (label free) pour permettre une caractérisation plus poussée de la virulence, en établissant les niveaux d'expression des facteurs fixés. Enfin, cette méthode se veut simple et rapide pour permettre une cadence d'analyse importante.

La MRM est un mode d'acquisition ciblé. L'information qu'elle génère dépend des cibles sélectionnées. La première étape repose sur le choix des peptides cibles rapporteurs des protéines d'intérêt. Cette démarche est basée sur différents critères comme la taille des peptides, leur composition en acides aminés ainsi que leur spécificité. Une étape de validation des peptides rapporteurs est également requise pour vérifier leur spécificité. La dernière étape concernant les peptides cibles est le choix des transitions (couple ion précurseur/ ion fragment fils) pour établir la détection la plus efficace possible en termes de sensibilité, robustesse et spécificité.

Lors de la création de la méthode MRM, il est nécessaire de réaliser une préparation d'échantillon optimale. L'objectif est de permettre le plus rapidement (une heure) et le plus simplement (faible besoin en manipulation) possible d'obtenir l'information à partir d'une culture bactérienne. Chaque analyse MRM multiplexée génère un grand nombre de données (fonction du nombre de transitions). La mise en place d'outils automatiques de retraitement de données est cruciale afin de valider et quantifier pour chaque analyse les protéines identifiées.

Par ailleurs, il est important de choisir en amont le type de quantification à utiliser (dans notre cas, label free), car cela impose des contraintes lors de la construction de la méthode. Il est donc essentiel d'évaluer l'intégralité des paramètres impactant la quantification, afin de les caractériser pour garantir la plus grande robustesse et justesse possible.

Afin de finaliser la création de la méthode MRM, il est nécessaire de la valider. Cela consiste à comparer l'approche ciblée à une technique de référence, à définir ses attributs comme sa robustesse ainsi que ses limites de détection et de quantification. De plus, il est important d'établir les limitations de l'ensemble des paramètres dans l'intention d'assurer un rendu de résultats fiable.

Dans ce chapitre, l'intégralité des étapes du développement de la méthode MRM multiplexée pour la caractérisation du virulome seront détaillées.

II. Sélection des facteurs de virulences chez *S. aureus*

L'objectif premier de la méthode est de détecter et de quantifier le plus grand nombre possible de facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*, sans omettre les mécanismes dits « principaux » qui ont été détaillés dans l'introduction générale. Elle doit cependant être compatible dans sa durée et sa complexité pour une application clinique. Cela fixe alors des contraintes sur les choix techniques de préparation d'échantillon, les paramètres expérimentaux ainsi que sur leur optimisation.

La création d'une approche MRM se base spécifiquement sur des protéines identifiées. Il en résulte un travail minutieux afin de sélectionner les cibles adéquates à analyser : dans notre cas, le choix des protéines ainsi que le choix des séquences peptidiques associées.

Comme il a été montré dans l'introduction générale, *S. aureus* est une bactérie possédant tout un arsenal de facteurs de virulence (plus de 100 facteurs identifiés à ce jour). Or, pour assurer une très bonne spécificité de la méthode, il est admis que trois peptides par protéine ainsi que trois transitions par peptide sont nécessaires¹⁸⁷. Cela engendre donc un grand nombre de composés (transitions) à suivre en une seule analyse. Or, pour réaliser l'approche en moins d'une heure, il est nécessaire que l'analyse en elle-même ne dépasse pas 30 minutes ; la préparation d'échantillons est une étape obligatoire qui requiert généralement beaucoup de temps. Si l'on veut étudier 100 facteurs de virulences, il faudra suivre environ 900 transitions, et cela en moins de 30 minutes (soit 20 minutes de séparation chromatographique). Ce type d'étude est très délicat et difficilement envisageable étant donné que l'on se trouve en présence d'une matrice complexe.

Un choix préalable des facteurs de virulence à suivre a dû être effectué afin d'englober les protéines déjà identifiées comme très importantes^{84,86,150,188,189} et obligatoires dans la caractérisation d'un *S. aureus* (comme PVL, TSST, MecA, HLD, HLA ...), mais aussi des facteurs de virulence potentiellement intéressants dans la différenciation des souches bactériennes. En étroite collaboration avec l'équipe du Pr. F. Vandenesch du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), nous avons pu établir une liste comportant 93 facteurs de virulence d'intérêt détaillés dans le Tableau 3.

Proteins	Function	Proteins	Function	Proteins	Function	Proteins	Function
MecA	Betalactam resistance : MRSA	LUKD	Leukocidin D	SEN	Enterotoxin N	FnbB	Fibronectin-binding
BlaI	Beta lactamase repressor	LUKE	Leukocidin E	SEO	Enterotoxin O	IcaA	Intercellular adhesion
BlaR	Beta-lactamase regulator	HlgA	Gamma-hemolysin component A	SEU	Enterotoxin U	IcaC	Intercellular adhesion
BlaZ	Beta-lactamase	HlgB	Gamma-hemolysin component B	LukM	Leukocidin M	IcaD	Biofilm PIA synthesis
Cat1	Chloramphenicol resistance	HlgC	Gamma-hemolysin component C	SspA	Glutamyl endopeptidase	IsaB	Immunodominant Antigen B
CcrA	Cassette chromosome	Psm1	Phenol-soluble modulin	SspB	Staphopain B	IsdB	Transferrin-binding protein
CcrB	Cassette chromosome	Psm4	Phenol-soluble modulin	SspP	Staphopain A	SdrC	Fibrinogen-binding
ErmA	Erythromycin/ Clindamycin resistance	ETA	Exfoliative toxin A	SarZ	Virulence regulation	SdrD	Fibrinogen-binding
ErmB	Erythromycin/ Clindamycin resistance	ETB	Exfoliative toxin B	SaeS	Virulence regulation	Sbi	IgG-binding protein
ErmC	Erythromycin/ Clindamycin resistance	ETD	Exfoliative toxin C	SarA	Virulence regulation	AlsD	Decarboxylase
Cfr	Chloramphenicol resistance	SEA	Enterotoxin A	Spa	Protein A	Cap5A	Capsular polysaccharide
NorA	Quinolone resistance	SEB	Enterotoxin B	Chp	Chaemotaxis-inhibiting	Cap8A	Capsular polysaccharide t
NorB	Quinolone resistance	SEC	Enterotoxin C	CoA	Coagulase	CtsR	Transcriptional regulator
FosB	Resistance to fosfomycin	SED	Enterotoxin D	GapA	Dehydrogenase, metabolism	Vras	Sensor protein
FusC	Fusaric acid resistance	SEG	Enterotoxin G	KatA	Catalase A	MupA	Isoleucyl-tRNA
MecC	Penicillin-binding protein	SEH	Enterotoxin H	Scn	Staphylococcal complement inhibitor	EdinA	Epidermal cell inhibitor
Tet38	Tetracyclin resistance	SEJ	Enterotoxin J	Sak	Staphylokinase	EdinB	Epidermal cell inhibitor
TetK	Tetracyclin resistance	SEK	Enterotoxin K	NUC	Extracellular nuclease	EdinC	Epidermal cell inhibitor
PVL-lukF	Panton Valentine leucocidin F	SEM	Enterotoxin M	ClfA	Clumping factor A	SplA	Serine protease A
PVL-lukS	Panton Valentine leucocidin S	SEQ	Enterotoxin Q	ClfB	Clumping factor B	SplB	Serine protease B
HLA	Haemolysin alpha	SEE	Enterotoxin E	Cna	Collagen-binding adhesin	SplE	Serine protease E
HLD	Haemolysin delta	SEI	Enterotoxin I	Fib	Fibrinogen binding	EsxA	Secretion system
TSST	Toxic shock syndrome toxin-1	SEL	Enterotoxin L	FnbA	Fibronectin-binding	Sa2165	SA2165 protein

Tableau 3 : Liste des facteurs de virulence intéressants pour la caractérisation du virulome de *S. aureus*.

On retrouve dans cette liste les facteurs essentiels décrits dans l'introduction générale, comme MecA pour l'aspect multirésistance de la bactérie, mais aussi les principales toxines avec les PVL, TSST, HLA et HLD. De plus, la liste couvre les toxines à deux composantes comme HLG A,B,C suspectées d'être associées à la sévérité des souches de *S. aureus*¹⁸⁸, ainsi la protéine Scn (Staphylococcal complement inhibitor) qui est impliquée dans la défense contre notre système immunitaire¹⁸⁹.

Cette liste englobe une partie des facteurs de virulences retrouvés *Staphylococcus aureus*, ce qui correspond à 93 protéines (290 peptides - 900 transitions). Toutefois, certaines protéines, parce que trop petites en taille (pas ou peu de peptides analysables) ou trop faiblement exprimées comparé à la sensibilité de la méthode, peuvent ne pas être détectées. Ce multiplexe est donc voué à être affiné lors du choix et de la validation des couples peptides-transitions rapporteurs des protéines.

III. Sélection et validation des peptides

Dans une approche classique dite « bottom-up », une étape de digestion des protéines est toujours accomplie (généralement *via* l'ajout de trypsine). L'analyse en spectrométrie de masse sera réalisée sur les peptides tryptiques ainsi générés, qui sont rapporteurs des protéines d'intérêt. C'est pourquoi, lors de la création de la méthode, la première étape consiste à choisir, pour chaque facteur de virulence d'intérêt, les peptides rapporteurs protéotypiques (peptides uniques) qui permettront leur détection et leur quantification.

A. Caractéristiques d'un peptide rapporteur

Si l'on se réfère au tutoriel¹⁸⁷ créé par Lange *et al.* pour l'établissement d'une méthode MRM, il est conseillé, pour identifier une protéine, de suivre au moins deux transitions pour deux peptides rapporteurs. Cependant, plus le nombre de transitions est important, plus la détection sera spécifique. Le suivi d'un seul peptide peut induire des erreurs, car une mutation ou le moindre problème durant la séparation chromatographique pourraient entraîner la perte de l'information. Compte tenu du fait de la grande fréquence de mutations au sein des facteurs de virulence, nous avons fait le choix de prendre, dans la mesure du possible, 3 peptides rapporteurs. Toutefois, dans certains cas, comme pour les protéines très petites ou pour celles dont la séquence en acides aminés présente une mauvaise répartition des arginines et des lysines, un nombre de peptides plus restreint a dû être sélectionné.

Le nombre de transitions suivies est quant à lui important pour la spécificité de notre méthode; plus celui-ci sera élevé, plus le risque d'identifier un composé qui n'est pas celui souhaité sera faible. Cependant, un trop grand nombre de transitions limite très rapidement la capacité de multiplexage de l'approche. C'est pourquoi nous avons fait le choix de suivre 3 transitions, ce qui se trouve être un solide compromis entre gain en spécificité et nombre de composés à suivre.

La digestion d'une protéine peut entraîner la création de quelques peptides à plusieurs dizaines. Des règles ont été mises en place pour cibler les peptides rapporteurs permettant une bonne détection et quantification de la protéine d'intérêt. La première concerne la taille du peptide. Les peptides de petite taille (4 à 7 acides aminés) sont exclus, car plus la séquence

est courte, plus la possibilité de retrouver celle-ci au sein d'une autre protéine contenue dans l'échantillon est grande. De même, les peptides de taille trop importante (supérieure à 20 acides aminés) auront une probabilité considérable d'être présents sous plusieurs états de charge différents. Il en résulte alors une dilution de l'information entraînant globalement une perte de sensibilité.

La seconde règle concerne la composition et la séquence en acides aminés du peptide. Dans une méthode ciblée, les peptides qui sont susceptibles de comporter des modifications chimiques spontanées ou induites sont exclus. Les cystéines par exemple sont enclines à subir des modifications (pont disulfure), et leur analyse nécessite une étape de dénaturation et de carbamidométhylation. D'autres acides aminés sont propices aux modifications chimiques, comme les méthionines (M) et tryptophanes¹⁷³ (W) qui peuvent être facilement oxydés. En conséquence, aucun peptide à cystéine n'a été sélectionné afin de gagner en temps de préparation d'échantillon ; également, les peptides présentant des M et des W ont été le plus possible évités.

La trypsine permet un clivage spécifique¹⁵¹ *via* l'hydrolyse des liaisons peptidiques du côté C-terminal d'un résidu de lysine (K) ou d'arginine (R). Cependant, certains enchainements d'acides aminés conduisent à l'absence ou la mauvaise hydrolyse de la liaison peptidique. Il est préférable d'écarter les peptides où l'on repère une succession d'arginines et de lysines (KK, RR, RK), car il est probable d'y observer l'absence de clivage entre les deux résidus. Nous avons, pour des raisons similaires, évité les peptides où l'on retrouve au sein de la séquence la combinaison du résidu proline avec le résidu lysine ou arginine : cet enchainement limite l'hydrolyse par la trypsine et peut entraîner une perte de répétabilité pour la quantification de ces peptides^{9,10}.

Comme décrit dans l'introduction générale, nous avons fait le choix de garder préférentiellement des ions précurseurs dichargés. Toutefois, pour certains peptides de grande taille, ou lorsqu'une proline est située dans la séquence protéique, des précurseurs trichargés sont sélectionnés. De plus, la présence de résidus K ou R en N-terminal est propice à la génération d'ions fragments de type y, qui ont donc été suivis préférentiellement dans la méthode.

B. Bases de données et choix des séquences protéiques

La sélection des peptides candidats peut s'effectuer de diverses façons, par exemple, grâce aux données issues d'analyses *Shotgun Proteomics*, ou encore par des digestions *in silico* générant l'ensemble des peptides possibles à partir des séquences FASTA des protéines référencées dans les bases de données protéiques, comme UNIPROT.

Les données issues des analyses non ciblées en *Shotgun Proteomics* peuvent apporter des informations sur le choix des peptides à cibler ainsi que sur leur profil de fragmentation. Les répertoires publics de données de protéomique (dépôt par la communauté scientifique), comme ProteomeXchange, en lien avec les autres bases de données comme peptideAtlas¹⁹⁰, Global Proteome Machine¹⁹¹ et Pride¹⁹², permettent d'utiliser les données collectées sur les peptides protéotypiques et les transitions des protéines d'intérêt. Cependant les données déposées sont en grande majorité des données sur des protéines de levures et des protéines humaines. Des données protéogénomiques sur des bactéries ou bien des organismes non séquencés (arthropodes) sont toutefois disponibles.

1. Digestion *In-silico*

Pour établir la liste des peptides à conserver pour la méthode MRM, la recherche des séquences FASTA a été réalisée à partir du site Uniprot Knowledgebase, qui répertorie un grand nombre d'informations sur les protéines de nombreux organismes¹⁹³. Uniprot est une base ouverte accessible en ligne, consolidée par les données produites par la communauté scientifique. Elle combine les données des bases Swiss-Prot, TrEMBL et Protein Information Resource. Elle contient non seulement les séquences protéiques, mais aussi des données bibliographiques, phylogénétiques et des informations sur la fonction et la structure de la protéine. L'extraction de l'ensemble des séquences a été réalisée *via* Uniprot. L'utilisation d'UniprotKB donne l'accès à deux informations primordiales pour le choix de peptides. Premièrement, elle permet d'obtenir la séquence FASTA de la protéine (fichier texte, Figure 38) et donc de faire un premier choix sur les peptides candidats.

```

      10      20      30      40      50
MRIERVDDTT VKLFITYSDI EARGFSREDL WTNRKRGE EF FWSMMDEINE
      60      70      80      90     100
EEDFVVEGPL WIQVHAFEKG VEV TISKSKN EDMNMSDDD ATDQFDEQVQ
     110     120     130     140     150
ELLAQTLEGE DQLEELFEQR TKEKEAQGSK RQKSSARKNT RTIIVKFNDL
     160     170     180     190     200
EDVINYAYHS NPITTEFEDL LYMVDGTYYY AVHFDSHVDQ EVINDSYSQL
     210     220     230
LEFAYPTDRT EVYLNDYAKI IMSHNVTAQV RRYFPETTE

```

Figure 38 : FASTA de la protéine MecA, récupérée sur UniprotKB, numéro d'accèsion : P60184. En vert sont représentés les peptides candidats correspondant aux normes souhaitées. En jaune est représenté un peptide en limite d'acceptabilité (petite taille) et en rouge l'ensemble restant de la séquence ne comportant aucun peptide candidat.

Des exemples de peptides tryptiques sont surlignés en Figure 38. Les peptides surlignés en rouge (plus de 80% des peptides dans ce cas) sont incompatibles avec la méthode. En effet, ceux-ci présentent soit un nombre trop faible d'acides aminés, soit un nombre trop important, soit un enchaînement KR (en 34 et 131 par exemple). En jaune est représenté un peptide candidat, non sélectionné dans un premier temps, dont la longueur de la chaîne correspond à notre limite fixée de 7 AA, ce qui pourrait induire une non-spécificité de ce peptide à cette protéine. En revanche, le peptide est conservé dans le cas où il n'y aurait pas suffisamment de peptides candidats valides pour la protéine. En vert sont surlignés les 3 seuls peptides qui répondent aux critères de sélection des peptides pour la méthode MRM. Une fois les peptides choisis, des alignements de séquence sont réalisés afin de s'assurer que les peptides triés sont uniques (protéotypiques), c'est-à-dire qu'ils sont retrouvés seulement dans la protéine d'intérêt¹⁹⁴. Pour cela, une technique de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est employée. Elle consiste à rechercher dans une base de données protéique des parties de séquence qui sont localement homologues à une séquence fournie par l'utilisateur (*query sequence*). BLAST utilise une matrice de similarité pour calculer des scores d'alignement. Il propose un score pour chaque alignement trouvé et utilise ce score pour fournir une évaluation statistique de la pertinence de cet alignement (probabilité qu'il soit dû au hasard). Dans notre cas, le peptide est protéotypique lorsqu'aucune homologie n'est retrouvée (score de 100 %).

2. Spécificité des peptides

Pour certaines protéines, il n'est pas évident de trouver un grand nombre de peptides spécifiques analysables. En effet, au sein des toxines de *S. aureus* un certain nombre de toxines se sont révélées être très proches dans leurs séquences protéiques¹⁹⁵. Sur la Figure 39 sont représentés les alignements de séquences pour les protéines LukG (MSHR1132), LukE, HlgA, PVL-LukS et HlgC.



Figure 39 : Alignement des séquences protéiques de LukE, HlgA, LukS, et HlgC avec la séquence de la protéine LukG présente dans la souche MSHR1132. En vert sont représentés les 4 peptides spécifiques analysables pour la protéine HlgC. En rouge des exemples de peptides non spécifiques.

Les alignements pour ces protéines montrent une grande homologie entre elles, ce qui se traduit par un faible choix de peptides spécifiques possibles pour ces facteurs de virulences. Par exemple, en vert sont représentés les peptides spécifiques pour la protéine HlgC, et en rouge les peptides non spécifiques. Toutefois, dans ce cas, cette spécificité ne prend en compte que ce sous-ensemble précis de toxines. On remarque facilement que la présence d'homologie avec la protéine Pvl-LukS engendre une forte restriction des peptides potentiels, ne laissant plus que 4 choix. De plus, les peptides verts ainsi mis en évidence peuvent ne pas posséder un bon facteur de réponse ou encore être sujets à des modifications post-traductionnelles, ce qui induirait une impossibilité de détection. Dans l'ensemble, la présence de ce type d'homologie de séquence a entraîné de grandes difficultés pour obtenir 3 peptides spécifiques analysables pour chacune de ces protéines. Il est aussi important de noter que très peu de variants sont annotés dans les bases de données et que le repérage de ces similarités peut s'avérer très compliqué à mettre en place.

3. Limitations des bases de données

Cependant, l'utilisation des bases de données montre certaines limitations. Uniprot combine les informations de séquences issues de Swiss-Prot et TrEMBL. Les séquences vérifiées manuellement et annotées provenant de Swiss-Prot sont des séquences corrigées dont les données de séquence peuvent être exploitées de façon sûre. À l'inverse, dans le cadre des séquences issues de TrEMBL, de nombreuses erreurs et redondances peuvent apparaître. Il est donc très important d'être vigilant sur la séquence utilisée. De plus, plusieurs protéines différentes peuvent avoir le même nom dans la base Swiss-Prot. Par exemple, la séquence représentée sur La Figure 39 est issue de Swiss-Prot et est répertoriée comme étant la protéine MecA de *S. aureus*. Cependant, cette séquence ne correspond pas à la protéine MecA impliquée à la résistance aux bêta-lactames. Il s'agit d'une protéine avec une fonction distincte. En effet, la page d'information précise que cette protéine possède un rôle différent (« This protein is unrelated to the penicillin-binding protein Pbp2a, also called MecA, that confers resistance to methicillin in several strains of *S.aureus* [MRSA] and is used as a marker for the identification of MRSA isolates »). Malheureusement, les différents variants ou possibles mutations potentiellement connues ne sont pas répertoriés, ce qui impactera *in fine* la détection. La description des variants et des mutations est dépendante de l'organisme d'intérêt. De plus, des ré-interrogations doivent être effectuées, que ce soit au niveau des bases de données protéiques ou bien dans la recherche d'homologie de séquences (BLAST), car les bases de données sont révisées. C'est pourquoi il est important de noter les dates auxquelles les séquences ont été récupérées pour les analyses protéomiques.

Une fois la séquence protéique récupérée, le logiciel Skyline a été employé dans le but de réaliser la digestion tryptique *in silico*. Le logiciel offre par la même occasion des valeurs calculées de CE (Collision Energy) et de DP (Declustering Potential) pour chacune des transitions pour le spectromètre de masse choisi (ici QTRAP 6500, Sciex). Skyline permet ainsi de construire une méthode MRM avec une liste de transitions des peptides en fonction des paramètres fixés par l'utilisateur. Aucun site de clivage manqué par la trypsine n'a été toléré. Les peptides comprenant des résidus cystéine et des acides aminés susceptibles de subir des modifications (oxydation) ne sont pas retenus. La taille des peptides est limitée entre 6 et 25 acides aminés avec un état de charge de 2 ou 3. Un état de charge 3 pour un peptide est choisi seulement si le rapport masse sur charge du précurseur (en 3+) est supérieur à 500. En

effet, il a été observé qu'il y a très peu de chance d'avoir un état de charge 3 pour de faibles valeurs de m/z (sauf cas particulier avec la présence de multiple proline). Pour chaque précurseur, il est demandé de fournir les 8 fragments de type y de plus haute masse pour assurer une meilleure spécificité de l'analyse. Parmi ceux-ci, un tri pour sélectionner les trois transitions les plus adaptées à l'approche sera effectué par la suite.

C. Validation expérimentale des peptides présélectionnés

1. Vérification des peptides *in-silico* via l'analyse d'échantillons bactériens

Pour chaque protéine d'intérêt, nous avons alors établi la liste des fragments, et par conséquent des transitions potentiellement spécifiques. Plusieurs analyses ont été conduites, pour chaque protéine, sur des souches bactériennes génotypées censées exprimer les différents facteurs de virulence choisis comme cible. Le but est ici d'obtenir des spectres dits de *discovery* dans lesquels, sachant que la protéine d'intérêt est exprimée, il est possible de vérifier la présence des peptides prédits à travers la détection des transitions associées.

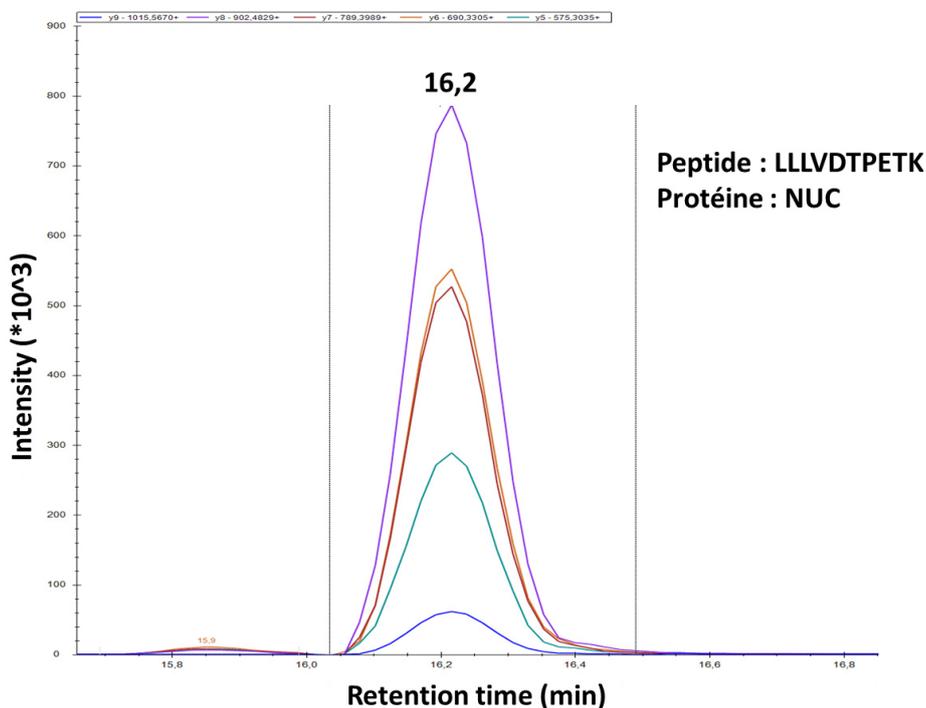


Figure 40 : chromatogramme reconstitué sur Skyline® d'un bon peptide candidat. Peptide LLLVDTPETK rapporteur de la protéine NUC (thermonucléase). On détecte la présence de 5 transitions alignées, correspondant aux fragments caractéristiques y5, y6, y7, y8 et y9. Le pic est parfaitement défini, et les fragments retrouvés correspondent à des fragments de haute masse.

La Figure 40 montre un exemple de chromatogramme reconstitué pour les différentes transitions attendues pour le peptide LLLVDTPETK, rapporteur de la protéine NUC (thermonucléase). Cinq transitions associées à ce peptide (y5 à y9) sont détectées. Outre la détection de l'ensemble des transitions, celles-ci doivent être alignées en temps de rétention, car elles correspondent au même précurseur qui est élué à un temps donné (16,2 min). De plus, les peptides présentant le plus grand rapport signal/bruit ont été préférablement sélectionnés. Enfin, il est souhaitable qu'aucune des transitions ne soit aussi détectées à un temps de rétention proche (quelques secondes) lors d'analyse en matrice bactérienne, dans la mesure où cela constitue une interférence qui peut engendrer une mauvaise identification, ou alors un biais dans la quantification.

2. Vérification des transitions sélectionnées par l'analyse des peptides de synthèse

Une fois chaque candidat sélectionné, nous avons fait synthétiser l'ensemble des peptides sous forme lyophilisée (Pepotec, ThermoFisher). Cette étape est nécessaire afin de valider que les pics préalablement choisis correspondent bien aux peptides souhaités. Chaque peptide de synthèse a été alors analysé par LC-ESI-MS/MS. Cela permet d'obtenir des spectres de référence, avec un temps de rétention associé au peptide et les valeurs des ratios entre les aires sous le pic chromatographique de chaque transition du peptide. Ce ratio est spécifique du peptide dans le cas où l'on conserve les mêmes paramètres de source et du spectromètre de masse (DP : Declustering Potential, CE : Collision Energy, nature du gaz, pression). Dans ce cas, la distribution des différents fragments d'un ion précurseur sera identique d'une analyse à l'autre. Donc si le fragment majoritaire constitue 65 % de la somme de toutes les transitions suivies dans l'analyse A, il devra aussi représenter 65 % de la somme de toutes les transitions suivies dans l'analyse B.

L'ensemble de ces caractéristiques pour chaque peptide est compilé dans une base de données. Enfin, les peptides endogènes sont de nouveau analysés et comparés aux références afin de valider ou non le peptide pour la méthode. Ces étapes sont nécessaires, car le choix d'un peptide peut s'avérer complexe. Deux exemples sont détaillés sur la Figure 41 et sur la Figure 42, illustrant divers stades de la sélection.

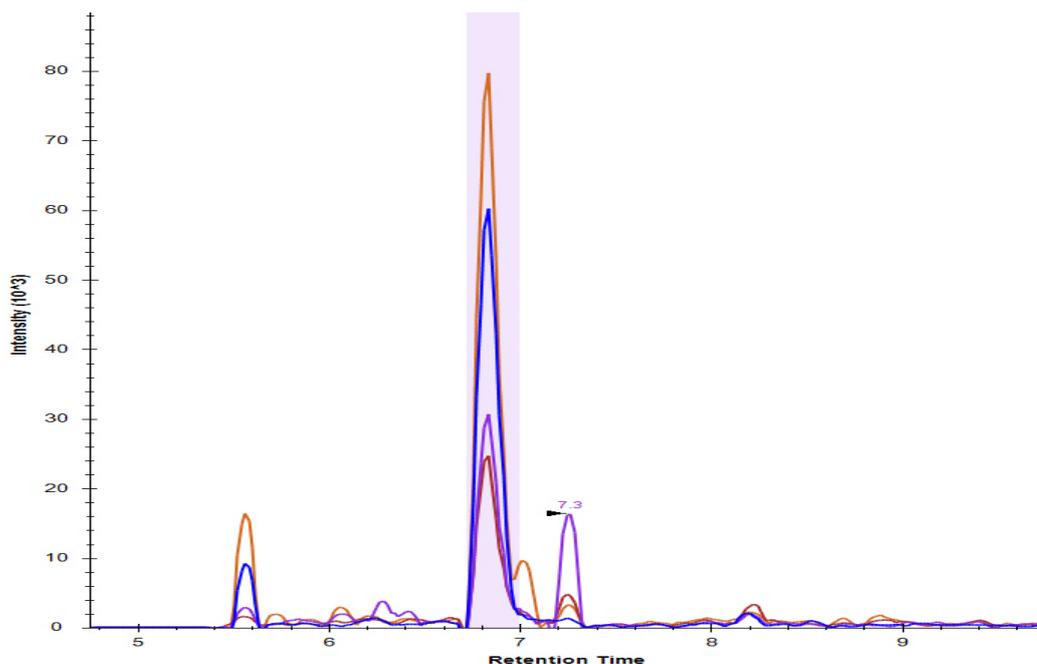


Figure 41 : Chromatogramme reconstitué du peptide endogène SYANLIGK de la protéine MecA lors de l'analyse d'une souche de *S. aureus*.

On remarque (Figure 41) sur le chromatogramme reconstitué d'un peptide (SYANLIGK) lors de l'analyse d'une souche bactérienne la présence de 3 pics chromatographiques, pour lesquels on observe un alignement de 4 transitions, qui pourraient tous correspondre au peptide recherché. Il est donc difficile de trancher sur l'identité du pic correspondant au peptide d'intérêt. Selon l'hydrophobicité des différents acides aminés et la longueur de la chaîne, il est parfois possible d'éliminer certains pics. Dans notre cas, la taille de notre peptide ne nous autorise pas de conclure entre les divers candidats. Il reste alors le temps de rétention du peptide pur, bien que celui-ci puisse subir des décalages en fonction des différentes matrices (Figure 42).

En A, l'analyse du peptide DTSTPAAFGK dans une souche bactérienne montre la présence de 2 pics (à 7 min et 7,7 min) composés de trois transitions. Dans cet exemple, il est difficile de déterminer quel pic correspond effectivement au peptide. En B, seulement le peptide de synthèse est analysé, et un pic unique à 7,5 min est observé. Cependant, celui-ci se situe entre les deux temps de rétention observés lors de l'étude de la souche bactérienne.

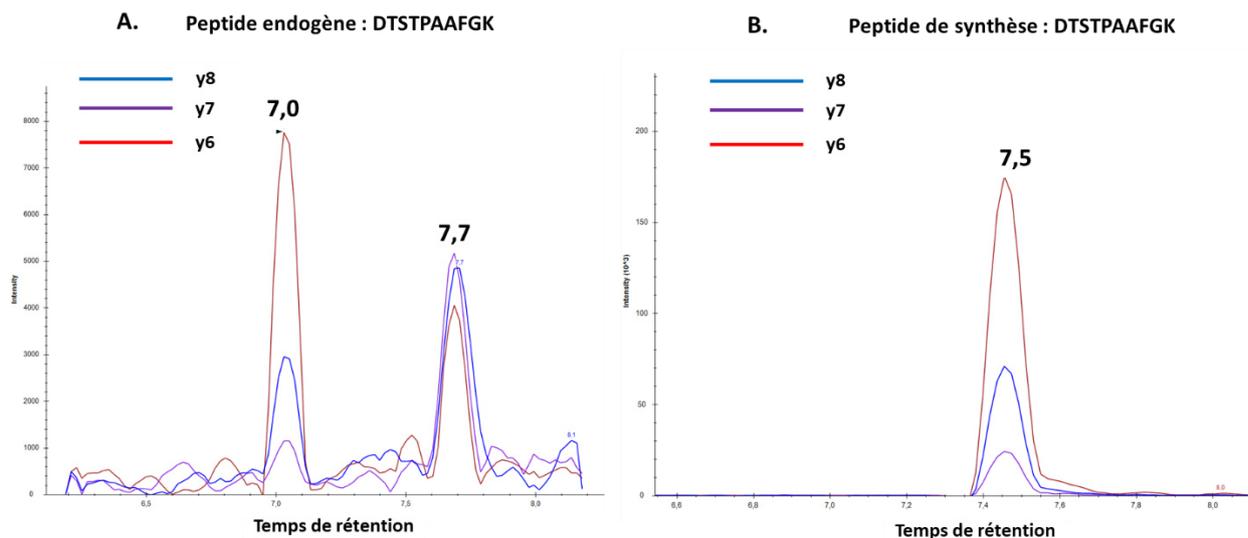


Figure 42 : En A. Le chromatogramme reconstitué du peptide DTSTPAAFGK (transition y8/y7/y6) lors de l'analyse d'une souche bactérienne. En B. le chromatogramme reconstitué du peptide DTSTPAAFGK (transition y8/y7/y6) pour l'analyse du peptide de synthèse seul.

Si l'on regarde alors l'analyse correspondant au peptide de synthèse, on remarque, même visuellement, que la transition y6 est celle majoritaire, et qu'elle est deux fois plus intense que la transition y8. Étant donné que le ratio entre les transitions doit être constant, il apparaît donc évident que le pic associé au peptide DTSTPAAFGK est celui retrouvé au temps de rétention de 7,0 min.

La dernière étape avant la fin de la sélection consiste à analyser à nouveau les souches bactériennes avec les peptides intermédiaires validés. Il est ainsi envisageable de vérifier en matrice, pour l'ensemble des transitions, la présence d'interférences. Les transitions potentiellement interférées sont alors éliminées. De plus, les transitions correspondant à de petits fragments (y3/y4/y5), jugées peu spécifiques, ne sont pas retenues de façon prioritaire, même si ce sont les transitions les plus intenses ; toutefois, il est impossible de faire ce choix dans le cas de peptides de peptide 6 à 8 acides aminés.

Il est important de noter qu'il est compliqué d'avoir une vision d'ensemble des potentielles interférences de chaque transition pour un grand nombre de matrices, et que cette optimisation doit se poursuivre au cours du temps, en fonction des analyses et des études menées.

3. Sélection finale des peptides suivis

L'ensemble des paramètres d'étude concernant les rapports de transitions et les temps de rétention sont consignés dans une base de données qui servira pour la validation post-analyse. Il ne faut néanmoins pas oublier que la moindre modification sur la méthode chromatographique ou les paramètres internes au spectromètre auront un impact sur ces valeurs. Il est donc important de fixer rapidement une méthode de travail unique et de prendre en compte chaque changement.

Lors du processus de choix des peptides et des transitions pour les protéines d'intérêt, la liste a été réduite pour ne cibler finalement plus que 50 protéines spécifiques de la virulence de *S. aureus*. (Tableau 4). Plusieurs raisons ont mené à l'élimination de certains facteurs de virulence de l'approche. Premièrement, certaines protéines comme Sa2165 ne présentaient pas de séquences parfaitement caractérisées. Des séquences incorrectes entraînent un choix de peptides rapporteurs ne correspondant pas à la protéine et donc une impossibilité de détection. Deuxièmement, certains facteurs comme certaines résistances aux antibiotiques (NorA, NorB) sont très rarement exprimés. Il a été difficile pour l'ensemble de ces facteurs d'obtenir des souches exprimant ces protéines. Afin d'alléger également le multiplexe, la décision a été prise, dans un premier temps, de ne pas suivre certains facteurs de faible occurrence. Ensuite, tous les facteurs de virulence ne sont pas forcément exprimés dans les conditions de culture utilisées (temps de croissance, milieu de culture), et certains facteurs peuvent être inductibles (principalement des mécanismes de résistances) ce qui complexifie leur étude. Finalement, certains facteurs de virulences sont trop faiblement exprimés pour que la méthode en l'état permette leur détection, ou comporte trop peu de peptides spécifiques pour une analyse fiable et répétable.

Proteins	Functions	Proteins	Functions
Blal	Beta lactamase repressor	PVL-lukF	Panton Valentine leucocidin F
BlaZ	Beta-lactamase	LukG (LukB)	Bi-component leukocidin LukGH
Chp	Chaemotaxis-inhibiting	LukH (LukA)	Bi-component leukocidin LukGH
Cna	Collagen-binding adhesin	PVL-lukS	Panton Valentine leucocidin FS
CoA	Coagulase	MecA	Betalactam resistance : MRSA
EdinB	Epidermal cell inhibitor	Nuc	Extracellular nuclease
EdinC	Epidermal cell inhibitor	Psm1	Structural maintenance
ETA	Exfoliative toxin serotype A	Psm4	Phenol-soluble modulins
ETB	Exfoliative toxin serotype B	Sak	Staphylokinase
ETD	Exfoliative toxin serotype C	SarA	Staphylococcal accessory
Fib	Fibrinogen binding	Sbi	IgG-binding protein
GapA	Dehydrogenase	Scn	Staphylococcal
HLA	Haemolysin alpha	SdrD	Fibrinogen-binding
HLD	Haemolysin delta	SEA	Enterotoxin A
HlgA	Haemolysin gamma,	SEB	Enterotoxin B
HlgB	Haemolysin gamma	SEC	Enterotoxin C
HlgC	Haemolysin gamma	SED	Enterotoxin C
IcaA	Intercellular adhesion	SEH	Enterotoxin H
IcaD	Biofilm PIA synthesis	Spa	ProteinA
IsaB	Immunodominant	SplB	Serine protease B
KatA	Catalase A	SSPA	Glutamyl endopeptidase
LukD	Leukocidin D	SSPP	Staphopain A
LukE	Leukocidin E	TSST	Toxic shock syndrome toxin-1

Tableau 4 : Liste finale des facteurs de virulence gardés dans la méthode, après différents filtres et sélections approfondies

Une fois cet ensemble de protéines éliminé, la méthode comprend 48 facteurs d'intérêt permettant une bonne caractérisation de l'expression de la virulence pour une souche de *S. aureus*. La méthode comporte la grande majorité des facteurs principaux décrits précédemment, comme MecA (responsable de la multirésistance chez *S. aureus*) et les 2 PVL (toxines impliquées dans les pneumonies à *S. aureus*), sans oublier les toxines hémolytiques les plus prévalentes (HLA, HLD). L'outil créé permet de suivre 163 peptides rapporteurs de ces 48 facteurs, représentant un total de 489 transitions.

IV. Préparation des échantillons bactériens

La préparation d'échantillons est une étape décisive dans la construction de la méthode et est limitante pour certains aspects de l'étude. Dans les recherches appliquées à la bactériologie discutées dans l'introduction, elle demeure complexe et constitue une majeure partie du temps de l'analyse. Un grand nombre de protocoles classiques utilisés pour une caractérisation en protéomique requiert des temps de digestion longs, ceux-ci pouvant aller de l'heure à une digestion réalisée sur une nuit complète, et pouvant s'accompagner d'étapes de dénaturation et d'alkylation. La digestion des protéines d'intérêt exige obligatoirement une lyse, en amont, afin de libérer les protéines contenues dans les cellules bactériennes. De plus, les échantillons étant généralement complexes, une étape de purification est souvent nécessaire, avec par exemple une purification par SPE (Solide Phase Extraction). Cependant, malgré l'existence de systèmes automatisés, la SPE requiert du temps (plus d'une heure) pour sa réalisation, notamment à cause de l'étape final d'évaporation, ce qui constitue une limitation dans le cadre de notre approche.

L'ensemble des étapes de cette préparation est présenté dans le workflow ci-dessous. Les différents choix effectués pour la préparation d'échantillons sont ensuite discutés dans cette partie.

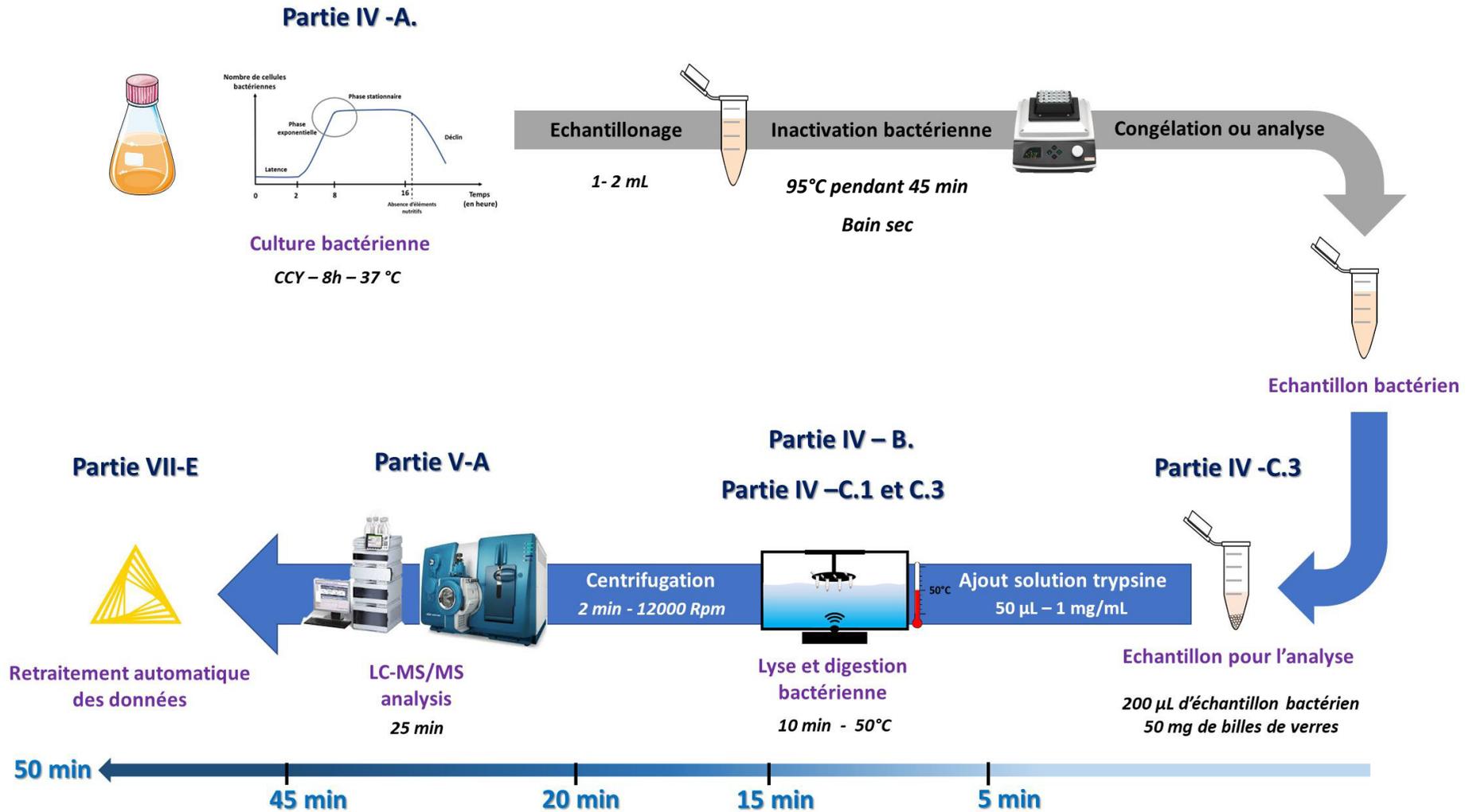


Figure 43 : Le workflow ci-dessus représente l'intégralité des étapes réalisées, de la culture bactérienne au retraitement des données de l'analyse. La totalité des étapes est détaillée dans les différentes parties indiquées en **bleu foncé**. Premièrement la culture bactérienne, avec le milieu et le temps de culture. Ensuite, le choix réalisé pour la lyse bactérienne et les optimisations associées (ajout de billes) ainsi que les paramètres de la digestion trypsique (temps, température, quantité de trypsine). L'analyse LC-MS/MS est réalisée en 25 minutes, portant l'ensemble de la préparation d'échantillon à 50 minutes.

A. Conditions de culture des souches cliniques

La composition du milieu de culture influence la croissance bactérienne ainsi que l'expression des facteurs de virulence. Le choix du milieu et les conditions de culture sont à prendre en compte lors de la construction du protocole de préparation d'échantillons. Afin d'évaluer ces paramètres, 20 souches de *S. aureus* ont été utilisées. Ces souches, préalablement typées par puce ADN, ont été fournies par le CNR à *Staphylocoques* via le CIRI (équipe Pathogénie des *Staphylocoques*). Elles ont également été utilisées pour valider le choix des peptides détaillés précédemment ainsi que pour le développement du protocole de préparation des échantillons nécessaire avant l'analyse en spectrométrie de masse. Les cultures ont été effectuées sur un milieu de culture liquide de type CCY. Ce milieu est employé pour permettre une meilleure expression de nombreuses toxines du *staphylocoque doré*¹⁹⁶ et a donc été adopté comme milieu de référence pour l'élaboration de la méthode.

Le milieu de culture estensemencé au départ à 50 UFC/mL et laissé sous agitation pendant 8 h à 37 °C pour atteindre la fin de la phase exponentielle de croissance (Figure 44).

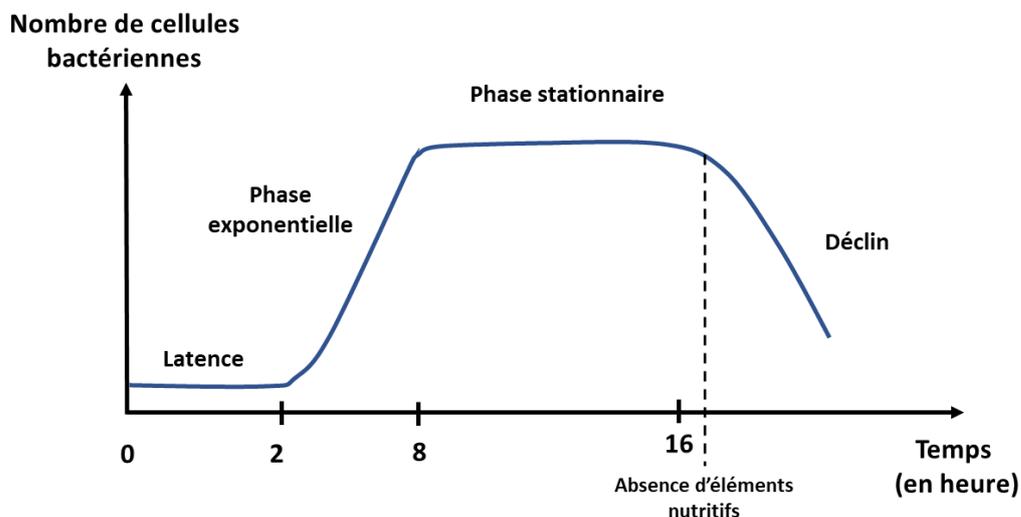


Figure 44 : Schéma représentatif d'un exemple de courbe de croissance bactérienne. Les temps indiqués sont fournis à titre d'exemples. On retrouve la phase de latence, suivie d'une accélération vers la phase exponentielle avant d'atteindre un palier lors de la phase stationnaire. Puis à confluence, on observe un déclin du nombre de cellules bactériennes dans la culture.

Comme expliqué sur le schéma ci-dessus, on retrouve plusieurs phases lors de la croissance bactérienne. Une phase de latence où un grand nombre d'enzymes sont synthétisées pour

permettre la croissance, puis une phase exponentielle où la reproduction cellulaire est maximale, suivie d'une phase stationnaire où la bactérie est parfaitement implantée dans le milieu. Dans le cas d'une culture, lorsque survient la carence en élément nutritif, une phase de déclin est alors observée.

La plupart des toxines et certains facteurs de virulence ne sont pas produits dans les premiers temps de la croissance bactérienne, mais lorsque l'on s'approche de la phase stationnaire ¹⁹⁷, qui est généralement constatée après 8 h d'accroissement. De plus, une linéarité entre l'accumulation de certaines protéines ribosomiques et le nombre de bactéries présentes est observée jusqu'au début du plateau de la phase stationnaire ¹⁹⁸. Cette linéarité est importante, car les protéines ribosomiques sont utilisées comme normalisateur interne dans le cadre de la quantification relative (VIII.B.1 Page :121). C'est pourquoi un temps de croissance de 8 h a été choisi pour la réalisation des échantillons.

Des aliquots de 1 mL de culture sont prélevés (mélange bactéries et milieu de culture). En général, dans le cadre des analyses MALDI-TOF, ne sont conservées que les bactéries sans le milieu de culture. Dans un souci d'exhaustivité de l'information, et du fait que les toxines d'intérêts sont sécrétées dans le milieu, nos analyses sont réalisées sur un mélange de cellules et de milieu de culture. Les souches sont enfin inactivées à 95 °C pendant 45 minutes afin de respecter les conditions de sécurité au sein du laboratoire. Les aliquots sont stockés à -80 °C avant utilisation.

B. Lyse des bactéries : choix de la méthode de lyse

Une fois les conditions du milieu d'étude fixées, la seconde étape est l'extraction des protéines. Pour ce faire il est nécessaire de réaliser une lyse bactérienne. Les toxines de *S. aureus* sont majoritairement excrétées et se retrouvent en grande partie dans le surnageant, mais une portion demeure néanmoins au sein de la cellule bactérienne. La majeure partie de l'information recherchée est située dans le compartiment intracellulaire, sans oublier l'ensemble des protéines membranaires (comme les porines et pompes d'efflux). Pour ces protéines, plus la lyse est efficace plus l'information recueillie est complète.

Devant les nombreuses approches possibles pour accomplir la lyse bactérienne, il est nécessaire de sélectionner celle convenant le mieux à notre application. La première stratégie mise en place a été l'utilisation de billes de verre sous une forte agitation. Le type de billes a été choisi selon les recommandations de Hayoun et al¹⁸⁵. Dans un second temps, des tests à l'aide d'une technologie à cycles de pression de type Barocycler NEP 2320¹⁹⁹ ont été réalisés. La technique permet la lyse complète de tissus complexes^{21,22} en moins de 30 minutes. La troisième approche a été l'utilisation d'ultrasons, qui s'est avéré être l'option la plus simple et la plus rapide pour une efficacité similaire.

	Méthode classique	Barocycleur	Ultrason
Efficacité	+	+++	++
Simplicité de la manipulation	++	+	+++
Rapidité	+	++	+++
Coût	+	+++	++

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des méthodes testées pour lyser les bactéries afin d'extraire les protéines. L'échelle correspond pour + pour un apport moyen, ++ pour très correct, et +++ pour la meilleure des solutions.

Ce tableau (Tableau 5) est un récapitulatif rapide sur différents paramètres des trois techniques. Il est difficile de comparer directement les trois approches, car chacune ne demandait pas le même temps, ou la même quantité d'échantillon et requérait parfois certains traitements particuliers. Dans l'ensemble, chaque stratégie permettait la détection des protéines d'intérêt sur les souches analysées. En termes de rapport signal sur bruit, la démarche Barocycler apparaît supérieure aux deux autres techniques. Cependant, le coût de l'appareil et sa relative complexité de mise en œuvre modèrent cet avantage. De plus, cet appareil nécessite un maniement de très haute pression, et requiert l'utilisation de tubes spécifiques de faible volume, ce qui rend la manipulation délicate, notamment pour la récupération de l'échantillon.

Le paramètre que nous voulions privilégier dans notre démarche restant la rapidité du processus, les ultrasons se sont révélés être les plus efficaces, avec de très bons résultats en seulement 2 minutes de lyse. Un avantage décisif de cette technique est la possibilité de

coupler l'étape de lyse et la digestion dans l'appareil à ultrasons, ce qui ne s'est pas avéré être réalisable pour les deux autres stratégies. Le gain de temps associé à ce couplage permet de réduire considérablement la durée de la préparation d'échantillons, et de passer en dessous de 30 minutes. Nous avons de ce fait construit notre approche basée sur l'utilisation d'ultrasons comme moyen de lyse.

C. Optimisation de la digestion trypsique

L'efficacité de la digestion enzymatique dépend d'un grand nombre de facteurs internes et externes. Par exemple, l'accessibilité aux sites de clivage ainsi que la résistance de la protéine vis-à-vis de l'enzyme de digestion²⁰² font varier cette efficacité. Plusieurs autres paramètres externes comme la quantité de trypsine, le pH, la température et le temps sont à prendre en compte. Pour des digestions sur la nuit, il est courant d'employer 20 fois moins de trypsine que de protéine totale (en masse). Plus la digestion est réalisée sur des temps courts plus il faudra un ratio important entre quantité de trypsine et quantité d'échantillon. Il est toutefois important de ne pas saturer l'échantillon, car la trypsine est une protéine qui peut s'autolyser générant des peptides pouvant entraîner des phénomènes de compétition à l'ionisation, conduisant à une perte globale en sensibilité. Cela contribue aussi à un encrassement plus rapide de l'appareil. Enfin, l'activité de la trypsine est maximale à un pH avoisinant 8, il est donc généralement préconisé d'employer un tampon salin, par exemple NH_4HCO_3 , permettant de maintenir ce pH optimal lors de la digestion.

1. Optimisation des temps de digestion

Nous avons dans notre cas évalué plus particulièrement le temps de digestion ainsi que l'impact de la température pour différentes protéines d'intérêt. La Figure 45 met en lumière l'impact du temps de digestion sur l'intensité du signal détecté. Plusieurs protéines ont été choisies comme exemple pour illustrer les divers comportements observables. Ces protéines correspondent aux toxines hémolytiques HLA et HLGB, une leukocydine (LukD) et une protéine ribosomique.

Pour chacun des graphiques est représentée la somme des aires de l'intensité brute de chacune des trois transitions d'un peptide en fonction du temps de digestion (0, 2, 5, 10, 20 et 30 minutes) pour 200 µL d'échantillon digérés grâce à 50 µg de trypsine ajoutée. En A, un profil classique est observé, avec une évolution rapide de l'aire du peptide avant d'atteindre un palier vers 10 minutes de temps de digestion. Une faible diminution en fin de palier (30 minutes) de l'aire du peptide est présente, ce qui peut correspondre soit à de l'adsorption sur les parois du tube ou alors à l'existence d'une activité résiduelle d'une autre enzyme de digestion (comme la chymotrypsine, présent en très faible quantité dans la trypsine utilisée).

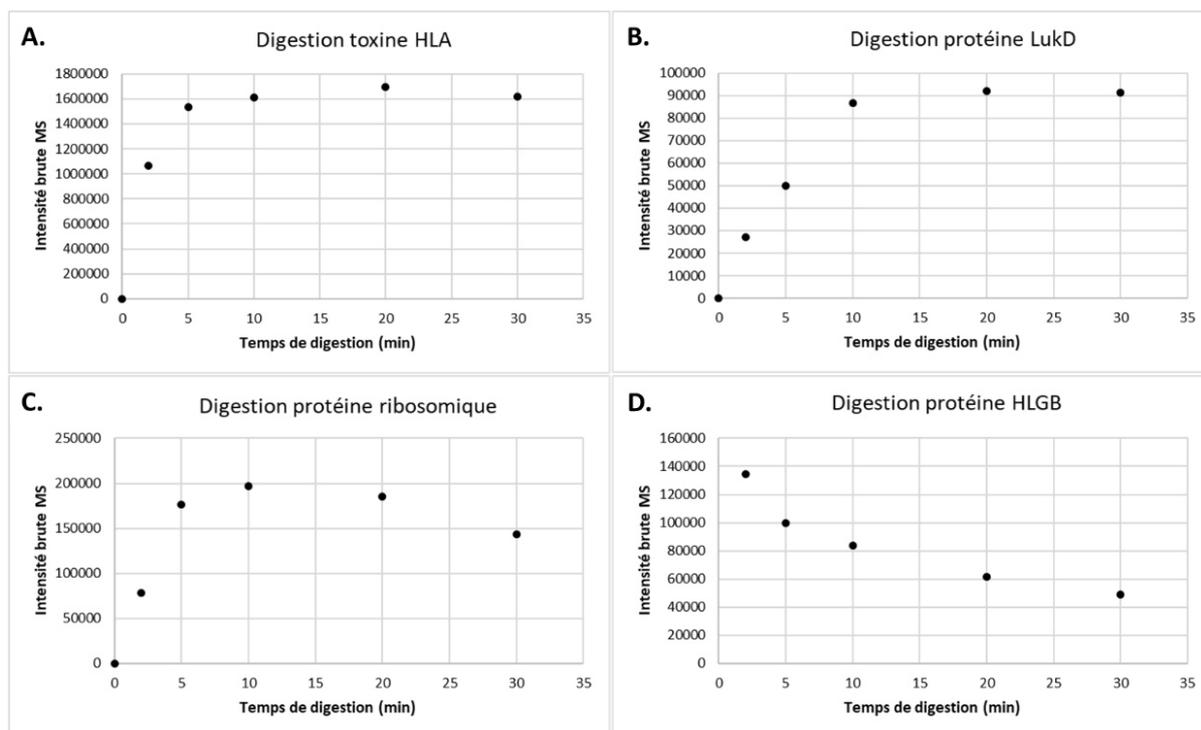


Figure 45 : Graphique explicitant l'impact du temps de digestion (en min) sur l'intensité brute du signal MS pour 4 exemples représentatifs (i.e. sommes des aires des 3 transitions d'un peptide caractéristique). En A, la toxine HLA avec une évolution rapide puis un plateau. En B, la protéine LukD avec une montée progressive puis un plateau. En C, une protéine ribosomique avec une montée rapide, puis une décroissance. En D, la toxine HLGB avec une décroissance rapide.

Dans le cas présenté en B, l'évolution est moins rapide, ce qui peut se justifier par le fait qu'en majorité, la protéine est située dans le compartiment cellulaire bactérien, et qu'il faut donc que la lyse s'opère avant que la digestion puisse être réalisée. Dans le cas du C, la même évolution est constatée, avec malgré tout une chute plus rapide, qui s'explique par la présence de traces de chymotrypsine qui hydrolyse les liaisons peptidiques après les résidus tyrosine et phénylalanine présents pour ce peptide. Le phénomène est aussi observé dans le cas D avec

une chute rapide qui intervient après 2 minutes de digestion. Parmi ces nombreuses allures de courbes possibles, on remarque que l'information est déjà présente dès 2 minutes de digestion. Néanmoins, un temps très court occasionnera une chute de la robustesse, car un écart de quelques secondes dans la manipulation deviendrait significatif. Comme chaque peptide d'une protéine ne présentera pas forcément les mêmes cinétiques de digestion, cela entraînera un biais dans le rapport d'intensité entre les peptides. De plus, la sensibilité s'en retrouverait amoindrie dans la quasi-totalité des cas. Il a donc été choisi de travailler sur 10 minutes de lyse + digestion, cas qui semble être un compromis satisfaisant entre temps/signal/robustesse. Il faut cependant garder à l'esprit que cette étape contribue grandement à la variabilité des résultats.

2. Influence de la température sur la digestion

Le second paramètre à optimiser pour l'étape lyse/digestion est la température. Cependant, le nombre de bactéries dans un échantillon ne sera jamais réellement le même, car sa variation dépend de multiples paramètres de culture. Il est donc nécessaire d'ajuster en conséquence la quantité de trypsine. Afin d'être dans les meilleures conditions pour une digestion rapide, la trypsine est ajoutée en forte quantité, à un ratio de 1 pour 5 (m/m). Être en condition d'excès de trypsine et travailler à de plus fortes températures procure un gain d'efficacité significatif lors de l'étape de digestion comme on peut le voir sur la Figure 46. L'appareil utilisé est un prototype issu du Bioruptor® plus (Diagenode s.a. Belgium), qui est un bain à ultrasons thermostaté. L'ajout dans notre cas est un système de chauffage et de régulation en température du bain à plus de 50 °C avec une marge de 1 °C tout au long de l'étape de lyse/digestion.

La Figure 46 représente pour 4 protéines issues de trois compartiments distincts (A : Protéine ribosomique - protéine située dans le cytoplasme. B : HLD : toxine sécrétée. C/D : Psm1 et MecA - transmembranaires ²⁰³) l'évolution du signal brut détecté en spectrométrie de masse en fonction du temps de digestion (2 minutes, 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes) pour une température de 37 et 50 °C. L'ensemble des conditions est normalisé par rapport à la condition 2 min à 37°C afin de représenter le gain en signal apporté par les différentes conditions.

Dans la quasi-totalité des cas présentés, l'impact de la température est bien visible, avec une augmentation significative du signal brut. Sur l'histogramme A, les gains observés sont supérieurs à 100 % pour chaque temps de digestion étudié. Pour la protéine Psm1 (C), l'augmentation de l'intensité brute est proche de 200 % à 15 minutes de digestion.

Travailler à 50 °C permet d'être dans des conditions proches de l'activité maximale de l'enzyme et octroie une homogénéisation importante du milieu. Grâce à cela, on remarque qu'en 10 minutes à 50 °C, la sensibilité obtenue est supérieure à celle pour 15 minutes de digestion à 37 °C. Ces constatations se retrouvent pour une majorité des protéines étudiées quelques soient leurs localisations. Par exemple, malgré le fait que la protéine HLD (B) est majoritairement présente dans le surnageant, ce qui entraîne une digestion rapide et directe, l'impact de la température est quand même visible. Cependant, l'effet est souvent plus important dans le cas des protéines ribosomiques qui nécessitent au préalable la lyse de la cellule, avant que la trypsine puisse avoir accès à la protéine. En revanche, pour certaines protéines comme MecA (D), l'impact de la température demeure faible et n'engendre pas un gain de signal important. Sur l'ensemble des protéines de la méthode, digérer à 50°C apporte soit une augmentation du signal brut, soit aucun changement. Des tests complémentaires ont été réalisés à des températures supérieures. Il a été observé un gain de signal jusqu'à 55 °C ; malheureusement la stabilité du maintien de la température ne permet pas l'utilisation de l'appareil dans ces conditions. En conséquence, il a été fait le choix de travailler à 50°C.

Cette expérience permet aussi de discuter du choix du temps de digestion sélectionné. En effet, l'apport dû à l'augmentation de la température pour les temps courts de digestion (2 et 5 minutes) est significatif. C'est le cas pour les protéines ribosomiques où l'intensité brute observée à 2 min 50°C est supérieure à celle obtenue en 10 minutes à 37°C. Il serait donc possible au vu des résultats de travailler très rapidement en seulement 2 minutes de digestion. Cela serait envisageable dans une optique de simple détection, car comme discuté dans la partie précédente, un temps aussi court entrainera une chute de la robustesse pour l'aspect quantitatif. Cependant, pour la réalisation d'une identification très rapide de l'espèce bactérienne, une digestion en moins de 2 minutes serait envisageable, permettant ainsi de diminuer grandement les temps d'analyse.

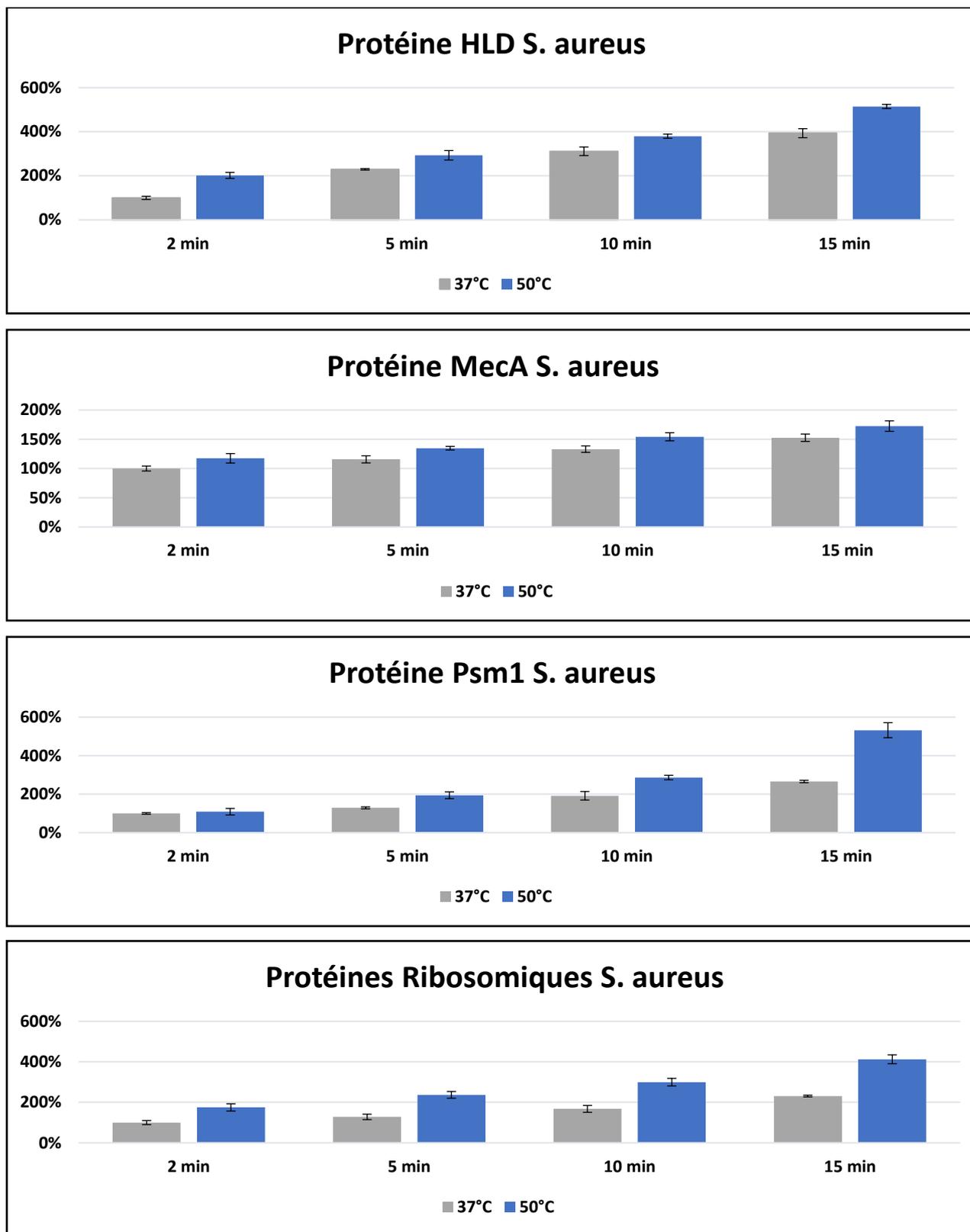


Figure 46 : Exemple de 4 protéines pour évaluer l'impact de la température sur l'efficacité de la digestion. Pour 2 températures (37° gris, 50° bleu), 4 temps de lyse/digestion sont testés (2, 5, 10, 15 min) sur des triplicats techniques. L'intensité brute correspond ici à la somme des aires des trois transitions du peptide majoritaire caractérisant la protéine. Sur l'axe des ordonnées est représenté l'intensité normalisée par la valeur de la condition 2 min à 37°C. La quantité de trypsine est de 50 µg pour 200 µL d'échantillon.

Pour l'ensemble des protéines présenté, l'augmentation de la température entraîne un accroissement du signal brut observé. L'augmentation est plus conséquente pour de faibles temps de digestion avec un gain de plus de 200 % pour 2 minutes de digestion pour la toxine HLD, puis 100 % à 10 minutes. Travailler à 50 °C permet d'être dans des conditions proches de l'activité maximale de l'enzyme et octroie une homogénéisation importante du milieu. Grâce à cela, on remarque qu'en 10 minutes à 50 °C, la sensibilité obtenue est supérieure à celle pour 30 minutes de digestion à 37 °C.

Il a donc été choisi de travailler à 50 °C pendant 10 minutes pour l'étape de lyse/digestion afin d'assurer dans un temps court une digestion efficace et robuste.

3. Optimisation : utilisation de billes de verres

Dans une optique d'optimisation du signal brut détecté, des billes de verre sont rajoutées dans les tubes avant l'étape de lyse par les ultrasons. Des billes de différents matériaux (silice ou verre) et diamètres (entre 0,1 et 0,5 mm) sont souvent utilisées pour la lyse bactérienne ; elles permettent d'effectuer une lyse mécanique dans l'échantillon. Dans leurs recherches, Hayoun *et al.*¹⁸⁵ emploient différentes billes en diverses quantités et concluent qu'il est nécessaire d'avoir un minimum de billes dans l'échantillon (en moyenne un tiers du volume de l'échantillon), que le diamètre optimum est de l'ordre de la centaine de μm et que le verre reste le matériau le plus efficace.

Nous avons pour une souche bactérienne réalisé un triplicat d'analyses avec l'ajout de 50 mg de billes de verre dans un tube Eppendorf de 1,5 mL (environ un tiers du volume de notre échantillon), d'un diamètre de 150-212 μm afin d'étudier l'impact sur le signal pour nos protéines d'intérêt (celles exprimées dans la souche). (Figure 47)

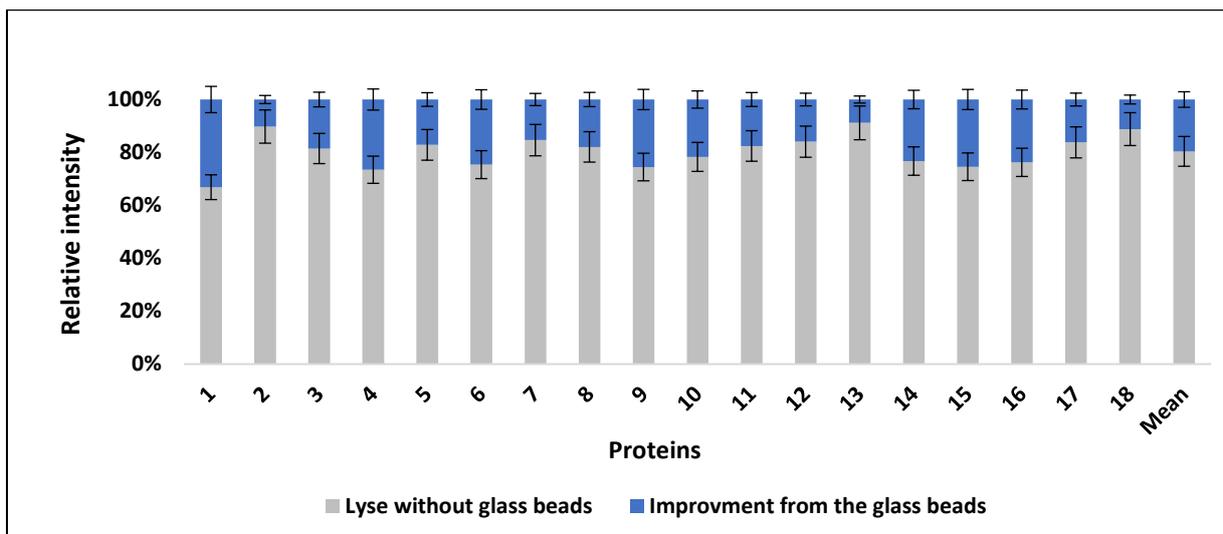


Figure 47 : La figure montre l'impact de l'utilisation des billes de verre lors de l'étape de lyse/digestion. On représente pour 18 protéines l'intensité relative entre la présence de billes (bleu) et l'absence de billes (gris). On observe dans l'ensemble des cas que l'ajout de billes engendre une augmentation du signal avec un maximum de 30 % pour la protéine 1 et un minimum de 10 % pour la protéine 13. La moyenne de gain en signal est de 20 %.

On remarque que pour les 18 protéines exprimées dans la souche, l'ajout de billes se traduit dans tous les cas par une augmentation du signal brut observé. Cette augmentation varie de 10 à 30 % et représente en moyenne un gain de 20 % de signal. Cette hausse dépend de la protéine et de son compartiment, car l'addition de billes aura un impact moindre sur une toxine sécrétée que sur une protéine membranaire. La protéine 1, dans notre cas, est une protéine ribosomique et la protéine 2, la toxine HLD. Nous avons constaté que l'augmentation de la quantité de billes pouvait se traduire par un gain en signal supplémentaire. Cependant, l'extraction de l'échantillon devient aussi plus difficile, et nous avons donc choisi de conserver les conditions présentées ci-dessus. En effet, il est très important d'éviter la présence de petites billes de verre dans l'échantillon lors de l'analyse LC-MS, car celles-ci peuvent entraîner l'obstruction de l'aiguille de prélèvement.

D. Conclusion sur la préparation d'échantillon

La création et la mise en place de ce protocole de préparation d'échantillon ont été une évolution de l'approche dans le laboratoire. Cette nouvelle approche a permis de passer d'une préparation sur 2 jours (digestion sur la nuit) à une préparation en 20 minutes pour qu'un échantillon bactérien soit prêt pour l'analyse en LC-MS/MS.

Le gain de temps le plus notable provient de la fusion des étapes de lyses et de digestion. Celles-ci sont réalisées grâce à une solution de trypsine concentrée dans un bain à ultrasons thermostaté à 50 °C, le tout en présence de billes de verre pour améliorer la lyse bactérienne. À cela se rajoute la suppression des étapes demandant de longs temps d'attente comme la dénaturation/alkylation ou la SPE, ce qui engendre un gain de temps considérable, mais aussi une simplification globale du protocole.

V. Analyse LC-MS-MS

L'analyse des échantillons est accomplie par LC-MS/MS sur un triple quadripôle de chez AB Sciex®. Il a été fait le choix de ne pas effectuer une étape de SPE afin de gagner du temps dans le processus analytique. Cependant, une étape de dessalage en ligne a été mise en place. L'utilisation d'une première colonne permet la rétention des peptides, tandis que sont éliminés les sels et les composés polaires présents dans l'échantillon. Le dessalage est accompli en 3 minutes en début d'analyse, ce qui permet la réalisation de l'ensemble du workflow en moins d'une heure. En comparaison, une étape de SPE classique demanderait typiquement entre 1 h et 3 h, et ne serait pas compatible avec notre approche de réduction des durées d'analyse.

Les étapes de la préparation d'échantillons sont opérées en 20 minutes, avec un objectif de temps total d'analyse total de moins d'une heure. Cela impose l'élaboration d'une séparation chromatographique de 30 minutes maximum. L'analyse LC débute donc par les 3 minutes de dessalage pendant lesquelles est effectué le conditionnement de la colonne utilisée pour la séparation. Une montée rapide à 10 % de phase organique (acétonitrile) est opérée pour accélérer le début du gradient. Un gradient linéaire de 10 % à 35 % en acétonitrile est mis en

place en 17 minutes, permettant l'élution de l'ensemble des peptides contenus dans l'échantillon. Pour finir, une étape de lavage et de reconditionnement est réalisée en 5 minutes, portant la totalité de la méthode LC à 25 minutes.

L'analyse mise en place comporte 49 protéines caractérisées par 163 peptides correspondant au suivi de 489 transitions. Comme détaillé dans l'introduction générale, une analyse en mode MRM classique est limitée à 120-150 transitions. Afin d'augmenter la capacité en multiplexage, l'utilisation du mode Scheduled-MRM a été choisi. Ce mode permet le suivi des transitions seulement sur de courtes plages de temps, centrées sur le temps de rétention des peptides et offre une augmentation de la capacité de multiplexage. Cependant, il est nécessaire d'une part de bien connaître les temps de rétention, et d'autre part que la séparation soit la plus robuste possible pour éviter toute perte d'information.

Les plages de détection ont été fixées à 1 minute et 20 secondes pour pallier d'éventuels décalages en temps de rétention des composés. Cette durée des plages permet également de maintenir un dwell time minimum de 5 ms sur l'ensemble de l'analyse, assurant un rapport signal/bruit satisfaisant. La largeur des pics chromatographiques est comprise entre 12 et 15 secondes. On peut donc obtenir une douzaine de points par pic, ce qui est suffisant pour une quantification robuste, en fixant le temps de cycle à 1 seconde.

La Figure 48 est un exemple d'analyse d'une souche bactérienne comportant l'intégralité des facteurs de virulence suivis dans la méthode, dans laquelle ont été ajoutés des peptides de synthèse. Lors d'une analyse de souches bactériennes, l'ensemble des protéines n'est pas présent à chaque fois.

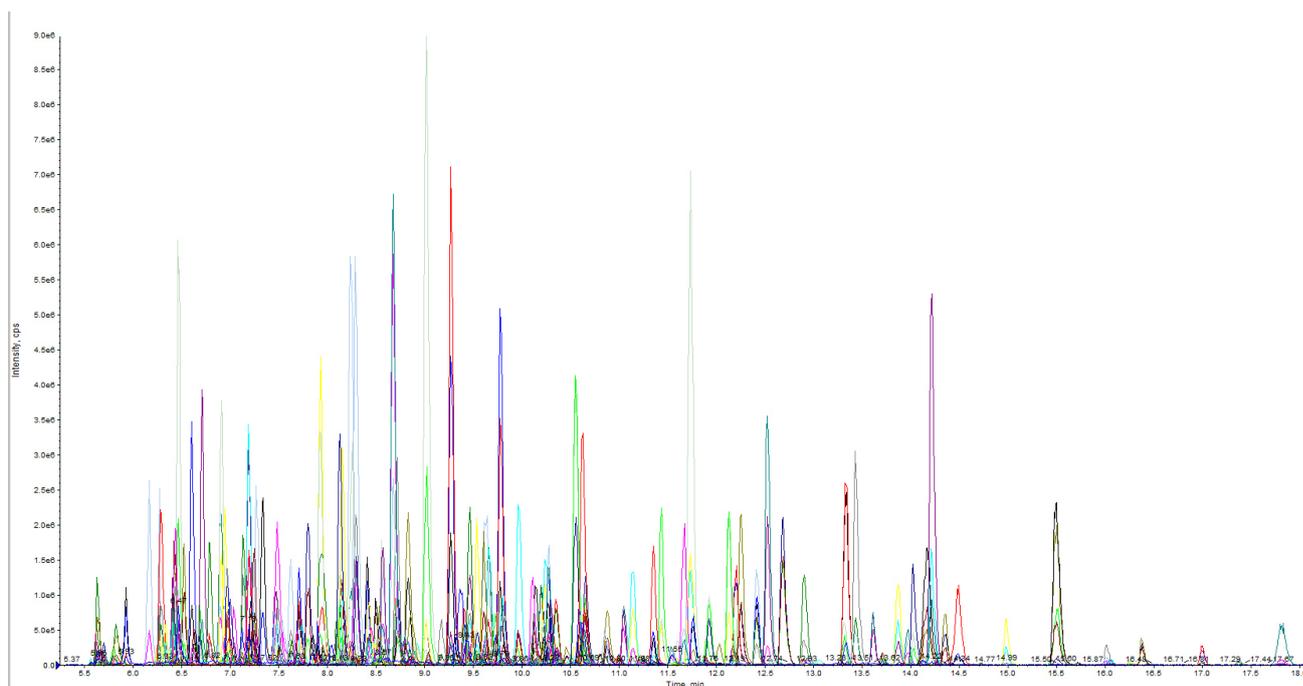


Figure 48 : Exemple d'une analyse avec l'utilisation de la méthode pour une souche bactérienne avec l'ajout des peptides de synthèse. L'ensemble des peptides est élué en moins de 20 minutes.

VI. Récapitulatif de la méthode

A. Réactifs

Le méthanol (MeOH), l'isopropanol (IPA), l'eau et l'acétonitrile (ACN) (qualité LC-MS) ont été achetés chez Fisher Scientific (Illkirch, France). L'acide formique (FA) (qualité LC-MS), les billes de verre lavées à l'acide (150-212 μm) et la trypsine de pancréas porcin (Type IX-S) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Les peptides synthétiques non marqués (PEPotec™ grade 2) ont été synthétisés par Thermo Fisher Scientific.

B. Souches bactériennes et conditions de culture

L'ensemble des souches bactériennes utilisées lors de la création de méthode et sa validation ont été fournies par le Centre national de référence de *Staphylococcus aureus* (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France).

Les cultures bactériennes ont été effectuées sur un milieu de culture liquide (CCY) media (3 % extrait de levure, 2 % bacto-casamino acids, 2,3 % sodium pyruvate, 0,63 % Na_2HPO_4 , 0,041 % KH_2PO_4 , pH 6,7). La concentration initiale dans la culture est de 50 UFC/mL et la culture est laissée croître sous agitation pendant 8 h à 37 °C afin d'arrêter la culture en fin de phase exponentielle de croissance. On récupère un mélange de culot et de surnageant afin d'avoir le maximum d'information. Les souches sont ensuite inactivées à 95 °C pendant 45 minutes afin de respecter les conditions de sécurité au sein du laboratoire. Les tubes Eppendorf sont alors congelés par immersion dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -20 °C ou -80 °C en attendant leurs analyses.

C. Préparation d'échantillon

Dans un premier temps, le mélange surnageant - culot est homogénéisé, puis 200 μL sont prélevés pour la préparation de l'échantillon auquel on ajoute 50 mg de billes de verre (diamètre : 150-212 μm) pour faciliter la lyse bactérienne. La digestion trypsique est effectuée avec 50 μL d'une solution de trypsine de 1 mg/mL, préparée dans 150 mM de NH_4HCO_3 . La

particularité de cette préparation d'échantillon est que la digestion et la lyse sont effectuées simultanément, dans un prototype de bain à ultrasons dérivé du Diagenode Bioruptor® plus (Diagenode s.a. Belgium) thermostaté à 50 °C pendant 10 minutes (cycle de sonication : 30 s en marche/30 s en arrêt) et utilisé en mode basse puissance. La digestion trypsique a été stoppée en acidifiant les échantillons à l'aide de 5 µL d'acide formique. Les tubes ont été centrifugés deux fois à 10 000 tours/minute pendant 2 minutes par centrifugation (minispin®, Eppendorf). Enfin, 180 µL de surnageant sont transférés dans des vials ambrés contenant un insert de 250 µL.

D. Analyse en ligne SPE LC-MS-MS

La séparation des peptides est effectuée sur un système composé d'une chaîne HPLC Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies) avec une pompe binaire haute pression Agilent 1290 (têtes de pompe A et B, pour la séparation LC) (Agilent Technologies, Wald-bronn, Allemagne), un passeur automatique, un four à colonnes ainsi qu'une seconde pompe binaire Agilent 1290 Infinity (têtes de pompe C et D) pour le dessalage en ligne.

Pour chaque analyse, le digestat trypsique bactérien (80 µL) est chargé sur une précolonne Be Online PL RP-S (15-20 µM – 2.1x50 mm 3/PK) (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) à 100 µL/min avec de l'eau (pompe C). Après 3 min de dessalage, la précolonne est mise en ligne avec une colonne d'analyse BEH C18 (130 Å, 1,7 µm, 2.1x100 mm) avec une pompe A à un débit de 300 µL/min. L'élution des peptides est réalisée grâce à un mélange de solvants A/B à 60 °C. La phase mobile A était composée d'eau avec 0,1 % d'acide formique, la phase mobile B étant de l'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique (v/v). Pendant la charge de la précolonne, la colonne est soumise à une étape isocratique de conditionnement à 2 % B, cette étape se prolongeant pendant 3 minutes après injection. Une montée rapide à 10 % de B est alors réalisée suivie de la séparation peptidique en utilisant un gradient de 10 % à 35 % pendant 17 min, puis augmentée de 35 % à 75 % B pendant 3 min à un débit de 300 µL/min. Une étape d'équilibrage a été réalisée à 2 % B pendant 2 minutes. Au cours de l'élution peptidique, la précolonne est lavée avec 100 % d'ACN contenant 0,5 % (v/v) d'acide formique

pendant 3 minutes à 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ (phase mobile C). Celle-ci est ensuite reconditionnée pendant 2 min dans les conditions initiales.

Les analyses sont effectuées sur un spectromètre de masse QTRAP 6500 (AB Sciex, Les Ulis, France) équipé d'une source d'ions TurboV électrospray et fonctionnant avec une version du logiciel Analyst (version 1.6.2, AB Sciex). Les données sont acquises en mode positif avec une tension de cône +5500 V. Le nébuliseur (air) est réglé à 70 psi et le gaz rideau (azote) est utilisé à 50 psi. La source d'ions Turbo VTM est réglée à 550 °C et le débit de gaz auxiliaire (azote) à 60 psi. Le spectromètre de masse a été calibré par du polypropylène glycol (provenant d'AB Sciex, Foster City, CA, USA) selon les instructions du constructeur. La résolution du Q1 est ajustée à $0,7 \pm 0,1$ Th. Et la résolution du Q3 est également réglée sur la résolution unitaire en mode MRM.

VII. Validation post-analyse

Afin d'assurer une analyse spécifique et caractéristique de l'échantillon, il est obligatoire de mettre en place des éléments de validation post-analyse. Ceux-ci ont pour but de vérifier l'identité du composé détecté, lors du retraitement à chaque analyse.

Comme montré plus haut avec l'exemple d'un peptide rapporteur de MecA (Figure 41), la seule détection des transitions ciblées à un temps de rétention compatible avec celui attendu peut ne pas être suffisamment concluant. Plusieurs paramètres de validation ont déjà été évoqués comme le **nombre** et **l'alignement des transitions**, le **temps de rétention**, le **ratio entre les transitions**. Dans cette section nous discuterons en détails ces critères, auxquels nous ajouterons **l'aire minimale acceptable**, ainsi que le **ratio d'intensité des peptides rapporteurs** d'une protéine. Il est en effet nécessaire, pour établir une méthode robuste, de définir précisément des plages de valeurs convenables pour chacun de ces critères. La définition de critères objectifs est en outre une étape indispensable à la mise en place de procédures de validation automatisées.

A. Nombre et alignement des transitions

Lors de la détection d'un pic chromatographique, le premier filtre de validation est l'alignement des transitions, illustré dans la Figure 49.

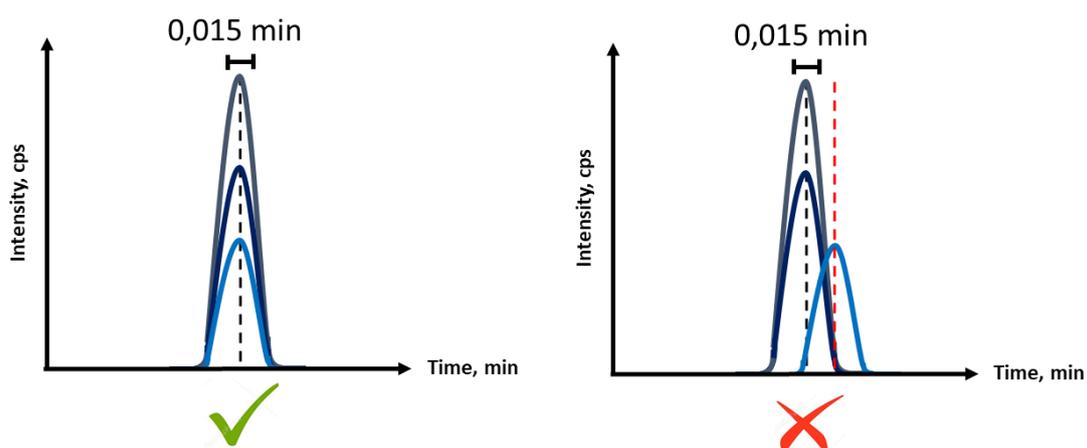


Figure 49 : Représentation schématique de la reconstitution des pics chromatographiques de trois transitions issues de l'analyse d'un peptide. À gauche le cas valide, où l'apex de chaque pic est bien aligné avec une marge de 0,015 minute. À droite, un exemple présentant un décalage en temps de rétention avec la transition bleu ciel.

Une transition correspond à un couple ion parent/ion fils. Etant donné que la fragmentation a lieu au sein de la cellule de collision, c'est-à-dire en aval de la séparation chromatographique, les trois fragments atteignent le détecteur au même moment ; il est donc essentiel que les transitions soient alignées pour pouvoir les attribuer à un même précurseur. Sur la Figure 50, on comprend très bien que le décalage à droite signifie bien l'absence d'une des transitions du peptide, et donc l'absence du composé cible. À gauche, les trois apex sont parfaitement alignés et autorisent la validation de la présence du peptide. Ce schéma représente des cas idéaux dans la détection, c'est pourquoi nous avons mis en place une valeur d'écart admissible de 0,015 minute qui équivaut à l'ordre de grandeur de notre temps de cycle. Cette tolérance permet de prendre en compte de possibles décalages de l'apex d'un cycle qui peuvent apparaître lors de la faible expression d'un facteur, proche de la limite acceptable en termes de rapport signal sur bruit.

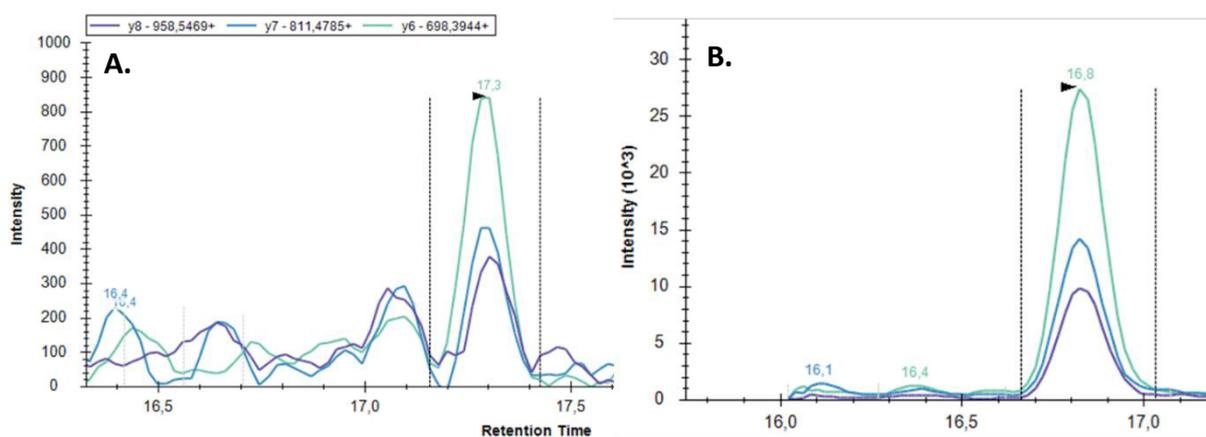


Figure 50 : Représentation de deux chromatogrammes reconstitués A. et B. pour un même peptide (SNFNPEFLSVLSHR) dans deux souches de *S. aureus* différentes (Logiciel Skyline®).

Ce type de cas est illustré par la Figure 50 qui présente des chromatogrammes pour les transitions associées au peptide (SNFNPEFLSVLSHR) de la toxine HLG B, détecté dans deux souches de *S. aureus* différentes. Premièrement, une disparité des niveaux d'expression est observée, avec dans un cas (A) une intensité brute de l'ordre de 1000 pour la transition la plus intense, tandis que dans l'autre cas (B), nous sommes proches des 30 000. On remarque ensuite que dans la première analyse, les apex des transitions ne sont pas parfaitement alignés (dû à la fréquence d'échantillonnage), mais qu'ils ne fluctuent que très faiblement, alors que dans le second cas, l'alignement est parfait. Cela met en avant un des points essentiels de

cette validation post analyse : elle doit être adaptée à de grandes variations d’expression, même si la plupart des cas critiques se retrouvent en limite de détection. Une différence du temps de rétention est également constatée entre les deux analyses (17,3 min et 16,8). Ces variations de temps de rétentions proviennent de l’écart observable entre différentes souches bactériennes, notamment pour des profils d’expression très contrastés.

B. Ratios de transitions

Afin de pallier à la limite du simple alignement des transitions et du temps de rétention pour l’identification d’un peptide, un nouveau critère de validation a dû être introduit. Comme détaillé dans la Figure 42, il est envisageable de se référer aux ratios entre les transitions. Ceux-ci sont déterminés lors de l’analyse du peptide de synthèse, avec les paramètres de source et de cellule de collision fixés. La fragmentation d’un peptide est rigoureusement reproductible lors de la conservation de ces paramètres, ce qui engendre un profil unique entre les différents fragments caractéristiques. De ce fait, la transition majoritaire dans un échantillon A sera toujours majoritaire dans l’échantillon B (sauf interférence). En se basant sur cette propriété, il est possible de calculer un rapport entre les différentes transitions qui doit être préservé entre les analyses. Ce rapport est nommé TVA pour Transition Validation Area (Figure 51). **TVA = Aire de la transition majoritaire/Somme des aires des trois transitions**

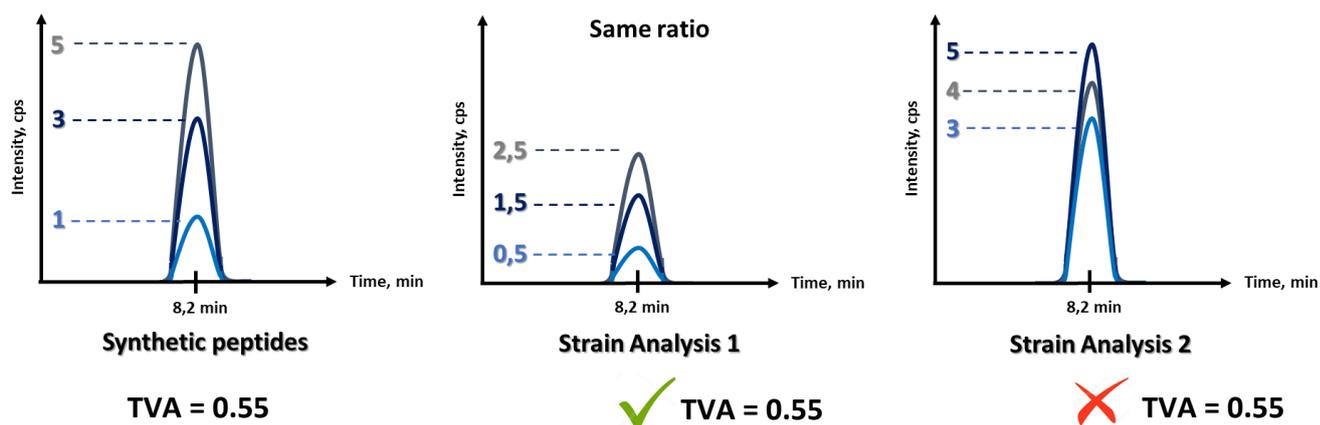


Figure 51 : Représentation schématique pour trois exemples, d’un chromatogramme reconstitué pour illustrer le critère TVA. À gauche, le peptide synthétique, avec l’intensité correspondant aux trois transitions du peptide, et une TVA associée de 0,555. Au milieu l’analyse d’une souche avec une intensité brute plus faible, mais une TVA toujours égale à 0,555 conduisant à la validation de l’identité du composé. À droite, l’analyse d’une seconde souche avec une même intensité maximale, mais un ordre et une TVA qui diffèrent, conduisant à l’invalidation du peptide.

Comme expliqué précédemment, l'analyse du peptide de synthèse permet de déterminer la présence du peptide à 8,2 min, caractérisé par une aire de la transition majoritaire (grise) ayant une valeur arbitraire de 5, puis la seconde à 3 (Bleu foncé) et la dernière à 1 (Bleu ciel). L'ensemble est défini par une TVA de 0,55. Le chromatogramme central, est un exemple d'analyse d'une souche, où un pic chromatographique est observé au même temps de rétention (8,2 min), caractérisé lui aussi par une TVA de 0,55, ce qui permet l'identification du peptide recherché. Le troisième chromatogramme quant à lui décrit également la présence d'un pic chromatographique à 8,2 min, mais avec une TVA de 0,42. De plus, la transition majoritaire est ici la transition bleu foncé, ce qui prouve que le pic observé ne correspond pas au peptide désiré. Plusieurs possibilités peuvent expliquer ce phénomène, par exemple lorsqu'une interférence impacte une transition, modifiant l'ordre relatif des transitions entre-elles, et donc la TVA.

Afin d'évaluer les limites acceptables de variation de la TVA, des résultats issus d'un grand nombre de souches préalablement analysées ont été compilés. Au total, les données ainsi collectées concernent 183 souches bactériennes de *S. aureus*. L'exemple présenté sur la Figure 52 se focalise sur les données de la protéine Chp (Chemotaxis inhibitory protein) qui permet la prévention de la phagocytose de la bactérie. Cette protéine a été choisie car elle possède divers niveaux d'expression et possède un taux de présence proche de 50 % (104 souches positives sur 183). La valeur de la TVA du peptide 1 (NSGLPTTLGK) est représentée pour l'ensemble des 183 souches (Figure 52).

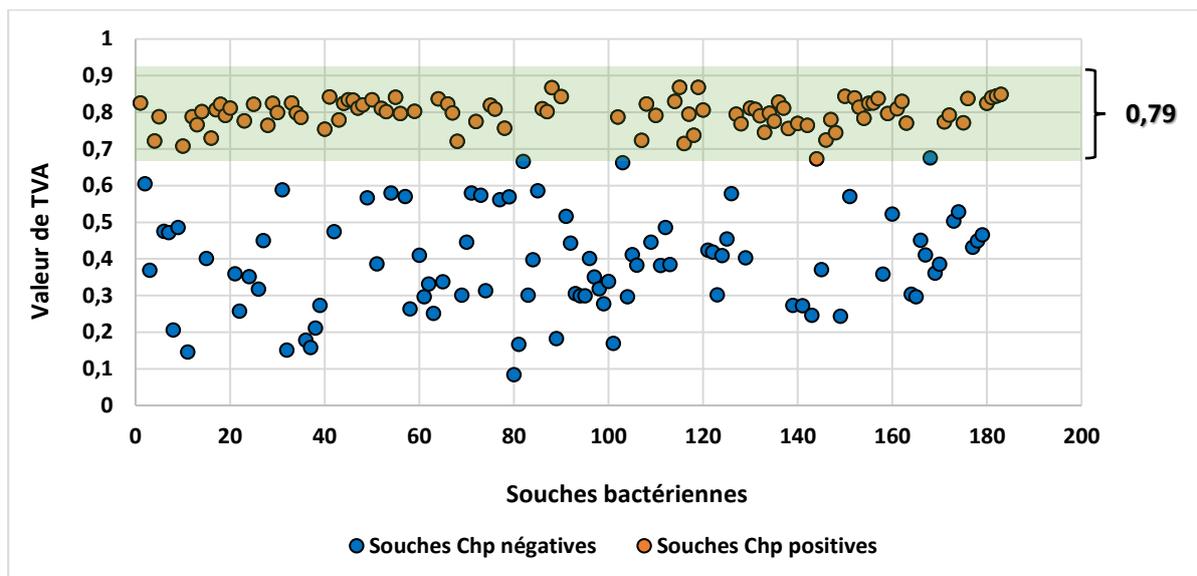


Figure 52 : Graphique représentant la valeur de la TVA du peptide n° 1 (NSGLPTTLGK) de la protéine CHP pour 183 souches de *S. aureus*. En orange les souches considérées comme positives pour la protéine CHP et en bleu les souches négatives. La zone verte représente une variation de 15 % autour de la valeur cible de 0,79 pour la TVA.

La valeur de TVA attendue pour le peptide NSGLPTTLGK selon l’analyse du peptide de synthèse en matrice est de 0,79. La présence d’un cluster centré sur 0,8, qui correspond à la valeur escomptée, est observable. Si l’on compare la totalité des points au sous-ensemble correspondant seulement aux souches positives (points orange), alors il apparaît que toutes les souches positives sont comprises dans le cluster. La zone verte représente l’intégralité des valeurs concordant à la valeur cible, plus ou moins 15 % d’erreur. La moyenne pour l’ensemble des valeurs de TVA pour les souches positives est 0,798 pour un écart type de 0,039 et un CV de 4,8 %. Une grande majorité des souches négatives ne sont par ailleurs pas incluses dans cette zone de validité. Cependant, on remarque la présence de 3 points bleus ainsi que d’un point orange en limite de la zone verte. Ce sont ces cas limites positifs et négatifs qui demandent l’utilisation de plusieurs filtres pour conclure sur la présence ou non de la protéine.

La valeur de la TVA est directement reliée à la corrélation entre les différentes transitions du peptide. Il est crucial que cette corrélation soit maintenue sur une gamme dynamique importante. Si l’on observe la droite de corrélation entre les deux transitions majoritaires (γ_6/γ_8) du peptide NSGLPTTLGK (Figure 53), alors on remarque que la corrélation ($R^2 = 0.989$) est conservée sur plusieurs décades d’expression de la protéine (4000 en aire à 400 000).

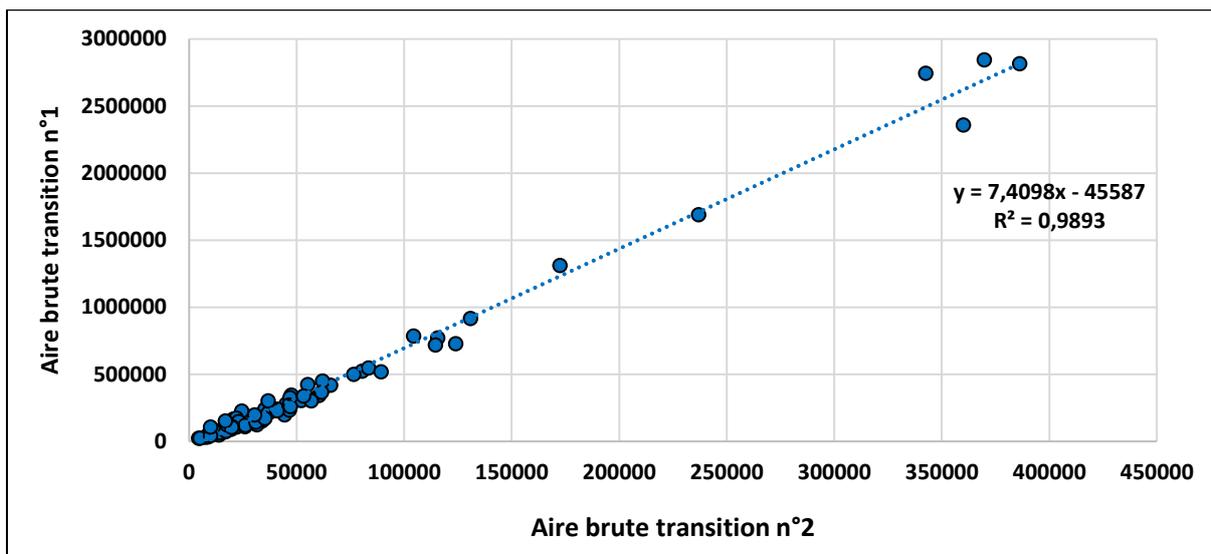


Figure 53 : Droite de corrélation entre les aires brutes des 2 transitions majoritaires du peptide n° 1 de la protéine CHP. Le R^2 associé à la droite est de 0,9893.

La Figure 54 représente un box plot entre les valeurs de TVA pour des souches positives (en vert) et pour des souches négatives (en rouge). Cette représentation met en avant l'efficacité du filtre pour valider la présence d'un peptide dans l'échantillon, avec dans ce cas aucun recoupement des deux plots, et un plot pour les souches positives très affiné pour cette protéine.

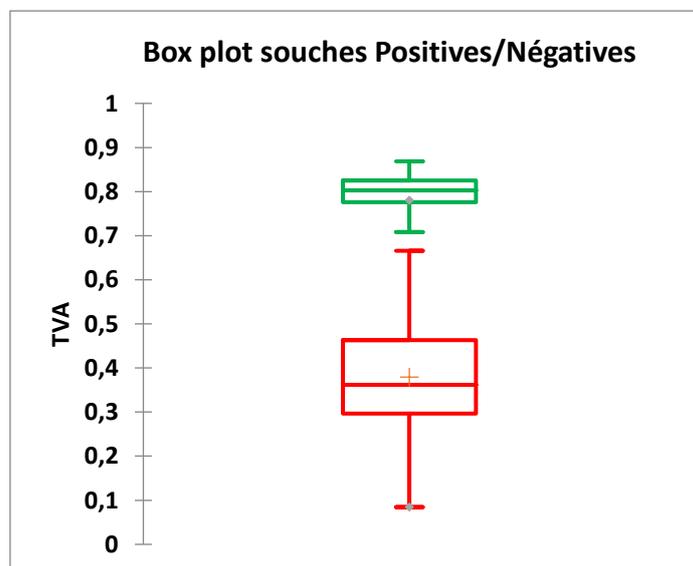


Figure 54 : Box plot de la valeur de TVA en fonction des souches positives ou des souches négatives. Pas de recoupement observé.

Même si la TVA dépend de processus physiques hautement répétables, on observe tout de même de légères variations pour certains points sur la Figure 52, notamment dans le cas de peptides en limite de détection. Une variation maximale de 20 % par rapport à la valeur attendue d'après le peptide synthétique est autorisée, même si dans les cas optimums, la variation constatée est de l'ordre de 5 % comme c'est le cas dans notre exemple.

Les valeurs de TVA possibles sont comprises entre 0,99 et 0,33, et ce paramètre est à prendre en compte lors du choix des transitions du peptide. En effet, il est souhaitable d'être dans la plage 0,45 – 0,8, car avoir une TVA proche de 0,99 signifie que l'une des transitions compose 99 % du signal total, et donc que deux transitions se retrouvent au niveau du bruit de fond. Comme il est nécessaire de détecter les trois transitions pour valider le peptide, une transition de très faible intensité peut entraîner des difficultés supplémentaires lors du retraitement. D'un autre côté, plus la valeur sera proche de 0,33, plus cela signifie que les aires des trois transitions sont équivalentes. Or, le bruit moyen généralement observé pour une analyse se rapproche statistiquement de cette valeur. Cela peut ainsi conduire à la validation du bruit intégré automatiquement au temps de rétention attendu lors d'un retraitement automatique, ce qui augmente le taux de faux positifs. Dans le cas de la Figure 54, il n'y a pas de recoupement entre les 2 boîtes (rouge et verte), mais cela provient aussi du fait que la valeur de la TVA est suffisamment caractéristique. La TVA n'est pas faite pour être le seul filtre ; elle est destinée à éliminer la sélection d'un pic interférent qui serait présent au même temps de rétention de l'analyse, mais ne permet pas d'éliminer l'ensemble des pics parasites possible.

C. Aire minimale de détection

Il est nécessaire de mettre en place un critère de filtre supplémentaire afin d'éliminer les pics d'intensité insuffisante *via* l'utilisation d'une aire minimale de détection.

La plupart des difficultés provient des peptides faiblement concentrés (Figure 50). Afin de limiter les faux positifs, il faut que le seuil théorique soit assez élevé. Il est donc indispensable de trouver un compromis pour la valeur de ce seuil en aire, et l'adapter si possible à chaque peptide et à chaque protéine en fonction de l'information pertinente que l'on veut en retirer. Expérimentalement, sur l'ensemble des analyses menées au cours de la thèse, une valeur

moyenne de 8000 en aire a semblé être le bon compromis pour optimiser le retraitement. Cette valeur est toutefois ajustée en fonction des divers peptides. Dans le cas où une protéine n'est jamais fortement exprimée (intensité de ses différents peptides proche du bruit de fond et valeur limite de 8000 en aire pour la transition maximale), le seuil est abaissé.

En reprenant l'exemple de la protéine CHP, avec l'application du filtre en aire minimale (Figure 55), on est capable d'affiner le retraitement.

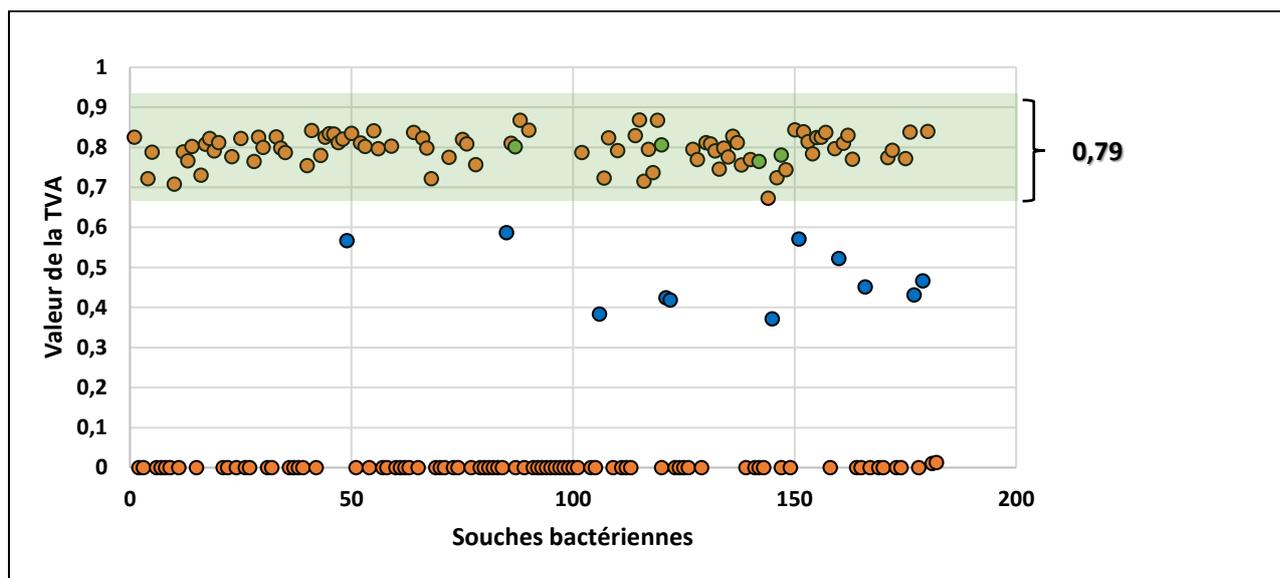


Figure 55 : Graphique représentant la valeur de la TVA du peptide n° 1 (NSGLPTTLGK) de la protéine CHP pour 183 souches de *S. aureus*. Les souches à 0 sont les souches ne validant pas le filtre d'aire minimale. En vert, on retrouve les souches avec une valeur de TVA valide, mais qui ne valident pas le filtre d'aire minimale. En bleu, les souches ayant une TVA invalide, mais ayant une valeur en aire minimale suffisante.

Les points éliminés sont marqués par une valeur nulle de TVA ou une couleur verte. Un grand nombre de points sont écartés et seulement 11 points concordant à des souches négatives (point bleu) sont gardés. Ces 11 points bleus correspondent à l'intégration de pics parasites proches du temps de rétention du peptide cible lors de l'absence de celui-ci. Cependant, l'ensemble de ces points demeure hors de la zone de validité (zone verte) de la TVA. De plus, on remarque que les 3 points bleus en limite de la zone de validité observés sur la Figure 52 ont été éliminés par le filtre.

Les points verts quant à eux se réfèrent à des souches pour laquelle la valeur de TVA est valide, mais de trop faible intensité. Deux cas de figure sont alors possibles : un faux positif ou un faux négatif. Un faux positif résultera généralement d'une intégration d'un pic parasite très

peu intense pour lequel la TVA reste malencontreusement valide, phénomène le plus souvent constaté pour des valeurs de TVA proches de 1 et 0,33. En revanche, il est aussi envisageable que le filtre élimine le peptide, car celui-ci est simplement trop faiblement exprimé par rapport à la limite fixée. Le compromis sur la valeur de ce filtre correspond la limite de détection pour le peptide.

D. Conservation du ratio de peptide

Le dernier filtre mis en place est un filtre de sécurité qui permet d’assurer la véracité du résultat avec une caractéristique supplémentaire. Si la digestion est répétable et le protocole mis en place robuste, alors les intensités de chaque peptide d’une protéine doivent corrélérer entre elles, entre chaque analyse, comme sur l’exemple présenté avec la Figure 56.

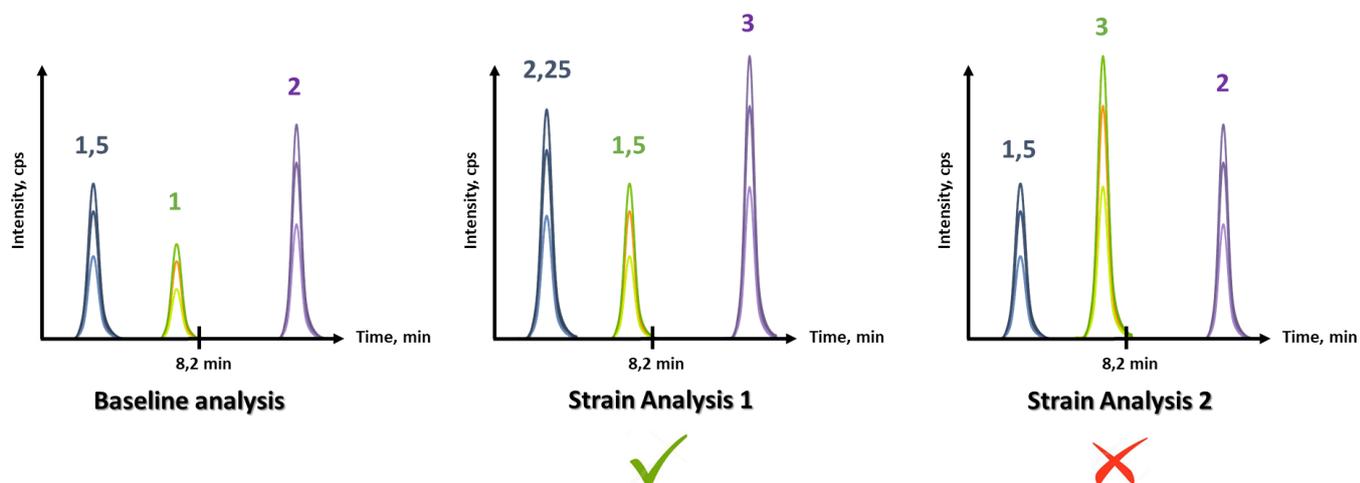


Figure 56 : Représentation schématique, pour trois exemples, d’un chromatogramme reconstitué pour illustrer le critère du ratio entre les peptides. Les valeurs au-dessus des peptides sont des valeurs arbitraires représentant la somme des aires des trois transitions du peptide. À gauche, l’analyse référence, avec les valeurs de références entre les peptides. Au milieu l’analyse d’une souche avec une intensité brute supérieure, mais un ratio entre les peptides bien conservé à la validation de l’identité du composé. À droite, l’analyse d’une seconde souche avec une même intensité maximale, mais une incohérence dans le ratio, avec le peptide minoritaire (vert) qui devient majoritaire dans cette analyse.

Le cas représenté à gauche dans la Figure 56, est celui d’une analyse de protéines parfaitement caractérisée. Pour l’exemple, une valeur arbitraire en aire pour chacun des peptides est attribuée (1 pour le peptide vert et 2 pour le peptide violet). Il y a donc un rapport 2 entre ces deux peptides, qui doit être retrouvé lors de l’analyse d’une future souche (même si l’on observe entre ces deux souches des variations d’expression de la protéine), ce

qui est montré dans le second chromatogramme, avec le même rapport de 2 entre les peptides. Cependant, sur le troisième chromatogramme, le rapport entre ces deux peptides est de 0,75, ce qui révèle la présence d'une anomalie durant l'analyse.

Le ratio de peptides est théoriquement identique dans chaque analyse pour des conditions inchangées. Néanmoins, un nombre considérable de paramètres peuvent l'impacter et engendrer des variations plus ou moins importantes. Le principal est l'effet matrice, qui survient lors d'une coélution de l'analyte avec d'autres composés, entraînant des compétitions lors du processus d'ionisation menant par la suite à une perte ou un gain en signal. Dans notre cas, cela peut se traduire sur une souche bactérienne qui n'exprime pas une protéine dont un peptide est élué au même temps de rétention que notre composé d'intérêt puis qui dans une seconde souche exprime fortement cette protéine, entraînant une suppression d'ionisation et une perte de signal important. D'autre part, un biais lors de la préparation d'échantillon peut aussi entraîner de légères variations.

Devant l'ensemble des possibilités d'impact, il a été choisi d'accepter une variation de l'ordre de 20 % entre les différents ratios de peptide et d'utiliser l'information comme sécurité lors de cas litigieux.

Afin d'illustrer ce point, la Figure 57 correspond à l'analyse de corrélation entre deux peptides pour la protéine CHP de notre exemple.

La somme des aires des trois transitions du peptide 1 (NSGLPTTLGK) est représentée en fonction de la somme des aires des trois transitions du second peptide (SSYVINGPGK). Une corrélation importante avec une P-value <0,01 est alors obtenue

Ce ratio peut également servir d'assurance pour la quantification. Une fois que le ratio est caractérisé sur un grand nombre de souches, il permet de remonter à la quantité d'un peptide qui aurait subi une mutation sur une analyse, simplement via l'aire d'un second peptide et la droite de corrélation correspondante.

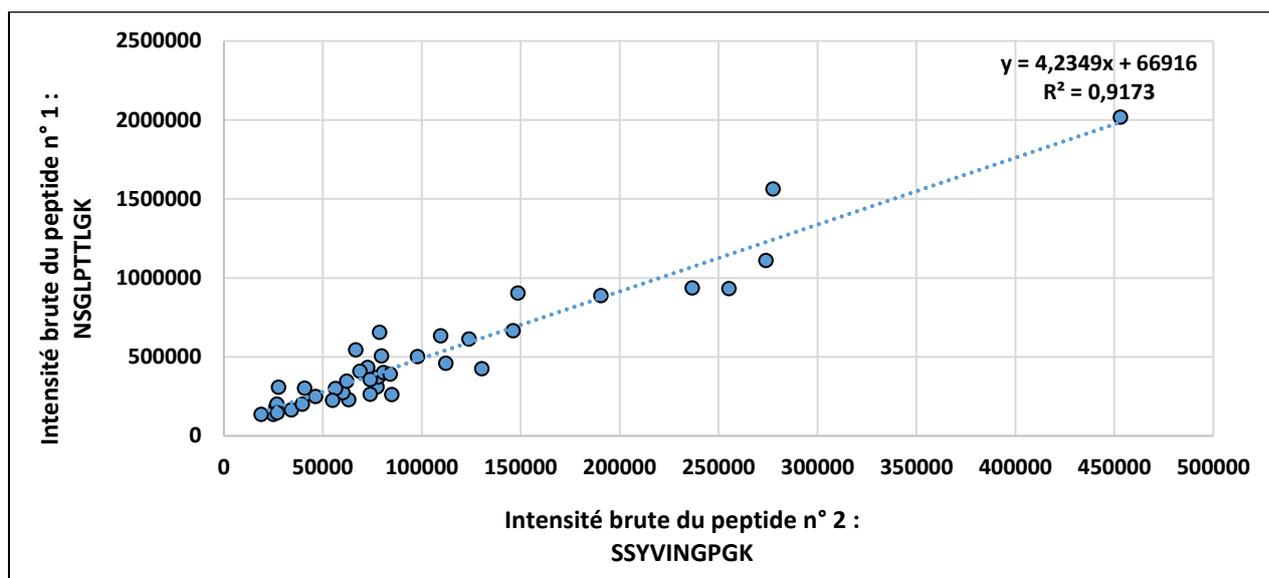


Figure 57 : Droite de corrélation entre la somme des aires des transitions du peptide 1 et du peptide 2 de la protéine CHP, avec un R^2 associé de 0,9173.

VIII.Étape de quantification

A. Quantification relative

La quantification pour l'ensemble des approches en spectrométrie de masse est un véritable défi, notamment les stratégies de quantification absolue. Elles requièrent beaucoup de temps de développement et demandent un investissement conséquent pour l'achat de peptides lourds marqués. Même si l'information quant à la quantité exacte de protéines d'intérêts est alléchante, il serait trop compliqué de mettre en place une telle approche pour doser spécifiquement l'ensemble de nos 50 facteurs de virulence. L'impact économique que représente l'ajout de 50 composés lourds à chaque analyse (pour un peptide par protéine) est trop important. De plus, l'addition des peptides marqués lourds doit être particulièrement contrôlée et n'est pas vraiment compatible avec des analyses à haut débit. Nous avons donc choisi de réaliser une quantification relative (approche label-free) à l'aide de normalisateurs internes. La comparaison d'expression de façon relative demeure une information très pertinente à obtenir, et l'élaboration de l'approche reste bien plus simple à mettre en place. En revanche, il est nécessaire de sélectionner minutieusement les normalisateurs de la méthode et de fixer l'ensemble des paramètres pouvant impacter la quantification.

B. Utilisation de normalisateurs internes

Pour comparer les niveaux d'expression des facteurs de virulence entre les différentes souches bactériennes, il est important d'obtenir des informations sur les niveaux d'abondance ; cela permet de mieux comprendre et appréhender l'impact de certains facteurs sur la sévérité et de compléter les approches génomiques. Il n'est pas possible de normaliser en fonction du nombre total de protéines à cause des grandes variations d'expression observées lors de l'analyse des diverses souches cliniques. Pour pallier ce problème, nous avons eu recours à l'utilisation de normalisateurs internes. Ceux-ci doivent (i) permettre la comparaison de l'expression des bactéries entre elles (ii) être robuste et (iii) simple

d'utilisation. Il a été choisi d'employer les protéines ribosomiques comme normalisateur interne.

1. Protéines ribosomiques

Les protéines représentent 55 % de la masse sèche d'une bactérie, et son cytoplasme est très riche en ribosomes qui représentent à eux seuls 40 % du poids sec de la bactérie. Ce sont des protéines très abondantes, qui se détectent facilement par LC-ESI-MS/MS. Elles sont très spécifiques et hautement conservées (très peu de mutations), c'est d'ailleurs pour ces raisons qu'elles sont majoritairement utilisées pour l'identification bactérienne par analyse MALDI-TOF. De plus, la quantité de protéines ribosomiques est plus ou moins constante dans chaque bactérie pendant la phase de croissance, ce qui permet de rapporter la quantification à l'expression d'une bactérie.

2. Caractéristiques et choix des normalisateurs

Même si ces protéines sont hautement conservées, il est préférable de s'appuyer sur plusieurs normalisateurs pour effectuer la quantification. Nous avons décidé d'utiliser 3 peptides, issus de trois protéines ribosomiques différentes, à trois temps d'élution distincts (début, milieu et fin de gradient), assurant ainsi la robustesse de notre quantification.

Une étude de dénombrement bactérien sur des cinétiques de cultures (milieu CCY) allant de 2 à 10 heures de temps de croissance a été réalisée. Cette étude nous a permis de faire notre choix quant à nos normalisateurs internes (Figure 58).

En A est représentée la droite correspondant à chacun des 3 peptides sélectionnés (IYPGENVGR, EMSVLELNDLVK et ALQSAGLEVTAIR) représentant la somme de l'aire des trois transitions du peptide en fonction du nombre de bactéries dénombrées. Pour les trois droites, la linéarité observée est très satisfaisante ($R^2 > 0,99$) et démontre que l'utilisation de ces peptides semble cohérente en tant que normalisateur interne. Néanmoins, il semble plus adéquat et plus robuste d'utiliser la moyenne de ces trois peptides pour laquelle la corrélation est maximale, pour la quantification relative. (Figure 58 -B)

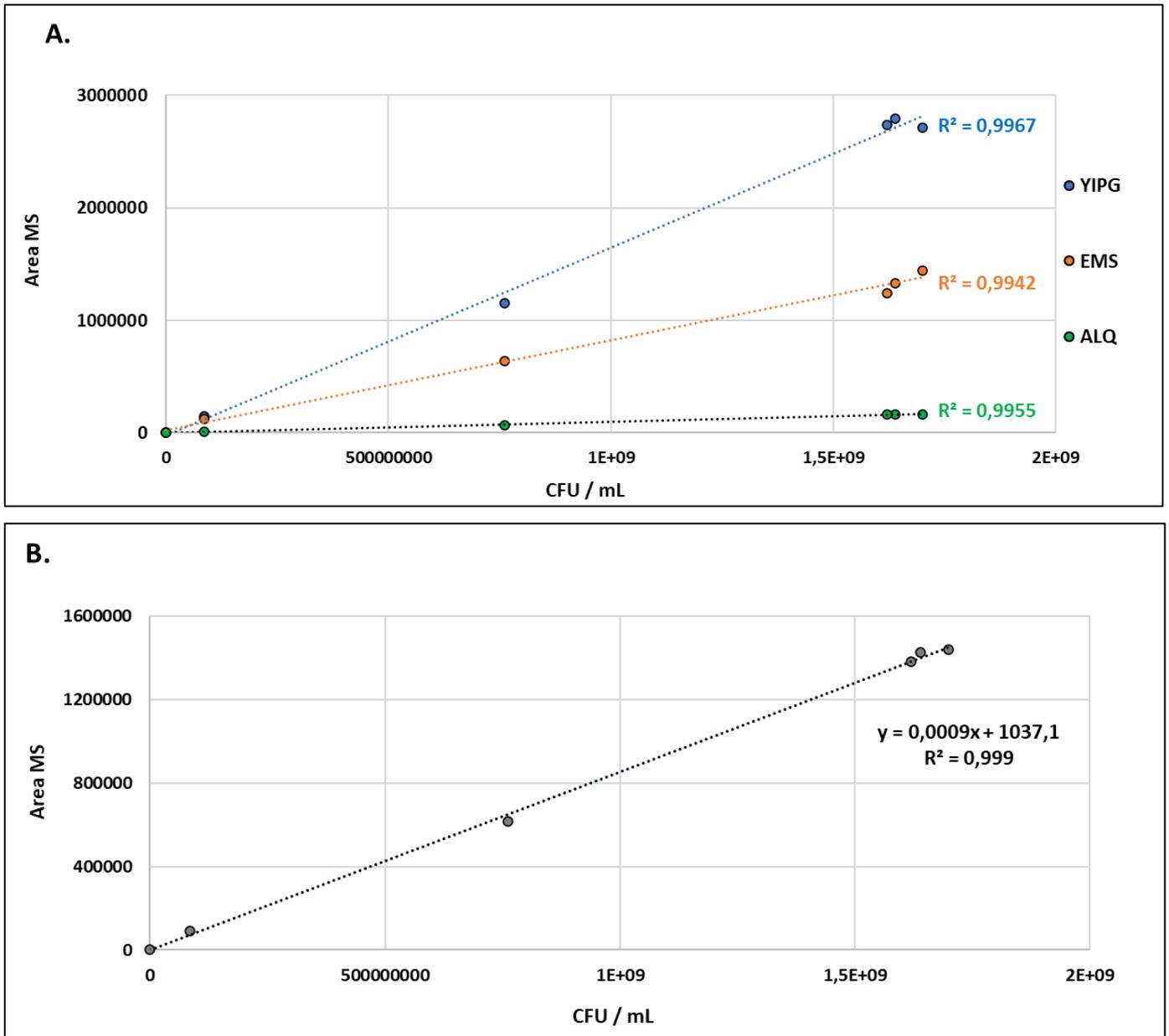


Figure 58 : Droite de corrélation entre l'aire des peptides ribosomiques utilisés comme normalisateur et le nombre de bactéries (en CFU/mL). En A, les droites indépendantes pour les peptides rapporteurs des protéines ribosomiques. En bleu le peptide YIPGENVGR : 30S ribosomal protein S11. En orange le peptide EMSVLELNDLVK : 50S ribosomal protein L7/L12. En vert le peptide ALQSAGLEVTAIR : 50S ribosomal protein L27. En B est représentée la moyenne des 3 peptides en fonction du nombre de bactéries dans l'échantillon.

C. Quantification relative en MRM

1. Calcul de quantification d'un peptide

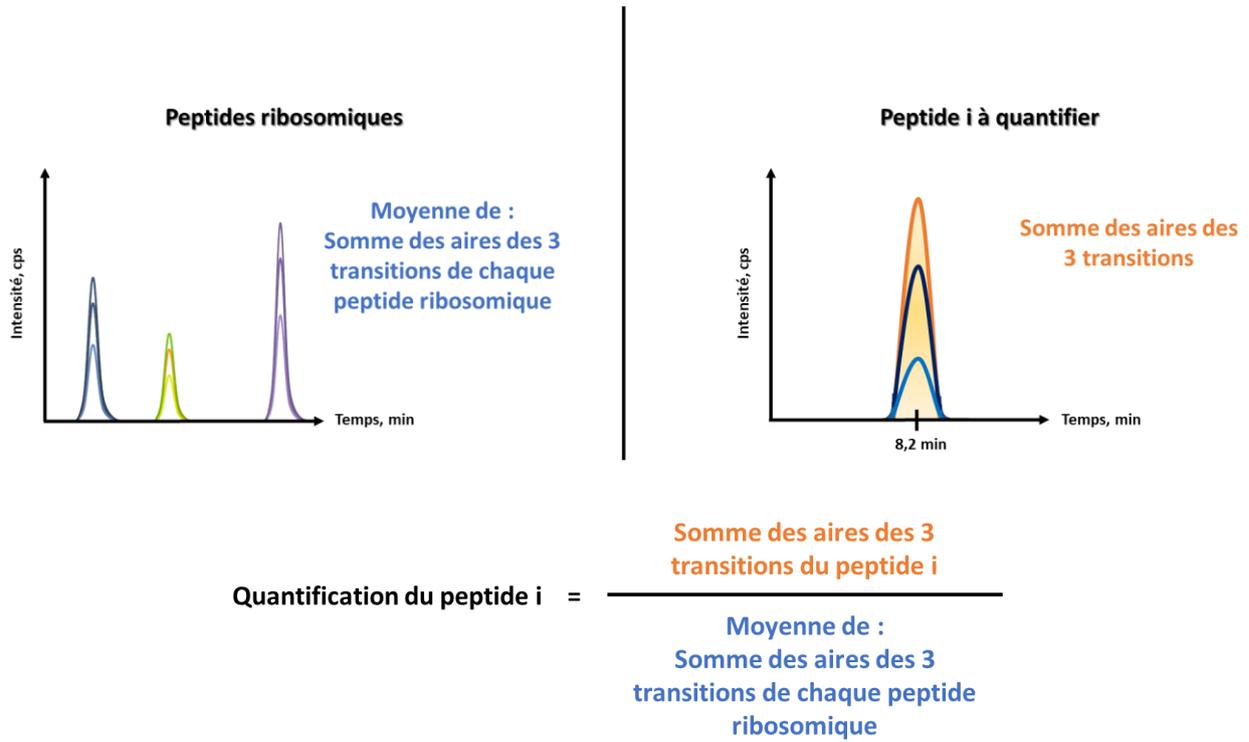


Figure 59 : Représentation schématique pour la réalisation de la quantification. À gauche, les trois normalisateurs internes décrits préalablement. À droite, le peptide à quantifier. La quantification est alors réalisée en utilisant la somme des aires des 3 transitions du peptide i divisées par la moyenne des sommes des aires des 3 transitions de chaque normalisateur.

La Figure 59 illustre l'application de la quantification relative à un peptide. Pour chaque protéine, parmi les peptides préalablement sélectionnés dans la méthode, un peptide est choisi comme peptide quantifieur. Ce peptide est généralement celui qui à l'intensité la plus importante au sein des trois peptides, tout en étant le plus spécifique possible (peptide comportant la plus longue chaîne en acide aminé). De plus, il est préférable que l'on ne retrouve, si possible, pas de pics interférents à un temps de rétention très proche.

Pour ce peptide, la somme des aires des 3 transitions est relevée et divisée par la moyenne de la somme des 3 transitions des 3 peptides ribosomiques. Une information sur l'expression de la protéine en fonction de la quantité de protéines ribosomiques dans l'échantillon, et donc

du nombre de bactéries est ainsi obtenue. Cela permet la comparaison de deux échantillons entre eux, quelle que soit la quantité de bactéries initialement présentes dans l'échantillon.

Dans le cas où le peptide quantifieur est muté, la quantification est réalisée par un second peptide, et la valeur obtenue est ensuite corrigée pour pouvoir réaliser la comparaison. Le facteur correctif est calculé à partir des corrélations entre les peptides (Page : 117 - Conservation du ratio de peptide) d'une même protéine.

2. Différents cas observables

La fourchette de valeurs d'expression des différentes protéines étudiées qui a été constatée lors de la création de méthode est comprise entre 500 fois l'expression des protéines ribosomiques et 0,005 fois, correspondant à une gamme dynamique de concentration de l'ordre de 10^4 à 10^5 selon les échantillons. On sépare les protéines en 4 cas observables (Figure 60).

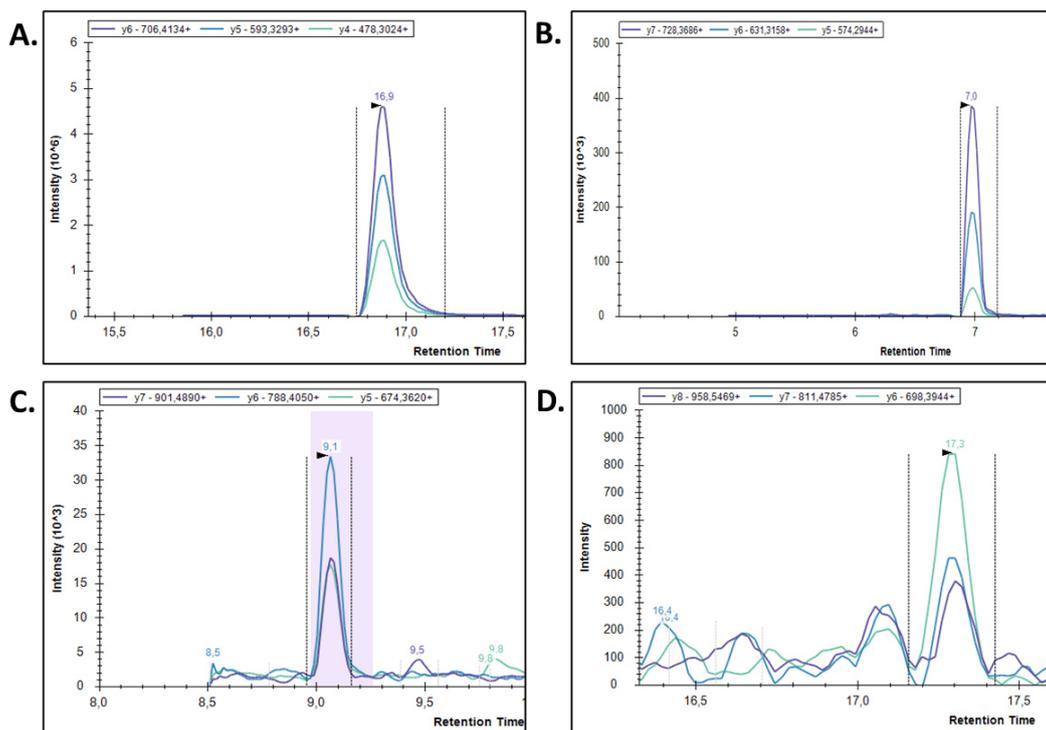


Figure 60 : Chromatogrammes reconstitués représentant les différences d'expression possibles. En A, la protéine a une valeur de quantification de 100 et plus (très forte expression -> aucun problème de retraitement). En B, est représentées les protéines du même niveau d'expression que les protéines ribosomiques (valeur entre 0,5 et 10). La majorité des protéines dans la méthode sont dans le cas de la figure C avec une expression de l'ordre de 1 à 10 % des protéines ribosomiques. Les protéines dans le cas D sont au niveau de la limite de quantification avec des valeurs proches de 0,05 % de l'expression des protéines ribosomiques.

Le cas présenté en A correspond aux protéines ayant une valeur d'expression dans un échantillon de l'ordre de 100 (100 fois l'intensité des peptides rapporteurs des protéines ribosomiques). Lorsqu'elles sont aussi fortement exprimées, les protéines ne représentent aucun défi analytique particulier. Les protéines dans le cas B sont exprimées au même niveau que les protéines ribosomiques (valeur : 1) et les difficultés rencontrées lors du retraitement de ces cas sont très rares. La majorité des protéines analysées dans la méthode sont dans le cas C, avec une expression observée de l'ordre de 1 à 10 % des protéines ribosomiques. Le cas D représente un véritable défi (comme vu pour le retraitement) concernant la répétabilité de la quantification, car la présence d'artefact entrainera une complexité accrue de l'étape de retraitement ainsi qu'un biais significatif dans la quantification.

Lors de la description des différents filtres de validation, il a été conclu que l'identité d'un peptide ne pouvait pas, dans la grande majorité des cas, être validée en dessous d'une aire minimale de 8000 pour la transition maximale. Il a donc été choisi de définir la limite de quantification à un seuil légèrement supérieur, équivalent à une aire totale de 15 000. C'est une valeur arbitraire qui se base sur notre capacité à définir correctement la présence ou l'absence d'un peptide, sachant que pour une quantification relative il est très difficile de comparer finement des expressions aussi faibles. Dans le cadre des cultures utilisées lors de la création de la méthode, une aire de 15 000 correspondait à une valeur d'expression normalisée de 0,003, soit 0,3 % de l'expression des protéines ribosomiques. Cette valeur correspond à la limite de quantification.

D. Paramètres impactant la quantification

1. Temps de digestion

La quantification relative apporte bien des avantages en ce qui concerne le temps et la simplicité de retraitement, cependant elle est bien moins précise, car elle dépend d'un grand nombre de paramètres. Par exemple, plusieurs étapes de la préparation d'échantillon impacteront directement les valeurs obtenues. Comme il a été noté dans la Figure 45 (optimisation du temps de digestion), une baisse ou une augmentation du temps de digestion entrainera ainsi une variation de la quantité de peptides générés, dans la mesure où en se

plaçant à 10 minutes le plateau de digestion n'est pas encore atteint. De plus, comme on a pu l'observer, chaque peptide possède une cinétique de digestion propre. Ceci engendrera une déviation pouvant être importante et rendra la quantification imprécise. Par conséquent, l'intégralité des paramètres de la méthode se doit d'être fixe. C'est aussi pourquoi l'étape de lyse/digestion est réalisé en 10 minutes plutôt qu'en 2 ou 5 minutes, afin de lisser les impacts potentiels des écarts de temps possibles lors de la manipulation.

2. Ratio trypsine/échantillon

Dans cette étape de préparation d'échantillons, nous avons fixé la concentration en trypsine afin qu'elle soit en excès pour permettre une digestion rapide. Cependant, le ratio trypsine/échantillon aura aussi une incidence sur l'efficacité de la digestion. Il a donc été nécessaire d'évaluer cet impact sur les peptides quantifieurs de la méthode (

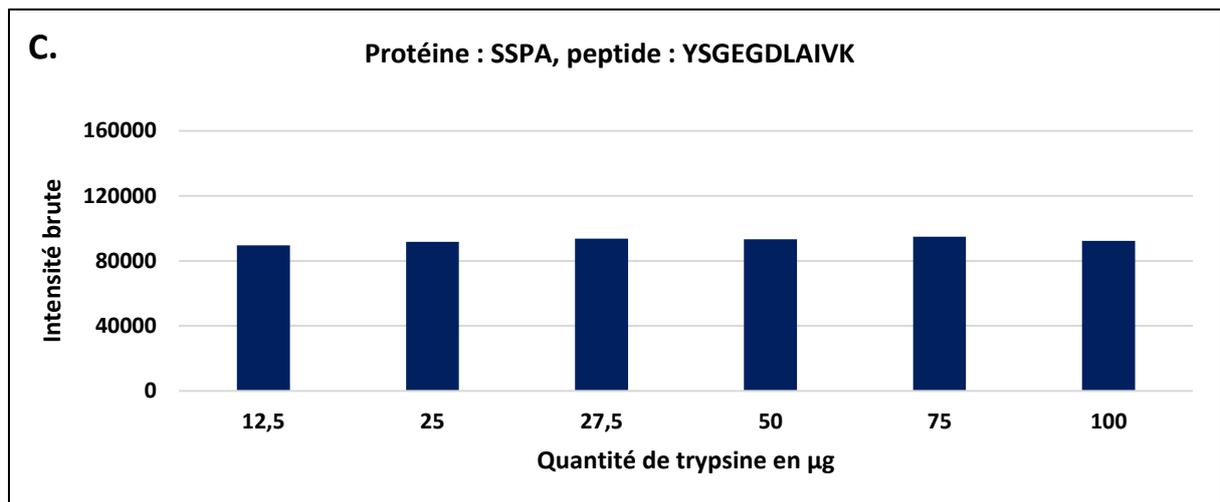
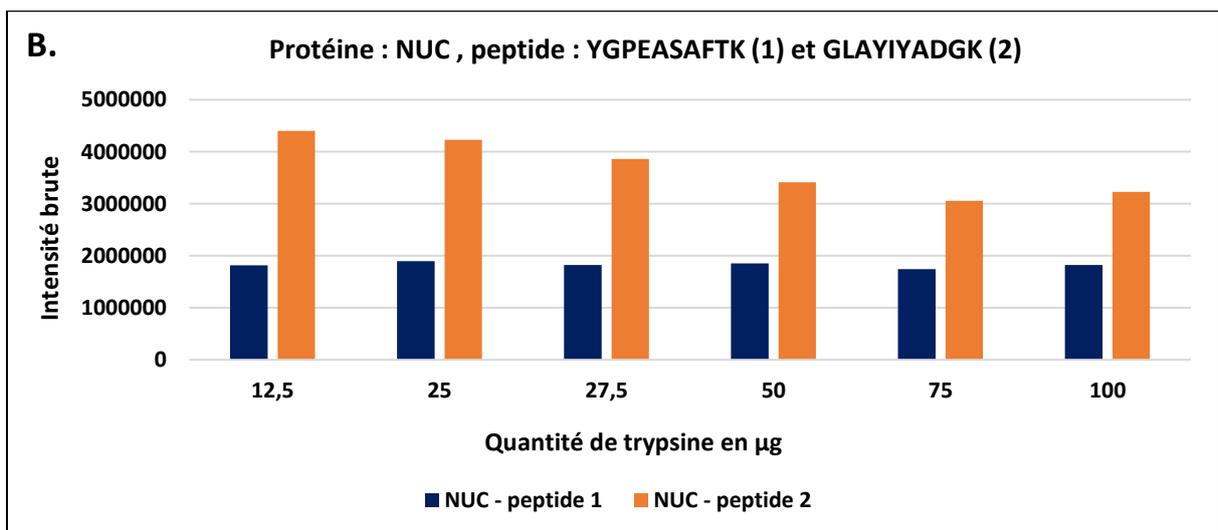
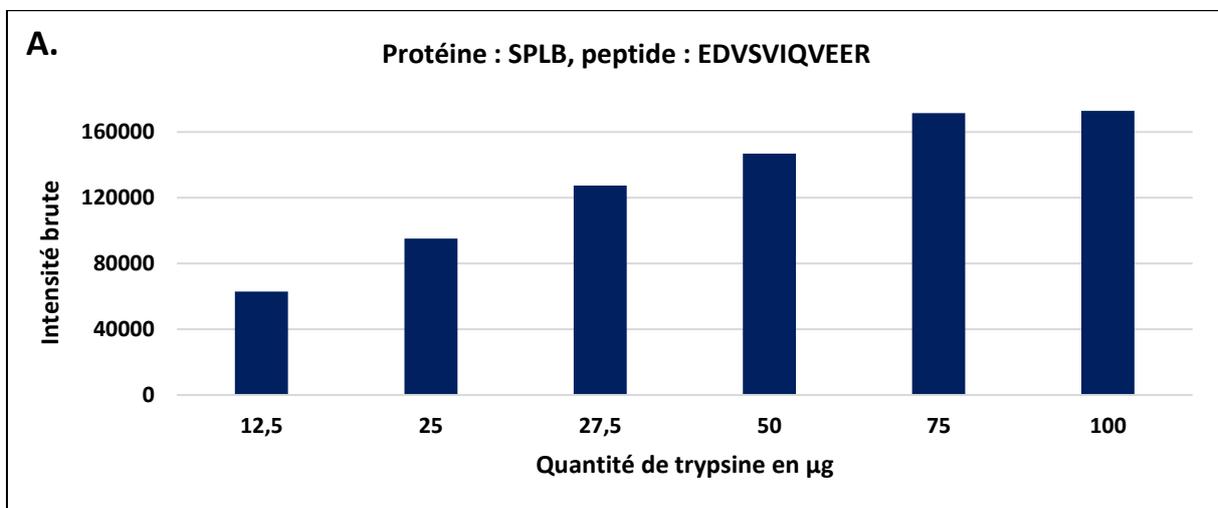


Figure 61).

Dans un souci d'uniformité de l'expérience, la quantité d'échantillon a été fixée et la quantité de trypsine adaptée à chaque échantillon, afin d'éviter l'ajout d'autres facteurs d'impact, comme le volume de l'échantillon. Dans la réalité, c'est bien la quantité de bactéries qui variera selon l'échantillon et non la quantité de trypsine, qui sera alors fixée. Un mix de plusieurs souches bactériennes a été préalablement effectué en vue d'obtenir l'information sur un maximum de peptides, comme chaque souche n'exprime pas l'ensemble des facteurs. La quantité initiale de trypsine du protocole est de 50 µg, et les tests ont été accomplis afin de couvrir des variations allant de 12,5 à 100 µg de trypsine.

Comme pour le facteur temps, différents profils d'intensités en fonction des protéines et des peptides sont observables. Le diagramme A montre pour la protéine SPLB une évolution rapide de l'intensité brute en fonction de la quantité de trypsine pour ce peptide. On remarque donc que si, pour diverses raisons, un échantillon comporte 4 fois plus de bactéries, soit ici une quantité de trypsine de 12,5 µg, alors cela engendre une erreur proche d'un facteur 2 sur la quantification. Il est par conséquent préférable de ne pas prendre comme quantifieur les peptides ayant ce genre de profil de réponse. Dans le cas de la protéine NUC (B), le peptide 2 (GLAYIYADGK) est le peptide le plus intense dans les analyses, ce qui fait de lui le premier candidat pour être le peptide quantifieur.



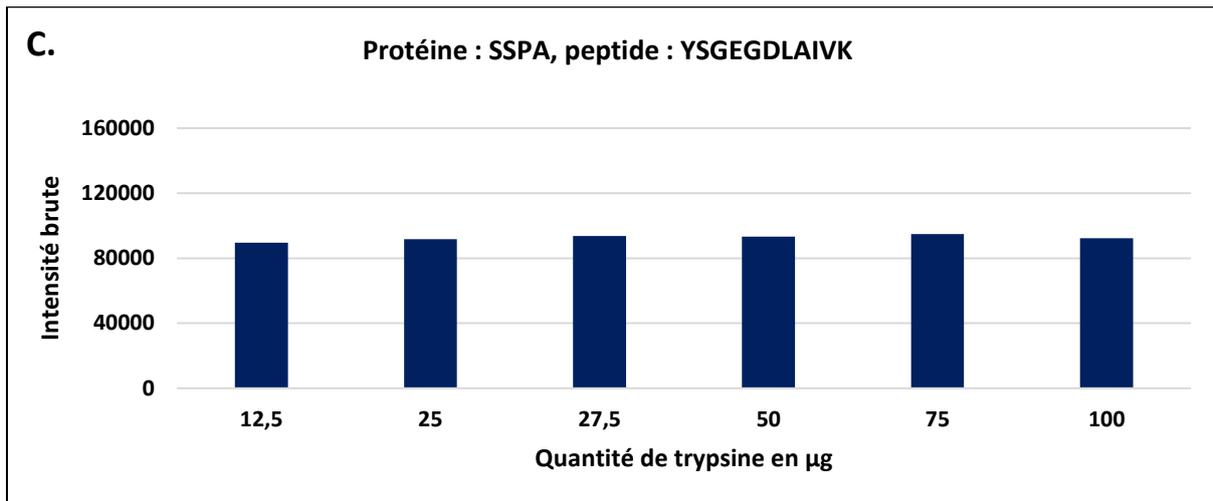


Figure 61 : Diagramme représentatif pour 3 protéines de l'impact du ratio quantité de trypsine/quantité de bactéries sur l'intensité brute observée. Pour la protéine SplB on observe une augmentation puis un plateau. Dans le cas de Nuc est représenté le cas de deux peptides, en orange (GLAYIYADGK) et en bleu (YGPEASAFTK). L'orange est caractérisée par une décroissance avant un plateau alors que le bleu reste constant. Le bleu sera donc un meilleur choix de peptide quantifieur afin d'assurer une robustesse maximale. Ce cas de peptides quantifieur optimum est représenté également pour la protéine SSPA.

Cependant, en regardant son évolution en fonction du ratio trypsine/échantillon (T/E), une décroissance est notable, ce qui engendre un léger biais dans la quantification, alors que le peptide n° 1 (YGPEASAFTK) n'est pas impacté.

Cette étude a permis de faire le choix de la plupart des peptides quantifieurs pour chaque protéine, avec comme cible le profil de digestion constaté pour SSPA (C), ayant une sensibilité importante avec peu de variations observées. Malheureusement, il n'est pas toujours possible d'obtenir ces caractéristiques pour chaque peptide de chaque protéine. C'est pourquoi il est difficile d'aller rechercher et d'étudier de faibles variations d'expression avec une méthode de quantification relative, car celle-ci est impactée par de nombreux paramètres entachant sa robustesse.

E. Ratio des peptides ribosomiques

Devant l'ensemble des facteurs pouvant impacter significativement la quantification, il a été nécessaire de mettre en place un outil de vérification assurant que celle-ci puisse être réalisée. Les trois peptides ribosomiques ne sont pas caractérisés par le même profil de réponse quant aux ratios T/E, donc si le rapport d'intensité entre les 3 peptides ribosomiques est conservé, alors il n'y a pas eu de changement ou d'erreurs dans le protocole. Cela permet ou non la réalisation de la quantification et la comparaison de l'échantillon.

La Figure 62 illustre, pour 70 souches de *S. aureus* le ratio entre les trois peptides ribosomiques. La répartition des souches sur la figure a été effectuée de façon aléatoire. On remarque que pour les souches récemment analysées (point bleu), le ratio est très constant, centré en moyenne sur 0,69 avec un coefficient de variation de 6 %. De plus, ce ratio est très bien conservé entre les analyses et le temps, car en superposant des échantillons analysés il y a 1 an et 6 mois, ceux-ci sont compris dans l'intervalle global. Il est nécessaire de vérifier à chaque analyse que le ratio des 3 normalisateurs est bien celui attendu pour pouvoir réaliser la quantification. Un changement important de la valeur du ratio indique la présence d'un biais dans l'analyse. Toutefois, cet exemple montre la très bonne répétabilité de la méthode dans le temps et confirme le choix de ces peptides ribosomiques en tant que normalisateur.

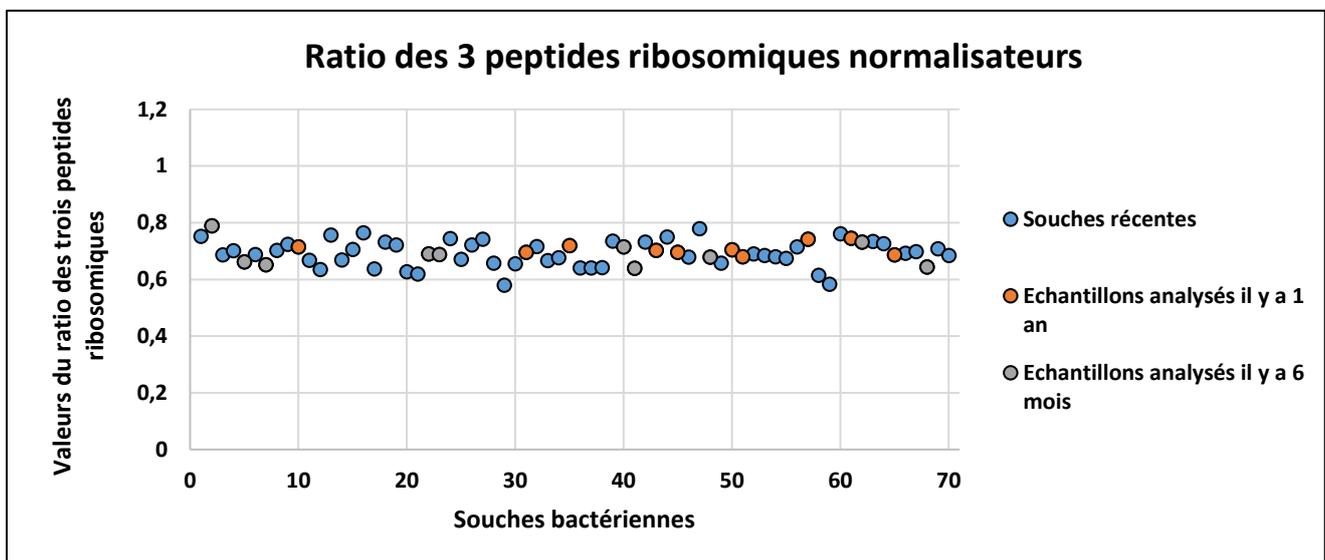


Figure 62 : Diagramme représentant le ratio des 3 peptides normalisateurs entre eux pour 70 souches analysées. En bleu des souches issues d'une analyse récente, en gris des souches analysées 6 mois auparavant et en orange d'une analyse datant d'un an. L'ordre des points a été réparti de manière aléatoire.

F. Profil d'expression de facteurs de virulence

La méthode mise en place permet d'acquérir très rapidement (50 minutes) des informations quant à l'expression ou non d'une protéine ainsi que sur la quantité relative de la protéine. C'est l'utilisation de normalisateurs et le solide choix des peptides quantifieurs qui autorisent l'établissement de profils d'expression des facteurs de virulence.

Un exemple de résultat qu'il est possible d'obtenir est illustré par la Figure 63 sous forme de carte de chaleur (Heat map). Elle présente la quantification relative de 13 facteurs de virulence pour 3 souches cliniques de *S. aureus*.

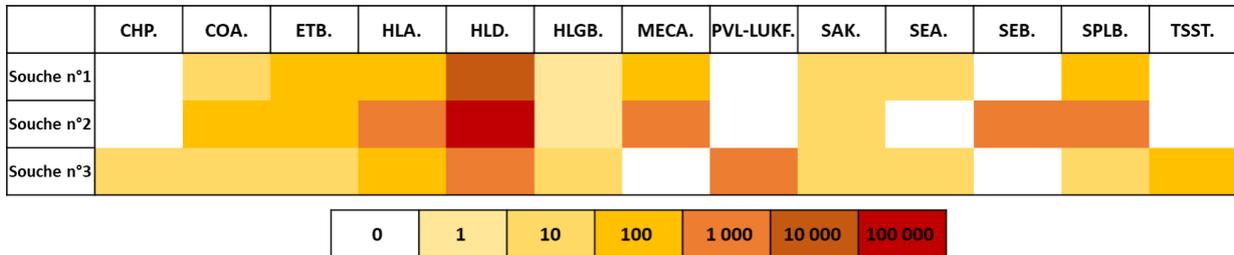


Figure 63 : Heat map pour 3 souches de *S. aureus* sur certaines protéines, selon une échelle logarithmique afin de faciliter la comparaison dans cet exemple. La valeur 0 correspond à l'absence d'expression et le 100 000 est l'équivalent des protéines du cas A. de la figure 60, soit 100 fois supérieure à l'expression des protéines ribosomiques.

Il est possible de constater rapidement l'information reliée à l'expression ou non d'un facteur spécifique, comme la présence de mécanismes de résistance (MecA) ou de toxines importantes (TSST). Pour la souche n° 1 la protéine MecA est exprimée, mais pas la protéine TSST. Les données de quantité relative se trouvent être très pertinentes, car on remarque que de très fortes différences d'expression pour les protéines peuvent être observées. Par exemple, la souche n° 2 exprime 10 fois plus de la toxine HLD que la souche n° 1 et 100 fois plus que la souche n° 3. De telles différences d'expression, notamment dans les toxines, pourraient être déterminantes pour la compréhension de la sévérité d'une souche spécifique et ne pourraient être obtenues par des méthodes génotypiques classiques.

G. Conclusion

La quantification est une étape importante du protocole. Pour des raisons économiques et de simplicité de la méthode, la quantification relative label-free a été choisie. Cette approche quantitative est moins précise, car de nombreux paramètres peuvent l'influencer (effets matrices, temps de digestion, rapport E/T, choix des peptides quantifieurs, mutation). Elle requiert la mise en place de normalisateurs internes caractéristiques et spécifiques. Dans notre cas, ce sont des peptides ribosomiaux qui remplissent ce rôle, permettant de déterminer le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon. La quantification mise en place permet

de mettre en évidence sur une grande gamme dynamique de concentration les variations d'expression des différents facteurs de virulence.

Devant les diverses possibilités d'impact, des outils pour assurer la bonne réalisation de la quantification ont été mis en place (valeurs correctives dans le cas d'une mutation du peptide quantifieur, ratio des peptides normalisateurs).

Malheureusement, il existe des limitations à ce genre d'approche. Premièrement, il n'est pas possible de comparer l'expression de deux protéines différentes entre-elles. Deuxièmement, il est aussi difficile d'obtenir une solide précision de mesure pour des facteurs très faiblement exprimés. Enfin, il est compliqué de discriminer de faibles variations de niveaux d'expression dues notamment aux nombreux paramètres impactant la quantification relative. Cependant, comme il est observable sur la Figure 63, on peut noter la présence de grandes disparités d'expression pour certaines protéines, supérieure à un facteur 100. Malgré ces limitations, la méthode de quantification mise en place reste cohérente avec les fluctuations d'expression rencontrées. L'obtention de profils semble être un atout conséquent pour affiner la compréhension de la virulence en général, pouvant potentiellement expliquer les écarts de virulence entre 2 souches ayant les mêmes gènes.

IX. Logiciel de traitement automatique

Devant la grande quantité de données générées à chaque analyse, il est indispensable d'utiliser un outil de retraitement automatisé afin de valider la présence ou non d'une protéine (par le biais de peptides rapporteurs) puis de la quantifier.

Des logiciels créés par la communauté scientifique ou par les constructeurs de spectromètres de masse existent qui permettent de répondre en partie à ce besoin. Dans notre cas, la méthode a été développée sur des appareils de la société Sciex®, qui possède son logiciel de retraitement : MultiQuant®. Cet outil permet la réalisation d'intégration automatique des pics chromatographiques issus de données MRM, en particulier par le biais d'algorithmes de détection et de reconstitution. Certaines de ses fonctionnalités permettent la réalisation d'une quantification et d'une validation, en prenant en compte les rapports de transitions de peptide marqués, par des isotopes lourds par exemple.

On retrouve aussi Skyline²⁰⁴ et les algorithmes de mProphet^{205,206}, qui offrent des validations plus poussées, par exemple avec la comparaison avec des spectres de référence résultants de l'analyse de peptides de synthèse et la prise en compte de l'alignement des transitions. Malheureusement, même si ces solutions sont toutes efficaces, elles demeurent la plupart du temps incomplètes ou non parfaitement appropriées à notre cas. Ensuite, l'ensemble des filtres de validation mis en place pour la méthode ne sont pas retrouvés dans ces applications, notamment le rapport entre peptides. De plus, il est généralement très compliqué d'appliquer des filtres spécifiques et adaptés à chaque peptide afin d'optimiser la validation. Un autre frein à l'emploi de ce type de logiciel, qui ajoute la difficulté d'utilisation et de personnalisation, est lié aux incompatibilités de format de fichier ou de version de logiciel. Il est donc souvent plus efficace, pour répondre à une application précise, de développer sa propre solution.

A. Description de la méthode de retraitement

L'approche de retraitement que nous avons adoptée est résumée par la Figure 64. Nous avons fait le choix de développer une solution personnalisée seulement pour la partie validation ; le traitement des données brutes (détection et intégration des pics, etc.) aurait représenté un

travail particulièrement lourd et hors de nos compétences. Nous avons donc utilisé le logiciel MultiQuant pour réaliser l'intégration des pics de façon automatique avec l'algorithme MQ4 et 1,5 point de lissage. Cette étape permet la récupération d'un fichier de sortie (texte, CSV, Excel) comprenant l'ensemble des données importantes pour le retraitement et la validation des protéines. On retrouve les aires et intensités associées aux différentes transitions de chaque peptide, les temps de rétention, les largeurs à mi-hauteur, dates et numéros d'échantillon.

Pour le tri et l'analyse de ces données, c'est le logiciel Knime²⁰⁷ qui a été utilisé. Knime est un logiciel libre permettant de mettre au point des chaînes de traitement de données complexes à travers un langage de programmation graphique fonctionnant par modules. Le logiciel propose une liste importante de nœuds autorisant la réalisation d'une tâche spécifique, comme l'ouverture de fichier, la modélisation, la recherche d'informations dans des bases de données et la visualisation des résultats sur une même interface. L'avantage de Knime est qu'il supporte l'utilisation d'un certain nombre d'algorithmes ne nécessitant que peu ou pas de connaissances en programmation.

Le workflow se divise en deux parties : la première est focalisée sur la validation de la présence des protéines d'intérêt, et la seconde sur leur quantification. Une fois le fichier de sortie de MultiQuant ouvert sous Knime, un filtre de bruit est appliqué, éliminant toutes les transitions inférieures à 1500 en aire brute. La valeur du filtre est adaptable en fonction de l'analyse ; il a pour but principal d'éliminer un certain nombre de données pour éviter que le programme ne demande trop de ressources. Dans un second temps, la validation des protéines est effectuée en fonction d'une succession de filtres éliminatoires (Figure 64 : en haut à droite) basée sur les valeurs de différents paramètres présents dans la base de données (Figure 64 : en vert). L'intérêt de ce retraitement est qu'il permet pour chaque peptide et chaque transition, d'ajuster des valeurs de filtres spécifiques pour le retraitement. Ainsi, l'adaptation du retraitement à différentes situations est possible et cela le rend plus proche d'un retraitement fait par l'analyste lui-même.

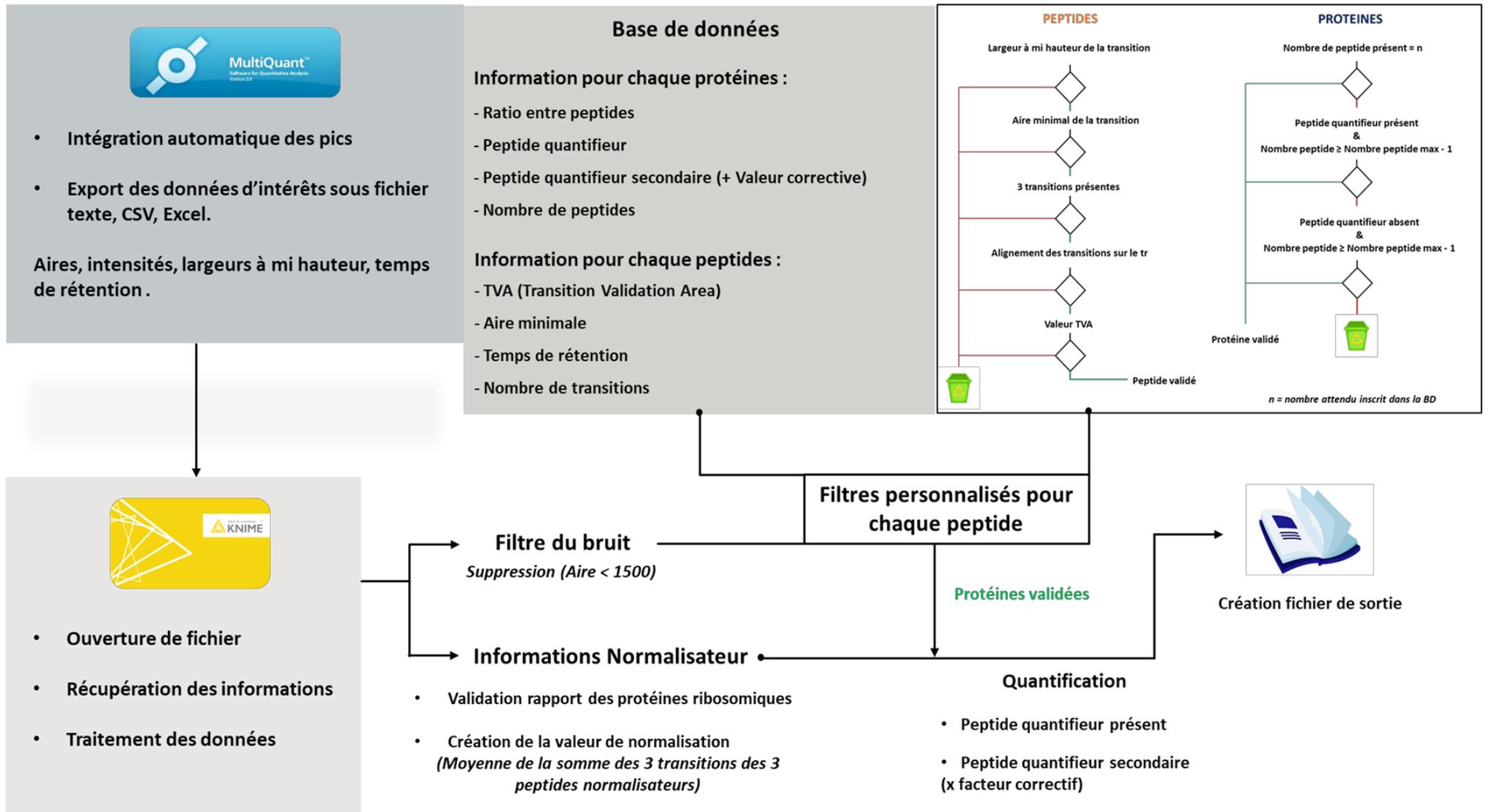


Figure 64 : Schéma récapitulatif du traitement des données. La première étape (en bleu) est la réalisation de l'intégration des pics et la récupération des données via MultiQuant. En second, l'ouverture du fichier d'entrée par KNIME pour faire le retraitement. Les données sont alors divisées entre la partie identification et la partie quantification. Chaque peptide est alors retraité de façon spécifique avec différents filtres (en haut à droite de la figure) dont les valeurs sont inscrites dans une base de données (en vert). Une fois les protéines validées, elles sont alors quantifiées selon les étapes décrites précédemment. Pour finir, un fichier de sortie (texte, CSV, Excel) est créé pour chaque échantillon où sont inscrites les protéines présentes ainsi que leur quantification.

Une fois la détection des protéines validée, celles présentes dans l'échantillon sont quantifiées. Le type de quantification et sa réalisation ont été expliqués page 120, dans la section Quantification. La dernière étape est la création d'un fichier de sortie, contenant les informations sur l'échantillon, la date et l'heure d'analyse, ainsi que l'ensemble des protéines présentes et leur quantification associée.

B. Limitations et évolutions

Ce workflow de retraitement permet un gain notable en temps de retraitement, mais reste restreint dans ses fonctionnalités. Le point fort du workflow est sa spécificité, car le retraitement est spécifique à chaque protéine et chaque peptide. Cependant, son architecture actuelle le rend difficilement adaptable à d'autres bactéries ou protéines. De plus, les filtres stricts engendrent de nombreuses erreurs lors des cas limites de détection (très faible intensité). Par exemple, l'utilisation du filtre d'aire minimale à 8000 éliminera le cas à 7999 alors que l'écart entre les 2 est insignifiant. L'utilisation de filtres trop stricts occasionne une augmentation du nombre de faux négatif. *A contrario*, diminuer l'aspect restrictif des filtres entraîne une hausse du nombre de faux positifs. Il est nécessaire de trouver le compromis qui concilie ces deux aspects, mais celui-ci demande l'analyse d'une multitude d'échantillons, avec toutefois une limite intrinsèque qui restera présente. On peut garder à l'esprit que selon la protéine, il peut être préférable d'être dans un cas plutôt que l'autre. Par exemple, lors d'une application clinique, il faut à tout prix éviter les faux négatifs pour l'identification des mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Compte tenu des bénéfices de l'approche, mais en ayant conscience de ces limites, il a été choisi de transférer le processus de retraitement de KNIME à un programme sous python, en vue de permettre une plus grande flexibilité. Ce travail, exigeant des connaissances avancées en programmation, fut réalisé par Numa-Rainier Georges, lors d'un stage de Master 2 (bio-informatique). Le fichier d'entrée reste identique et est issu de MultiQuant. Afin de faciliter la déclinaison sur de nouvelles protéines ou bactéries et de couvrir de nouveaux variants dans la méthode, le système de base de données et son utilisation ont été complètement modifiés. Contrairement à KNIME où une partie de l'information nécessaire au retraitement était liée

au programme, tout est ici contenu dans une base de données, contenue dans un fichier Excel. Ce module emploie différents outils de programmation comme Batch, Python, Flask, Jinja, Psutils, MySQL, PyMysql (XLRD, Xlutils, XLWT). Il permet de réaliser simplement l'ajout et la suppression de données dans la base, ainsi que leur utilisation directement dans le module de retraitement.

Le module de retraitement (Batch, Python, Plotly, ReportLab, Excel, Psutils, MySQL, PyMysql : XLRD, Xlutils, XLWT) comprend l'ensemble des filtres développés sous KNIME. De plus, il a été choisi d'ajouter un score progressif (Figure 65) associé aux protéines et aux peptides, pour affiner la validation.

À chaque filtre du retraitement, un score de pénalité est incrémenté pour chaque peptide. Par exemple, si la valeur de la largeur à mi-hauteur correspond à celle dans la base de données, alors l'ajout d'un score de 0 est réalisé. En revanche, si la valeur s'éloigne de la cible, une pénalité sera appliquée. Le filtre associé à la présence de 3 transitions demeure quant à lui éliminatoire, car l'absence d'une seule transition entache la spécificité de l'analyse. Le score évolue en fonction des filtres et si celui ne dépasse pas une valeur limite, le peptide est alors validé. Un système similaire est appliqué aux protéines, en fonction du nombre de peptides manquants et de leurs intensités respectives.

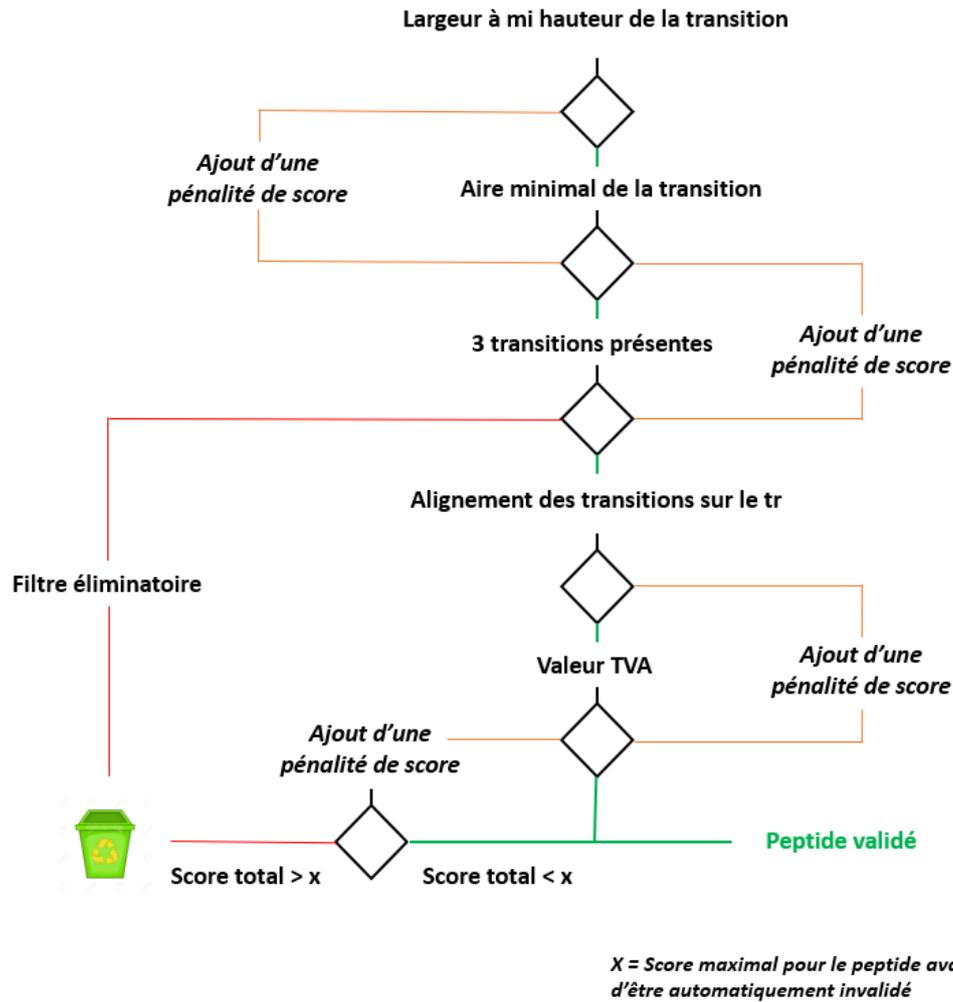


Figure 65 : Évolution de la logique de retraitement avec l'ajout d'un score de peptide. Les traits verts correspondent à la validation de la condition. Les traits orange montrent une différence entre la valeur cible et celle obtenue, ce qui entraîne une pénalité. Les traits rouges sont associés aux conditions éliminatoires du peptide.

Plusieurs modèles de scores sont possibles. Le modèle exponentiel a été sélectionné pour cette approche. Ce modèle permet de limiter les pénalités sur de faibles écarts et de les augmenter rapidement sur les grands écarts. C'est le choix qui permettait le plus de diminuer cet effet de seuil éliminatoire tout en conservant l'élimination des valeurs éloignées de notre cible. Dans le cas de filtres qui se veulent moins restrictifs, comme dans le rapport d'intensité entre peptides d'une protéine, un modèle sigmoïdal est le plus adapté. Il permettra de lisser la pénalité de façon plus conséquente sur des écarts faibles.

L'ensemble des valeurs associées aux filtres et aux scores a été testé et optimisé lors de l'analyse de 100 échantillons, préalablement retraités manuellement par un analyste. Un

ensemble de 131 200 conditions a ainsi été testé, permettant *in fine* d'atteindre un taux de spécificité de 99 % et un taux de sensibilité de 95,5 %, avec pour volonté la minimisation du nombre de faux positifs. Ces valeurs correspondent au meilleur compromis possible avec ce jeu de données. Ce sont des optimisations générales avec quelques spécifications pour certains peptides. Il serait souhaitable de réaliser ce genre d'optimisation pour l'ensemble des paramètres de chaque peptide afin d'améliorer encore le processus. Il serait aussi envisageable de travailler avec un algorithme d'apprentissage de type « machine learning » dans le but de faire de l'amélioration continue des filtres.

Ce traitement automatisé est primordial durant l'analyse d'importantes cohortes d'échantillons, et certaines des fonctionnalités voulues n'ont pas encore été implémentées dans le programme. Par exemple, dans le cas de la disparition d'un peptide, si celui-ci correspond au peptide le moins intense de la protéine ou si le peptide le plus intense est de faible intensité, alors l'absence est considérée comme normale. Un second problème rencontré provient de l'intégration des pics : un pic peut être intégré alors que celui-ci ne correspond pas au pic de la transition, ou bien des oublis d'intégration peuvent survenir alors que le pic est bien présent dans la plage d'intégration. Le logiciel intègre du bruit de fond ou un pic artefact même si aucun pic correspondant au composé n'est détecté. Cela entraîne une accumulation de données inutiles qui peuvent dans certains cas être néfastes pour l'analyse.

L'approche requiert encore des optimisations avant sa finalisation. Il est cependant possible d'utiliser cette version bêta. Une nouvelle solution informatique est en cours de développement et va reprendre l'ensemble des filtres et principes de ce premier programme, avec l'ajout d'algorithmes de traitement, pour une gestion efficace des cas limites. Un système d'amélioration perpétuel des filtres *via* l'auto-alimentation des bases de données est prévu, tout en optimisant l'architecture des bases pour travailler sur de nombreuses espèces bactériennes. De plus, des processus d'analyse de données afin d'étudier et de supprimer le bruit des différentes matrices sont des évolutions envisagées.

Chapitre 1

Développement d'une nouvelle méthode d'identification rapide et multiplexée du virulome de *S. aureus* par approche ciblée : de la préparation rapide d'échantillons (souches cliniques) à l'analyse MRM.

Partie 2 : Validation de la méthode

I. Validation de méthode

La dernière étape de la construction de méthode est sa validation, par le biais de l'évaluation de sa spécificité, justesse, robustesse, ainsi que ses limitations.

A. Comparaison génomique/protéomique

Pour ce faire, nous avons utilisé dans un premier temps 20 souches de *S. aureus* exprimant 28 protéines clés, génotypées par puce à ADN. Ce nombre restreint de facteurs de virulence provient du fait que l'ensemble des souches n'exprimait pas toutes les différentes protéines, et que certaines amorces pour des gènes étaient absentes.

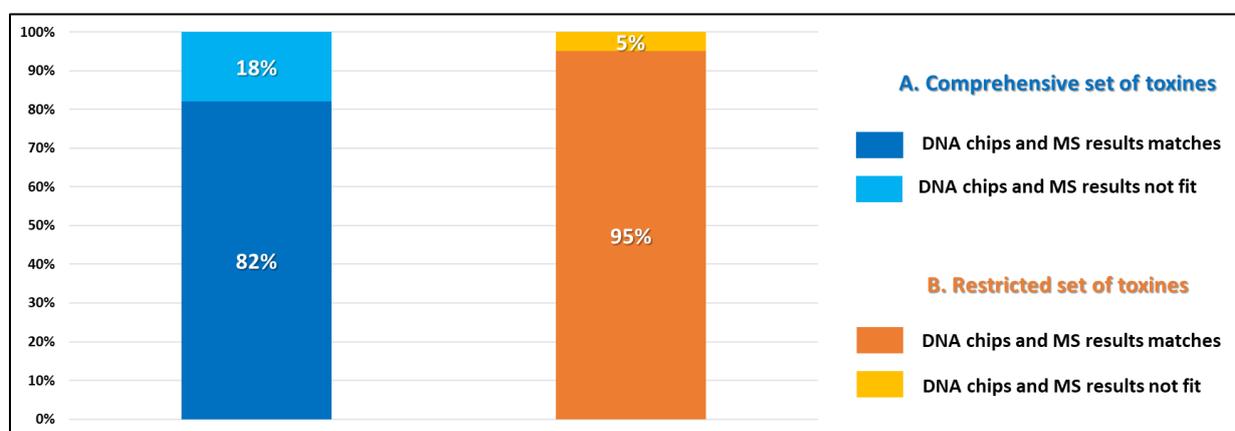


Figure 66 : Diagramme de recouvrement des résultats entre la génomique (puce à ADN) et la protéomique (MS) pour 20 souches génotypés sur 28 protéines. En bleu, les résultats comprenant l'ensemble des entérotoxines. En orange, les résultats sur un panel restreint d'entérotoxines. La non-concordance n'est dans aucun cas la présence d'un faux positif, mais bien la présence du gène alors que la protéine n'est pas détectée.

Cette première comparaison génomique/protéomique a fourni des résultats très encourageants sur la spécificité de la méthode. Une corrélation de 95 % (Figure 66 : barre orange) a été obtenue entre le génotype et le protéome, sans noter de faux positifs, lorsque l'on se focalise sur les protéines impliquées dans la résistance aux antibiotiques Meca, les adhésines principales (FiB, Sbi), la protéine A, les toxines comme la PVL, l'hémolysine (α , β et Δ) et les principales entérotoxines (A, B, C)²⁹. Cette corrélation a été réduite à 82 % (Figure 66 : barre bleue) si l'on considère l'ensemble des toxines, et cela toujours sans faux positif. Ces faux négatifs peuvent s'expliquer par l'absence d'expression de certaines d'entre elles, pouvant être dues aux conditions de culture (temps de culture, composition du milieu de

culture). De plus, il existe certaines compétitions se produisant entre l'expression des divers enterotoxines²⁰⁹, ce qui peut entraîner la non-expression de la protéine. L'autre possibilité est une expression trop faible de la protéine, en dessous de notre seuil de validation. Qui plus est, la présence d'un gène ne conduit pas nécessairement à son expression, et c'est ce qui fait la force des approches phénotypiques en comparaison aux approches génomiques.

B. Vérification de la spécificité

Afin de compléter cette validation, 16 souches mutées ont été analysées en aveugle afin de vérifier la non-expression des gènes supprimés. La suppression a été réalisée par double recombinaison homologue, pour différents facteurs de virulence très importants comme : SPA, TSST, PSM (1 et 4), PVL, HLA ,HLGA/B/C, SARA, LUKD/E, FnbB et ARN3 qui est un des régulateurs les plus importants chez *S. aureus* ²¹⁰ impactant l'expression de nombreux facteurs de virulence comme HLD.

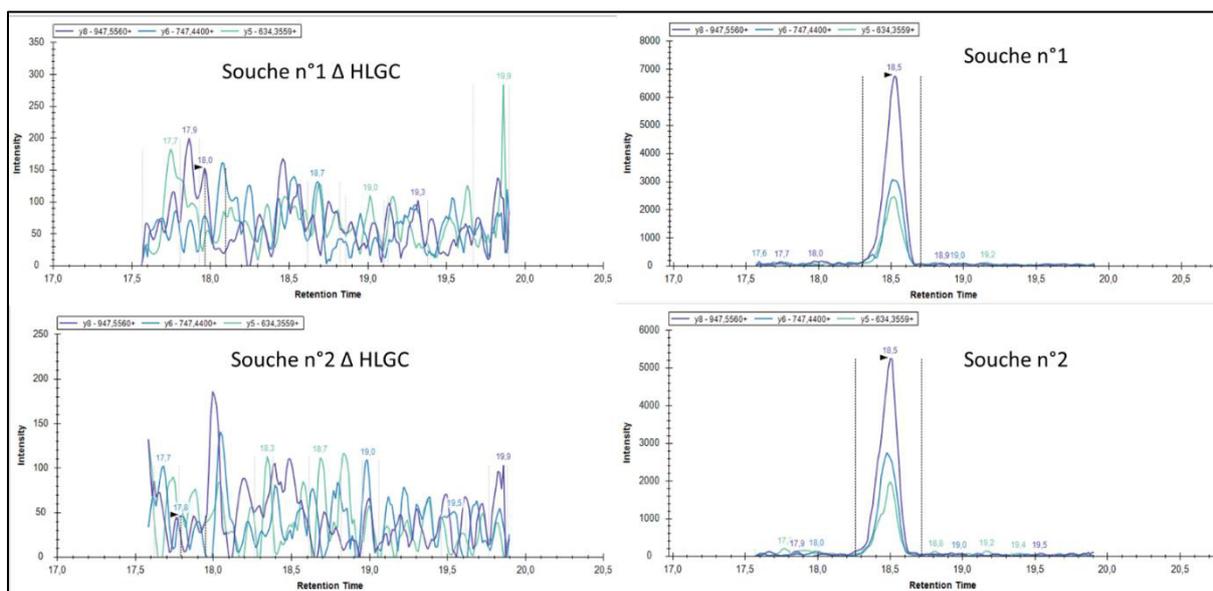


Figure 67 : Chromatogrammes reconstitués pour 4 souches de *S. aureus*. Sur chaque ligne, sont représentées, à gauche, une souche où le gène correspondant à l'expression de HLGC est supprimé et à droite la souche sans suppression. Dans les deux cas où la suppression a été réalisée (Δ HLGC), le peptide n'est pas détecté contrairement au cas de l'homologue non muté.

Les résultats ont permis de confirmer la spécificité de la méthode sur ces différents facteurs, après croisement avec l'identité des souches analysées. Par exemple, la Figure 67 nous montre les chromatogrammes reconstitués pour 4 souches, avec à gauche les souches pour lesquelles

le gène HLGC avait été supprimé (Δ HLGC), et à droite une souche homologue où le gène est exprimé. On observe bien à gauche l'absence du peptide, et à droite la présence de notre pic présentant le temps de rétention et le rapport de transitions attendus. Ces différents tests nous permettent d'être confiants quant à la spécificité et la justesse de la méthode.

C. Robustesse de la méthode

Un grand nombre de paramètres peuvent impacter la quantification de la méthode. Il est de ce fait important d'évaluer la robustesse de celle-ci pour chacune des protéines. Afin de pouvoir caractériser dans une même expérience le maximum de facteurs, 3 souches de *S. aureus* ont été mélangées avant d'être analysées. L'analyse est réalisée en triplicats, dans les conditions classiques présentées dans le workflow final, puis à nouveau, le jour suivant, afin d'étudier l'impact de l'étape de congélation et décongélation supplémentaires.

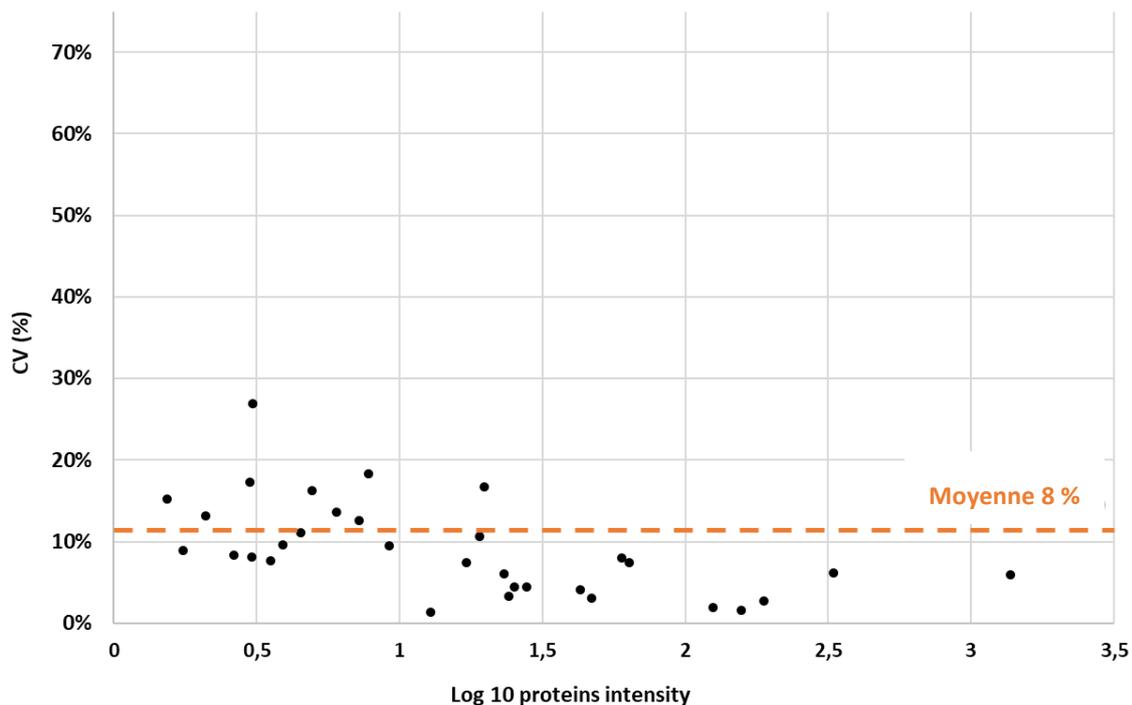


Figure 68 : Coefficient de variation associé aux facteurs de virulence en fonction de leur intensité relative (en log). L'analyse est réalisée sur un triplicat technique d'un mélange de trois souches de *S. aureus*. Les valeurs de CV importantes sont retrouvées pour les plus faibles expressions, avec un maximum de 27 %. La moyenne est de 8 % (indiqué en orange).

La Figure 68 représente le coefficient de variation (CV – écart type/moyenne) en fonction de l'intensité relative des différentes protéines en unité log 10. La moyenne pour l'ensemble des

facteurs est de 8 % avec un CV maximum observé à 27 %. On remarque également que plus l'intensité est élevée, plus l'erreur associée est faible, ce qui semble parfaitement logique. De plus, l'erreur maximale observée est de 27 %. Cette valeur confirme le fait qu'une discrimination d'une différence d'expression faible (inférieure à un facteur 2 d'expression) sera grandement imprécise.

Dans un second temps, l'impact de l'expression de la protéine et de l'étape de congélation/décongélation supplémentaire a été étudié. La Figure 69 illustre pour 2 protéines (HLA, HLD) présentant des différences d'expressions importantes, l'impact de ces facteurs sur la quantification relative.

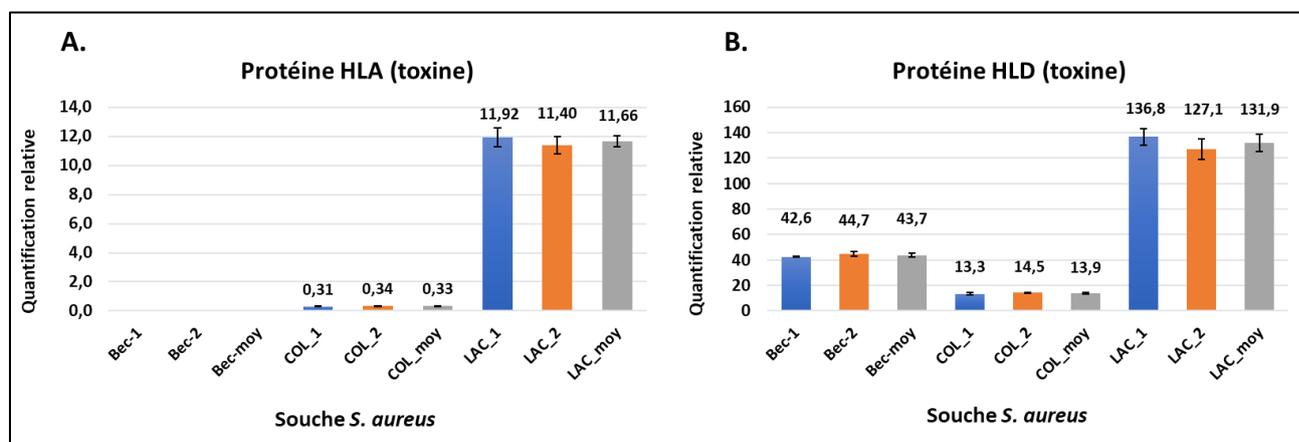


Figure 69 : Quantification relative pour HLA (a) et HLD (b). Les résultats présentés sont issus de la réalisation de triplicats techniques pour 3 souches différentes. En bleu est décrite la première expérience, et en orange la même expérience avec un jour d'écart et un cycle de congélation/décongélation supplémentaire. Les barres grises représentent la moyenne des deux.

Les barres bleues représentent les résultats issus du triplicat initial, les barres orange correspondent au second triplicat, analysé un jour plus tard, après un cycle de congélation/décongélation. La moyenne des deux analyses (barres grises) est également représentée sur la figure. Aucune différence significative entre les deux conditions sur l'ensemble des trois souches n'est remarquée, même lors d'un écart important d'expression du même facteur de virulence (Souche COL : 0,31 et LAC : 11,92 pour la quantification de HLA). L'impact de la congélation est également négligeable.

D'après ces différentes expériences, la méthode montre une spécificité ainsi qu'une robustesse suffisante quant aux différences d'expression observables. Au vu des résultats présentés dans la partie quantification, les différences d'expression pour une même protéine

peuvent atteindre un facteur supérieur à 100. Une variation maximale de 30 % reste en adéquation avec les observations possibles. En revanche, la robustesse et la quantification sont bien impactées par de multiples facteurs, comme le ratio E/T ou la durée de la digestion comme démontré précédemment (Optimisation des temps de digestion), ce qui empêche une discrimination des niveaux d'expression entre 2 souches pour des différences inférieures à un facteur 2. Il serait donc difficile d'essayer d'interpréter de faibles variations d'expression entre deux souches.

D. Limitations observées de l'approche

Cependant, certaines limitations demeurent présentes et il est important de bien les caractériser afin d'être le plus rigoureux possible lors de l'utilisation de cette méthode dans une étude à visée clinique.

Nous avons déjà mis en avant l'impact direct du ratio E/T sur la quantification qui force une attention particulière sur la préparation d'échantillon, et la mise en place de normalisateurs internes, cependant les approches ciblées peuvent rencontrer d'autres problèmes.

Le premier problème est la présence de variants ou de mutations au niveau de la protéine d'intérêt. L'ensemble de la première étape (choix des peptides) est dépendant de l'information présente dans les bases de données et des connaissances initiales sur celle-ci. La présence d'une mutation ou d'un variant non caractérisé ne sera pas prise en compte lors de la création de la méthode, ce qui entraînera l'absence de détection du facteur. C'est pourquoi le séquençage des différents facteurs sur un grand nombre de souches serait nécessaire afin de parfaire ce type d'approche. Cependant, les coûts associés et le temps requis pour sa réalisation sont très importants. C'est pourquoi une méthode ciblée en spectrométrie de masse ne reste pas figée dans le temps ; elle se doit de s'adapter en fonction des différentes découvertes, notamment lors de l'apparition de mutations ou de nouveaux variants.

La seconde limitation survient lors de l'analyse de facteurs de virulence inductibles, c'est-à-dire des facteurs qui nécessitent une action préalable, comme la présence d'un antibiotique ou d'un quelconque stress, pour être exprimés. ^{32,211}

Les protéines à expression inductible ne pourront pas être pleinement caractérisées dans tous les cas de figure. De plus, les conditions de cultures (temps, composition du milieu de culture) ont un impact sur l'expression de certains facteurs. (Figure 70)

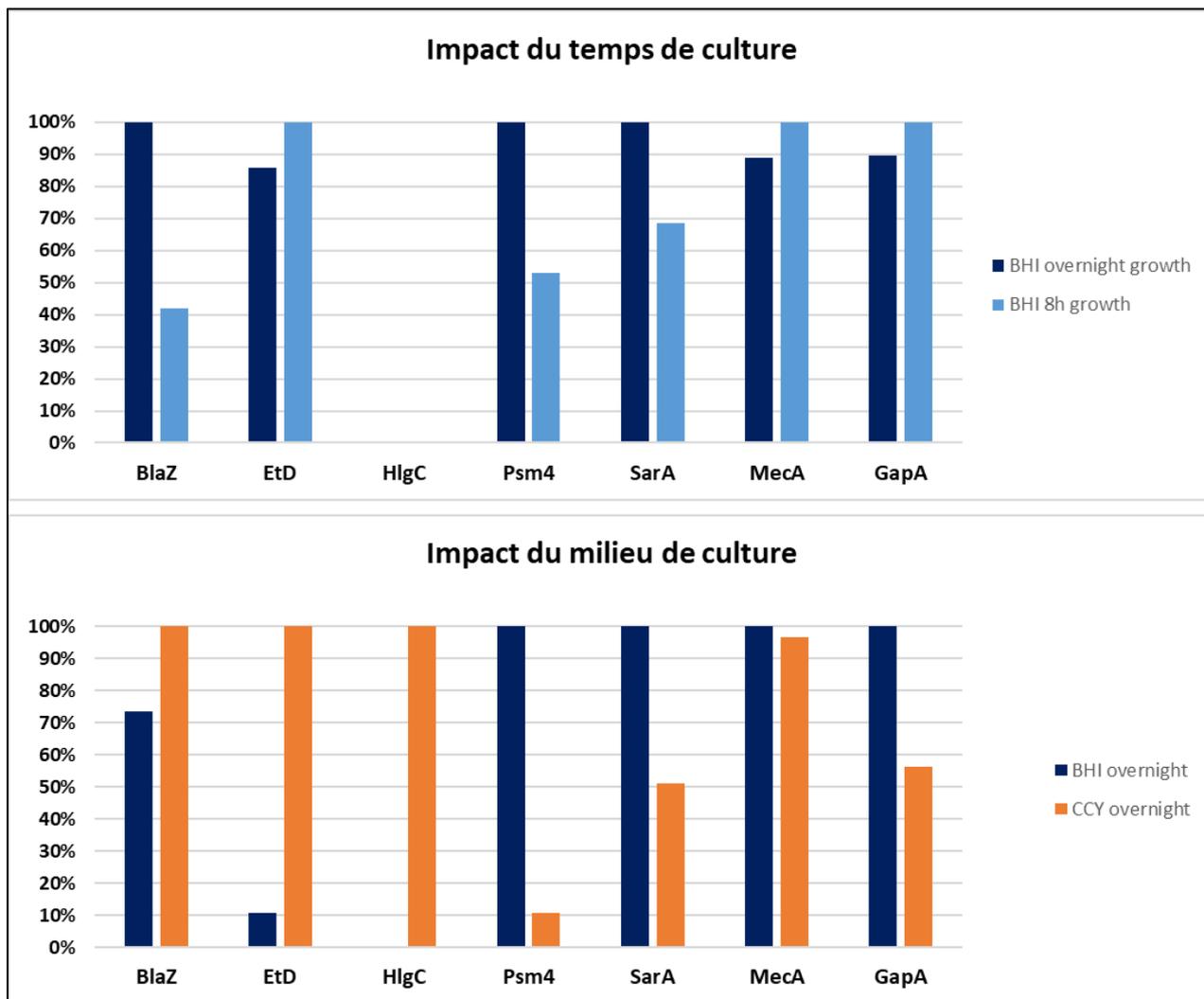


Figure 70 : Diagramme présentant l'impact du temps et du milieu de culture sur l'expression de certains facteurs de virulence. Les deux conditions d'étude pour le temps sont : une croissance sur 8 heures (fin de phase exponentielle) (Bleu clair) et une croissance sur la nuit (plateau) (Bleu foncé). Le niveau d'expression est indiqué en pourcentage relatif par rapport à l'expérience où le facteur est majoritaire. Deux milieux de culture ont été testés, le milieu CCY et le milieu classique BHI (bouillon cœur-cerveille).

En fonction de la phase de croissance, différentes protéines vont être synthétisées par la bactérie^{3, 34, 35}. La Figure 70 illustre pour différents facteurs l'impact de ce temps de culture : soit croissance sur la nuit (bleu foncé), soit pendant 8 h pour être à la fin de la phase exponentielle (bleu clair). L'expression des protéines est comparée en relatif avec l'expression maximale fixée à 100 %. Des variations d'expression en faveur des deux temps de cultures

sont observées, avec Psm4 où un plus long temps de culture entraîne une augmentation de 50 % d'expression alors que pour la protéine GapA la plus forte expression est observée pour 8 h de croissance.

Sur le deuxième graphique, l'expression de ces facteurs pour une croissance sur la nuit est comparée, pour deux milieux de culture différents (CCY en orange et BHI en bleu). L'impact observé est ici bien plus fort que pour celui du temps de pousse. En effet, la toxine HLGC n'est pas exprimée sur le milieu BHI contrairement au milieu CCY, et une augmentation de 90 % pour l'exofoliative toxine D (EtD) est observée. En revanche, cette même variation est retrouvée dans le cas opposé pour Psm4. Il est donc totalement impossible de comparer l'expression de souches issues de différents milieux de culture et de temps de culture ne correspondant pas à la même phase de croissance. Il en ressort qu'il est primordial de choisir son milieu et ses conditions de culture en fonction du but de l'étude associée, car cela aura un impact global sur le virulome caractérisé par une approche protéomique.

II. Validation à plus grande échelle

Afin de poursuivre la validation de l'approche sur une plus grande échelle, l'analyse de 300 souches clinique de *S. aureus* issues de 2 cohortes distinctes a été réalisée. Ces souches cliniques ont été fournies par l'équipe *Pathogénie des Staphylocoques* du Prof. F. Vandenesch, et en particulier Mariane Pivard et Florence Couzon, du Centre International de recherche en Infectiologie (CIRI) en collaboration avec le Centre National de Référence des Staphylocoques (Institut des Agents infectieux, Hôpital de la Croix Rousse). L'objectif de cette étude n'est pas seulement de confirmer et d'affiner les différents paramètres déjà déterminés comme la robustesse ou la spécificité de la méthode, mais aussi de vérifier que la quantification est en adéquation avec les variations observées.

Travailler sur un grand nombre d'échantillons permet d'établir de nouvelles caractéristiques de la méthode, comme l'encrassement de l'appareil qu'il est très important de maîtriser dans le cadre d'un transfert en milieu clinique. De plus, il est envisageable de vérifier que l'approche quantitative est juste, en comparant les résultats obtenus avec des observations biologiques connues, grâce par exemple à l'étude des corrélations d'expression entre certaines protéines. Enfin, grâce au couplage de ces données avec des outils de génomique (séquençage, puce à ADN et protéomique simulée), il a été possible d'améliorer considérablement l'approche, via l'ajout de multiples peptides pour couvrir les variants rencontrés.

Cependant, l'analyse d'une telle cohorte demande des précautions dans le choix des conditions préanalytiques. Le milieu de culture et le temps de croissance se doivent d'être judicieusement choisis, pour s'assurer que l'ensemble de l'étude reste cohérent et pertinent.

A. Conditions préanalytiques : optimisations et impacts

Les conditions de cultures demeurent extrêmement importantes lors de la réalisation d'une étude. En effet, le type de milieu de culture entraîne des changements d'expressions pour certaines protéines, avec un impact important pour les toxines (PVL, HLD). De plus, en fonction de la phase de croissance (phase exponentielle ; phase stationnaire) l'expression de protéines comme MecA varie significativement. Une décision doit par conséquent être prise concernant

les conditions pré-analytique choisies pour la réalisation de l'étude, et les résultats obtenus découleront directement de celle-ci. Ceci est par ailleurs essentiel à garder à l'esprit au moment de la discussion de ces résultats.

En amont de l'essai mené sur les 300 souches cliniques de *S. aureus*, il a donc fallu mettre en place des tests afin de fixer ces conditions de cultures. Les principaux choix concernent le milieu de culture et le temps de croissance. Enfin, il faut vérifier que les paramètres expérimentaux annexes, comme l'agitation ainsi que le choix du manipulateur, n'entraînent pas de biais dans l'analyse.

1. Milieux de culture

Parmi la grande diversité des milieux de culture possibles, 4 milieux utilisés pour des cultures de *S. aureus* ont été présélectionnés : le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute), DMEM (pour Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium), le milieu BHI (Brain Heart Infusion) ainsi que le milieu CCY (Casein hydrolysate and yeast extract medium). Pour chacun des milieux de culture, deux souches de référence ont été utilisées, l'USA 300 et la ST80. Ces deux clones sont des souches communautaires de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) et productrices de la leucocidine de Panton Valentine (PVL). Ces clones sont devenus endémiques aux États-Unis et sont fortement étudiés par les laboratoires.

	Sensibilité	Expression facteurs de résistances	Expression toxines
RPMI	-	-	--
DNEM	--	-	--
BHI	++	++	+
CCY	++	++	++

Tableau 6 : Récapitulatif des caractéristiques pour les 4 milieux de cultures étudiés. La sensibilité correspond à la capacité de détection globale des protéines d'intérêts. L'expression des facteurs de résistance est principalement liée à l'expression de *MecA* et *BlaZ*.

Le milieu RPMI est usuellement employé pour la culture cellulaire, mais qui est connu en microbiologie médicale pour sa capacité à induire le processus de filamentation (agglomération des bactéries sous forme de filaments). Le milieu dans les tests préliminaires

s'est avéré très efficace dans l'expression de certains facteurs comme NUC (Nucléase), SSPP (Staphopain – protéase) et SPA (Protéine A). Cependant, un grand nombre de facteurs de virulence sont sous ou non-exprimés. Les toxines sont les plus impactées avec de très faible expression de HLA et HLD, les PSM et les HLG (A, B, C). De plus, le milieu RPMI est un milieu pauvre, ce qui engendre une maigre croissance bactérienne, et par conséquent conduit à une perte globale de sensibilité. Cette perte de sensibilité s'avère déterminante dans le cas des protéines comme MecA qui sont parfois très faiblement exprimées et qui n'ont pas été détectées dans ce milieu, bien que ces protéines puissent être de première importance. Il en résulte que le milieu de culture RPMI n'a pas semblé être adapté pour l'étude à mener et n'a donc pas été retenu.

Le milieu DMEM est très similaire au milieu RPMI : c'est un milieu de culture cellulaire, assez pauvre, mais enrichi avec une forte quantité de fer. Dans l'ensemble, le milieu n'apporte pas une information exhaustive, notamment à cause de la surexpression de très peu de facteurs et l'absence d'expression d'un grand nombre d'autres (principalement les toxines), le tout pour une faible croissance bactérienne dans le milieu. Par conséquent, le milieu est considéré comme inadapté pour l'étude.

Les deux derniers milieux envisagés sont le BHI et le CCY. Dans l'ensemble, les deux milieux sont des milieux riches. Ils permettent tous deux une forte croissance bactérienne dans le milieu, ce qui se traduit par un gain en sensibilité dans l'analyse. Les deux milieux s'avèrent être similaires quant à l'expression des différents facteurs de virulence étudiés. Cependant, le milieu CCY engendre globalement une expression des protéines d'intérêt plus importante. De plus, il permet la détection de l'ensemble des protéines recherchées dans les deux souches de référence, tandis que le BHI montre certaines limites pour 7 facteurs, notamment pour la PVL, HLGC, et les autres leucocidines. Devant ces résultats c'est le milieu CCY qui a été utilisé pour l'étude de la cohorte.

2. Qualité du milieu de culture

Le milieu CCY est un milieu qui est fait main par l'équipe du CIRI lors de la préparation des échantillons. Celui-ci est parfois conservé sur une période pouvant atteindre 1 mois. Or, il a

été remarqué pour l'analyse d'une même souche à plusieurs mois d'intervalles que des différences d'expression pour certains facteurs de virulence étaient présentes. Ces variations peuvent atteindre un facteur 5 pour des toxines comme HLG, HLD, ou les PVL, ce qui engendre un biais important dans la quantification relative mise en place. Afin de vérifier que les différences d'expressions proviennent bien du milieu de culture et non pas d'une variabilité biologique, une expérience visant à comparer un milieu « vieux » (un mois) et un « neuf » a été effectuée. Les résultats du Tableau 7 représentent, pour les 2 souches de référence, les différences observées entre les moyennes de 5 réplicats techniques pour les milieux « neufs » et « vieux ». Il en résulte que l'âge du milieu de culture impacte de façon significative l'expression d'un grand nombre de protéines. Les toxines sont les plus touchées, avec de fortes variations d'expression constatées : par exemple pour HlgC et LukD, un écart supérieur à un facteur 3 est observé. La protéine SplB est même non-exprimée pour la souche ST80 dans le milieu le plus ancien.

Globalement, un milieu « neuf » entrainera une meilleure production des toxines. Toutefois, on remarque que pour la protéine A (Spa – en bleu), l'inverse est observé avec une meilleure expression dans le milieu « vieux ». Une hypothèse est que l'expression de Spa est anti-corrélée à l'expression des toxines (HLD, HLA), donc si dans un « vieux » milieu moins de toxines sont créées, alors l'expression de Spa sera plus forte. Devant l'impact potentiel de la qualité du milieu sur la quantification, il est primordial de vérifier que la préparation du milieu est bien répétable et homogène au cours de l'intégralité de l'étude. C'est pourquoi des précautions dans la réalisation du milieu de culture ont été mises en place lors de la culture des 300 souches bactériennes. Dans un premier temps, un mélange global de tous les composants (sous forme de poudre) nécessaires à la création d'une quantité de milieu suffisante pour l'ensemble de l'étude a été réalisé. Puis, ce premier mélange a été séparé en plusieurs batchs. Chaque jour, un batch frais a été utilisé, et les composants pouvant subir une forte détérioration avec le temps (vitamines) y ont été ajoutés au dernier moment.

Ces précautions sont primordiales dans l'optique d'une étude quantitative de comparaison relative entre les différentes souches.

	Souche ST80			Souche Usa 300	
	Milieu "ancien"	Milieu "nouveau"		Milieu "ancien"	Milieu "nouveau"
Blal	0,255	0,244	Blal	0,139	0,192
BlaZ	0,000	0,000	BlaZ	0,037	0,029
Chp	0,000	0,000	Chp	0,118	0,080
CoA	0,023	0,016	CoA	0,015	0,020
EtB	0,017	0,030	EtB	0,013	0,020
Fib	0,068	0,055	Fib	0,057	0,043
GapA	0,086	0,043	GapA	0,049	0,048
HLA	0,049	0,109	HLA	0,088	0,122
HLD	12 294	22 951	HLD	8 977	16 578
HlgA	0,006	0,017	HlgA	0,007	0,015
HlgB	0,008	0,011	HlgB	0,002	0,005
HlgC	0,060	0,274	HlgC	0,103	0,395
IsaB	0,034	0,034	IsaB	0,021	0,022
LukD	0,070	0,310	LukD	0,192	0,501
LukG	0,067	0,075	LukG	0,138	0,112
LukH	0,136	0,213	LukH	0,283	0,304
MecA	0,231	0,267	MecA	0,041	0,057
Nuc	0,130	0,303	Nuc	0,276	0,438
Psm1	1,216	2,368	Psm1	0,733	2,143
Psm4	0,937	2,092	Psm4	0,686	1,743
PVL-LukF	0,332	1 580	PVL-LukF	1 321	2 758
PVL-LukS	0,102	0,598	PVL-LukS	0,363	1 060
SAK	0,273	0,479	SAK	0,308	0,331
SarA	0,076	0,056	SarA	0,057	0,073
Sbi	0,083	0,060	Sbi	0,100	0,076
Scn	0,110	0,083	Scn	0,124	0,117
SeA	0,053	0,042	SeA	0,056	0,043
Spa	0,214	0,083	Spa	0,632	0,259
SplB	0,000	0,086	SplB	0,073	0,177
SSPP	0,019	0,014	SSPP	0,025	0,020

Tableau 7 : Tableau récapitulatif de la quantification sur 5 réplicats techniques pour plusieurs conditions. À gauche les valeurs pour la souche de référence ST80 et à droite pour l'USA 300. Dans chacun des cas, la comparaison entre un milieu CCY ancien (1 mois) et nouveau est réalisée. Les cases surlignées en jaune et bleu correspondent aux protéines impactées significativement par la fraîcheur du milieu.

3. Temps de croissance bactérienne

Outre l'impact de la nature du milieu de culture, le temps de croissance a un effet significatif sur l'expression des protéines, comme illustré précédemment sur la Figure 70. Deux temps principaux de culture ont été définis pour la mise en place de l'étude : 8h et 16 h (croissance sur la nuit).

Les variations d'expression constatées sont généralement inférieures à un facteur 2 entre les 2 conditions. Cependant, pour certaines protéines comme BlaI (inhibiteur de l'expression de BlaZ) et BlaZ (bêta-lactamase), la variation est plus importante. Il est également observé que les temps de croissance long (croissance sur la nuit) favorisent l'accumulation d'une majorité des protéines. Toutefois, certaines protéines comme MecA sont mieux exprimées sur des temps courts de croissance, car elles sont produites très tôt dans la croissance et se détériorent avec le temps. De plus, un temps de croissance long éloigne le moment d'arrêt de la culture au niveau de la fin de la phase exponentielle de croissance et ainsi de la linéarité démontrée entre nombre de bactéries et quantité de protéines ribosomiques. Enfin, il est plus simple de réaliser une croissance sur 8 h pour des conditions pratiques. C'est pourquoi les 300 souches ont été préparées dans un milieu CCY avec une croissance sur 8 h.

4. Paramètres expérimentaux annexes

Dans un souci de rigueur de l'approche, divers paramètres expérimentaux, comme l'effet du manipulateur et le type d'agitation pendant la croissance, ont eux aussi été étudiés. L'impact du manipulateur s'est révélé être non-significatif dans l'expression des facteurs de virulence. En revanche, en fonction d'une agitation sur tube droit ou incliné, le niveau d'expression de certaines protéines comme les Psm et SplB s'est avéré être impacté. L'effet observé est de l'ordre de 30 %, ce qui représente une variation significative. L'inclinaison du tube pourrait entraîner une meilleure homogénéisation/oxygénation du milieu, et donc impacter l'expression de certaines protéines. En conséquence, les mêmes types de portoirs ont été utilisés pour l'ensemble des souches.

5. Conclusion sur les conditions pré analytiques

Il est important de prendre en compte l'ensemble des conditions qui dépassent le cadre de l'analyse lors de la réalisation de celle-ci, car elles peuvent avoir des répercussions considérables sur les résultats obtenus, notamment dans une approche quantitative. Parmi les différentes conditions testées, le milieu CCY avec un temps de culture de 8 h a été sélectionné. De plus, la qualité du milieu a été assurée sur l'ensemble de l'étude avec l'utilisation de batch provenant du même mélange et l'ajout des composés fragiles au dernier moment. L'agitation des tubes ayant un impact significatif, des portoirs strictement identiques ont été utilisés pour les souches. Ces mesures sont nécessaires pour assurer la plus grande cohérence et robustesse possible pour l'analyse de la cohorte.

B. Validation de la justesse de la méthode

Cette partie de l'étude (Analyse de Protéomique simulée) a été réalisée en collaboration étroite avec Sylvère Bastien, ingénieur bio-informaticien de l'équipe *Pathogénie des Staphylocoques* du Prof. F. Vandenesch (CIRI).

La première étape de la validation consiste à déterminer si ce que l'on détecte est bien ce qui doit être détecté. Pour ce faire, il est nécessaire de confronter la méthode à d'autres méthodes qui nous serviront de référence. Dans notre cas, pour les 300 souches étudiées, il a été possible de comparer les données issues de la protéomique à des données provenant d'analyses *via* des puces à ADN (sauf pour les facteurs PSM1 et PSM4). De plus, le génome de 239 souches a été séquencé, ce qui a permis la réalisation d'une analyse protéomique simulée (PEPS). La protéomique simulée consiste à repérer, dans les séquences des souches, les peptides utilisés dans la méthode, afin de vérifier que ceux-ci sont bien présents dans le gène (pas de mutation ou de protéine tronquée). Il est alors possible de vérifier lors de l'absence d'un gène ou de sa modification, l'absence de détection en protéomique classique.

1. Matrice de confusion

Les résultats des 300 souches ont donc été dans un premier temps, comparés aux données issues des puces à ADN, *via* l'utilisation de matrices de confusion. Plusieurs termes sont

couramment employés pour décrire ces caractéristiques. Il s'agit de vrai positif (VP), vrai négatif (VN), faux négatif (FN) et faux positif (FP).

Sensibilité = $VP / (VP + FN)$ = (Nombre d'évaluations positives identifiées) / (Nombre réel d'évaluations positives).

Spécificité = $VN / (VN + FP)$ = (Nombre d'évaluations négatives identifiées) / (Nombre réel d'évaluations négatives)

Précision = $(VN + VP) / (VN + VP + FN + FP)$ = (Nombre d'évaluations correctes) / (Nombre de toutes les évaluations)

2. Spécificité de la méthode

Comme le montrent les équations ci-dessus, la spécificité est la proportion de vrais négatifs correctement identifiés par la méthode. Elle indique dans quelle mesure celle-ci est capable de discriminer l'absence d'expression de l'expression d'un facteur de virulence. Les valeurs de spécificité par rapport aux données des puces à ADN sont représentées sur la Figure 71.

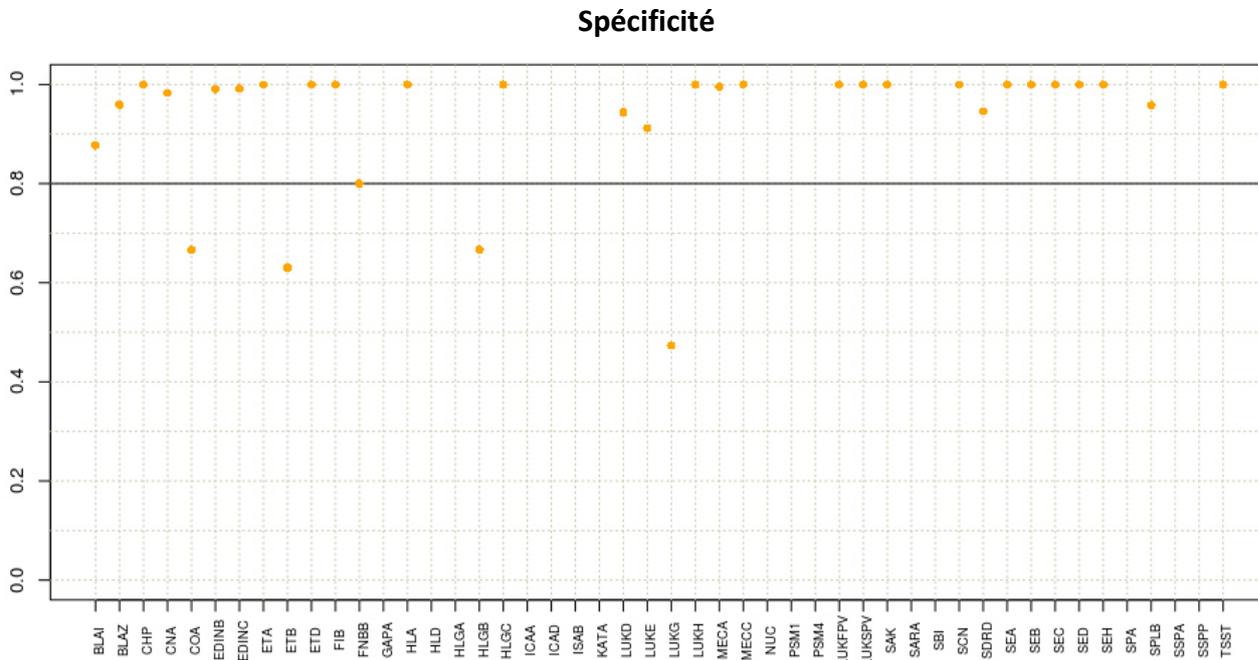


Figure 71 : Représentation pour l'ensemble des facteurs de virulences étudiés de la spécificité par rapport aux résultats issus des puces à ADN.

À première vue, les résultats de spécificité semblent être plutôt corrects sur l'ensemble des protéines avec des valeurs proches de 90-95 %. Cependant, 5 protéines (CoA, FnbB, EtB, HlgB, et lukG) sont en dessous d'une valeur symbolique de 80 %, ce qui révèle un problème de détection sous-jacent dans la méthode.

Pour la protéine HlgB, la valeur de spécificité (0,666) provient du fait de la présence d'un unique FP, mais pour seulement 3 souches négatives attendues. Il apparaît donc que dans les faits, la spécificité demeure bonne avec uniquement 1 FP sur 300 souches analysées. De plus, après comparaison avec les analyses en PEPS, aucun faux positif n'est véritablement présent, la souche possédant bien le gène codant pour la protéine. La protéine CoA est exactement dans le même cas, avec 1FP pour 3 souches négatives attendues.

Cet exemple reflète une limitation de la notion de spécificité, qui reste peu pertinente pour les cas où il n'y a que très peu de valeurs. Un très faible éventail de données peut complètement minimiser une valeur (HlgB et CoA) ou la maximiser. C'est le cas de la protéine EtA, où aucune souche n'exprime la protéine, ce qui se traduit par une spécificité de 100 % alors qu'on est dans un simple cas d'absence de données.

Dans le cas de la protéine LukG, les résultats obtenus étaient composés de 56 FP. Seulement, l'analyse PEPS a montré qu'il n'y avait finalement que 0 FP pour 13 VN, ce qui confère une valeur de spécificité de 100 % et démontrent que les amorces pour les puces ne sont pas toujours sûres.

En revanche, pour FnbB la valeur de spécificité met en lumière un véritable problème : la protéine est très faiblement exprimée dans l'ensemble des souches et s'est avérée être très sujette aux mutations. La plupart des fois où la protéine est exprimée, celle-ci est en limite de détection, ce qui a forcé l'utilisation de filtre plus permissifs (aire minimale de détection) et a engendré plus de FP. Après vérification, les résultats de la protéine ne peuvent pas être pris en compte. La détection de la protéine nécessite l'ajout de nombreux peptides variants à la liste de détection, pour être correctement détectée.

Pour la dernière protéine, EtB, la problématique provient d'un mauvais choix de peptide. Le peptide quantifieur ESPYGQGLDLAIK s'est avéré ne pas être spécifique de la protéine EtB, car

celui-ci est détecté au bon temps de rétention, avec la bonne valeur de TVA dans des souches supposées négatives (89 fois). Cependant, il n'est retrouvé dans aucune base de données pour une autre protéine que EtB. De plus, les BLAST sont aussi négatifs pour d'autres protéines, lorsque l'on étudie toutes les combinaisons d'inversion de leucine et d'isoleucine dans la chaîne d'acides aminés. Enfin, le peptide n'est pas détecté pour la seule souche parmi les 300 possédant le gène alors que le peptide est bien présent dans la séquence selon l'analyse PEPS. Le peptide a donc été éliminé de la méthode, et synthétisé une nouvelle fois pour effectuer des analyses hautes résolutions. Ce type de problématique ne peut être malheureusement mis en évidence qu'avec ce genre d'étude.

3. Sensibilité de la méthode

La sensibilité est la proportion de vrais positifs qui sont correctement identifiés par la méthode. Elle montre la capacité de l'approche à détecter dans ce cas une protéine d'intérêt. C'est une valeur qui s'avère être plus difficile à interpréter dans le type d'analyse étudié. En effet, celle-ci ne prend pas en compte dans son calcul la possible absence d'expression de la protéine lorsque le gène est présent. Les valeurs obtenues seront donc forcément inférieures à la réalité. Les valeurs de sensibilités pour chacune des protéines d'intérêt sont représentées sur la Figure 72.

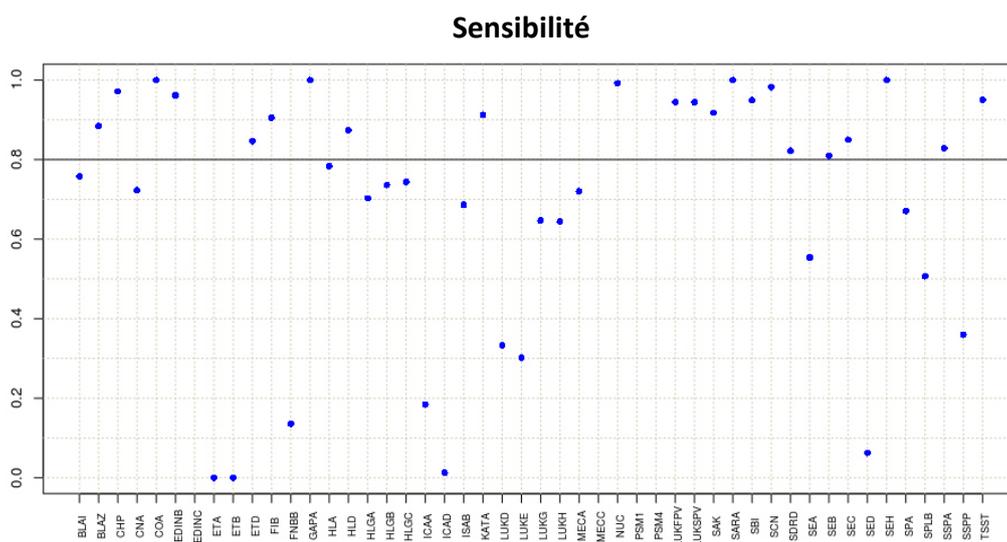


Figure 72 : Représentation pour l'ensemble des facteurs de virulence étudiés de la sensibilité par rapport aux résultats issus des puces à ADN.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sont très disparates, allant presque de 0 % à 100 % de sensibilité. Les faibles sensibilités peuvent être dues à plusieurs facteurs, comme une absence de détection car la quantité de protéine est inférieure à la limite de détection, une mutation des peptides, ou encore la non-expression de la protéine.

Par exemple, la protéine EtA est retrouvée à 0 de sensibilité, pour seule raison d'une absence totale de souches exprimant la protéine sur l'ensemble de la cohorte. Pour EtB, le problème discuté dans le paragraphe précédent se répercute ici aussi. Une fois corrigée, la sensibilité s'avère être de 100 %, car la seule souche positive est bien détectée. Toutefois la valeur perd de son sens devant un échantillon de données aussi restreint.

Il en va de même pour les entérotoxines (SeA, SeB, SeC, SeD, SeH) qui même lorsque le gène est présent sont souvent non-exprimées.

En revanche, IcaA et IcaD sont des protéines pour lesquelles l'analyse révèle un problème majeur. Ces protéines sont censées être toujours exprimées, mais sont seulement détectées respectivement 43 et 10 fois sur les 230 souches séquencées. Lorsque l'on regarde les valeurs associées à la détection, ces protéines sont constamment en limite de détection. La méthode n'est donc pas assez sensible dans ces conditions pour permettre une bonne détection de ces 2 protéines pour l'ensemble des souches. C'est pourquoi les résultats pour ces deux protéines ne doivent pas être pris en compte, comme pour FnbB.

4. Précision de la méthode

La précision de la méthode a été évaluée (Figure 73) afin d'aller plus loin que la sensibilité et travailler sur des valeurs prenant en compte une pondération pour l'intégralité des souches. La précision est la proportion de résultats réels (soit positifs, soit négatifs) pour, dans notre cas, une protéine par rapport à l'ensemble des résultats. Elle mesure le degré de véracité de la méthode.

Les valeurs de précision sont globalement supérieures à 80% - 90 %, et cohérentes avec les validations précédentes. Cependant, la représentation de la précision met en évidence la présence de problèmes pour certaines protéines.

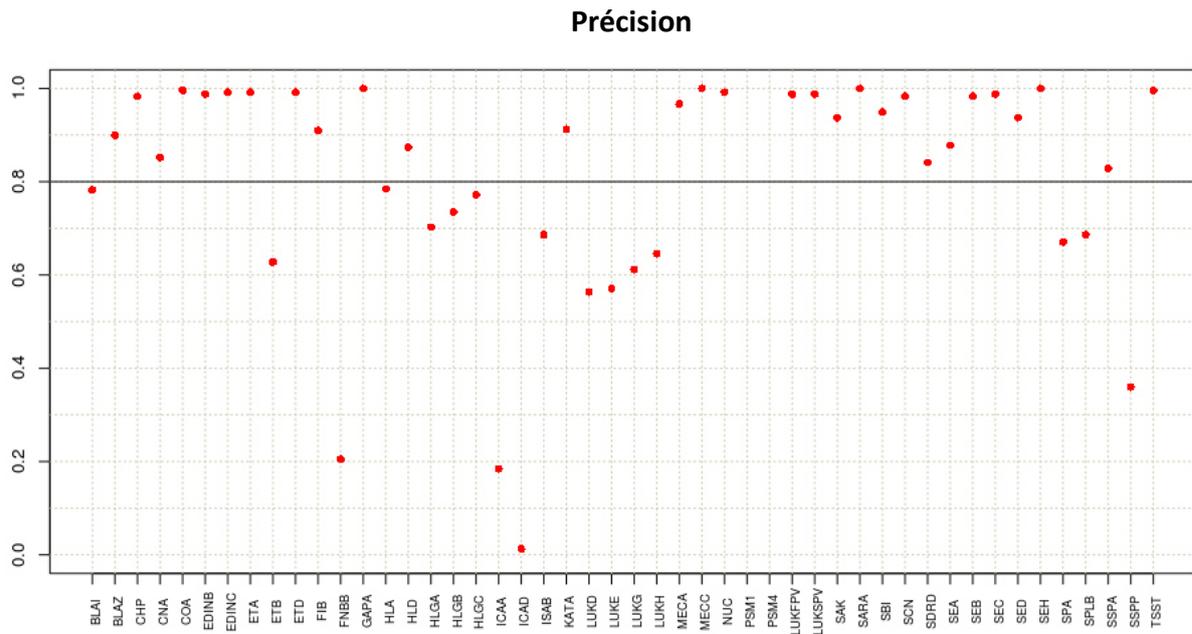


Figure 73 : Représentation pour l'ensemble des facteurs de virulence étudiés de la précision par rapport aux résultats issus des puces à ADN.

Les trois valeurs les plus faibles concernent les 3 protéines qui ont déjà été écartées de l'analyse (FnbB, IcaA, IcaD). De plus, EtB avant sa correction est aussi caractérisée par une faible valeur en précision, ce qui était attendu. Il reste en revanche, 19 protéines en dessous de 90 % dont 13 protéines en dessous de 80 % de précision. Pour chacun de ces cas, une investigation au niveau du retraitement analytique et des spectres de masses a été réalisée afin de comprendre d'où provient ce biais de détection et si celui-ci est dû à la méthode. Pour cette investigation, nous avons comparé la méthode aux résultats des puces à ADN et à la méthode PEPS. Plusieurs cas de figure ont pu ainsi être mis en évidence.

Premièrement, les protéines comme Blal, BlaZ, Cna, HlgA, HLA, HID, SSPA, Scn, SeA, Spa sont des protéines pour lesquelles on observe fréquemment une simple absence d'expression, même lorsque le gène est présent. Il ne faut pas oublier qu'il est aussi possible que l'expression soit si faible pour certaines souches qu'elle se retrouve sous la limite de détection. Pour ces protéines, le biais ne provient pas de l'incapacité à détecter la protéine, car celle-ci est correctement identifiée et quantifiée sur plusieurs décades d'expressions. La question suivante se pose : est-ce impactant, pour la caractérisation de la souche, de rendre un résultat négatif lorsque l'expression est trop faible pour être détecté lorsque des variations de facteur

100 sont observables ? La réponse à cette question dépend de la protéine considérée et requiert une connaissance approfondie du facteur de virulence. Il se peut qu'une faible expression entraîne un impact biologique négligeable, ou alors que la moindre présence entraîne l'apparition d'une résistance obligatoire à détecter. Par exemple pour MecA et PVL-LukS/F, il est obligatoire d'avoir une sensibilité de 100%. En revanche, pour les autres protéines dans la méthode, il faudra des études plus approfondies pour pouvoir répondre à cette question.

Le deuxième cas de figure est lorsque les résultats des puces à ADN sont incomplets ou incorrects (sonde inadaptée après l'apparition d'une mutation), ce qui concerne les protéines LukD, LukE, LukG et HlgB. Une fois corrigée par les résultats de l'analyse PEPS, la méthode montre une qualité de détection très bonne (>90 %) pour ces protéines.

Enfin, le dernier cas observé est la présence d'un grand nombre de variants de la protéine, comme pour les protéines SSPP, SplA, LukH et HlgC. Cela a considérablement impacté la détection de ces protéines dans un premier temps et a nécessité des corrections quand cela était possible. En effet, dans certains cas, il s'est avéré que sur les 3 peptides présents dans la méthode, 2 soient mutés simultanément (dont le peptide quantifieur), engendrant alors des FN. Pour ces cas de figure, il a été nécessaire de retraiter les résultats en élargissant les filtres de validation.

5. Évolution de la méthode et conclusion

Même si les paramètres de sensibilité, spécificité, et précision comportent des limitations, ceux-ci demeurent un excellent outil de caractérisation et de validation de la méthode. Ils ont permis de mettre en évidence un certain nombre de problèmes dans le retraitement ainsi que dans le choix des peptides spécifiques d'une protéine. Les valeurs obtenues après correction pour chacun des paramètres sont très encourageantes et sont supérieures à 90 %, malgré le fait que la présence du gène ne conduit pas forcément à l'expression de la protéine.

Devant la mise en évidence de la présence d'un nombre important de variants et de multiples mutations, l'analyse PEPS a été réalisée sur l'ensemble des facteurs de virulence. Grâce à cela, il a été possible de confirmer la bonne détection de 46 protéines. Les 4 protéines

restantes (IcaA, IcaD, FnbB, SdrD) ont été mises de côté, car les valeurs obtenues ne peuvent être utilisées en l'état. De plus, l'analyse PEPS a permis de récupérer les séquences des peptides nécessaires pour prendre en compte la présence de mutations chez les différents variants. Plus de 50 peptides ont ainsi été rajoutés à la méthode dans cette optique.

C. Validation de la quantification

La dernière étape de la validation concerne la partie de quantification relative de l'analyse. Comme détaillé précédemment, un grand nombre de paramètres internes et externes à la méthode influencent la quantification. Il est donc nécessaire de s'assurer que les valeurs obtenues représentent bien la réalité, afin de pouvoir tirer des conclusions sur l'expression des différents facteurs de virulence dans l'étude. L'étude de la robustesse de la méthode peut être scindée en deux parties distinctes : la première concernant la répétabilité de la mesure en elle-même, et la seconde avec la vérification de la cohérence de la quantification dans l'ensemble de l'étude sur les 300 souches cliniques de *S. aureus*. Afin d'étudier ces deux aspects, des échantillons de contrôles qualité (QC) ont été analysés tout au long de l'étude. Ils permettent dans un premier temps de s'assurer de la qualité de la quantification pour la totalité de la cohorte, puis dans un second temps de fournir des données de répétabilité intrinsèques à la méthode que l'on peut comparer à des réplicats techniques (réplicat de la culture à l'analyse) de certaines souches pour de nombreux facteurs de virulence. Cette robustesse pourra ensuite être confrontée aux résultats obtenus pour les différentes protéines afin de vérifier la cohérence globale de l'approche et le degré de discrimination possible entre les différentes souches de la bactérie. Enfin, pour finaliser la validation, les corrélations attendues entre l'expression de différents facteurs de virulence ont été vérifiés.

1. Échantillon de contrôle qualité

L'ajout et l'analyse de QC tout au long de l'étude ont été nécessaires pour vérifier la justesse et la cohérence de la quantification sur l'ensemble de la cohorte. De plus, ils ont permis d'évaluer la robustesse de la méthode inter-individus et inter-jours pour chaque protéine exprimée dans les échantillons QC. Enfin, l'estimation de paramètres comme l'encrassement de l'appareil *via* l'analyse des intensités brutes des normalisateurs internes a été réalisée.

Les QC ont été créés à partir d'un mélange des 2 souches de référence : ST80 et USA300. Le mélange ainsi créé permet de couvrir 37 des protéines présentes dans la méthode. La fréquence d'analyse des QC est de 1 pour 10 échantillons, avec 30 échantillons analysés par jours.

2. Cohérence de la quantification sur l'ensemble de la cohorte

Pour vérifier que la quantification relative réalisée est cohérente entre les 300 souches, il est possible d'étudier les rapports entre les peptides ribosomiques utilisés comme normalisateurs internes. Ce rapport est reporté en fonction de chaque souche analysée (point bleu) et chaque QC (point orange) sur la Figure 74.

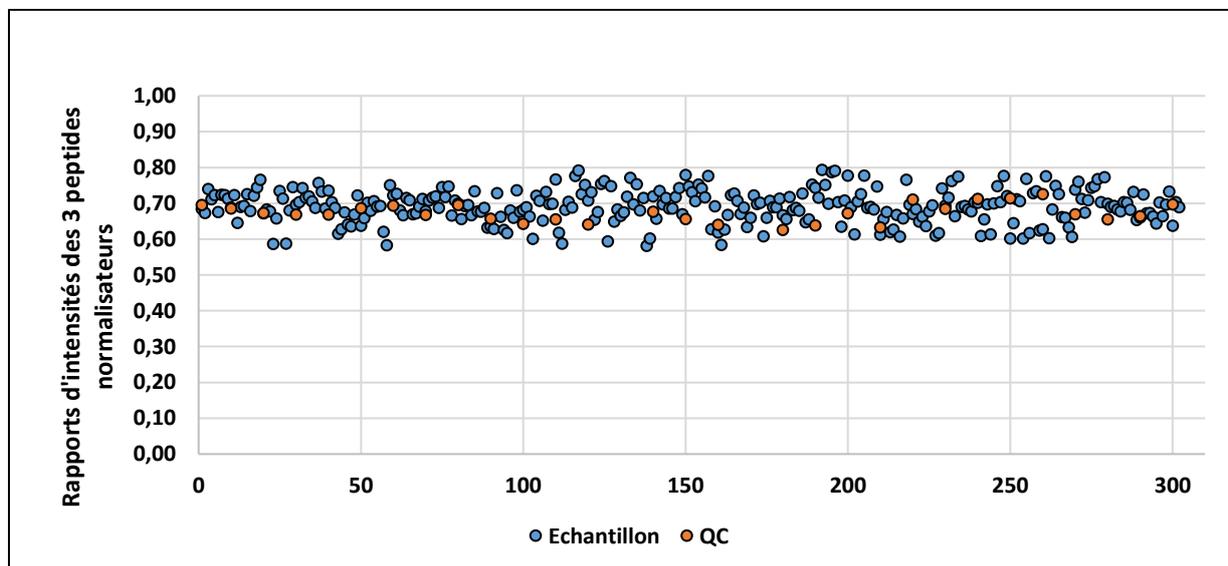


Figure 74 : Rapport des intensités des 3 peptides normalisateurs pour l'ensemble des 300 souches analysées (En bleu) et pour les QC (en orange). La valeur cible est de 0,68. La valeur moyenne obtenue est de 0,69 avec un CV de 5 %.

L'ensemble des valeurs sont centrées sur la valeur attendue du rapport (0,68), avec une moyenne pour les QC de 0,67 et pour les échantillons de 0,69. Les CV obtenus pour les valeurs du rapport sont de 5 % et aucune variation supérieure à 15 % n'est observée sur l'intégralité de l'étude. Ces données illustrent la robustesse des normalisateurs internes et assurent que la quantification est homogène pour l'ensemble des souches bactériennes.

3. Encrassement de l'appareil

L'encrassement de l'appareil lors de l'analyse à haut débit d'échantillons complexes est un paramètre qui reste souvent oublié. Cependant, il est très important de connaître les limites de la méthode et de pouvoir prédire les maintenances nécessaires pour optimiser le rendement d'analyse. En effet, le lavage de l'appareil demande un temps pour sa réalisation (30 minutes) et un temps pour la remise en route du spectromètre de masse (2 h), ce qui peut être handicapant en routine clinique. Un lavage préventif sera toujours préférable à un lavage en réponse à une intensité globale trop faible pour assurer une analyse juste.

L'analyse des rapports entre les peptides normalisateurs pour les échantillons de QC et de leurs intensités moyennes brutes au cours de l'analyse de la cohorte (Figure 75) a permis de caractériser l'encrassement de l'appareil.

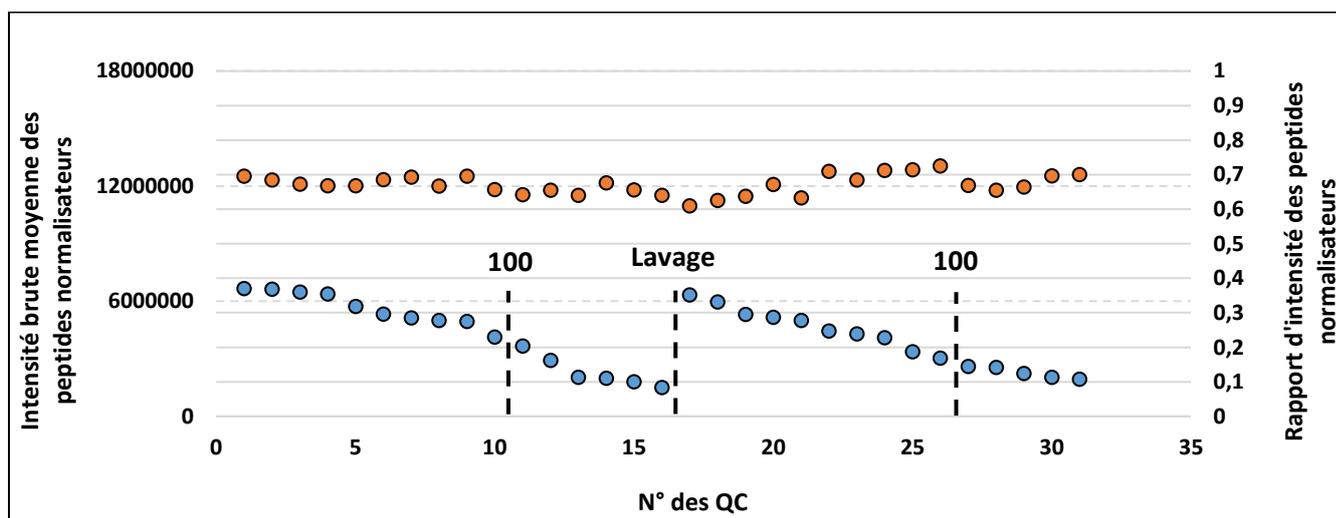


Figure 75 : En bleu est représenté l'intensité brute moyenne, répartie de façon chronologique, des peptides normalisateurs pour chaque QC analysé. Une décroissance forte est observée au bout de 10 QC analysé qui s'aggrave après 16 QC soit 170 échantillons. Le lavage réalisé permet de retrouver l'intensité brute initiale, et la décroissance est à nouveau observée. En orange est représenté pour les mêmes QC les valeurs des rapports entre les peptides normalisateurs. Les rapports restent constants malgré la décroissance observée.

Les points bleus représentent l'intensité moyenne brute des peptides normalisateurs pour chaque QC de l'analyse. Comme un QC est analysé tous les 10 échantillons, la chute globale d'intensité est grandement significative après 100 échantillons et devient très importante après 150 échantillons. Le lavage (Figure 76) de la plaque de l'orifice (1), du Q-jet (2) et du Q0 (3) permet de récupérer la sensibilité initiale observée.

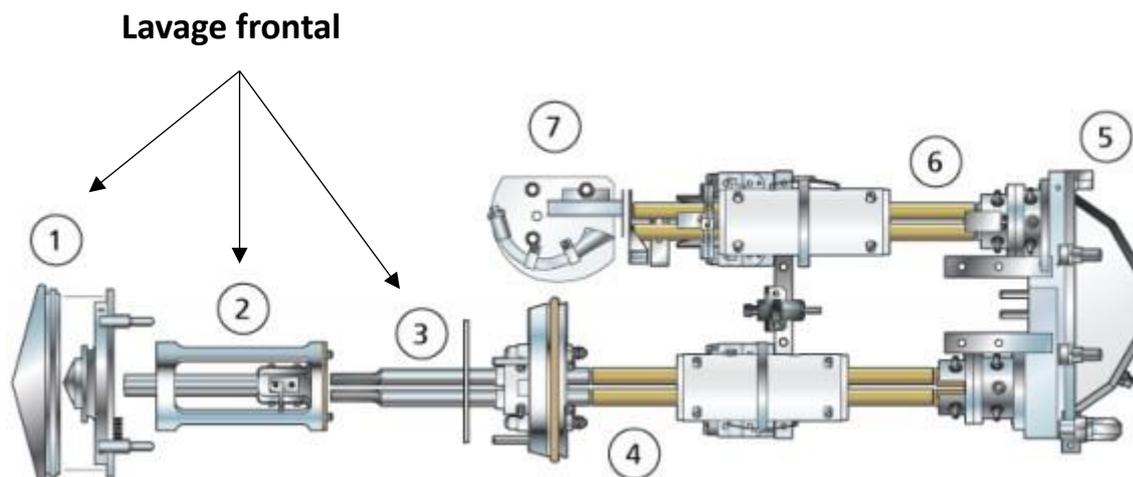


Figure 76 : Schéma descriptif du Qtrap 6500 Sciex. (1) Plaque de l'orifice ; (2) Qjet guide d'ion ; (3) Région du Q0 ; (4) Q1 ; (5) Q2 ; (6) Q3 ; (7) Détecteur.

Lors de l'étude, 30 échantillons étaient analysés par jour, et le lavage a été réalisé au début de chaque semaine, soit après 150 échantillons. La procédure de lavage et de remise sous vide requiert toutefois un minimum de 2h30 avant de pouvoir analyser à nouveau un échantillon. Il est à noter que malgré la chute globale d'intensité, les rapports d'intensité entre les peptides normalisateurs demeurent constants, permettant d'être confiants sur la robustesse de la méthode. Cependant, une chute en sensibilité trop importante entraîne une perte de détection pour les protéines en limite de détection. Il est donc nécessaire d'évaluer précisément à partir de quel degré d'encrassement la perte d'information s'avère être trop limitante pour chaque application. Cependant, devoir effectuer un lavage tous les 100 échantillons est une tâche très lourde, car cela demande un lavage tous les 2 jours pour un flux continu d'analyse. Plusieurs solutions, comme la diminution du volume d'échantillon digéré et injecté, ont été testées au sein du laboratoire. Ces nouveaux paramètres ont pour objectif d'accroître le nombre d'échantillons analysés avant lavage à 250, ce qui est déjà plus en adéquation avec une routine d'analyse.

4. Robustesse de quantification des facteurs de virulences

La robustesse de la quantification pour l'ensemble des facteurs de virulence a été évaluée par plusieurs moyens. Préalablement, l'étude d'un triplicat technique (hors culture bactérienne) avait été réalisée et présentée sur la Figure 68. Lors de l'analyse de la cohorte, la répétabilité

de la quantification a pu être appréciée *via* l'analyse des QC. Enfin, des réplicats techniques (culture bactérienne comprise) ont également été effectués.

La Figure 77 représente une boîte de Tukey (Box-plot) pour chaque protéine exprimée dans les QC. Chaque boîte représente les écarts relatifs à la moyenne pour une protéine. Les résultats obtenus sont très similaires aux premiers résultats de robustesse. Les CV des différentes protéines oscillent entre 6 et 20 % au maximum. Une augmentation en moyenne des CV est observée car la variabilité interjour et interindividu est maintenant prise en compte. Ces résultats confirment que la robustesse de la méthode est très bonne et globalement inférieure à 20 % d'erreur. Cependant, il est à noter que pour certaines protéines, des points hors gammes sont observables. Cela se traduit par une variabilité plus importante de certains facteurs comme CoA, HlgC ou LukH. Les CV obtenus pour la méthode ne permettent toujours qu'une discrimination de variation d'expression au-delà d'un facteur 2, ce qui est toutefois en accord avec les différences d'expression préalablement observées.

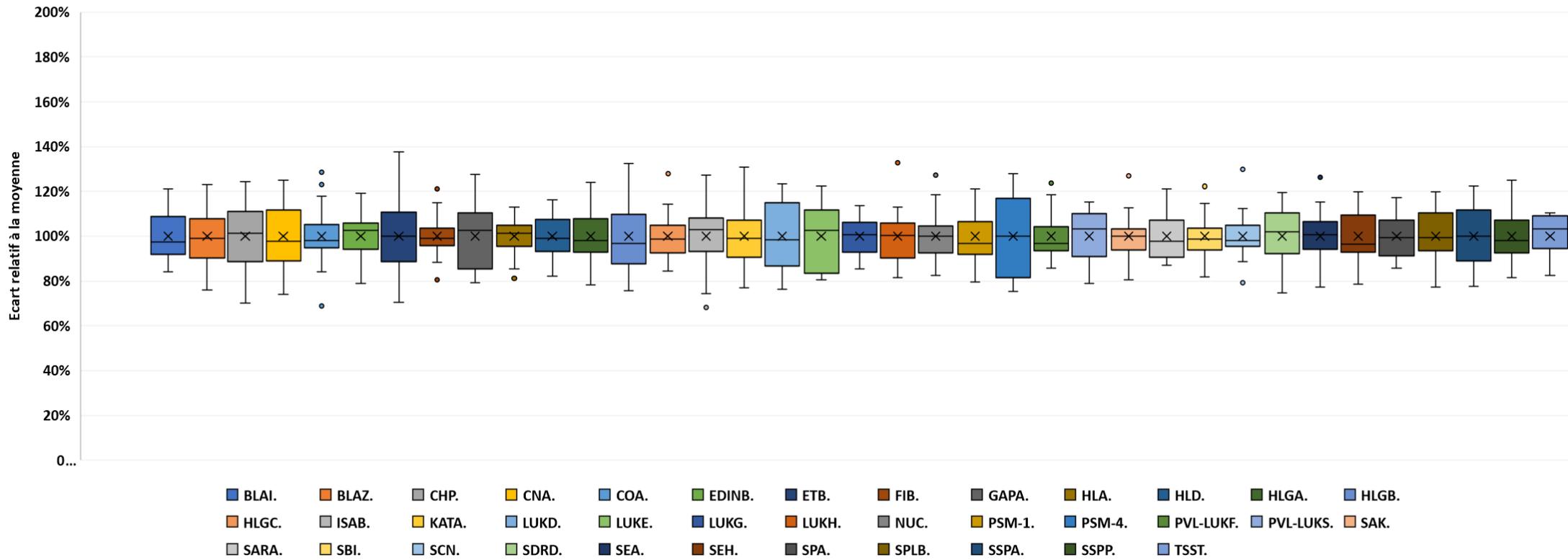


Figure 77 : Diagramme de type boîte à moustache pour chacune des protéines étudiées exprimées dans les échantillons QC. Elles représentent l'écart à la moyenne pour chaque QC, permettant d'évaluer la robustesse et les coefficients de variation associés à chaque facteur de virulence en tenant compte de la variabilité interjours et interindividu. Aucune variation supérieure à 20 % par rapport à la moyenne n'est observé sur l'ensemble des paramètres. Certaines protéines comme CoA, HlgC, SAK montrent des échantillons hors gammes qui demeurent inférieurs à 30 % de variation.

L'analyse des répliquats techniques comprenant la culture bactérienne est la dernière étape de la vérification de la robustesse de la méthode. Celle-ci a été menée sur 2 souches et les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Souche n°1			CV %	Souche n°2			CV %
Blal	0,274	0,269	1	Blal	0,291	0,263	7
CoA	0,013	0,014	5	CoA	0,018	0,017	4
EtB	0,061	0,054	9	EtB	0,063	0,069	6
Fib	0,064	0,077	13	Fib	0,068	0,06	9
GapA	0,057	0,067	11	GapA	0,058	0,049	12
HLA	0,095	0,087	6	HLA	0,123	0,123	0
HLD	58 673	57,7	1	HLD	56 348	54 247	3
HlgA	0,054	0,041	19	HlgA	0,032	0,034	4
HlgB	0,014	0,012	11	HlgB	0,011	0,009	14
HlgC	0,225	0,197	9	HlgC	0,327	0,313	3
IsaB	0,02	0,019	4	IsaB	0,023	0,019	13
LukD	0,27	0,277	2	LukD	0,439	0,412	4
LukG	0,052	0,045	10	LukG	0,036	0,034	4
LukH	0,125	0,114	7	LukH	0,152	0,141	5
MecA	0,164	0,155	4	MecA	0,22	0,184	13
Nuc	0,294	0,298	1	Nuc	0,357	0,363	1
Psm1	4,918	4,503	6	Psm1	7,705	7,197	5
Psm4	2,078	1,979	3	Psm4	3,913	3,86	1
PVL-LukF	1 557	1 416	7	PVL-LukF	2 189	2 297	3
PVL-LukS	0,667	0,585	9	PVL-LukS	0,751	0,768	2
SAK	0,443	0,477	5	SAK	0,612	0,55	8
SarA	0,111	0,136	14	SarA	0,119	0,09	20
Sbi	0,035	0,028	16	Sbi	0,045	0,042	5
Scn	0,093	0,077	13	Scn	0,076	0,070	6
SeA	0,041	0,038	5	SeA	0,049	0,055	8
Spa	0,058	0,046	16	Spa	0,042	0,039	5
SplB	0,083	0,072	10	SplB	0,147	0,145	1
SSPP	0,013	0,012	6	SSPP	0,019	0,018	4

Tableau 8 : Tableau récapitulatif de la quantification sur 2 répliquats techniques (culture comprise) pour 2 souches bactériennes. À gauche les valeurs d'intensités normalisées pour le premier réplikat et les CV associés aux diverses protéines détectées, et à droite pour le second réplikat avec également les valeurs de CV associées.

Pour l'ensemble des protéines exprimées dans les deux souches, la répétabilité est toujours inférieure à 20 % (CV), et ce malgré des expressions relativement faibles comme pour GapA et IsaB. On confirme également qu'il sera difficile de comparer des différences d'expression pour de très faibles niveaux d'expression proches de la limite de détection. En effet, il est dangereux de s'avancer sur une différence entre des valeurs de 0,002 et 0,006 qu'il serait possible d'observer. Pour conclure, les trois études réalisées sur la quantification relative de

la méthode, confirment une robustesse cohérente pour un rendu de résultats concernant des différences d'expression supérieures à un facteur 2.

5. Cohérence entre robustesse et variation d'expression

Même si la robustesse obtenue est inférieure à 20 % (CV), il est toutefois nécessaire de la comparer avec les différences d'expression observables au sein de la cohorte de 300 souches. En effet, si les variations d'expression n'excèdent pas 20 %, la robustesse de la méthode n'est pas adaptée pour la quantification de ce ou ces facteurs de virulence. En revanche, il sera toujours possible de déterminer si la protéine est exprimée ou non.

Afin d'illustrer les variations d'expression observables en fonction des souches bactériennes, les valeurs pour 24 protéines d'intérêt sont représentées en fonction de la valeur obtenue la plus faible pour la même protéine (Figure 78). Cela permet de rendre compte de la variation d'expression intrinsèque à chaque protéine.

Les différences d'expression observées s'étendent d'un facteur 50 pour la protéine KATA jusqu'à un facteur supérieur à 1000 pour une protéine comme HLD. De plus, ces différences d'expression ne sont pas dues seulement à quelques souches présentant une sous ou une sur expression, mais bien à une variation sur l'ensemble de la plage de variabilité, comme on peut le voir sur les protéines HlgC, Spa, SspA ou encore HLA. Certaines protéines comme COA et GapA montrent une variation d'expression beaucoup moins importante. Cela peut s'expliquer par le fait que ce sont des protéines qui sont exprimées dans l'ensemble des souches et considérées comme essentielles au fonctionnement de la bactérie.

L'ensemble de ces données démontre que la précision de l'approche quantitative est cohérente avec les différences d'expression observables entre les souches bactériennes pour les différents facteurs de virulence. La méthode est adaptée à la caractérisation et à la comparaison des profils de virulence chez *S. aureus*.

Il est aussi possible de représenter cette dispersion en fonction de la valeur normalisée obtenue pour étudier la gamme d'expression intra et inter protéine (Figure 79). Cette représentation situe l'expression des différentes protéines les unes par rapport aux autres. De

très fortes expressions par rapport aux protéines ribosomiques sont observées pour des protéines comme HLD, Psm1 et PVL pouvant atteindre des valeurs normalisées proche de 500 (500 fois l'intensité des peptides rapporteurs des protéines ribosomiques). L'information essentielle qui ressort de la figure est la grande gamme dynamique nécessaire à la méthode pour couvrir cette différence d'expression entre les facteurs de virulence. Si l'expression de la protéine HLD est maximale et celle de la protéine IsaB est minimale, la différence d'expression s'étend sur une plage de 6 décades. Il apparaît donc essentiel, pour fournir un profil complet d'expression de la virulence, de pouvoir travailler sur une grande gamme dynamique de concentration. Cela confirme notamment le choix d'un appareillage de type QQQ permettant d'atteindre ces spécifications.

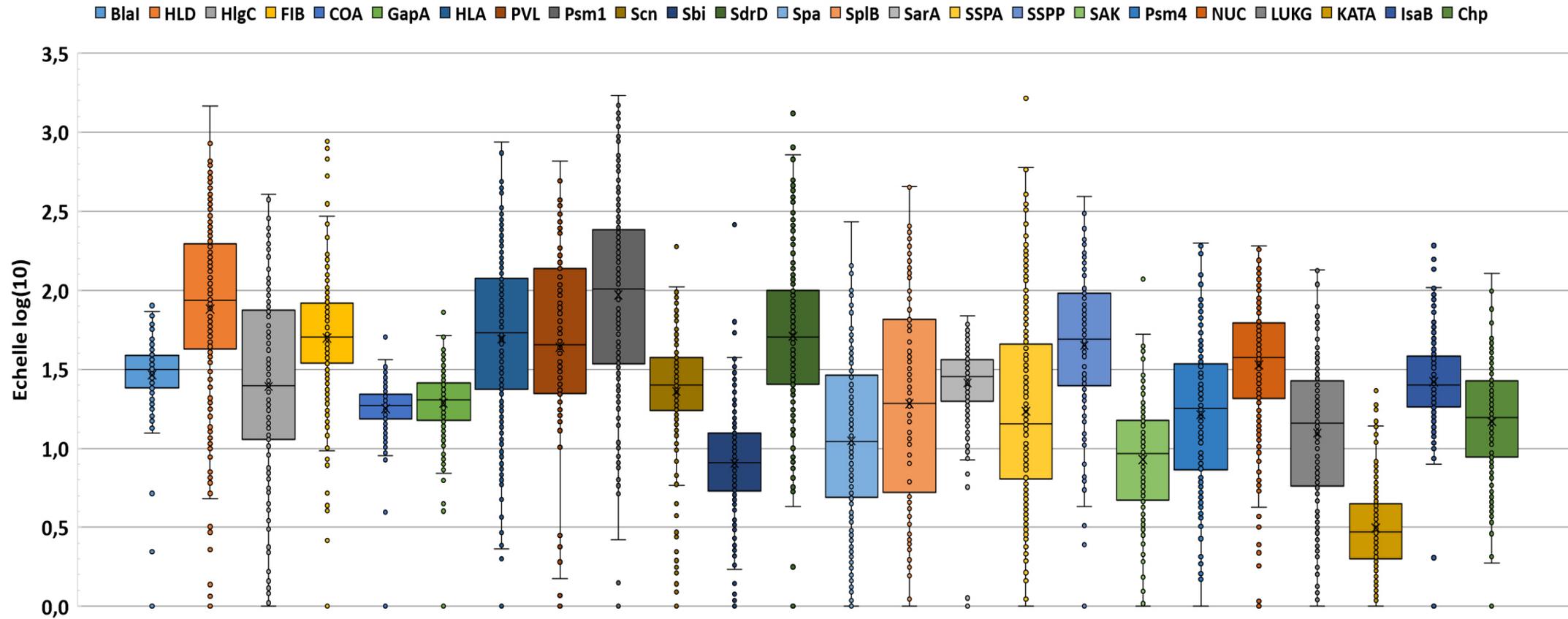


Figure 78 : Boîtes à moustaches pour 24 facteurs de virulence sur une échelle en log 10 d'intensités relatives pour chacune des protéines. Pour chaque boîte est représenté l'ensemble des valeurs en fonction de la valeur minimale observée sur les 300 souches de *S. aureus* analysées.

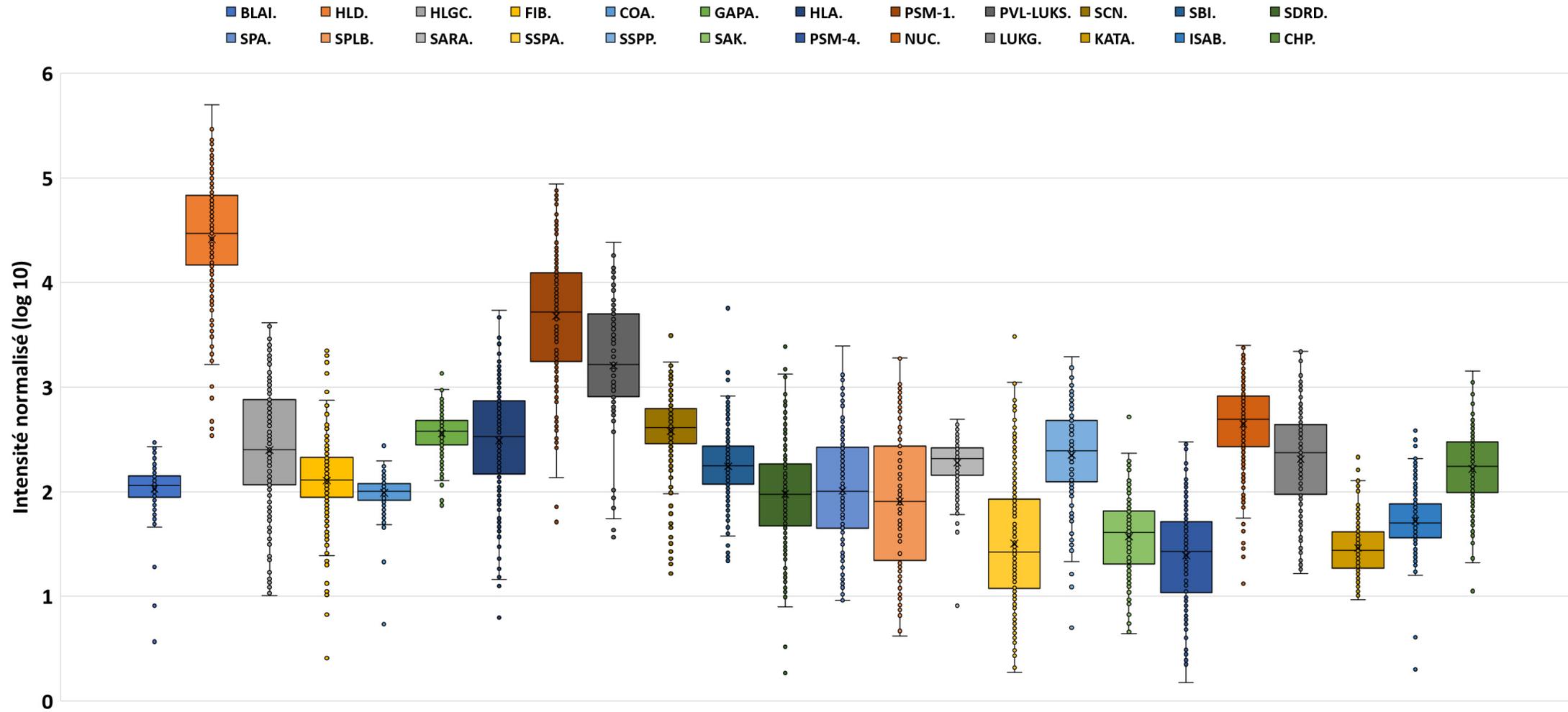


Figure 79 : Boîtes à moustaches pour 24 facteur de virulences sur une échelle en log₁₀ d'intensités normalisées. Pour chaque boîte sont représenté les intensités normalisées observées sur les 300 souches de *S. aureus* analysés. Une différence de plus de 5 log est observable entre le facteur le plus intense (HLD) et le plus faible (Sbi).

6. Corrélation entre l'expression de certains facteurs de virulences

La dernière étape de la validation pour la quantification est de retrouver des corrélations attendues entre l'expression de certaines protéines. En effet, certaines protéines se retrouvent sur un même opéron. Un opéron est une unité d'ADN regroupant des gènes qui opèrent sous le signal d'un même promoteur (section qui déclenche la transcription). Les gènes sont ainsi transcrits ensemble. Donc, soit tous les gènes d'un opéron sont transcrits, soit aucun n'est transcrit. Dans ce cas, l'expression des gènes d'un même opéron devrait être retrouvée simultanément. Une autre possibilité est que les mécanismes de régulation de deux protéines soient liés entre eux, et dans ce cas la corrélation entre leurs expressions peut aussi être observée.

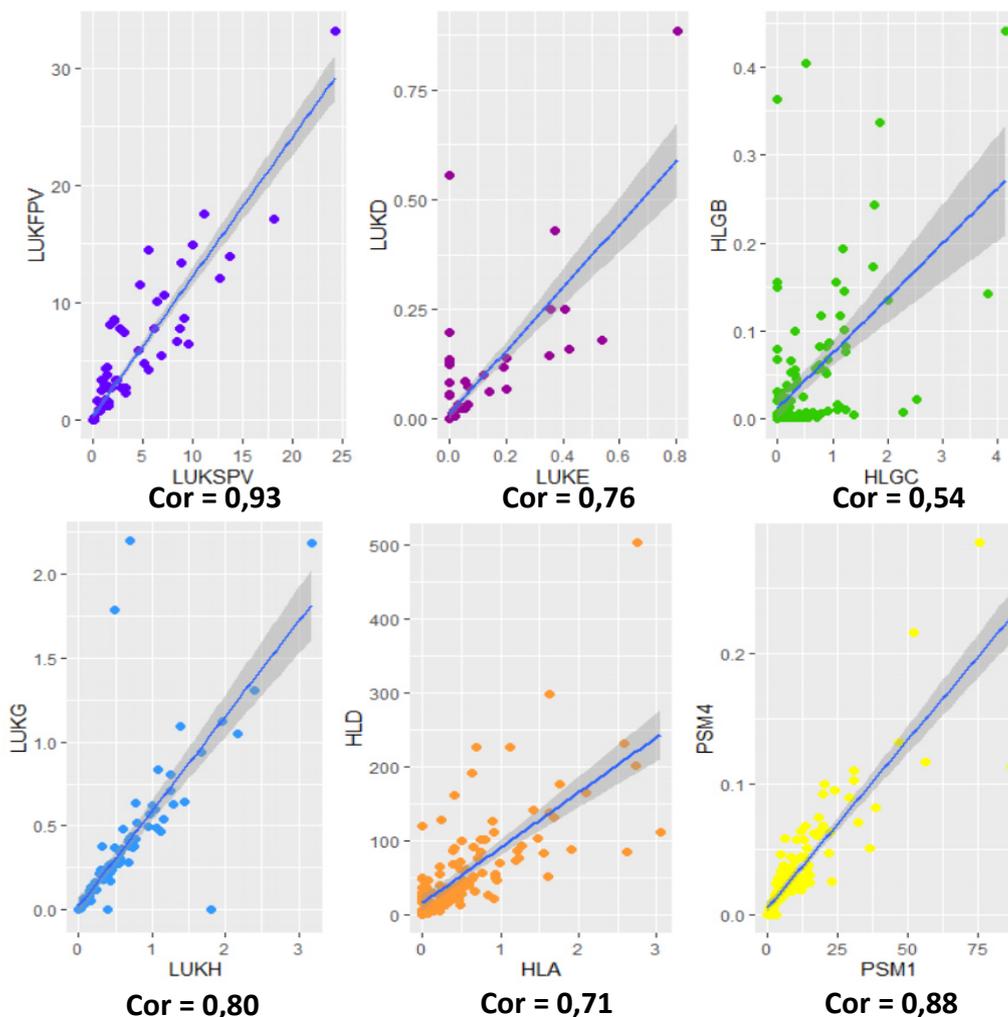


Figure 80 : Représentation de l'intensité relative de facteurs de virulence situés sur un même opéron ou liés dans leurs régulations deux à deux. Les valeurs de corrélation obtenue entre l'expression des protéines sont indiquées en dessous de chaque graphique. Toutes les P-value obtenues sont inférieures à 0,01 et indiquent une corrélation importante entre chaque duo de protéines étudiées.

La Figure 80 représente la corrélation entre les valeurs d'intensités normalisées des différentes protéines étant situées sur un même opéron^{2, 24, 36} (PVL-LukS/PVL-LukF, LukD/LukE, LukG/LukH, HlgB/HlgC et Psm1/Psm4) ou ayant un lien dans leur régulation (HLA/HLD).

Pour toutes les protéines issues d'un même opéron, les expressions mesurées par le biais de la méthode montrent des corrélations très fortes. Dans l'ensemble, toutes les P-values associées sont inférieures à 0,01, démontrant la présence d'une corrélation entre les couples de protéines étudiés. Par ailleurs, il est improbable d'observer une corrélation linéaire parfaite entre les facteurs, car il existe de nombreuses régulations au sein de la bactérie qui peuvent influencer l'expression d'une des deux protéines. C'est le cas observé par exemple avec HLGB/HLGC pour lequel le coefficient de corrélation est plus faible (0,54). Ce coefficient est en partie dû au fait que HLGB est souvent très faiblement exprimé et en limite de détection. De plus, d'autres systèmes de régulation peuvent entrer en jeu comme lors de l'expression simultanée avec HLGA ou PVL qui peuvent entraîner des sous ou surexpression d'HLGC. La même observation est possible avec le couple HLA/HLD pour lesquels une corrélation était attendue par le lien existant dans leur régulation²¹⁵. Ces résultats démontrent la cohérence des résultats obtenus avec les résultats attendus pour les liens d'expression existant entre les protéines d'intérêt.

D. Conclusion de la validation

La validation à grande échelle *via* l'analyse de la cohorte de 300 souches cliniques a permis d'établir l'ensemble des caractéristiques de la méthode. La spécificité, la sensibilité et la précision ont ainsi été évaluées pour les 49 protéines d'intérêt. Les valeurs obtenues se sont révélées très satisfaisantes et permettent d'être confiant sur une détection adéquate des différents facteurs de virulence suivis. Les analyses complémentaires réalisées en génomique et PEPS ont fait évoluer la méthode par l'ajout de 60 peptides supplémentaires afin de couvrir les variants observés.

En ce qui concerne la quantification, elle requiert une attention particulière au moment de la création de la méthode, mais aussi lors du choix des conditions préanalytiques qui peuvent se révéler également très impactantes. Cependant, une fois ces paramètres pris en compte, il

s'est avéré que la méthode est robuste ainsi que cohérente sur l'ensemble de la cohorte pour chacune des protéines étudiées. De plus, l'approche semble adaptée pour discriminer les variations d'expression rencontrées dans la cohorte. Enfin, on retrouve également des corrélations entre les expressions de protéines situées sur un même opéron ou en lien dans leurs régulations. Ces résultats permettent d'être très confiant sur la justesse de l'approche.

La méthode est donc valide dans son ensemble et peut être utilisée pour l'analyse de grandes cohortes. Les résultats obtenus lors de l'analyse des 300 souches de *S. aureus* seront plus amplement analysés et exploités par le CIRI. Les données cliniques associées aux résultats quantitatifs de la méthode pourraient permettre de mieux comprendre les différences de virulences observées entre les souches du staphylocoque doré. De plus, la méthode sera mise en place en routine dans le CNR pour poursuivre l'étude dans le temps.

III. Conclusion

Ce chapitre a été dédié au développement et à la validation d'une méthode semi-quantitative afin de caractériser le virulome chez *Staphylococcus aureus* par LC/MS-MS. L'approche couvre 49 facteurs de virulence, caractérisés par 163 peptides correspondant à un multiplexe de 469 transitions. Les stratégies impliquant un grand nombre de composés d'intérêt demandent une rigueur importante pour leur mise en place. Le premier défi provient de l'obtention des informations adéquates pour les séquences protéiques, dans le but de pouvoir faire les bons choix quant aux peptides et transitions spécifiques des protéines d'intérêt.

Notre volonté dans le développement de la méthode a été de rendre l'approche la plus simple et rapide possible dans le but de l'appliquer directement en clinique. Après diverses optimisations, cela permet de fournir un résultat en moins de 50 minutes après le prélèvement (Figure 43).

L'aspect quantitatif est le véritable atout de ce genre d'approche et est la plus grande différence avec les approches génomiques. Grâce aux choix de normalisateurs internes, il a été possible d'obtenir une information semi-quantitative pour l'expression des facteurs de virulence, sans ajouter un surcoût ou de la complexité pour la réalisation de l'analyse. Cela nous a permis de mettre en évidence la présence d'une grande gamme dynamique d'expression, s'étalant sur plus de 6 décades.

L'optimisation de chaque étape de la méthode est essentielle, pour un gain de temps et de justesse. Les analyses MRM génèrent un nombre important de données lors de chaque analyse (environ 500 spectres) ce qui a obligé la mise en place d'outils de validation et de retraitement automatisés. Cette première base servira pour la création d'un logiciel plus abouti, avec des fonctionnalités plus poussées. L'utilisation, par exemple, de filtres optimisés *via* des algorithmes afin de s'affranchir d'un maximum des cas en limites de détection et d'une analyse systématique du bruit, grâce à des systèmes d'analyse de données (deep learning), permettrait un gain en justesse pour l'approche. Dans le futur, l'augmentation du nombre de souches analysées par la méthode permettra l'optimisation de l'ensemble des filtres et l'amélioration perpétuelle des différents paramètres de validation.

La méthode n'est pas figée, elle se doit d'être renforcée pour couvrir l'apparition de variants, de mutations ou bien de nouveaux facteurs de virulence d'intérêt. Les analyses PEPS réalisées pour la validation à grande échelle ont permis l'ajout de 60 peptides dans cette optique. Cependant, la préparation d'échantillon, ainsi que les paramètres de culture (temps de culture, composition du milieu de culture) se doivent d'être fixes si l'on veut pouvoir effectuer une comparaison du virulome entre différentes souches. Comme ces paramètres influencent directement le niveau d'expression et parfois l'expression elle-même, il est très important de faire un choix en amont d'une étude, car ils auront un poids dans les résultats obtenus.

Malheureusement, les facteurs inductibles ou la présence de modifications post-traductionnelles resteront une limite dans cette approche ciblée. En revanche, cela ne concerne que peu de protéines d'intérêt et il est toujours possible d'étudier ces paramètres spécifiquement avec des conditions adaptées. Des études quant à l'induction rapide de MecA afin d'améliorer la sensibilité ont été réalisées avec succès.

La seconde problématique majeure est la dépendance des méthodes de protéomique ciblées envers l'information contenue dans les bases de données, notamment pour les séquences protéiques. Il serait important d'utiliser la génomique et le séquençage sur un maximum de souches avant la création d'une méthode afin de simplifier sa création et sa validation, mais cela engendre des surcoûts et requiert du temps.

Nous avons utilisé cette méthode sur diverses problématiques, par exemple afin de caractériser l'impact d'un composé dans le milieu de culture sur la régulation de certains facteurs, ou encore l'impact d'un régulateur sur la virulence d'une souche (données non présentées dans ce manuscrit). Afin de pouvoir mieux comprendre le virulome et essayer de relier son expression à la sévérité d'une souche, nous avons réalisé l'analyse d'une cohorte de 300 souches de *S. aureus*, dont les résultats en lien avec les données des patients seront étudiés dans un futur proche.

La méthodologie de travail mise en place pour *S. aureus* est facilement déclinable pour couvrir d'autres bactéries d'intérêt ainsi que de nombreux facteurs de virulence pour divers milieux de culture. A partir de cette méthodologie, une preuve de concept a été développée pour identifier et caractériser les principales bêta-lactamases pour les bactéries du groupe ESKAPE dans des hémocultures en moins d'une heure.

Chapitre 2 :

Identification bactérienne et caractérisation de la résistance aux antibiotiques en moins d'une heure directement à partir d'hémocultures par une approche MRM.

I. Contexte

La méthode décrite dans le chapitre 1 sur la caractérisation de souches cliniques de *S. aureus* représente le point de départ pour l'analyse rapide de souches bactériennes responsables de bactériémies. En effet, celle-ci permet en 50 minutes de déterminer un profil de résistance de la bactérie, mais aussi de l'identifier grâce à la présence de peptides ribosomiques spécifiques. En revanche, pour pouvoir l'appliquer dans le cadre d'un diagnostic rapide en clinique, il est nécessaire d'adapter le protocole pour travailler directement sur des hémocultures de patients. En conséquence, la transposition de ce protocole a été réalisée avec comme objectif principal un maintien du temps total de l'approche en moins d'une heure, tout en gardant une manipulation au cours des différentes étapes la plus simple possible. Une telle méthode se doit de couvrir l'ensemble des bactéries et des mécanismes de résistances les plus représentés. C'est pourquoi, dans un premier temps, la méthode créée se focalise sur les bactéries constituant le groupe ESKAPE (défini par l'OMS) et couvre l'ensemble des résistances aux bêtalactamases les plus répandues (carbapénémases, ESBL, céphalosporinases).

La réalisation de ces objectifs pose un défi analytique, puisqu'il s'agit de travailler à partir d'une matrice complexe sanguine et d'effectuer la quantification relative d'un nombre considérable de composés dans un temps le plus court possible. L'approche MRM classique n'est malheureusement pas appropriée pour de telles analyses car elle reste limitée au suivi de 150 transitions. En revanche, l'approche Schedule-MRM apparaît être adaptée, car le nombre de transitions suivies peut-être considérablement augmenté. En effet, le suivi des transitions est seulement réalisé durant des fenêtres de temps de rétention courtes. Même si la méthode est, dans un premier temps, restreinte aux bêta-lactamases principales retrouvées chez les bactéries du groupe ESKAPE, elle requiert néanmoins le suivi de près de 500 transitions pour 150 peptides rapporteurs. De plus, pour permettre une caractérisation exhaustive il est essentiel d'inclure un grand nombre de variants ^{1,2} pour chaque mécanisme de résistance, ce qui accroît la taille du multiplexe nécessaire à l'analyse. Or, la dépendance de la Scheduled-MRM autour des temps de rétention s'avère limitante dès lors que des effets matrices deviennent importants et induisent des décalages en temps de rétention des peptides élués. Pour pallier les décalages en temps de rétention tout en assurant une capacité de multiplexage conséquente, la méthode a été développée avec le mode d'acquisition

SCOUT-MRM^{217,218}. Cette approche est basée sur l'utilisation de peptides SCOUT servant de référence en temps de rétention. La détection d'un SCOUT entrainera le suivie d'un groupe de transitions associées, ce qui permet de prendre automatiquement en compte les écarts de temps de rétention au cours de l'analyse.

La dernière étape en vue d'une future application clinique d'identification d'un large panel bactérien et de la caractérisation complète du profil de résistance a été de mettre au point une méthode ciblée sans *a priori*. Pour ce faire, une preuve de concept sur un nouveau mode d'acquisition sous forme d'arbre décisionnel a été établi.

II. Création de la méthode multiplexée

La première étape de la méthode ciblée reste le choix des protéines d'intérêt à suivre permettant d'identifier les bactéries les plus prévalentes²¹⁹ dans les infections nosocomiales, à savoir les bactéries du groupe ESKAPE³ (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*). Il est donc nécessaire de faire un choix sur les peptides spécifiques permettant l'identification de l'espèce et du genre ainsi que ceux caractéristiques des mécanismes de résistances associés.

La démarche pour le choix et la validation des peptides est identique à celle détaillée dans le chapitre 1 (peptides protéotypiques, longueur, composition en acides aminés, etc..) et ne sera pas développée ici. L'attention sera portée dans un premier temps sur les peptides impliqués dans la stratégie d'identification des bactéries et dans un second temps sur les mécanismes de résistances suivis.

A. Identification bactérienne à partir des protéines ribosomales

L'identification bactérienne par spectrométrie de masse est largement répandue avec l'utilisation du MALDI-TOF¹³⁸. L'identification repose sur l'analyse des pics caractéristiques des espèces bactériennes, correspondant en grande majorité aux protéines ribosomiques¹³⁹. Ces protéines sont très abondantes, conservées et spécifiques d'une espèce bactérienne. Comme expliqué au chapitre précédent, l'emploi de ces protéines comme normalisateurs internes permet en outre de réaliser une quantification relative des protéines cibles.

Afin de dépister les peptides ribosomiaux candidats pour l'identification des différentes espèces, des expériences en Shotgun Proteomics avec le mode d'acquisition DDA ont été conduites sur les bactéries du groupe ESKAPE. L'ensemble des souches bactériennes a été fourni par plusieurs Centres Nationaux de référence (CNR) : CNR des Staphylocoques (HCL Lyon, Prof. F. Vandenesch), CNR des souches d'entérobactéries (CHU Clermont-Ferrand, Dr. F. Robin) et CNR des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (CHRU Besançon, Prof. P. Plésiat).

1. Spécificité et validation

À l'issue des analyses en DDA, un grand nombre de peptides ribosomaux a été caractérisé pour chacune des espèces bactériennes. Une étape de validation a été réalisée, dans l'intention de s'assurer que les peptides retenus supportaient l'identification spécifique des souches bactériennes. Dans un premier temps, une analyse BLAST a été conduite, ce qui a permis d'effectuer un premier tri dans la liste des peptides préalablement sélectionnés. Cependant, les bases de données pouvant s'avérer incomplètes, des analyses MRM complémentaires ont été réalisées afin de garantir la spécificité des peptides ribosomiques triés. Ces analyses (Figure 81) consistent au suivi de chaque peptide ribosomique pour chaque espèce bactérienne étudiée. Ainsi, si un peptide est détecté dans de multiples analyses, celui-ci n'est pas spécifique. Malgré tout, certaines bactéries du groupe ESKAPE sont proches génétiquement (famille des entérobactéries), et la sélection de peptides communs à la famille peut toutefois se montrer pertinente.

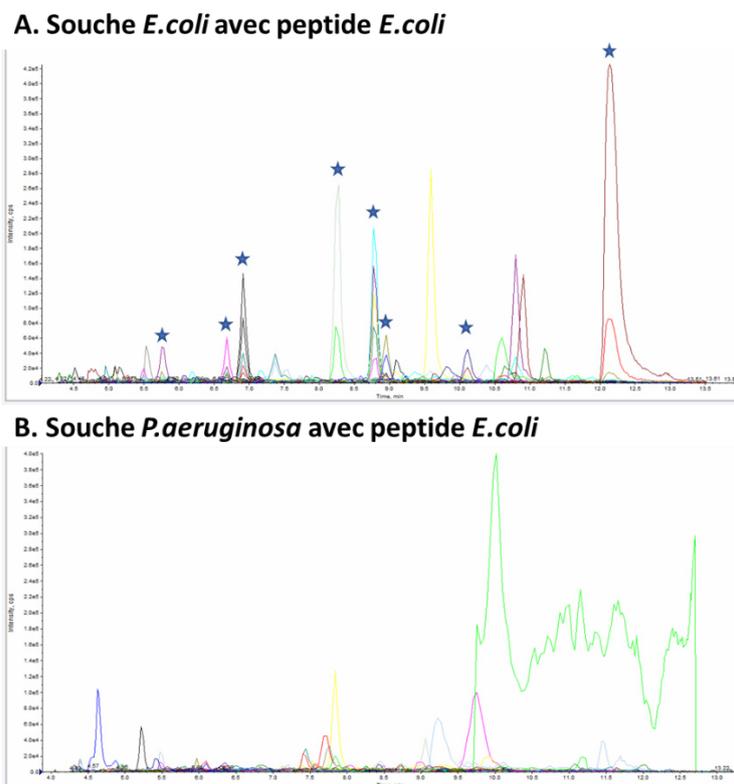


Figure 81 : Chromatogrammes reconstitués illustrant en A l'analyse d'une souche *E. coli* avec le suivi des peptides ribosomiques spécifiques de *E. coli*. Ces peptides sont identifiés sur le chromatogramme par la présence d'une étoile bleue. En B, l'analyse d'une souche de *P. aeruginosa* avec le suivi des peptides ribosomiques de *E. coli*. Aucun peptide ribosomique n'est détecté.

L'analyse présentée en A correspond aux suivis des peptides ribosomiques spécifiques à *E. coli* (étoiles bleues) pour l'analyse d'une souche de *E. coli*. Ces mêmes peptides sont également suivis en B pour une souche de *P. aeruginosa*. Aucun des peptides de *E. coli* n'est retrouvé dans cette analyse. Cela confirme que les peptides sélectionnés pour *E. coli* sont bien spécifiques de la souche *E. coli*. Ces analyses ont été répétées sur d'autres souches pour vérifier l'ensemble des combinaisons possibles.

L'intégralité des peptides ribosomiques choisis a subi les différentes étapes de validation détaillées en chapitre 1, avec l'évaluation des rapports de transitions (via l'analyse de peptides de synthèse) et la caractérisation des temps de rétention (Figure 82). Cela permet d'assurer la détection du peptide souhaité parmi la totalité des pics interférents potentiellement rencontrés lors de l'analyse d'échantillons complexes. En effet, la matrice sanguine est très riche en protéines, et il est difficile d'extraire spécifiquement les bactéries du milieu. Cela entraîne donc la présence d'un grand nombre de peptides indésirables dans l'analyse, qui peuvent occasionner des interférences.

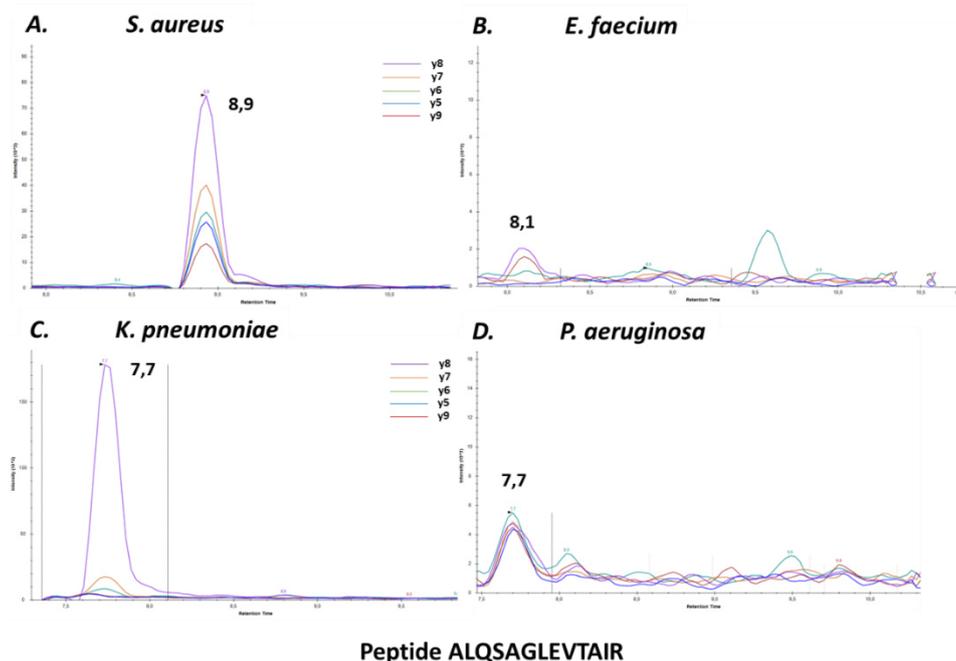


Figure 82 : Chromatogrammes reconstitués pour l'analyse de 4 souches bactériennes pour le peptide ALQSAGLEVTAIR, rapporteur de **30S ribosomal protein S11** de *S. aureus*.

A. Analyse correspondant à une souche de *S. aureus*, le peptide recherché est présent à 8,9 min.

B. Analyse d'une souche de *E. faecium*, aucun pic ne s'apparente au peptide recherché.

C. Chromatogramme reconstitué pour une souche de *K. pneumoniae*, la présence d'un pic à 7,7 min est observable, mais le rapport des transitions ne correspond pas au peptide recherché.

D. Analyse d'une souche de *P. aeruginosa*. Un pic est présent à 7,7 min, mais qui ne correspond pas au peptide recherché.

Par exemple, le peptide ALQSAGLEVTAIR est un peptide rapporteur d'une protéine ribosomique spécifique de *S. aureus* (**30S ribosomal protein S11**), et est utilisé comme normalisateur interne. L'analyse A correspond à l'analyse d'une souche de *S. aureus* pour laquelle le pic correspondant au peptide est facilement repérable et identifiable à 8,9 minutes, avec 5 transitions alignées. Concernant le suivi du peptide dans d'autres espèces bactériennes (B : *E. Faecium*, C : *K. pneumoniae* et D : *P. aeruginosa*), la présence du peptide ne peut pas être confirmée. En effet, pour l'analyse B, aucun pic chromatographique n'est retrouvé dans la plage de temps de rétention attendu. Cependant, dans le cas des analyses C et D, des pics chromatographiques sont présents à 7,9 minutes. Un tel écart de temps de rétention est plausible lors de l'analyse de différentes matrices, ce qui ne permet pas de conclure. En revanche, les rapports entre les transitions dans les analyses C et D ne correspondent pas à ceux observés dans le cas A, ce qui confirme l'absence du peptide. Ces étapes de validation sont d'autant plus nécessaires que pour la méthode sur *S. aureus*, le fait que l'analyse soit effectuée en matrice sanguine induit un plus grand nombre d'interférents.

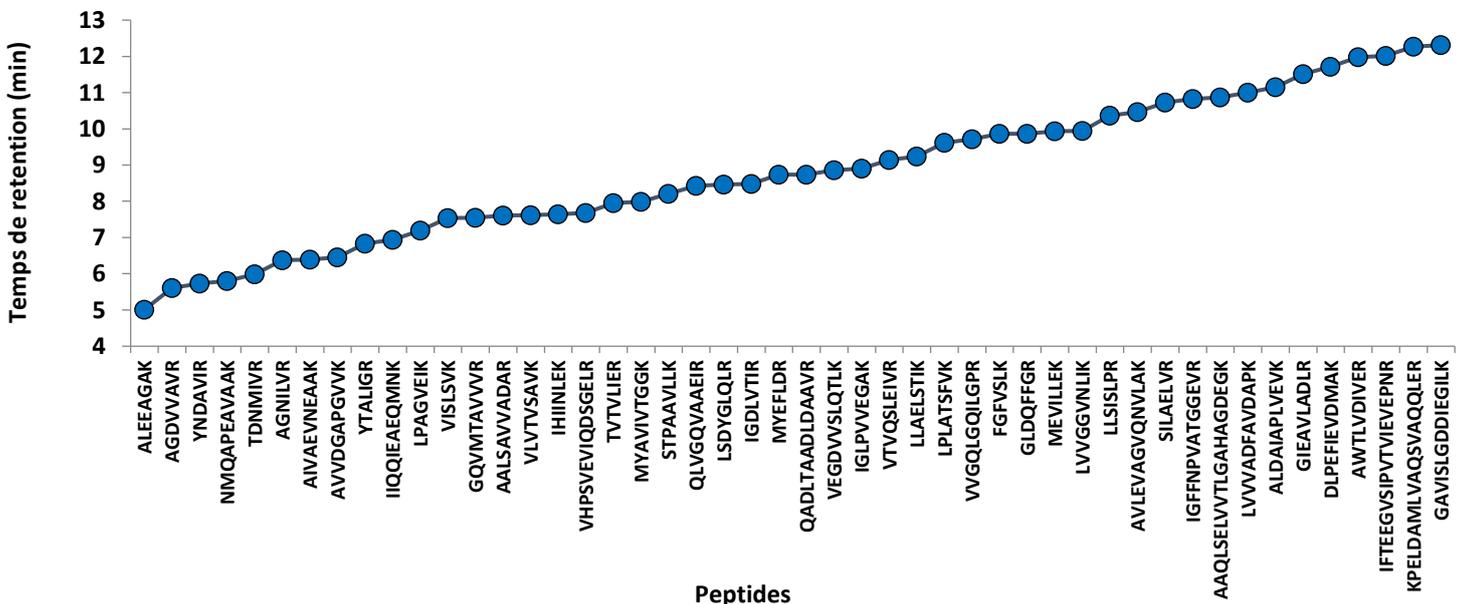


Figure 83 : Répartition des 48 peptides ribosomiques spécifiques de *P. aeruginosa* sur le gradient de séparation de la méthode (entre 4 et 12,5 minutes).

Ces expériences ont été réalisées pour l'intégralité des bactéries du groupe ESKAPE, afin d'établir une liste de peptides ribosomiaux spécifiques à chaque espèce bactérienne. De plus, les peptides choisis couvrent l'ensemble du gradient chromatographique (Figure 83). Par exemple, dans le cas de *P. aeruginosa*, plus de 40 peptides ont été sélectionnés, avec des temps d'éluion allant de 4 à 14 minutes.

2. Cas des entérobactéries

Cependant, dans le cas des entérobactéries, l'identification des espèces s'avère plus complexe, car il existe plus de 40 genres possibles²²⁰. Un choix a été fait sur les genres les plus prévalents, et pour lesquels les mécanismes de résistances de type bêta-lactamases étaient les plus présents.

Peptides	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Klebsiella Oxytoca</i>	<i>Klebsiella Aerogenes</i>	<i>Klebsiella Raoultella</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Citrobacter Koseri</i>	<i>Citrobacter Freundii</i>	<i>Citrobacter Youngae</i>	<i>Citrobacter Braakii</i>	<i>Enterobacter Cloacae</i>
IGVPFVEGGVIK	oui	oui	oui	oui	non	non	non	non	non	non
MYGVLER	oui	oui	oui	oui	non	non	non	non	non	non
EITLSIK	oui	oui	oui	oui	non	non	non	non	non	non
YTGAITAAEGTIHR	non	oui	oui	oui	non	non	non	non	non	non
YTGAITAAAGTIHR	oui	non	non	non	non	non	non	non	non	non
AMITAEIR	oui	non	non	non	non	non	non	non	non	non
ISELSEEQIDILR	oui	non	non	non	non	non	non	non	non	non
AANIIGVQIEFAK	oui	non	non	non	non	non	non	non	non	non
LSDLAHVEGDVVDLNALK	oui	non	non	non	non	non	non	non	non	non
AYEDAETVVGIIINGK	non	oui	non	non	non	non	non	non	non	non
VGFFNPIASATEEGTR	non	oui	non	non	non	non	non	non	non	non
LSDLAHVEGDVIDLNTLK	non	oui	non	non	non	non	non	non	non	non
DIADAVSAAGVAVAK	non	non	oui	non	non	non	non	non	non	non
NMINVALNTGTLQHPVK	non	non	oui	non	non	non	non	non	non	non
AQIVSEFGR	non	non	oui	non	non	non	non	non	non	non
SATGLGLK	non	non	non	oui	non	non	non	non	non	non
ALLNSVMIGVTEGFTK	non	non	non	oui	non	non	non	non	non	non
YSAAITGAEGTIHR	non	non	non	non	non	non	non	non	non	oui
VAVTMPSAK	non	non	non	non	non	non	non	non	non	oui
IGSQITYYGTAAALR	oui	non	non	non	non	non	non	non	non	oui
LQHIDFVR	non	non	non	non	oui	non	non	non	non	non
VFQTHSPVVDSSIVK	non	oui	non	non	oui	non	non	non	non	non
YTAAITGAEGK	non	non	non	non	oui	non	non	non	non	non
LIDQATAEIVETAK	non	non	non	non	oui	non	non	non	non	non
YTQLIER	non	non	non	non	oui	non	non	non	non	non
NIEFFEAR	non	non	non	non	oui	non	non	non	non	non
AAITAEVR	non	non	non	non	oui	oui	oui	oui	oui	non
IAHWVVGQATISDR	non	non	non	non	oui	oui	oui	oui	oui	non
AILAAAGIAENVK	non	non	non	non	non	oui	non	non	non	non
AGDQVQSGVDAAIK	non	non	non	non	non	non	non	oui	non	non

Tableau 9 : Représentation des peptides permettant l'identification de différents genres ou espèces au sein de la famille des entérobactéries. Les peptides sont marqués en vert si les peptides sont retrouvés pour la bactérie et en rouge si ces derniers sont absents.

Les espèces bactériennes composant cette famille comportent de grandes similarités génétiques, et un fort taux de conservation des protéines ribosomiques entre les genres est retrouvé. Après l'analyse des données concernant les différentes espèces de la famille, 30 peptides caractéristiques permettant une discrimination de l'espèce ont été sélectionnés (Tableau 9). En vert sont représentés les cas où le peptide est identifié, et en rouge où il est absent. Pour octroyer une identification rigoureuse, il est parfois nécessaire d'avoir recours à une combinaison de plusieurs peptides ribosomiaux.

Par exemple, les 3 premiers peptides (IGVP*, MYGV*, EITL*) sont spécifiques au genre *Klebsiella*. Il serait possible d'identifier *Klebsiella pneumoniae* par l'absence du peptide YTGA*. Cependant, il est risqué de valider l'identification de la bactérie par l'absence d'un peptide qui peut s'expliquer par une mutation dans la séquence. C'est la raison pour laquelle d'autres peptides ont été rajoutés pour différencier les espèces *pneumoniae*, *oxytoca*, *aerogenes*, et *raoultella*.

L'identification de *E. coli* est réalisée par la présence d'au moins 4 des 8 peptides retrouvés. Le peptide VFQT* est commun avec *K. oxytoca*. Cependant, il reste seul et n'entraînera donc pas de fausse détection. Dans le cas des *Citrobacter* la différenciation est plus complexe. Pour *C. koseri* et *C. youngae*, seul un peptide permet l'identification des souches et leur démarcation des souches d'*E. coli*. Ces peptides sont respectivement AILA* et AGDQ*. Il est toutefois impossible à l'heure actuelle de différencier *C. freundii* et *C. braakii* avec la méthode, car les espèces sont très proches. Cette difficulté est d'ailleurs rencontrée en MALDI, où les deux espèces mènent parfois à de mauvaises identifications^{8,9}. En revanche, il est toujours possible de distinguer ces espèces d'*E. coli*, dans la mesure où les peptides ribosomiques spécifiques pour identifier les souches d'*E. coli* ne sont pas retrouvés dans ces deux espèces. La distinction de *E. cloacae* est assurée par 2 peptides spécifiques, le troisième peptide étant partagé avec *K. pneumoniae*. L'ensemble des peptides listés dans le Tableau 10 n'est pas repéré chez *S. aureus*, *A. baumannii*, *E. faecium* et *P. aeruginosa*.

Le cas des entérobactéries est unique du fait du fort lien phylogénétique partagé entre les espèces. Cet aspect n'est pas retrouvé entre les autres espèces d'intérêt (*S. aureus*, *A. baumannii*, *E. Faecium* et *P. aeruginosa*), pour lesquelles aucune difficulté supplémentaire lors du choix des peptides d'identification n'a été rencontrée.

B. Mécanismes de résistances aux antibiotiques

Comme vu précédemment (introduction générale), la famille des bêta-lactamases^{36,37} constitue la famille de protéines la plus importante à suivre en vue d'une méthode de caractérisation rapide. Cela provient du fait qu'elles sont fortement retrouvées chez les entérobactéries, et qu'elles occasionnent de forts taux de mortalité. Parmi les différentes betalactamases principales (Tableau 2), on retrouve majoritairement les protéines TEM, SHV, CTX-M et KPC pour la classe A, VIM, IMP et NDM pour la classe B. Les deux autres classes sont plus restreintes avec AmpC plasmidique et la famille des OXA (principalement OXA-48).

Type de betalactamase	Classe selon Ambler	Activités et enzymes principales
Betalactamase à spectre restreint	A	Activité penicillinase : TEM-1, SHV-1
Betalactamase à spectre étendue (BLSE)	A	Activité BLSE : SHV-2, TEM-2, CTX-M
Serine betalactamase	A	Activité carbapénémase : KPC, IMI
Metallo betalactamase	B	Activité carbapénémase : VIM, IMP, NDM
Cephalosporinase	C	Activité cephalosporinase : AmpC plasmidique
OXAacillinase	D	Familles des OXA , avec OXA-48 (carbapénémases) OXA-23, OXA-1 (BLSE)

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des bêta-lactamases selon Ambler, avec les activités associées ainsi que quelques exemples d'enzymes.

Ces bêta-lactamases ont été décrites dans un premier temps majoritairement pour les entérobactéries ; cependant ce ne sont pas les seuls mécanismes importants retrouvés chez les bactéries composant le groupe ESKAPE. Pour *E. faecium*, la résistance à la vancomycine procurée par le gène Van (A à G) est celle rencontrée le plus fréquemment. Parmi les différents variants possibles, Van-A est le plus prévalent et celui procurant les plus hauts niveaux de résistances. Dans le cas de *S. aureus*, la détection du gène MecA est indispensable pour pouvoir caractériser les souches MRSA et constitue la résistance prioritaire à suivre. De plus, sa détection est considérée comme le standard pour toutes méthodes d'identification des résistances aux antibiotiques. *K. pneumoniae* fait partie de la famille des entérobactéries pour laquelle l'ensemble des bêta-lactamases déjà décrites est retrouvé. Cependant, les

mécanismes les plus prévalents en Europe restent NDM et KPC. Les différentes protéines de la famille des OXA (principalement OXA-23 et OXA-48) sont les mécanismes majoritaires décrits chez *A. baumannii*, même si l'émergence récente de IMP et des diverses classes de bêta-lactamases devient une problématique majeure pour cette bactérie à travers le monde. Enfin, pour la dernière bactérie du groupe ESKAPE, *P. aeruginosa*, le gène le plus commun retrouvé est AmpC chromosomique couplé à un changement d'expression des porines et des pompes d'efflux. Cependant, certaines carbapénémases comme KPC et VIM sont de plus en plus rencontrées.

Pour le développement de la méthode multiplexée, nous nous sommes focalisés en priorité sur les mécanismes principaux. En revanche, dans le cadre de recherches plus approfondies, la méthode est amenée à être enrichie *via* l'ajout d'autres mécanismes prévalents dans les infections nosocomiales.

C. Mutations et mécanismes d'actions : conséquences sur le multiplexage

Les mécanismes de résistances comme les bêta-lactamases se retrouvent chez un grand nombre d'espèces bactériennes. L'échange des résistances entre les espèces *via* les plasmides en est la cause principale. Il en découle que ces gènes sont fortement mutés et qu'il existe de ce fait de multiples variants possibles pour la plupart de ces mécanismes. De plus, ces variants peuvent ne pas induire la même activité, comme pour SHV, qui peut être considéré comme une bêta-lactamase ou une BLSE en fonction des différents variants. En conséquence, il est primordial de suivre suffisamment de peptides spécifiques des variants pour permettre la détection dans le cas d'une mutation connue, et éventuellement identifier les mécanismes associés pour fournir la caractérisation la plus exhaustive. Cependant, pour certaines protéines, le nombre important de mécanismes et de variants engendre un ajout conséquent de peptides, ce qui a un impact non négligeable sur la capacité de multiplexage de la méthode. Le cas de TEM illustre parfaitement ce cas (Figure 84).

TEM: 237 mutants, 4 mécanismes, 23 peptides

Penicillinase	}	TEM1	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVEYSPVTEK(...)LDRWEPELNEAIPNDER(...)SGAGER(...)
		TEM2	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVEYSPVTEK(...)LDRWEPELNEAIPNDER(...)SGAGER(...)
Penicillinase résistante aux inhibiteurs	}	TEM30	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVEYSPVTEK(...)LDRWEPELNEAIPNDER(...)SGAGER(...)
		TEM33	(...)FPMLSTFK(...)IHYSQNDLVEYSPVTEK(...)LDRWEPELNEAIPNDER(...)SGAGER(...)
BLSE résistante aux inhibiteurs	}	TEM68	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVEYSPVTEK(...)LDRWEPELNEAIPNDER(...)SGASKR(...)
		TEM109	(...)FPMLSTFK(...)IHYSQNDLVKYSVPVTEK(...)LDHWEPELNEAIPNDER(...)SGAGER(...)
		TEM125	(...)FPMLSTFK(...)IHYSQNDLVKYSVPVTEK(...)LDRREPELNEAIPNDER(...)SGAGER(...)
		TEM152	(...)FPMVSTFK(...)IHYSQNDLVEYSPVTEK(...)LDHWEPELNEAIPNDER(...)SGAGKR(...)
BLSE	}	TEM3	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVKYSVPVTEK(...)LDRWEPELNEAIPNDER(...)SGASER(...)
		TEM6	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVKYSVPVTEK(...)LDHWEPELNEAIPNDER(...)SGAGER(...)
		TEM12	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVEYSPVTEK(...)LDRSWEPELNEAIPNDER(...)SGAGER(...)
		TEM19	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVEYSPVTEK(...)LDRWEPELNEAIPNDER(...)SGASER(...)
		TEM24	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVKYSVPVTEK(...)LDRSWEPELNEAIPNDER(...)SGTGER(...)
		TEM29	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVEYSPVTEK(...)LDHWEPELNEAIPNDER(...)SGAGER(...)
		TEM52	(...)FPMMSTFK(...)IHYSQNDLVKYSVPVTEK(...)LDRWEPELNEAIPNDER(...)SGASER(...)

Figure 84 : Représentation d'une portion d'alignement de séquence de 15 sur 237 variants de la protéine TEM. Les mutations indiquées en rouge impliquent un changement de mécanismes pour la protéine. Les mécanismes BLSE et pénicillinase, avec ou sans résistance aux inhibiteurs, sont retrouvés.

La Figure 84 représente un alignement de séquences de 15 variants parmi les 237 connus de la protéine TEM. Ces 15 séquences constituent les principaux variants rencontrés, et mettent en évidence les changements de mécanismes ^{12,13} connus en fonction des variants identifiés. L'expression de la protéine TEM en fonction de ses variants entrainera une activité BLSE, pénicillinase, avec ou sans résistances aux inhibiteurs. Un inhibiteur de bêta-lactamases est une molécule ayant pour rôle d'inhiber les enzymes de type bêta-lactamases. Elles sont souvent ajoutées en complément des antibiotiques pour améliorer le traitement dans certains cas critiques.

Par exemple, les deux mutants TEM1 et TEM68, qui ne diffèrent que par un seul résidu d'acide aminé dans la séquence peptidique (G par S), n'auront pas la même fonction. Il est alors nécessaire de distinguer les différents variants. Normalement, dans une analyse ciblée par MRM, 3 peptides sont nécessaires pour identifier une protéine. Pour couvrir l'ensemble des mécanismes de résistances induit par TEM, 23 peptides ont été retenus, soit 69 transitions pour une unique résistance. De plus, ce nombre est grandement retreint, car les variants sont fortement conservés entre eux, avec pour la plupart des cas une mutation ponctuelle unique entraînant un changement de mécanisme, ce qui limite la quantité de peptides nécessaires pour caractériser le mécanisme.

Malheureusement, pour certaines protéines les mutations sont bien plus éparses et entraînent l'apparition d'un grand nombre de variants^{1,2}, comme dans le cas de CTX-M où plus de 200 mutants⁴⁸ sont actuellement recensés. Grâce à la base de données BLDB²²⁵ (Bêta-lactamase DataBase - Structure and Function : bldb.eu), qui inventorie les alignements de séquences de ces variants et l'utilisation d'un algorithme de recherche de motifs, il a été possible d'établir le nombre minimal de peptides à suivre pour être exhaustif dans la caractérisation de CTX-M. Il en ressort qu'il faudrait suivre 102 peptides (306 transitions) dans l'analyse. Cependant, pour une grande partie d'entre eux, ces variants ne sont que très peu prévalents, et il est envisageable de questionner la pertinence du suivi de l'ensemble des variants. Malgré tout, ces deux exemples illustrent le besoin d'une méthode hautement multiplexée pour couvrir l'intégralité des mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques, ainsi que l'identification des souches.

CTX-M: 220 mutants, 1 mécanisme, 102 peptides

CTX-M-2	---.MTQ.I.RSM.-TVM.---LP.-----FS.AT.H..ANS...Q.EA..KS.....A....Q...DKH.....
CTX-M-4	---.MTQ.I.RSM.-TVM.---LP.-----FS.AT.H..ANS...Q.EA..KS.....Q.....V.....A....Q...DKH.....
CTX-M-6	---.MTQ.I.RSM.-TVM.---LP.-----FS.AT.H..ANS...Q.EA..KS.....L.....A....Q...DKH.....
CTX-M-7	---.MTQ.I.RSM.-TVM.---LP.-----FS.AT.H..ANS...Q.EA..KS.....V.....A....Q...DKH.....
CTX-M-8	---.MRHRVKRMM.-.T..C--IS.-----A.....AN.....A..KS.....D...A.T.....A....Q...TQKKV.S.K...
CTX-M-9	---.T.RVQRMMF-A.A.C--IP.-----A.....SA.....A..KS.....D...T.V...G...P.....A....Q...TQKQ...P...
CTX-M-10	-----V.....Q.....A.....
CTX-M-11	-----G.....A.....
CTX-M-12	-----A-----A.....S.....
CTX-M-13	---.T.RMQRMMF-A.A.C--IP.-----A.....SA.....A..KS.....D.K..T.V...G...P.....A....Q...TQKQ...P...
CTX-M-15	-----A.....
CTX-M-16	---.T.RVQRMMF-A.A.C--IP.-----A.....SA.....A..KS.....D...T.V...G...P.....A....Q...TQKQ...P...
CTX-M-17	---.T.RVQRMMF-A.A.C--IP.-----A.....SA.....A..KS.....D...T.V...G...P.....A....Q...TQKQ...P...

Figure 85 : Représentation d'une portion de l'alignement de séquences pour 13 variants sur 220 de la protéine CTX-M. Un grand nombre de mutations est observable sur cette partie de la protéine, ce qui entraîne la nécessité de suivre de nombreux peptides pour caractériser cette résistance.

La Figure 85 montre la difficulté à ne suivre que quelques peptides. En effet, un très grand nombre de mutations est observé, rendant l'analyse complexe. Pour suivre les 220 mutants recensés de CTX-M, plus de 100 peptides différents devraient être suivis.

D. Méthodes ciblées hautement multiplexées

Les approches par spectrométrie de masse ciblée employant le mode d'acquisition MRM permettent de suivre approximativement 150 transitions par analyse. La limitation est due au compromis entre le temps de cycle le plus court possible et la valeur de dwell-time. Pour des pics chromatographiques de 10 à 15 secondes et un dwell-time de 5 ms, la capacité de multiplexage est d'environ 120 transitions, soit 40 peptides, ce qui est incompatible avec l'approche envisagée. L'utilisation du mode Schedule-MRM permet un gain notable en capacité de multiplexage, permettant à des méthodes d'analyser près de 2000 transitions en 1 h. Cependant, la stratégie demeure hautement dépendante des temps de rétention.

1. Limitations de la méthode Scheduled-MRM

La capacité de multiplexage apportée par le mode Scheduled-MRM est directement reliée à la qualité ainsi qu'au temps de la séparation chromatographique. Dans le cas où l'on souhaite un dwell-time minimum, sur l'ensemble de l'analyse, de 5 ms, il est alors possible de suivre seulement 120 transitions à chaque instant. Par conséquent, plus les pics sont fins et répartis de façon homogène sur le gradient, plus il sera envisageable d'avoir des plages restreintes et donc une capacité de multiplexage importante. Cela va de pair avec la durée totale de la séparation. En effet, il sera bien plus facile d'envisager un grand multiplexe sur 1 h de séparation que sur 10 minutes. Or, dans notre cas, l'objectif d'obtenir un résultat en moins d'une heure implique que la séparation ne peut excéder 20 minutes. Pour contrebalancer cette limitation, il est nécessaire de réduire au maximum les plages de détection, et de répartir au mieux les peptides sur le gradient de séparation. C'est d'ailleurs une des raisons qui a poussé à repérer les peptides ribosomiques sur l'ensemble du gradient, afin de permettre cette répartition.

Malheureusement, travailler dans une matrice sanguine qui est très complexe (grand nombre de composants à de fortes concentrations) engendre diverses difficultés. Le principal effet matrice associé aux méthodes LC-MS/MS est la suppression des ions causée par les coélutions des composants de la matrice avec les molécules d'intérêts²²⁶. Cependant, des études ont aussi montré que, dans le cadre de matrices complexes dépendant d'individus comme le sang ou l'urine, le temps de rétention des composés ainsi que la forme des pics LC peuvent être

modifiés significativement²²⁷. Dans notre cas on analyse des souches bactériennes diverses issues d'hémocultures de patients différents et, en effet, des décalages importants des temps de rétention sont observés.

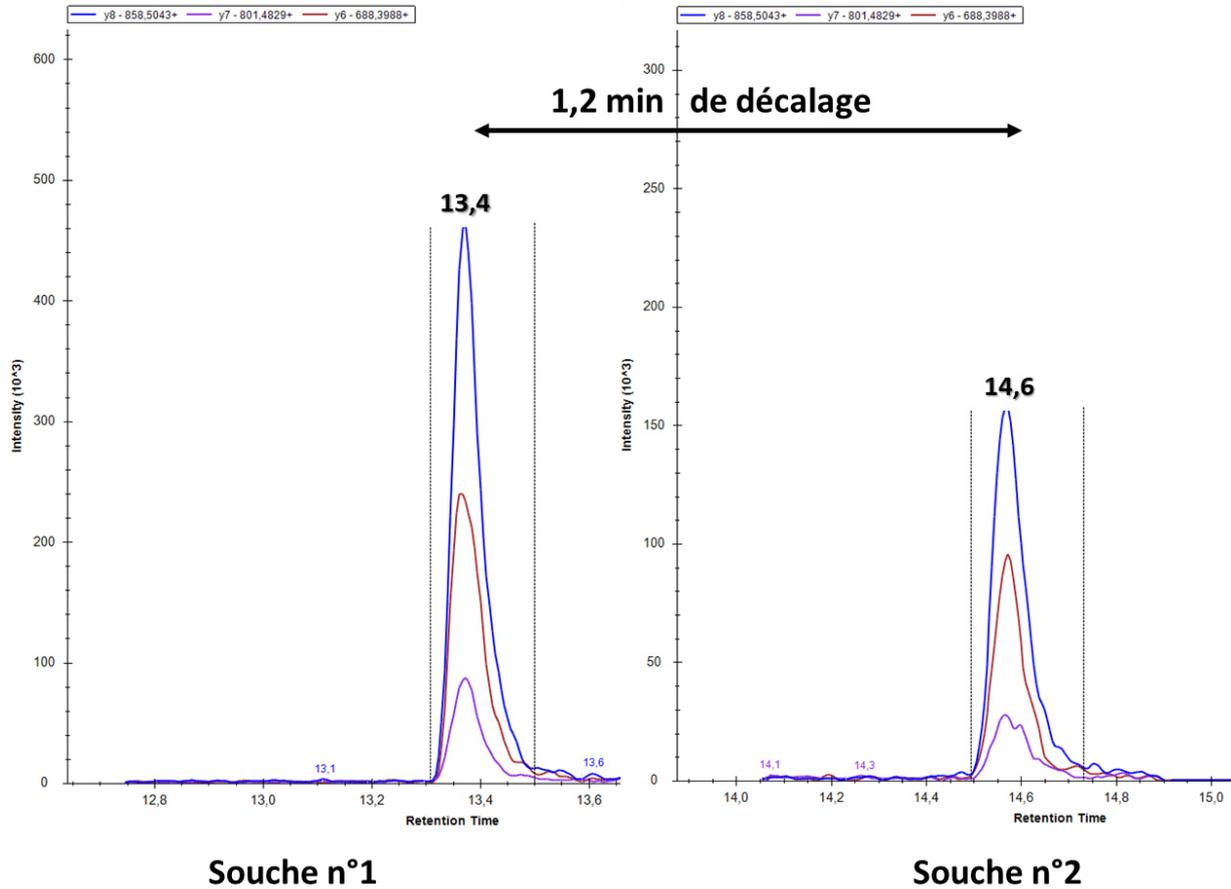


Figure 86 : Représentation de deux chromatogrammes reconstitués issus de l'analyse de 2 souches différentes de *S. aureus* pour le peptide EMSVLELNDLVK rapporteur d'une protéine ribosomique. Le temps de rétention dans la première souche est de 13,4 minutes pour 14,6 dans la seconde souche, soit un décalage de 1,2 minute.

Par exemple, la variation du Tr pour le cas du peptide EMSVLELNDLVK rapporteur de la protéine ribosomique 50S L7/L12 est illustrée sur la Figure 86. Deux analyses sont présentées, correspondant à 2 souches de *S. aureus* analysées au sein d'une même série analytique et dans des conditions identiques. Le décalage du Tr observé est supérieur à 1 minute. Même si ces décalages sont majoritairement dus aux effets matrices, ils peuvent également être observés lors d'un problème analytique faisant varier la séparation. Afin de ne pas perdre la détection du peptide dans la fenêtre de Tt définie, un ajustement des fenêtres de détection doit être réalisé, qui doit être supérieur au temps de décalage constaté. Cependant, cela va à l'encontre de la capacité de multiplexage qui requiert l'utilisation de fenêtres courtes. Pour

illustrer ce point, 2 expériences correspondant à une même méthode de 500 transitions, ne différant que par la durée des plages de détections, sont présentées en Figure 87. L'évolution du dwell-time en fonction de la largeur des plages de détection est représentée, pour des fenêtres restreintes de 1 minute (bleu) et des fenêtres étendues de 1,50 minutes (orange). La ligne rouge symbolise la ligne limite des 5 ms souhaitées comme valeur minimale de dwell-time.

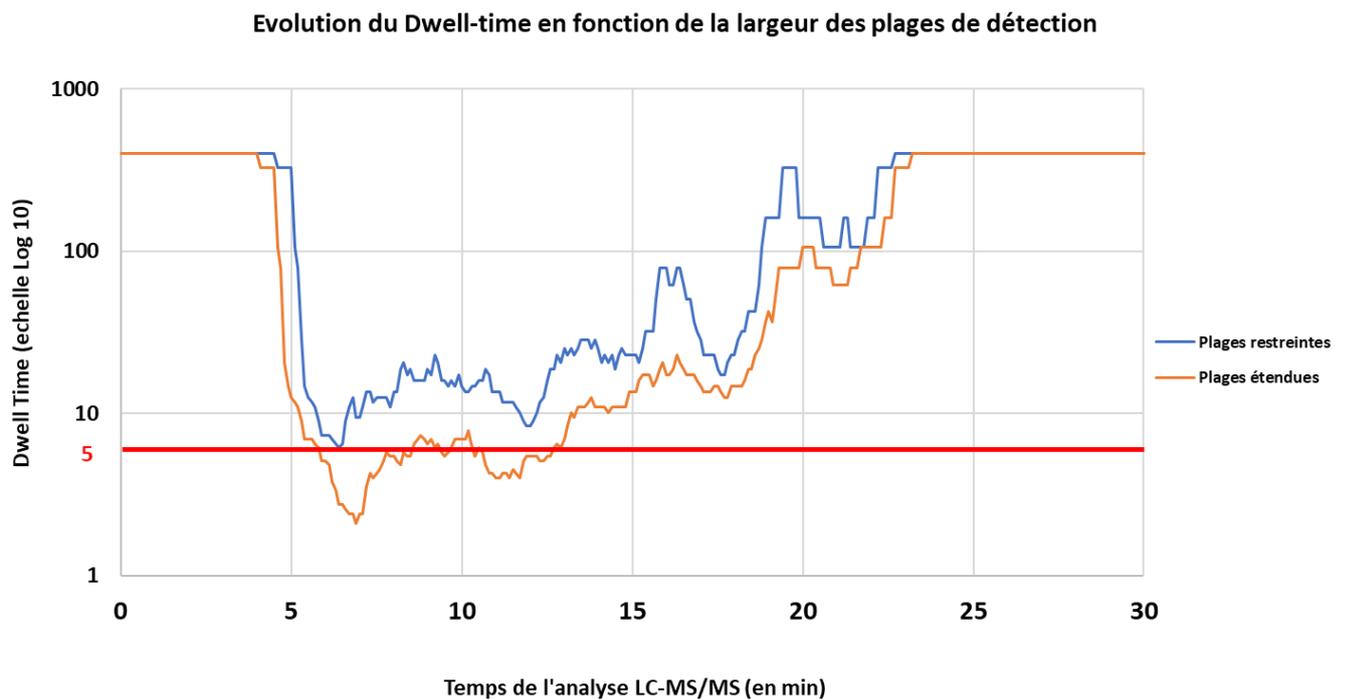


Figure 87 : Représentation de l'évolution du dwell-time en fonction de la largeur des plages de détections. La méthode utilisée comprend 500 transitions réparties sur le gradient entre 5 et 20 minutes. En orange la plage de détection a été fixée à 1,5 min, et 1 min pour la courbe bleue. La limite fixée pour le dwell-time de 5 ms est représentée par une ligne rouge. L'utilisation de plages étendues engendre un franchissement de la limite par deux fois.

L'utilisation de plages étendues engendre, à plusieurs moments de l'analyse, un nombre trop important de transitions suivies simultanément, ce qui entraîne une chute du dwell-time sous la limite acceptable. L'analyse employant les plages restreintes permet de maintenir un dwell-time supérieur à 5 ms pour l'intégralité des transitions. En revanche, elle ne permet pas de couvrir l'ensemble des peptides si des décalages importants dus aux effets matrices sont rencontrés.

Il existe divers moyens de prédire et prendre en compte des décalages, par exemple *via* l'utilisation de temps de rétention indexés (iRT) ou des recalibrages^{228,229} en direct. Les iRT

sont des temps de rétention prédits pour des peptides en fonction de l'appareillage et de certaines matrices. C'est un outil très utile pour la première détection d'un peptide, mais qui ne peut pas pallier aux décalages rencontrés dans notre cas. De plus, l'utilisation des recalibrages en direct n'est pas tout à fait au point, et se base seulement sur le premier composé détecté et calibre les Tr des autres composés en fonction. Dans l'ensemble, ces approches n'évitent pas la caractéristique intrinsèque reliée à l'emploi de la méthode Scheduled-MRM, qui impose un compromis entre la capacité de multiplexage de la méthode et l'assurance d'une détection du composé.

2. Scout-MRM : une nouvelle méthode hautement multiplexée indépendante des temps de rétention.

Les décalages des temps de rétention des peptides représentent une limitation majeure pour le multiplexage. Récemment au laboratoire, a été développée une nouvelle méthode d'acquisition ciblée et hautement multiplexée indépendante des temps de rétention, appelée Scout-MRM²¹⁷. Scout-MRM (Figure 88) repose sur l'utilisation de molécules sentinelles « Scout » (endogènes ou exogènes) présentes dans l'échantillon. Ces scouts servent de références en temps de rétention. Cela permet d'éviter de prendre de larges plages de temps pour pallier d'éventuels décalages, et de se baser sur la détection de ces sentinelles. En d'autres termes, cela se traduit par le passage d'un mode Scheduled-MRM classique à un mode dynamique qui s'adaptera aux écarts de temps de rétention au cours de l'analyse. Dans ce mode d'acquisition, chaque scout est positionné en amont d'un groupe défini de transitions. Au moment où l'appareil détecte les transitions du scout n° 1 à un seuil d'intensité fixé, alors le suivi du groupe de transitions n° 1 est déclenché jusqu'à la détection du scout suivant (n° 2).

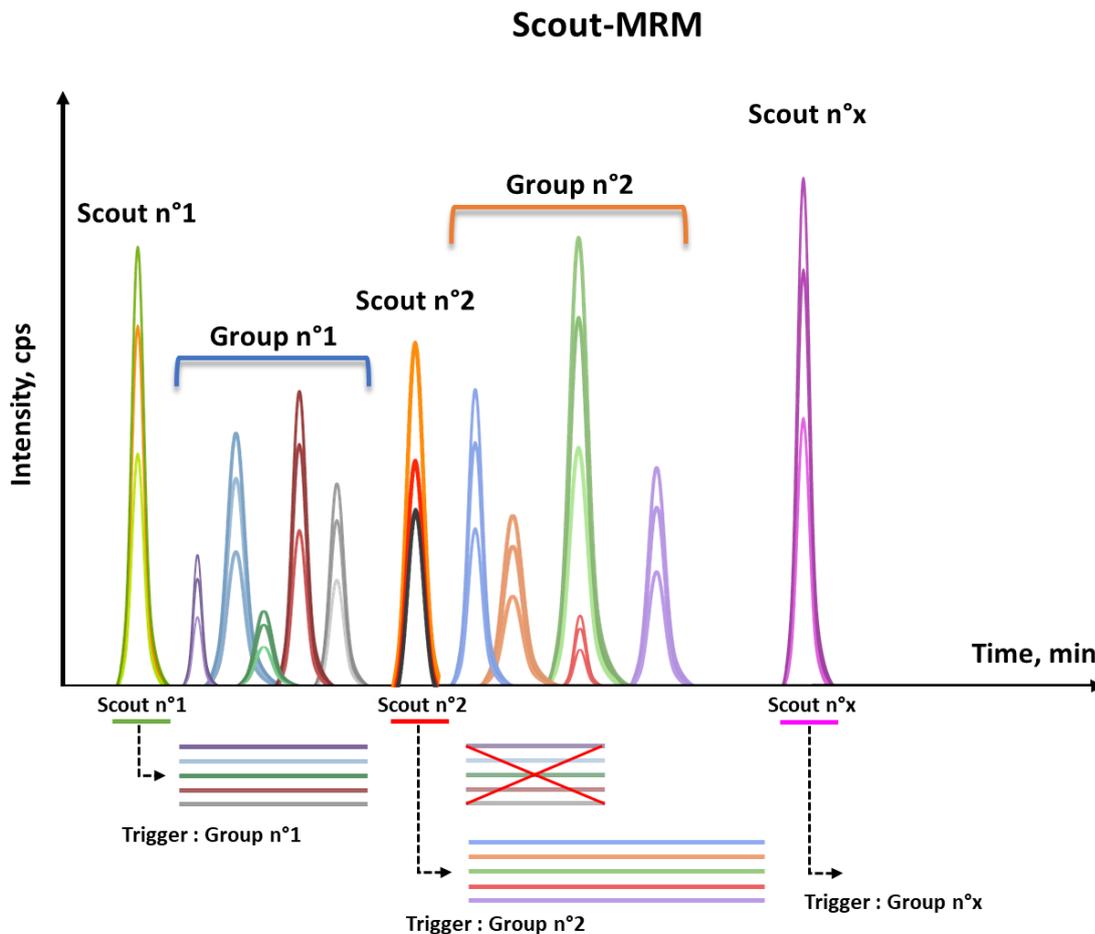


Figure 88 : Schéma de fonctionnement du mode d'acquisition Scout-MRM. La figure représente un chromatogramme reconstitué lors de l'analyse en mode Scout-MRM. Les composés scouts sont associés à un groupe de transition. Le scout n° 1 avec le groupe n° 1 (bleu). Lorsque le scout est détecté : 2 transitions dépassant un seuil fixé, le groupe associé est déclenché et le spectromètre commence le suivi des transitions du groupe. Si un nouveau scout est déclenché (scout n° 2) alors le suivi du groupe 1 est stoppé et remplacé par le groupe du nouveau scout. Ce processus est répété pour chaque scout dans la méthode. Ce mode d'acquisition permet de s'affranchir des décalages en temps de rétention lors des analyses.

Sur la Figure 88, le scout n° 1 est associé au groupe de transitions bleu n° 1. À l'instant où le scout est détecté alors le groupe est suivi, jusqu'à ce que le scout n° 2 soit détecté, entraînant l'arrêt du suivi du groupe 1, lançant par la même occasion le groupe n° 2. Ce processus se poursuit pour chaque scout présent dans la méthode. Lorsqu'un décalage en temps de rétention se produit, c'est l'ensemble molécule Scout—Groupe de transitions qui se déplacera, ce qui n'engendrera pas de perte dans la détection. Une illustration de l'affranchissement en temps de rétention par Scout-MRM est représentée sur la Figure 86. Bien que le décalage entre les deux souches soit de 1,2 minute, le peptide est détecté dans les deux cas, car le suivi du peptide ne démarre pas au même temps. Pour la souche n° 1, il débute à 12,8 minutes et 14,1 minutes pour la souche n° 2, correspondant pour les deux cas au temps

d'élution du scout associé à leurs groupes. De plus, Scout MRM offre la possibilité de faire un transfert rapide de méthode entre différents laboratoires, et permet l'adaptation presque immédiate entre différents appareillages chromatographiques.^{218,230}

Les « Scouts » doivent être intenses pour déclencher les groupes de transition dans chaque analyse. Si un composé scout ne se déclenche pas, l'ensemble du groupe de transition associé ne sera pas suivi dans l'analyse. L'absence totale d'interférences sur les transitions tout au long du gradient est obligatoire, car si le scout est déclenché à un moment inadéquat, cela engendrera l'arrêt du groupe en cours et lancera la détection du suivant. La spécificité des scouts est donc primordiale dans l'analyse. Il est possible de concevoir chaque association de scout - Groupe comme une méthode MRM à part entière, et un scout sera généralement associé à un maximum de 120 transitions. En fonction de la taille du multiplexe, il est nécessaire d'ajouter un nombre de scouts suffisant, répartis de façon homogène le long du gradient chromatographique.

L'option la plus simple est d'ajouter, dans l'échantillon avant l'injection, des mélanges de peptides artificiels parfaitement caractérisés et non présents initialement dans l'échantillon. Le nombre nécessaire de Scouts, leurs quantités ainsi que leurs répartitions tout au long du gradient chromatographique sont ainsi maîtrisés.

Les scouts peuvent être aussi des composés endogènes. Dans ce cas, il faut s'assurer que les scouts soient toujours présents dans l'échantillon avec une intensité suffisante pour déclencher le suivi des groupes et que leurs transitions ne soient pas interférées. Les peptides ribosomiaux peuvent être utilisés comme scout, car ils sont très intenses (protéines présentes en forte abondance et conservées au sein des bactéries). De plus, les peptides ribosomiaux sont nombreux et peuvent être répartis tout au long du gradient (

Figure 83). Pour finir, ces peptides ont plusieurs rôles subsidiaires dans l'analyse : ils permettent l'identification de la bactérie mais aussi servent de normalisateurs internes, comme il a été détaillé dans le chapitre 1.

E. Présentation de la méthode complète : de la préparation d'échantillons à l'analyse LC-MS/MS

Pour permettre une analyse en routine clinique, il est nécessaire d'adapter la préparation d'échantillons mise en place dans le chapitre 1. Puis, dans un second temps, de valider l'approche sur de multiples espèces bactériennes autre que *S. aureus*. De plus, le nouveau protocole doit être adapté à la matrice sanguine tout en restant simple et rapide (inférieur à 1 heure).

1. Matrices sanguines et hémocultures

L'hémoculture est composée d'un milieu de culture synthétique très riche ajouté à un volume de sang du patient. C'est donc une matrice sujette à de fortes variabilités. De plus, le sang est l'une des matrices les plus complexes, ce qui pose rapidement des problèmes pour le développement de méthodes analytiques. Le plasma est la fraction liquide du sang, et représente 55 % de ses composants¹⁰⁸. Il comporte plus de 20 000 protéines identifiées²³¹ à ce jour, présentes sur une grande gamme dynamique de concentrations (de quelques pg/mL à 40 mg/mL pour l'albumine). De telles concentrations en protéines engendrent de nombreux effets matrices, se traduisant par des phénomènes de suppressions d'ions (perte de sensibilité), ou encore par des décalages en temps de rétention. Il faut également noter que le sang est composé de globules rouges et blancs, qu'il est nécessaire d'éliminer afin de pouvoir réaliser l'analyse.

2. Préparation d'échantillons

L'ensemble du processus de préparation d'échantillons utilisé pour l'acquisition des résultats préliminaires est présenté sur la Figure 89. Les données liées à la création des hémocultures synthétiques sont quant à elles détaillées dans la partie Matériel et méthode

Deux options sont possibles pour la préparation d'échantillons, en fonction du degré d'information souhaité. Ces options sont décrites par les flèches de couleurs (grise, verte et bleu). Les étapes grises correspondent à une analyse directe du culot bactérien issu de l'hémoculture. L'ajout des étapes vertes à ce protocole permet la récupération de

l'information contenue dans le surnageant, ce qui concerne essentiellement les protéines fortement sécrétées par les bactéries. Ces étapes ont pour but de séparer au maximum les bactéries des composants du sang et du milieu de culture, afin d'obtenir finalement un culot bactérien le plus pur possible.

Ces 2 voies éventuelles sont obligatoirement suivies par la réalisation des étapes bleues, constituant la préparation classique dès lors que l'échantillon bactérien est constitué. Les étapes bleues sont identiques à celles présentées dans le chapitre 1, avec la réalisation d'une lyse et digestion en simultané dans un bain à ultrasons thermostaté à 50 °C pendant 10 minutes, suivi d'une analyse LC-MS-MS en 20 minutes avec un dessalage en ligne.

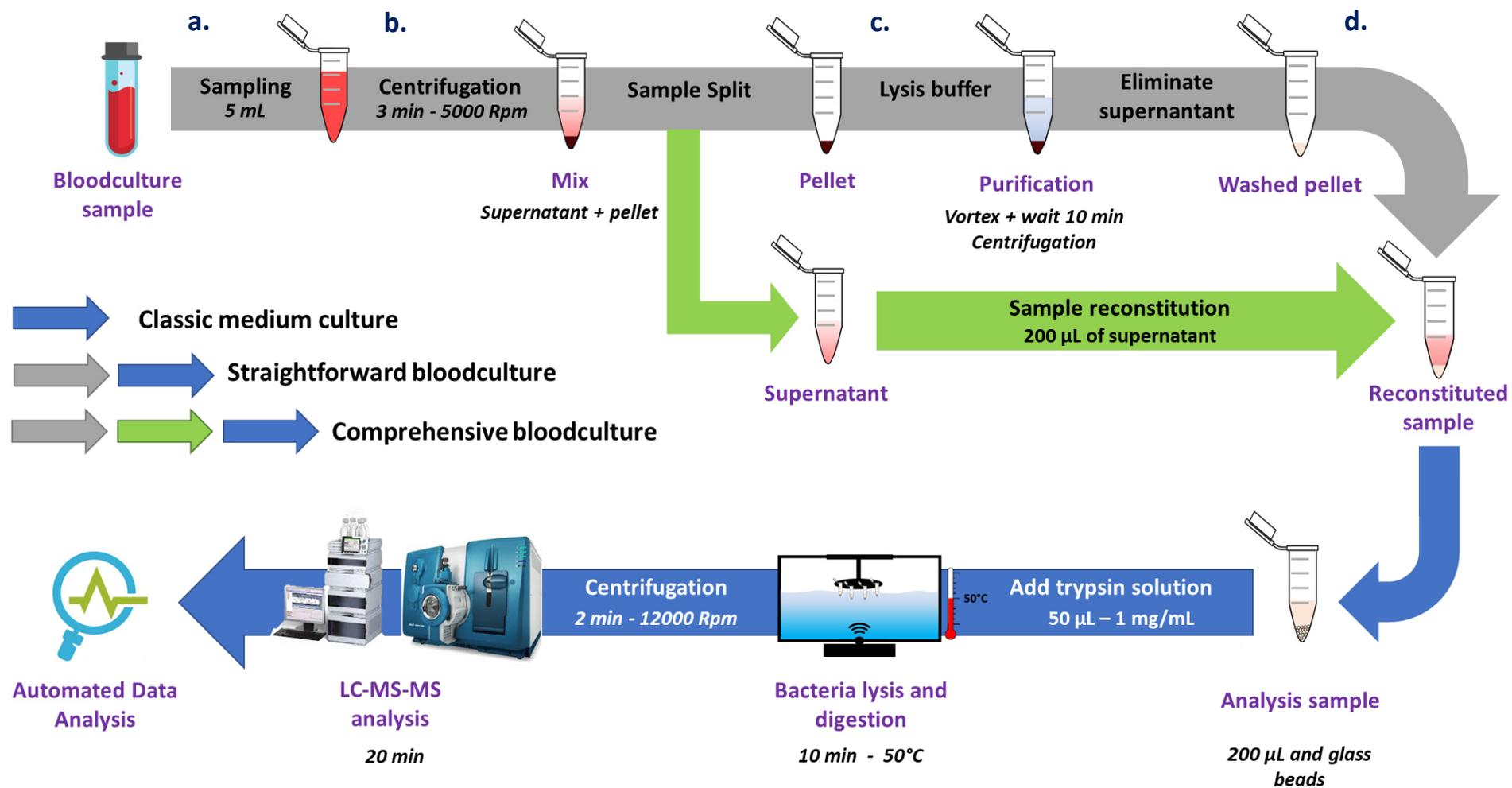


Figure 89 : Représentation globale du workflow pour l'analyse en une heure d'une hémoculture positive par LC-MS/MS. L'échantillon issu de l'hémoculture est prélevé puis centrifugé. Le surnageant est séparé du culot, et soit éliminé, soit gardé en vue d'une analyse ultérieure. Le culot est alors lysé par l'ajout d'un tampon. Le culot bactérien est alors récupéré après centrifugation et une étape de lavage est réalisée. Des billes sont ajoutées à 200 µL de l'échantillon reconstitué. La lyse et la digestion trypsique sont réalisées à 50 °C dans un bain à ultrason pendant 10 min. L'analyse LC-MS/MS peut alors être réalisée.

a. Prises d'essais

Pour la réalisation de l'étude préliminaire, le volume de la prise d'essai a été fixé à 5 mL d'hémoculture. Ce volume permet de récupérer une grande quantité de matériel requise aux différentes études menées et assure une concentration en bactéries très importante. Cependant, ce volume est trop grand pour une manipulation en routine, il nécessite plusieurs pipetages et requiert l'utilisation d'Eppendorf de 10 mL, ce qui oblige l'utilisation de centrifugeuses adaptées. Or, celles-ci ne permettent pas toujours la réalisation de centrifugation à haute vitesse. Dans un souci de praticité, simplicité et en vue d'une possible automatisation, la réduction de la prise d'essai à 1 mL serait souhaitable.

b. Étape de centrifugation

Les centrifugations sont utilisées pour 3 étapes distinctes pour la purification de l'échantillon d'hémoculture, avec dans un premier temps la séparation du sérum des composants solides et des bactéries. Pour cela une centrifugation rapide est nécessaire. Plus celle-ci sera rapide plus le culottage sera efficace, car cela fragilisera les cellules sanguines²³² et, par conséquent, facilitera les étapes de lyses de ces derniers. En revanche, si l'on souhaite étudier le surnageant (étapes vertes), alors il est impératif de limiter cette prélyse pour ne pas polluer davantage le surnageant. L'étape est donc réalisée pendant 3 minutes à 5000 RPM (vitesse maximale de la centrifugeuse présente à l'hôpital pour des tubes de 10 mL). Il serait toutefois envisageable d'augmenter la vitesse à 10 000 RPM et ainsi gagner en efficacité durant la préparation d'échantillons. Les deux étapes de centrifugation suivantes sont effectuées après la lyse et le lavage. Leurs objectifs premiers consistent à culotter les bactéries le plus efficacement possible, il est donc nécessaire de les réaliser à une vitesse importante (10 000 RPM) pendant 3 minutes. Un temps inférieur à 3 minutes a montré que des bactéries demeuraient en suspension dans le surnageant (culture sur boîte), ce qui conduit à une perte de matériel entraînant à une baisse de la sensibilité.

c. Lyse des composants du sang

La première partie de la purification de la matrice provient de l'élimination du surnageant lors de la première centrifugation, permettant de ne pas prendre en compte une grande fraction des protéines du plasma. La seconde partie de la purification provient de la lyse des composants solides du sang ainsi que leurs éliminations. Cette étape est essentielle pour travailler avec des hémocultures. La lyse est opérée par l'ajout de 7 mL de tampon (composé pour 100 mL de solution de : 4 g NH_4Cl ; 0.5 g de KHCO_3 ; 0.02 g d'EDTA, préparé dans du sérum physiologique). Le culot est re-suspendu dans le tampon de lyse et une étape de 10 minutes d'attente doit être respectée pour que le tampon agisse. Plusieurs cycles de 30 secondes de vortex sont alors réalisés pendant ce temps d'attente avant qu'une nouvelle centrifugation soit effectuée. Le culot ainsi formé doit être blanc sur la partie supérieure et le surnageant rouge. Ces 2 paramètres sont de bons indicateurs quant à la réussite de l'étape de lyse.

d. Lavage

L'étape de lavage permet d'éliminer les restes de surnageant et du tampon de lyse. Du sérum physiologique ou un tampon AMBIC (bicarbonate d'ammonium à 50 mM) est utilisé afin d'être directement dans des conditions adéquates pour la suite de l'analyse. Le volume de reprise est de 1 mL, permettant la réalisation de plusieurs analyses, mais il est possible pour un gain en sensibilité de diminuer cette valeur, étant donné que la prise d'essai pour la digestion est de 200 μL .

En fonction des études et de l'objectif visé, cette étape pourrait être supprimée pour gagner en temps de préparation (10 minutes) et en simplicité (étape de centrifugation en moins). Seulement, l'échantillon obtenu serait moins propre et cela pourrait, à terme, encrasser l'appareil.

3. Vérification de la détection

L'adaptation de la préparation d'échantillons, plus particulièrement la purification de l'hémoculture, est une première esquisse et n'a subi que très peu d'étapes d'optimisations. Son objectif principal était de permettre l'élaboration de la preuve de concept, et de faire en sorte que l'échantillon soit suffisamment purifié pour que la détection des protéines d'intérêts soit envisageable. Des tests ont été réalisés sur différentes souches bactériennes, afin de

vérifier qu'il était bien possible de détecter les mécanismes de résistances, comme les carbapénèmases et MecA, directement après que l'hémoculture soit considérée comme positive par l'automate.

Les chromatogrammes reconstitués de Figure 90 sont des exemples de ces tests préliminaires. En A, une souche de *S. aureus* pour laquelle sont marqués d'une étoile les 4 peptides spécifiques de la protéine MecA. En B, on observe 7 peptides permettant l'identification précise d'OXA-48 chez *K. aerogenese*. La détection d'AmpC a aussi été démontrée avec la présence de 6 peptides pour une souche de *P. aeruginosa*. Cependant, comme on peut le voir sur le chromatogramme A, de nombreux pics parasites sont présents, conséquences du travail en milieu très complexe. Cela indique également que la préparation d'échantillons n'engendre pas une très bonne purification. Celle-ci se doit d'être optimisée sur de nombreux points pour permettre un temps global plus court et une efficacité plus importante.

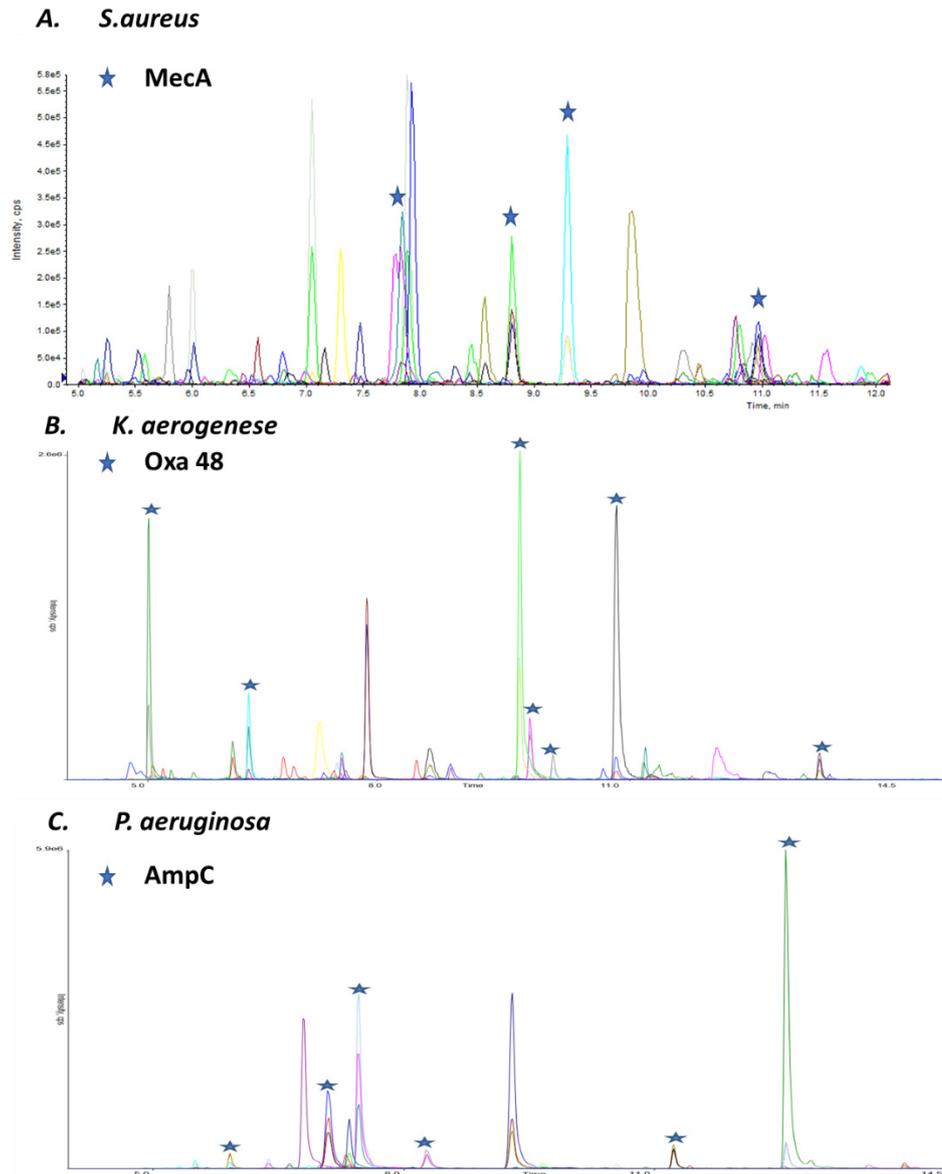


Figure 90 : Chromatogrammes reconstitués pour l'analyse de 3 espèces bactériennes issues d'hémocultures fraîchement positives. Les étoiles bleues représentent les peptides associés au mécanisme de résistance présent dans la souche.

En A. l'analyse d'une souche de *S. aureus*, MecA positive. En B. l'analyse d'une souche de *K. aerogenese*, OXA-48 positive. En C. l'analyse d'une souche de *P. aeruginosa*, AmpC positive. Les mécanismes recherchés sont détectés et identifiés par le biais de multiples peptides dans chacune des analyses.

4. Évaluation des paramètres pour l'étape de lyse/digestion

Même si les étapes suivantes du protocole de préparation (étapes bleues) n'ont pas été, dans un premier temps, ajustées pour travailler dans une hémoculture, elles ont en revanche été évaluées pour les espèces bactériennes du groupe ESKAPE. Cette évaluation est nécessaire pour vérifier que les conditions analytiques (Lyse/digestion) utilisées pour *S. aureus* sont adaptées à la caractérisation des autres bactéries. Notamment du fait que *S. aureus* et *E. faecium* sont des Gram+ et sont considérés comme plus résistants à la lyse en comparaison aux Gram- (grâce à l'épaisse couche de peptidoglycane).

La première étape de vérification concerne les cinétiques de lyse et de digestion qui est suivie d'une évaluation de l'impact des billes de verres pour les différentes espèces. Pour finir, la robustesse de l'approche sur la quantification dans le sang de quelques mécanismes de résistance a été déterminée pour s'assurer qu'aucun biais significatif n'était présent.

a. Cinétiques de digestion

Les cinétiques de digestion ont été réalisées pour les mêmes conditions utilisées pour *S. aureus*, l'objectif étant toujours d'être le plus efficace pour un temps le plus court possible. Les conditions évaluées sont deux températures (37 °C et 50 °C) et 4 temps (2 min, 5 min, 10, min et 15 min). Ces tests se sont axés dans un premier temps sur les protéines ribosomiques (Figure 91) des entérobactéries, de *E. faecium* et de *P. aeruginosa*, puis sur différents mécanismes de résistances (Figure 92) associés à ces espèces. Dans les deux cas, les résultats sont présentés pour chacune des conditions en fonction de la valeur obtenue pour la condition minimale (2 min à 37 °C). Cela permet d'apprécier l'augmentation de l'intensité brute moyenne de l'ensemble des peptides rapporteurs des protéines ribosomiques des espèces et des mécanismes de résistances.

Pour les peptides rapporteurs des protéines ribosomiques, le gain en signal apporté par l'augmentation de la température est significatif pour les entérobactéries, *P. aeruginosa*, et pour les temps courts (2 et 5 min) pour *E. faecium*. Dans l'intégralité des cas, la condition 10 min à 50 °C semble être un très bon compromis entre efficacité, temps suffisamment court et robustesse. En effet, un temps de 2 min sera très impacté par de légères variations dans la manipulation et entacherait la robustesse de la méthode.

Intensité normalisée par la condition 2 min à 37°C

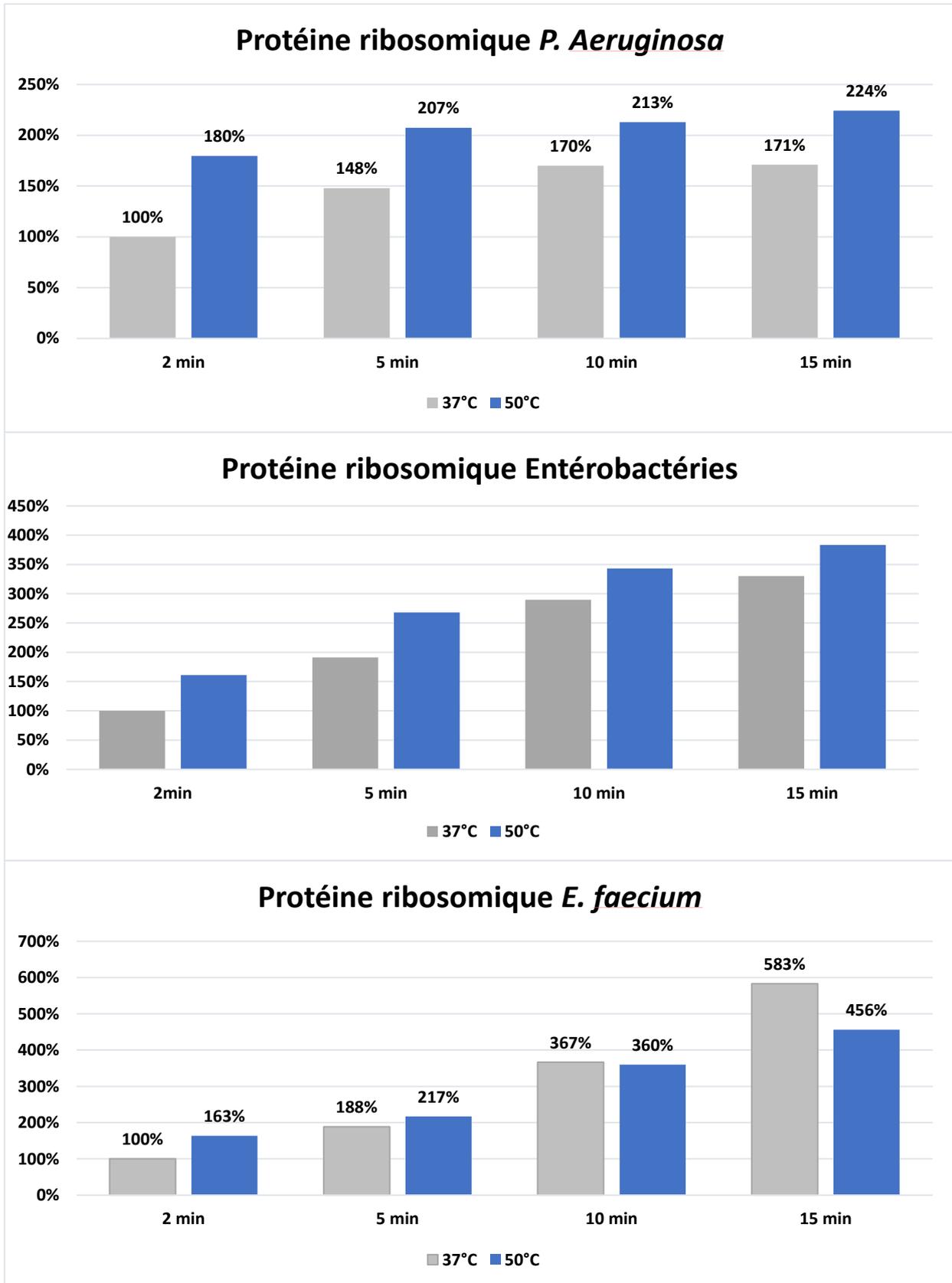


Figure 91 : Histogramme des intensités brutes en fonction du temps de lyse/digestion pour 2 températures (37 °C gris et 50 °C bleu) pour les peptides rapporteurs des protéines ribosomiques de *E. faecium*, *P. aeruginosa*, ainsi que pour les entérobactéries. L'intensité est représentée en pourcentage par rapport à la condition 2 minutes de lyse/digestion à 37 °C. Une augmentation moyenne du signal est observée avec le temps avec un palier atteint très rapidement pour *P. aeruginosa*. La température consiste à une augmentation importante de l'intensité obtenue. La condition 10 minutes et 50 °C reste la condition avec le meilleur compromis en termes de temps, sensibilité et robustesse.

Intensité normalisée par la condition 2 min à 37°C

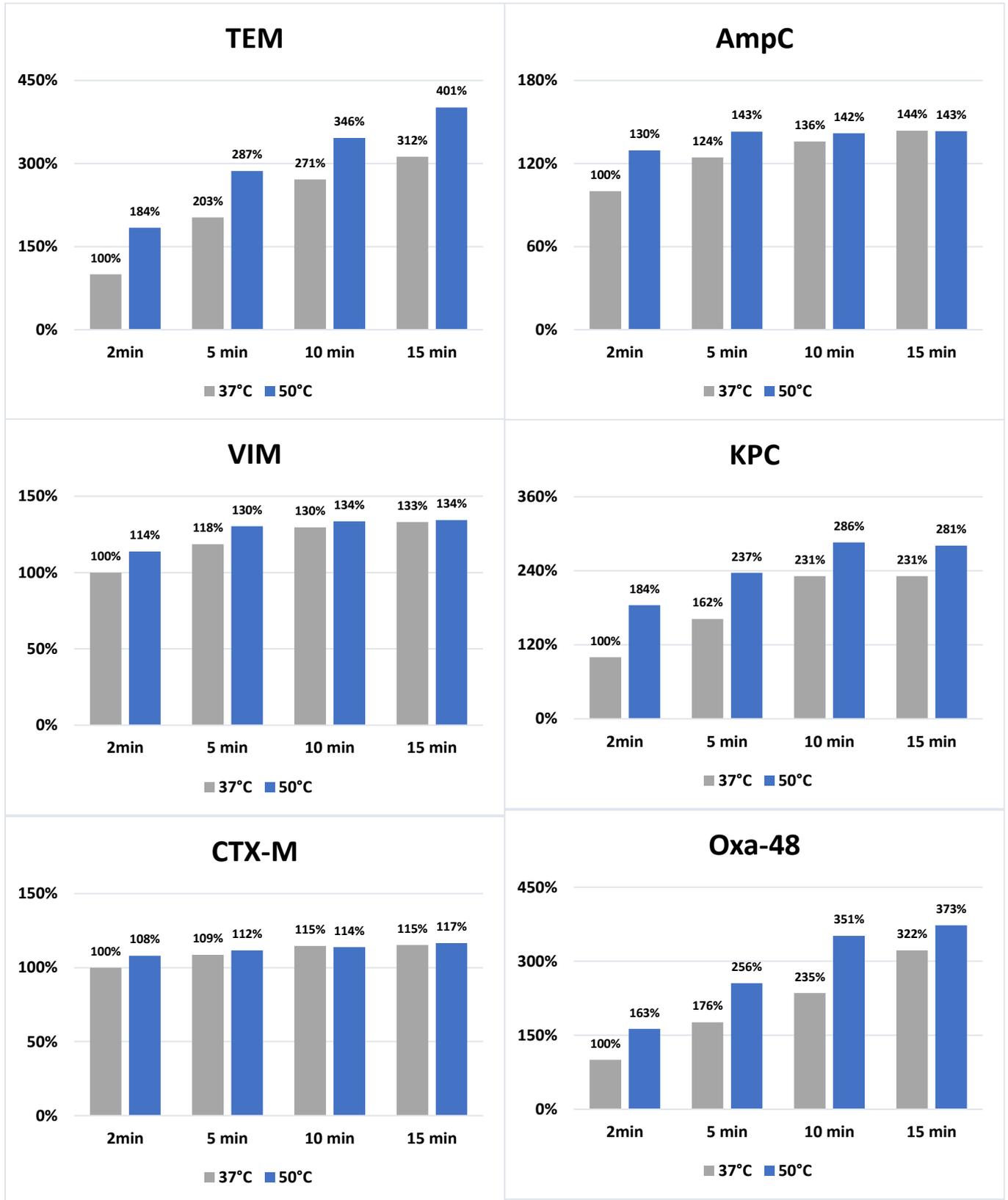
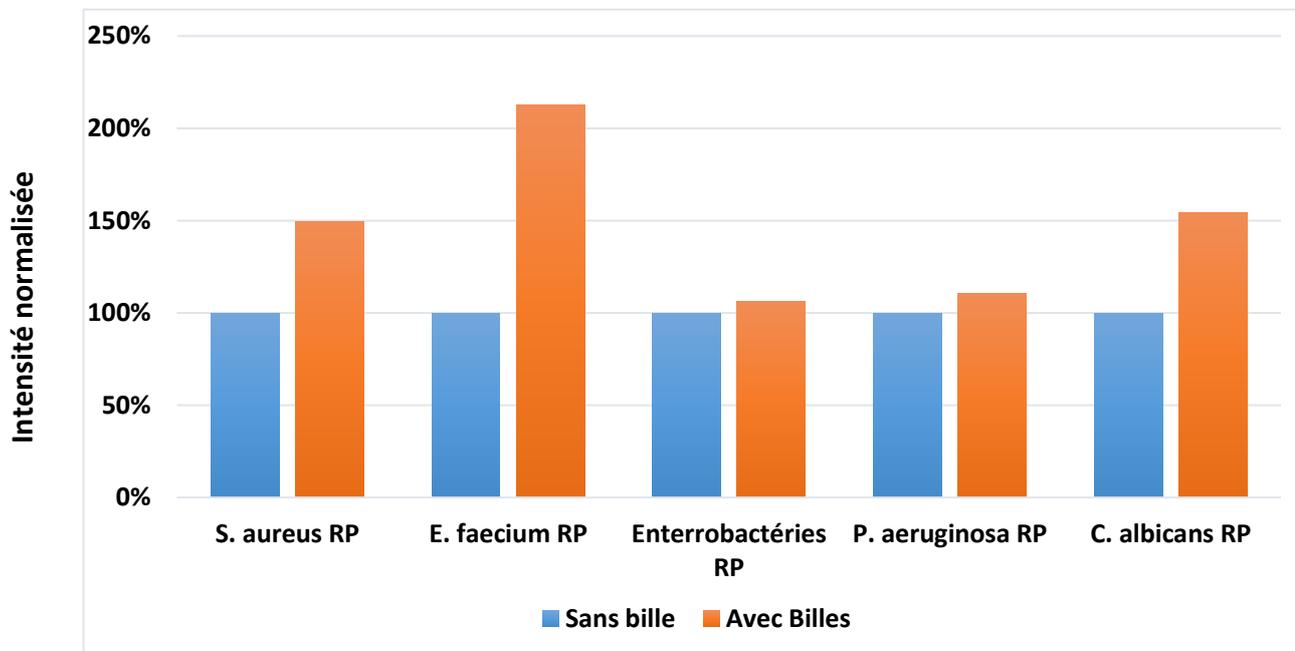


Figure 92 : Histogramme des intensités brutes en fonctions du temps de lyse digestion pour 2 températures (37 °C gris et 50 °C bleu) pour les peptides rapporteurs des mécanismes de résistances : TEM, AmpC, VIM, KPC, CTX-M, Oxa-48. L'intensité est représentée en pourcentage par rapport à la condition 2 minutes de lyse/digestion à 37 °C. Une augmentation moyenne du signal est observée lors de l'augmentation du temps de lyse/digestion pour la plupart des mécanismes. Un palier est cependant atteint très rapidement pour AmpC et VIM dès 5 minutes de lyse/digestion. Lorsque le palier n'est pas atteint, la température engendre une augmentation importante de l'intensité obtenue par exemple avec Oxa-48 (100 % supplémentaire). La condition 10 minutes et 50 °C reste la condition avec le meilleur compromis en termes de temps, sensibilité et robustesse pour l'ensemble

Dans le cadre des mécanismes de résistances, les profils de réponses sont légèrement différents. Pour un grand nombre de protéines comme AmpC, VIM, CTX-M, OXY, l'impact du temps et de la température est presque négligeable. Le palier d'intensité est atteint dans ces cas dès 2 minutes de digestion à 50 °C. Toutefois, pour certains facteurs de virulence (TEM, KPC, OXA-48), une digestion plus longue engendre une forte augmentation du signal brut moyen des peptides rapporteurs, ce qui permet une détection et quantification plus fiable. Un des points positifs de cette évaluation, c'est qu'elle confirme que les conditions employées pour *S. aureus* sont en adéquation avec l'ensemble des bactéries. De plus, dans le cadre d'un diagnostic rapide qualitatif, il serait possible d'accélérer le protocole avec l'utilisation d'une lyse/digestion en 2 minutes. Cependant, un des cas limites rencontrés est la protéine VanA (*E. faecium*) qui, pour plusieurs souches, n'était pas détectée après 2 min de lyse/digestion sans présence de billes de verres.

b. Impact des billes de verres

L'utilisation de billes de verres (~50 mg de billes de verre 150-212 µm pour 200 µL d'échantillon) pour *S. aureus* procurait une augmentation moyenne du signal sur les protéines étudiées de près de 20 %. L'impact sur les autres espèces bactériennes a donc également été évalué. (Figure 93).



des billes de verres pour les Gram+ semble apporter une augmentation significative du signal brut des peptides rapporteurs des protéines ribosomiques, avec 50 % pour *S. aureus* et 113 %

pour *E. faecium*, ce qui se traduit par une efficacité de lyse bien plus importante pour ces bactéries. De plus, ce fort impact est aussi retrouvé pour la levure *C. albicans*²⁵ (infections fongiques fréquemment rencontrées), qui s'avère être très résistante aux stress mécaniques, grâce à de forts taux de lipides au sein de sa membrane, selon une étude menée sur des cellules de levure par Tobias Walther, de l'Institut Max Planck de biochimie de Martinsried, en Allemagne.

L'ajout de billes semble être un atout significatif pour la lyse des bactéries Gram+, et est donc conservé dans le protocole final de préparation d'échantillons. Il est essentiel de noter que l'ajout de billes permet également de détecter VanA après 2 minutes de lyse/digestion pour les souches de *E. faecium* qui posaient des difficultés lors de l'absence de billes.

c. Robustesse de la quantification en hémoculture

La complexité de la matrice et le processus de purification sont des paramètres importants pouvant impacter la quantification relative des mécanismes de résistance. La dernière étape de la vérification concerne la robustesse de la méthode en hémoculture. Pour ce faire, une étude sur des triplicats techniques pour les différentes bêta-lactamases a été réalisée. Les résultats pour TEM, DDM, AmpC et OXA-48 sont présentés sur la Figure 94. Pour chacune des protéines, les valeurs d'intensités relatives pour les peptides rapporteurs reliés à la quantification sont exposées. Les barres d'erreurs associées correspondent à plus ou moins un écart type, calculé sur les valeurs issues des triplicats techniques. Pour chaque peptide de chaque mécanisme, les CV obtenus sont inférieurs à 10 %, confirmant une robustesse adéquate pour la réalisation de la quantification relative de ces protéines, ainsi que leurs utilisations lors de comparaison d'expression entre plusieurs souches de la même espèce.

Intensité

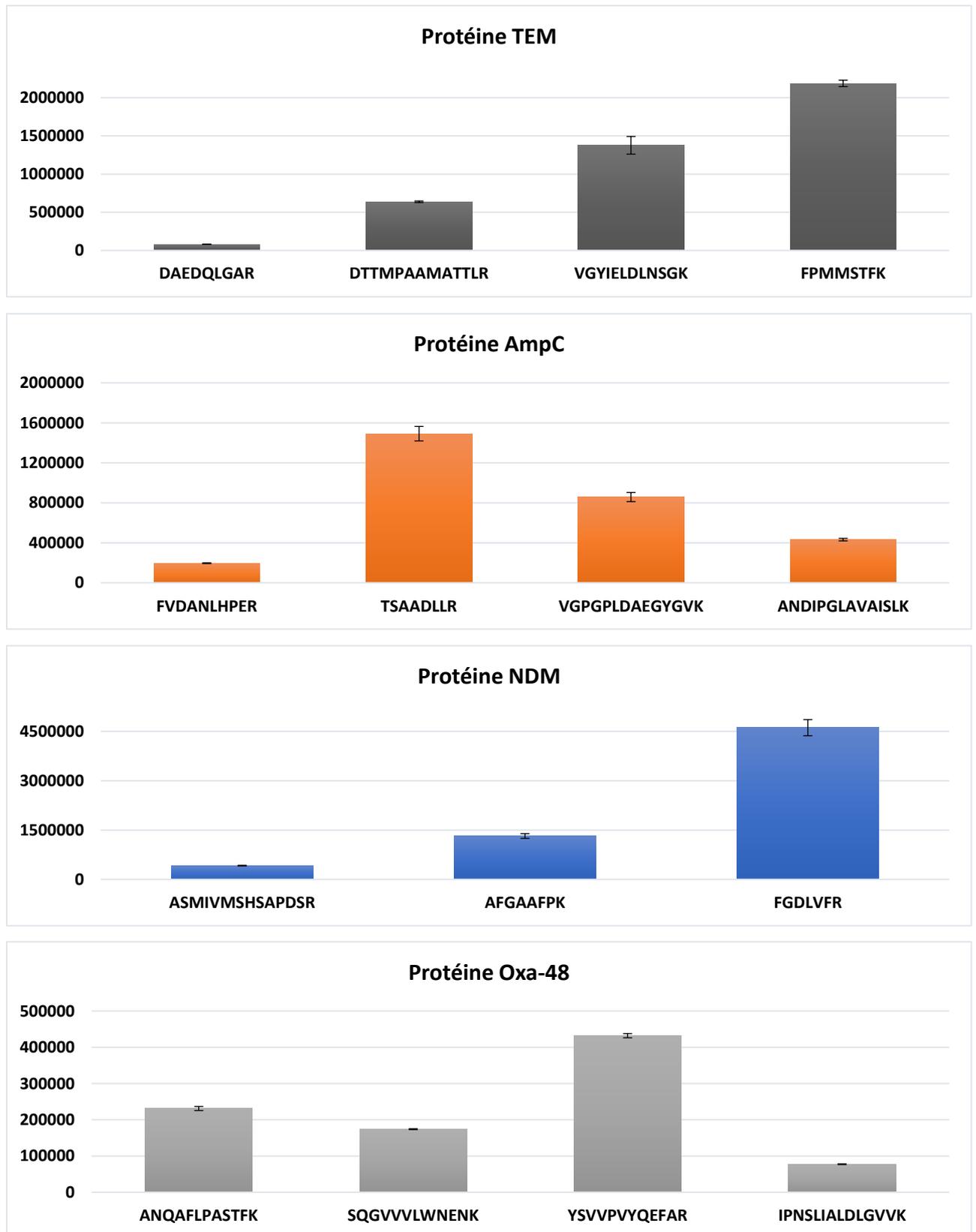


Figure 94 : Histogrammes des intensités des peptides rapporteurs de mécanismes de résistance pour des triplicats en hémoculture. La barre d'erreur représente plus ou moins un CV avec des valeurs maximales de variation de 10 %. La robustesse observée pour *S. aureus* est donc conservée pour des mécanismes de résistance sur d'autres bactéries dans les futures conditions analytiques.

III. Matériels et méthodes

A. Réactifs

Le méthanol (MeOH), l'isopropanol (IPA), l'eau et l'acétonitrile (ACN) (qualité LC-MS) ont été achetés chez Fisher Scientific (Illkirch, France). L'acide formique (FA) (qualité LC-MS), les billes de verre lavées à l'acide (150-212 μm), la saponine et la trypsine du pancréas porcine (Type IX-S) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Le sang a été fourni par l'Etablissement Français Sang (EFS - Lyon). Les tubes d'hémocultures BacT/ALERT® et BacT/ALERT FAN Plus® ainsi que les boîtes de Pétri COS (Columbia au sang) utilisés ont été achetés auprès de bioMérieux (Marcy-l'Étoile, France). Les peptides synthétiques non marqués (PEPotec™ grade 2) ont été synthétisés par Thermo Fisher Scientific.

B. Souches bactériennes et conditions de culture

Des souches bactériennes utilisées lors de la création de méthode et sa validation ont été fournies par les Centres nationaux de références : Résistances aux antibiotiques de Kremlin le Bicêtre et Clermont-Ferrand. Certaines souches ont été fournies par le Centre national de référence du Staphylocoque (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France).

Les hémocultures réalisées pour le développement de la méthode ainsi que pour la preuve de concept sont des échantillons créés et ne proviennent pas directement d'un patient. La création ainsi que les manipulations ont eu lieu à l'hôpital de la Croix-Rousse, Lyon. Une préculture est réalisée sur gélose COS et est ensuite incubée à 37 °C pendant 24 h. Si la culture est mono-bactérienne, une colonie est repiquée dans un bouillon BHI pendant 18 heures sans agitation à 37 °C.

Une dilution avec du sérum physiologique afin d'atteindre 0,5 McF (spectrophotomètre bioMérieux) est réalisée. Le flacon d'hémoculture BACT/ALERT® (bioMérieux) de 25 mL estensemencé avec 10 mL de sang fourni par l'ESF et par 100 μL de la solution bactérienne diluée afin d'atteindre une concentration finale de 50 UFC/mL dans l'hémoculture. Le tube est ensuite placé dans un Virtuo® (bioMérieux). Cette préparation entraîne une croissance moyenne des échantillons de 8 à 12 heures en fonction des espèces.

Une fois l'hémoculture considérée comme positive, la préparation d'échantillons est immédiatement débutée.

Des hémocultures des espèces suivantes ont été réalisées pour la preuve de concept et les tests préliminaires : *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*.

C. Préparation d'échantillons

Un volume de 5 mL d'hémoculture est prélevé et centrifugé pendant 5 minutes à 5000 RPM. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est repris dans 7 mL de tampon de lyse (pour 100 mL de solution de : 4 g NH₄Cl ; 0.5 g de KHCO₃ ; 0.02 g d'EDTA). Une fois homogénéisé, le mélange est laissé en attente pendant 10 minutes et est vortexé 3 fois pendant 1 minute. Le mélange est centrifugé à 5000 RPM pendant 5 minutes et le surnageant est à nouveau éliminé. Le culot est repris dans 5 mL d'eau physiologique pour une étape de lavage. Une fois homogénéisée, la solution est centrifugée dans les mêmes conditions. Le surnageant est éliminé et le culot final est repris dans 1 mL de sérum physiologique.

200 µL sont prélevés pour la préparation de l'échantillon auquel on ajoute 50 mg de billes de verre (150-212 µm) pour faciliter la lyse bactérienne. La digestion trypsique est effectuée avec 50 µL d'une solution de trypsine de 1 mg/mL, préparée dans 150 mM de NH₄HCO₃. La particularité de cette préparation d'échantillon est que la digestion et la lyse sont effectuées simultanément, dans un prototype de bain à ultrasons dérivé du Diagenode Bioruptor® plus (Diagenode s.a. Belgium) thermostaté à 50 °C pendant 10 minutes (cycle de sonication : 30 s en marche/30 s en arrêt) et utilisé en mode basse puissance. La digestion trypsique a été stoppée en acidifiant les échantillons à l'aide de 5 µL d'acide formique. Les tubes ont été centrifugés deux fois à 10 000 RPM pendant 2 minutes par centrifugation (minispin®, Eppendorf). Puis 180 µL de surnageant sont transférés dans des vials ambrées contenant un insert de 250 µL.

D. Analyse LC-MS-MS avec dessalage en ligne

La séparation des peptides est effectuée sur un système composé d'une HPLC Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies) avec une pompe binaire haute pression Agilent 1290 (tête de pompe A et B, pour la séparation LC) (Agilent Technologies, Wald-bronn, Allemagne), un passeur automatique, un four à colonnes ainsi qu'une seconde pompe binaire Agilent 1290 Infinity (tête de pompe C et D) pour le dessalement en ligne.

Pour chaque analyse, le digestat tryptique bactérien (80 µL) est chargé sur une précolonne Be Online PL RP-S (15-20 µm–2.1x12.5 mm 3/PK) (Agilent Technologies, Wald-bronn, Allemagne) à 100 µL/min avec de l'eau (pompe C). Après 3 min de dessalage, la précolonne est mise en ligne avec une colonne d'analyse BEH C18 (130 Å, 1,7 µm, 2,1x100 mm) avec une pompe A à un débit de 200 µL/min. L'élution des peptides est réalisée grâce à un mélange de solvant A/B à 45 °C. La phase mobile A est composée d'eau avec 0,1 % d'acide formique et la phase mobile B étant de l'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique (v/v). Pendant la charge de la précolonne, la colonne est soumise à une étape isocratique de conditionnement à 2 % B, cette étape se prolonge pendant 3 minutes après injection. Une montée rapide à 10 % de B est alors réalisée suivie de la séparation peptidique en utilisant un gradient linéaire de 10 % à 40 % pendant 13,5 min, puis augmentée de 40 % à 75 % B pendant 3,40 min à un débit de 300 µL/min. Une étape d'équilibrage a été réalisée à 2 % B pendant 2 minutes. Au cours de l'élution peptidique, la précolonne est lavée avec 75 % d'ACN contenant 0,5 % (v/v) d'acide formique pendant 3 minutes à 300 µL/min (phase mobile C). Celle-ci est ensuite reconditionnée pendant 2 min avec les conditions initiales. Les analyses sont effectuées sur un spectromètre de masse QTRAP 6500 (AB Sciex, Les Ulis, France) équipé d'une source d'ions TurboV électrospray et fonctionnant avec une version du logiciel Analyst (version 1.6.2, AB Sciex). Les données sont acquises en mode positif avec une tension de cône +5500 V ; le nébuliseur (air) est réglé à 70 psi et le gaz rideau (azote) est utilisé à 50 psi. La source d'ions Turbo VTM est réglée à 550 °C et le débit de gaz auxiliaire (azote) à 60 psi. Le spectromètre de masse a été calibré par du polypropylène glycol (provenant d'AB Sciex, Foster City, CA, USA) selon les instructions du constructeur. La résolution Q1 est ajustée à $0,7 \pm 0,1$ Th, et la résolution en Q3 est également réglée sur la résolution unitaire en mode MRM.

IV. Analyse Scout-MRM : Essais préliminaires

A. Contexte de l'étude

La suite logique de l'adaptation du protocole pour l'analyse d'échantillons issu d'hémocultures est le test de l'approche en conditions, sur de multiples mécanismes de résistance pour différentes espèces bactériennes. Pour ce faire, une étude sur 62 hémocultures de synthèse a été conduite. L'objectif principal est de vérifier que la méthode permet une identification juste, ainsi qu'une caractérisation précise des mécanismes de résistance

Le tableau 11 détaille les espèces, le nombre de souches, et les différents mécanismes recherchés pour l'étude complémentaire. Les souches bactériennes (9) ont été choisies pour couvrir l'ensemble des mécanismes de résistances souhaités (14). Les carbapénèmases étant les cibles prioritaires, un grand nombre d'entérobactéries sont retrouvées dans cette sélection. Afin d'assurer la possibilité de détecter *MecA*, qui demeure le standard, 4 souches de *S. aureus* (2 MRSA et 2 MSSA) ont été ajoutées. Aucune souche de *E. faecium* n'a été étudiés, car les seules disponibles étaient celles utilisées pour le développement du protocole. Cette méthode préliminaire ne s'axe que sur les variants principaux des mécanismes et permet l'analyse de 498 transitions pour 146 peptides cibles.

Les souches bactériennes ont été fournies par les CNR résistances aux antibiotiques de Kremlin le Bicêtre, de Clermont-Ferrand ainsi que par le CHU de Lyon Croix-Rousse. Les données associées à l'identification ont été obtenues grâce à des analyses MALDI-TOF. Aucune caractérisation complète de la résistance aux antibiotiques par antibiogramme n'a été réalisée et seules des informations sur les mécanismes principaux étaient fournies par le biais d'un séquençage des souches étudiées. Les protocoles de construction de l'hémoculture, de préparation d'échantillons et d'analyse sont restés inchangés.

Protéine	Mécanismes de résistances	Espèces	Nombre de souches
SHV	Penicillinase, BLSE, resistant to inhibitors	<i>C. braakii</i>	1
TEM	Penicillinase, BLSE, resistant to inhibitors	<i>C. freundii</i>	7
AmpC	Cephalosporinase	<i>E. cloacae</i>	6
CMY	Cephalosporinase	<i>E. coli</i>	10
DHA	Cephalosporinase	<i>S. aureus</i>	4
KPC	Carbapenemase	<i>K. aerogenes</i>	3
NDM	Carbapenemase	<i>K. oxytoca</i>	6
OXA-48	Carbapenemase	<i>P. aeruginosa</i>	6
VIM	Carbapenemase	<i>K. pneumoniae</i>	19
CTX-M	BLSE		
OXA-1	BLSE		
OXA-23	BLSE		
OXY	BLSE		
MecA	Global resistance mechanism (<i>S.aureus</i>)		

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des mécanismes de résistances suivis et des différentes espèces pour les analyses complémentaires.

B. Résultats de la méthode Scout-MRM

Les résultats obtenus pour les 62 souches sont présentés dans un tableau récapitulatif (Tableau 12). La caractérisation des mécanismes de résistance est symbolisée par un code à 4 couleurs (blanc — vert — orange — rouge). Une case blanche correspond à l'absence de mécanismes selon les données de séquençage et à l'absence de mécanismes détectés en MS. Si la case est verte, le mécanisme attendu est bien détecté. Dans le cas d'une case orange, le mécanisme est détecté alors qu'il n'était pas escompté. Ces cas peuvent être retrouvés dans les cas où la caractérisation de la souche n'avait pas été exhaustive, et ne concerne que 2 mécanismes TEM et CMY. En revanche, si la case est rouge, le mécanisme avait été caractérisé au préalable, mais l'expression n'est pas détectée lors de l'analyse. Il est possible que le gène ne soit pas exprimé, ou que ce dernier soit en dessous de la limite de sensibilité de l'analyse.

Sur la partie identification, une spécificité de 100 % est observée, avec aucune irrégularité repérée pour les 62 hémocultures. Les 3 discordances mises en évidence en orange dans la colonne ID MS (Identification par spectrométrie de masse) proviennent d'une erreur lors de la préparation des échantillons. Ces erreurs ont été confirmées par la réalisation d'une nouvelle analyse par MALDI-TOF validant l'identification retrouvée par la méthode Scout-MRM.

ID CNR/HCL	N°souche	ID MS	NDM	CTX-M	OXA-1	SHV	DHA	TEM	CMY	OXA-48	OXY	VIM	KPC	AMPC	OXA-23	MecA
<i>C. freundii</i>	2236	<i>C. freundii</i>														
<i>C. freundii</i>	2392	<i>C. freundii</i>														
<i>C. freundii</i>	2347	<i>C. freundii</i>														
<i>C. freundii</i>	3031	<i>C. freundii</i>														
<i>C. freundii</i>	193002908501	<i>C. freundii</i>														
<i>C. freundii</i>	19034526201	<i>C. freundii</i>														
<i>C. freundii</i>	19023818201	<i>C. freundii</i>														
<i>E. coli</i>	195H7	<i>E. coli</i>														
<i>E. coli</i>	196H6	<i>E. coli</i>														
<i>E. coli</i>	3092	<i>E. coli</i>														
<i>E. coli</i>	3110	<i>E. coli</i>														
<i>E. coli</i>	2557	<i>E. coli</i>														
<i>E. coli</i>	2388	<i>E. coli</i>														
<i>E. coli</i>	19002946880105	<i>E. coli</i>														
<i>E. coli</i>	19033397301	<i>K. pneumoniae</i>														
<i>E. coli</i>	19013975501	<i>E. coli</i>														
<i>E. coli</i>	19037767301	<i>E. coli</i>														
<i>E. coli</i>	19036007101	<i>E. coli</i>														
<i>K. oxytoca</i>	2560	<i>K. oxytoca</i>														
<i>K. oxytoca</i>	2273	<i>K. oxytoca</i>														
<i>K. oxytoca</i>	2658	<i>K. oxytoca</i>														
<i>K. oxytoca</i>	2261	<i>K. oxytoca</i>														
<i>K.aerogenes</i>	2832	<i>K.aerogenes</i>														
<i>K.aerogenes</i>	BLSE-2012-50	<i>K.aerogenes</i>														
<i>K. pneumoniae</i>	193C9	<i>K. pneumoniae</i>														
<i>K. pneumoniae</i>	185I5	<i>K. pneumoniae</i>														
<i>K. pneumoniae</i>	196E8	<i>K. pneumoniae</i>														
<i>K. pneumoniae</i>	2956	<i>K. pneumoniae</i>														
<i>K. pneumoniae</i>	3170	<i>K. pneumoniae</i>														
<i>K. pneumoniae</i>	2948	<i>K. pneumoniae</i>														

 Présence (séquençage) / Détection (MS)
  Absence (séquençage) / Détection (MS)
  Présence (séquençage) / Non détection (MS)

E. coli | 19033397301 | *K. pneumoniae* = erreur de de souche lors de la culture

ID CNR/HCL	N°souche	ID MS	NDM	CTX-M	OXA-1	SHV	DHA	TEM	CMY	OXA-48	OXY	VIM	KPC	AMPC	OXA-23	MecA
<i>K. pneumoniae</i>	2408	<i>K. pneumoniae</i>		Vert												
<i>K. pneumoniae</i>	3064	<i>K. pneumoniae</i>					Vert									
<i>K. pneumoniae</i>	2459	<i>K. pneumoniae</i>				Vert	Vert	Vert								
<i>K. pneumoniae</i>	2325	<i>K. pneumoniae</i>				Vert										
<i>K. pneumoniae</i>	19002940620103	<i>K. pneumoniae</i>														
<i>K. pneumoniae</i>	2462	<i>K. pneumoniae</i>				Vert		Vert								
<i>K. pneumoniae</i>	2558	<i>K. pneumoniae</i>		Vert												
<i>K. pneumoniae</i>	19026138401	<i>K. pneumoniae</i>	Vert													
<i>K. pneumoniae</i>	119002873001	<i>K. pneumoniae</i>											Vert			
<i>K. pneumoniae</i>	19029783801	<i>K. pneumoniae</i>								Vert						
<i>K. pneumoniae</i>	19014956801	<i>K. pneumoniae</i>						Vert								
<i>K. pneumoniae</i>	19016961601	<i>K. pneumoniae</i>						Vert								
<i>S. aureus</i>	ST20150295	<i>S. aureus</i>														
<i>S. aureus</i>	ST20020209	<i>S. aureus</i>														Vert
<i>S. aureus</i>	ST20030749	<i>S. aureus</i>														
<i>S. aureus</i>	ST20112206	<i>S. aureus</i>														
<i>E. cloacae</i>	187J9	<i>E. cloacae</i>	Vert													
<i>E. cloacae</i>	2371	<i>E. cloacae</i>						Vert								
<i>E. cloacae</i>	18042734001	<i>E. cloacae</i>						Vert								
<i>E. cloacae</i>	18191624602	<i>E. cloacae</i>						Orange				Vert				
<i>E. cloacae</i>	19045188401	<i>E. cloacae</i>								Vert		Vert				
<i>E. Faecium</i>	19031511201	<i>E. Faecium</i>														
<i>E. Faecium</i>	19007681301	<i>K. pneumoniae</i>				Vert		Vert		Vert						
<i>C. Braakii</i>	19028373001	<i>C. Braakii</i>														
<i>A. Baumannii</i>	19020779201	<i>E. cloacae</i>														
<i>A. Baumannii</i>	19020779201	<i>A. Baumannii</i>													Vert	
<i>P. aeruginosa</i>	19026525901	<i>P. aeruginosa</i>														
<i>P. aeruginosa</i>	19032206903	<i>P. aeruginosa</i>														
<i>P. aeruginosa</i>	19009990501	<i>P. aeruginosa</i>														



Présence (séquençage) / Détection (MS)



Absence (séquençage) / Détection (MS)

E. Faecium | 19007681301 | *K. pneumoniae* = erreur de de souche lors de la culture

A. Baumannii | 19020779201 | *E. cloacae* = erreur de de souche lors de la culture

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats pour les 62 souches analysées par MS. La caractérisation des mécanismes de résistance est représentée par un code à 4 couleurs. Blanc : absence du mécanisme (séquençage) et non détection. Vert : Présence du mécanisme et détection MS. Orange : Absence du mécanisme et détection MS. Rouge : Présence du mécanisme et non détection MS. L'identification a été juste dans l'ensemble des cas. Les cases orange représentent des cas où une erreur a été commise lors de la culture. Ces souches ont été identifiées par MALDI-TOF et ont confirmé la nouvelle identification.

Sur les 90 mécanismes de résistance attendus d'après les données de séquençage, 81 ont été détectés. De plus, chaque mécanisme de résistance a bien été identifié au moins une fois. Cela prouve qu'il est possible de détecter l'ensemble des mécanismes recherchés dans des hémocultures à l'instant où elles sont considérées comme positives.

Les 9 mécanismes manquants concernent un OXA-48, deux OXA-1, trois TEM et trois SHV. Chaque mécanisme ayant bien été identifié dans plusieurs autres souches, le problème ne provient pas du choix des peptides rapporteurs. Dans les cas des mécanismes TEM et SHV, l'hypothèse mise en avant est la non-expression des 2 gènes. En effet, pour chaque souche où les gènes n'ont pas été détectés, la présence d'une carbapénèmase est observée. Cette résistance permettant une défense plus élargie pourrait conduire à l'absence d'expression des 2 résistances chromosomiques.

En revanche, le manque de détection d'OXA-48 et des deux OXA-1 n'est pas expliquée. Dans les 3 cas, aucun peptide n'a été détecté. Les pistes d'une expression trop faible pour permettre la détection ou la non-expression sont les plus probables. Il serait indispensable de réaliser des antibiogrammes pour les souches en question afin de confirmer l'expression de ces différents mécanismes. Dans le cas où il y aurait bien une résistance des souches, il serait nécessaire par la même occasion de vérifier que celle-ci soit faible, ce qui serait cohérent avec les résultats obtenus.

Dans l'ensemble, les résultats préliminaires démontrent la viabilité de la méthode. Celle-ci permet en moins d'une heure d'identifier les espèces du groupe ESKAPE avec 100 % de spécificité, et de caractériser les mécanismes de résistances principaux. Malgré les quelques discordances dans la détection des mécanismes, celle-ci demeure très spécifique, ce qui est encourageant pour le futur de la méthode.

C. Limites de la méthode

Il a été remarqué un manque de sensibilité pour certains mécanismes de résistance. Ce manque de sensibilité peut être attribué à une très faible expression en milieu sanguin, mais aussi à une préparation d'échantillons qui se veut très rapide, mais qui n'est donc pas optimale dans sa purification. Malheureusement, certains mécanismes sont primordiaux à détecter (MecA), et il est nécessaire de pouvoir les identifier même dans le cas d'une très faible expression. Dans un premier temps seront détaillés les points limitants de la préparation d'échantillons et les mesures mises en place pour leurs améliorations.

De plus, lors des premiers résultats de la preuve de concept, il a été remarqué l'absence de détection de l'ensemble des toxines de *S. aureus*. Une investigation a été menée pour comprendre le phénomène et les implications qui en résultent.

1. Préparation d'échantillons

Une des premières sources de limitation et d'éventuelles améliorations de la méthode est la préparation d'échantillon. En effet, le protocole mis en place dans la preuve de concept est une esquisse et n'a subi que peu d'étapes d'optimisation. Le rôle primaire de ce protocole a été de permettre la réalisation de la preuve de concept. Les tests préliminaires présentés démontrent bien la possibilité de détecter les mécanismes en présence dès que l'hémoculture est positive. En revanche, il a été remarqué qu'un grand nombre de pics parasites étaient toujours présents sur le chromatogramme. Cela indique que la préparation d'échantillon n'engendre pas une très bonne purification et que l'échantillon est fortement contaminé par la présence de protéines issues des composants du sang et du milieu de culture. Une faible purification entrainera par la même occasion la possibilité de nombreux effets matrice, ce qui se traduit par une perte globale en signal et donc en sensibilité.

La purification provient principalement de la réussite et de l'efficacité de l'étape de lyse. Celle-ci est accomplie par l'utilisation d'un tampon permettant la lyse des différents composants du sang. Cependant, son efficacité est liée au temps d'attente et de contact avec l'hémoculture. Or, le temps d'attente est limité à 10 minutes si l'ensemble de l'analyse doit être réalisable en moins d'une heure. De plus, les multiples cycles de vortex par échantillon alourdissent le

protocole et limite les possibilités d'automatisation. Afin d'optimiser cette purification, il serait préférable d'employer des molécules avec des propriétés tensioactives comme la saponine pour la lyse des tissus. Injectée à des pourcentages faibles (3 % final), elle permet une lyse efficace²³⁴ pour un temps d'attente allant de 2 à 10 minutes. On retrouve l'utilisation de la saponine dans diverses méthodes de lyses sanguines, soit avec l'utilisation de Kit²³⁵ (Sepsityper®) ou *via* l'utilisation de méthode « maison »²³⁶. L'utilisation de la saponine pourrait se faire directement dans l'échantillon sanguin, permettant d'éliminer une étape de centrifugation et de gagner du temps tout en simplifiant la manipulation. De plus, si la saponine n'entraîne pas une perte d'efficacité de la trypsine lors de la digestion, la dernière étape de lavage pourrait elle aussi être supprimée.

Une expérience rapide sur une hémoculture positive de *E. coli* et une hémoculture de *S. epidermidis* pour comparer différents protocoles de lyse a été réalisée. Les 4 protocoles correspondent à l'emploi d'une solution de saponine directement rajoutée pour obtenir une concentration finale de 2 % et 3 %, l'utilisation du tampon de lyse (ACK) et du kit Sepsityper (Bruker ©). Les résultats sont présentés sur la Figure 95.

Dans chacun des cas, le kit Sepsityper est celui qui fournit la plus grande aire normalisée. Pour les analyses de la souche *E. coli* (A) la saponine apporte elle aussi une forte amélioration par rapport au tampon ACK. Cependant, cette amélioration n'est pas retrouvée dans le cas des Gram+ (*S. epidermidis*) ou les deux protocoles sont équivalents (B). Aucune différence significative n'est observée entre l'utilisation d'une concentration finale en saponine de 2 % ou 3 %.

Le protocole ACK est toutefois plus complexe et nécessite un temps de préparation plus long par rapport aux 2 autres protocoles. Les 3 étapes de centrifugations requièrent au total plus de 10 minutes et multiplie les étapes de prélèvements et d'éliminations du surnageant. De plus, pour obtenir une bonne efficacité, le protocole demande de travailler dans des volumes importants (Eppendorf de 10 mL). Ces volumes entraînent une limitation de la vitesse de centrifugation qui engendre un culottage non complet des bactéries. En effet, un repiquage du surnageant sur une gélose COS a montré la présence de bactéries dans le surnageant.

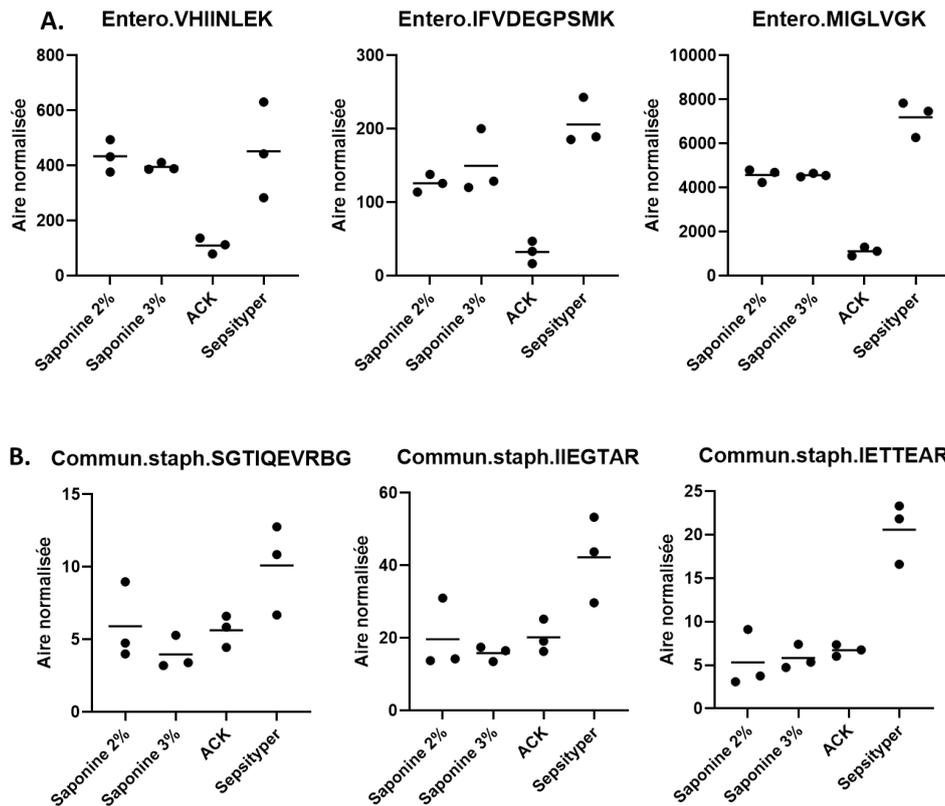


Figure 95 : Comparaison de 4 protocoles de lyse. Saponine 2 % finale – 3 % final, tampon de lyse ACK et Kit Sepsityper de Bruker ©. En A. les résultats obtenus pour une souche *E. coli*. Le Sepsityper entraîne une aire normalisée supérieure dans l'ensemble des cas, aux protocoles basés sur l'utilisation de la saponine. Le tampon ACK semble être bien moins efficace que les autres solutions proposées. En B. les résultats obtenus pour une souche de *S. epidermidis*. Le Sepsityper engendre une aire normalisée supérieure dans l'ensemble des cas. En revanche, aucune différence significative entre l'utilisation du tampon et de la saponine n'est observée.

L'utilisation de la saponine permettrait de diminuer la prise d'essais à 1 mL et d'éliminer la première étape de centrifugation en ajoutant directement la solution de saponine dans l'échantillon. De plus, cela pourrait permettre la réalisation d'une centrifugation rapide à haute vitesse (similaire au Kit du Sepcytiper). Pour finir, l'intégralité de ces modifications permettraient par la même occasion d'automatiser l'ensemble de la préparation d'échantillon rendant l'approche possible pour un emploi en routine.

Comme on peut le remarquer, un grand nombre de paramètres ne sont pas encore fixés et demandent de fortes optimisations pour effectuer au mieux une préparation d'échantillon adapté à une application clinique. Le workflow présenté permet tout de même l'identification et la caractérisation de résistance aux antibiotiques. Cependant, l'utilisation de composé comme la saponine semble être la meilleure option afin d'améliorer l'efficacité de la

purification tout en raccourcissant et simplifiant l'ensemble du protocole pour atteindre une analyse en moins de 50 minutes.

2. Virulence

Lors des analyses des souches de *S. aureus* issus de la preuve de concept, il a été remarqué l'absence de détection de certains facteurs de virulence. Particulièrement, ce sont les toxines qui semblent difficiles à détecter, notamment les protéines suivantes : HLA, HLD, les HLG (A, B, C), PVL, TSST. L'hypothèse principale est que la croissance dans le milieu est trop rapide et que l'expression des différents facteurs de virulence ne s'opère qu'ultérieurement. Les hémocultures ont pour but de permettre la croissance bactérienne la plus rapide possible afin de déceler la présence d'une infection le plus tôt possible. Il se peut donc que l'on ne se trouve pas dans la fin de phase exponentielle de croissance et que la majorité des facteurs de virulences ne soient pas encore pleinement exprimés. Le milieu de culture en usage dans les hémocultures peut être aussi une cause de sous expression de divers facteurs de virulences. Il est observé qu'un stress en fer implique une surexpression des toxines^{30,31} ainsi que de divers facteurs de virulence. Cependant, l'accès aux molécules de fer dans une hémoculture très riche n'est pas une difficulté pour la bactérie dès lors qu'un minimum de lyse survient, ce qui peut entraîner une sous-expression des toxines recherchées. Une telle lyse peut provenir d'une usure de l'échantillon par l'agitation et par la présence de billes de résines ayant une action mécanique sur les cellules du sang.²³⁹

a. Cinétique de croissance

Pour investiguer la cause du problème, plusieurs hémocultures de la souche ST20150295 de *S. aureus* ont été réalisées. Dans un premier temps, une étude cinétique sur une souche de *S. aureus* pour 3 temps a été conduite. Les trois conditions sont 0 h, 1 h 30 et 8 h, correspondant au temps supplémentaire une fois l'hémoculture considérée comme positive par l'automate. Les résultats pour 4 protéines sont mis en avant sur la Figure 96. En A. est représenté un exemple de peptide rapporteur de protéine ribosomique. Une expression intense est retrouvée dès le temps 0, ce qui est cohérent, car l'échantillon comporte un grand nombre de bactéries. Cependant, l'évolution de cette expression au cours du temps démontre le fait que la croissance bactérienne est toujours dans une phase évolutive et n'a pas atteint

un palier. Sur les parties B. C. D. correspondant respectivement aux protéines HLD, HLA, et Psm1, l'absence d'expression au temps 0 est remarquée. Les trois facteurs de virulence sont détectés à de faibles niveaux d'expression au bout d'une heure et demie de croissance additionnel. En revanche, après 8 h de croissance supplémentaire une expression très importante des 3 facteurs de virulence est observée. La différence entre les deux temps d'attente est d'environ un facteur 10 sur la somme des aires brutes des trois transitions. L'hypothèse de l'expression tardive des facteurs de virulences du fait que l'hémoculture soit considérée comme positive très rapidement en pleine phase exponentielle de croissance semble cohérente avec les résultats obtenus.

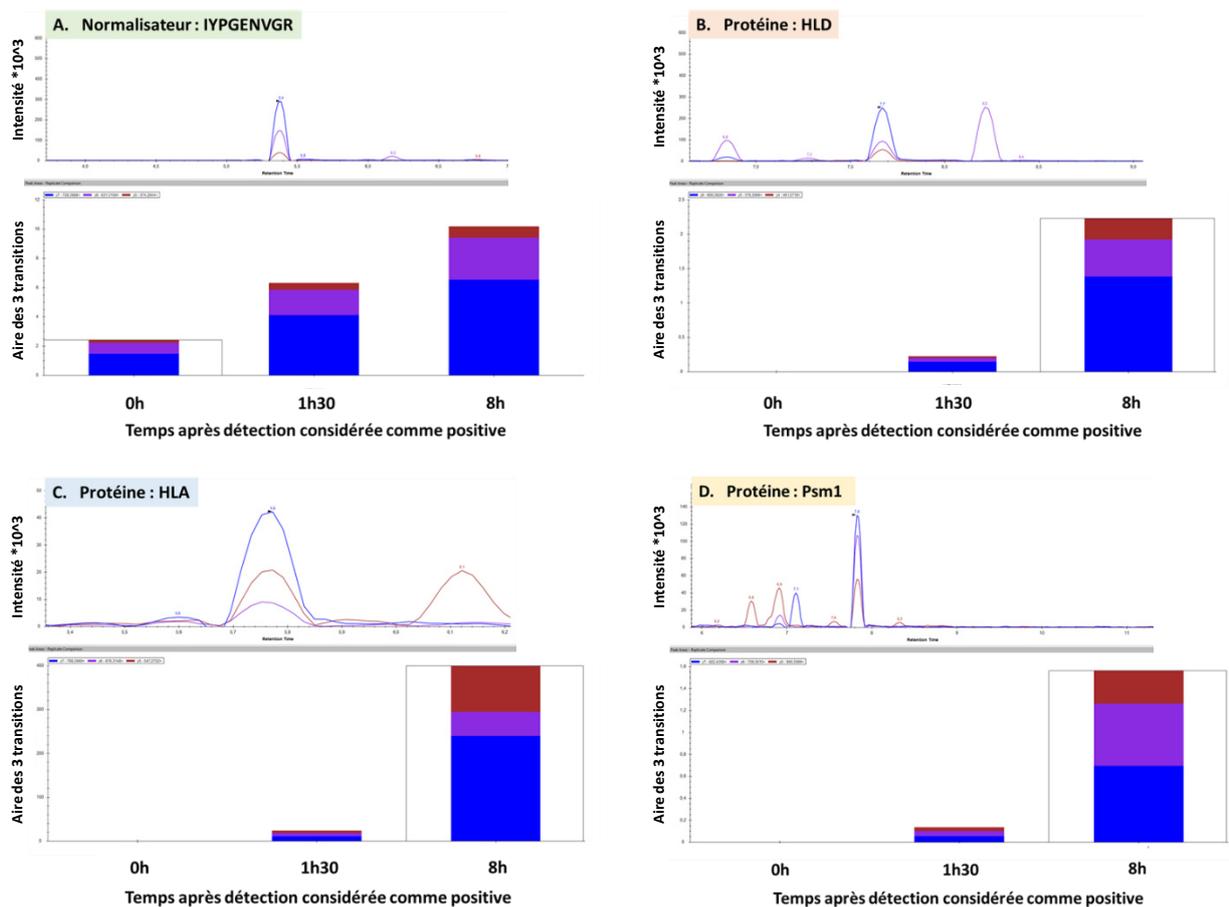


Figure 96 : Chromatogrammes reconstitués et histogrammes pour l'analyse de la souche ST20150295 dans des hémocultures réalisées dans des flacons BacT/Alert FAN Plus®. Le temps 0 h correspond à l'instant où l'hémoculture est considérée comme positive. En A. sont représentées les données pour un peptide ribosomique, montrant que la croissance continue après le temps 0 h. En B. C. et D. sont présentés respectivement les résultats pour les protéines HLD, HLA et Psm1. Aucune détection n'est observée pour le temps 0 h. À partir de 1 h 30, l'expression est détectée, et augmente d'un facteur 10 entre 1 h 30 et 8 h de croissance supplémentaire.

b. Impact des billes de résines

Les tubes d'hémocultures de dernière génération (BACTECT PLUS® et BacT/Alert FAN Plus®) contiennent des billes de résines, dans le but de lier les traces d'antibiotiques présent dans le sang du patient et d'améliorer la croissance bactérienne par la présence d'un support.^{240,241} Il semble possible, que la présence de ces billes entrainerait l'adsorption des toxines excrétées par les bactéries dans le milieu, ce qui empêcherait leur détection par la même occasion. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une des fonctions des billes est de lier les substances potentiellement toxiques pour la croissance bactérienne.

La souche ST20150295 préalablement étudiée dans les exemples décrits sur la figure 16 a été analysée de nouveau dans les mêmes conditions. Une étape complémentaire de récupération des billes (volume de 500 µL environ) a été réalisée pour chacun des trois temps de croissance supplémentaires. Afin de permettre l'analyse des protéines possiblement adsorbées sur la résine, un lavage a été effectué pour extraire les protéines d'intérêts. Les résines employées sont généralement des résines à échanges cationiques pour les composés chargés et des résines polymériques pour des interactions hydrophobes. Un lavage simple avec l'ajout de 1 mL de solution composée à 95 % de tampon de carbonate d'ammonium à 50 mM et 5 % d'acétonitrile a été réalisé. L'échantillon composé de la solution et des billes a été vortexé 5 fois pendant 30 secondes avant de subir le protocole de digestion.

Les résultats pour le peptide WIIDTVNK rapporteur de la protéine HLD sont présentés sur la Figure 97.

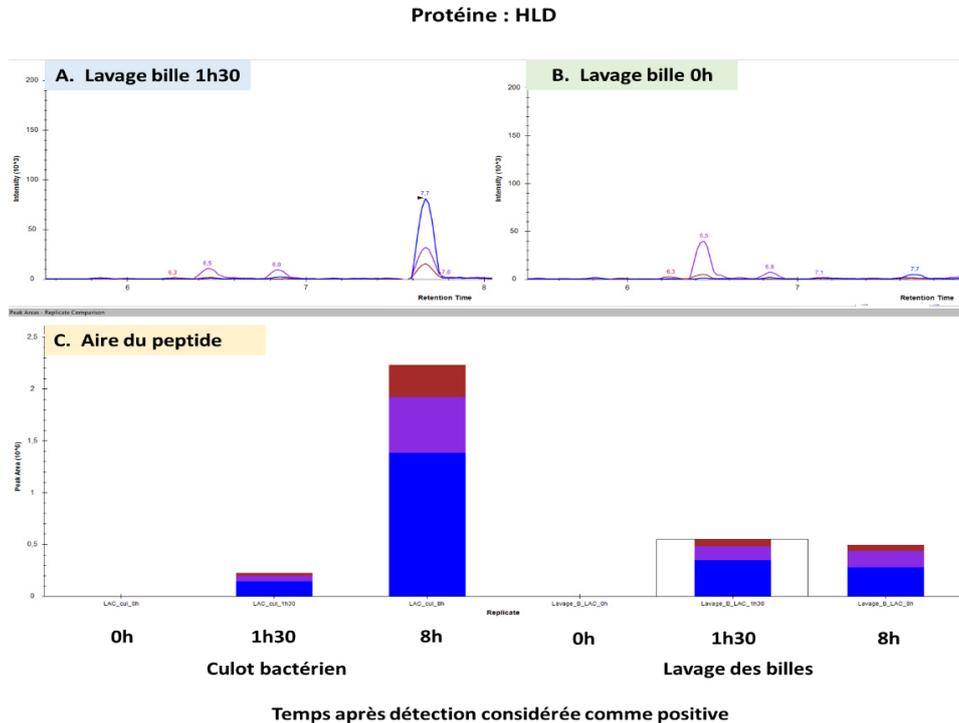


Figure 97 : Chromatogrammes reconstitués et histogrammes pour l'analyse de la souche ST20150295 dans des hémocultures réalisées dans des flacons BacT/Alert FAN Plus®. 6 conditions sont présentées pour l'analyse du peptide WIIDTVNK rapporteur de la protéine HLD. 3 pour l'analyse du culot bactérien à 0 h, 1 h 30 et 8 h et 3 pour l'analyse du lavage des billes de résines contenues dans le flacon d'hémoculture pour de même durée de culture. En A. le chromatogramme reconstitué pour le lavage des billes à 1 h 30 est présenté sur lequel, le pic correspondant au peptide WIIDTVNK est observé à 7,7 min. En B. le chromatogramme reconstitué pour le lavage des billes à 0 h montre l'absence du pic du peptide WIIDTVNK. En C. les histogrammes des aires des trois transitions du peptide pour chacune des conditions sont présentés.

Les aires pour les différentes conditions de l'expérience sont représentées (C) sous forme d'histogrammes, avec à gauche, les analyses issues du culot bactérien et à droite celles issues du lavage des billes. Dans les deux cas, la détection à 0 h est impossible, comme le montre le chromatogramme reconstitué présenté en B. En revanche, la protéine HLD est détectée lors du lavage des billes pour 1 h 30 et 8 h de croissance supplémentaire (A.). Ces résultats permettent de conclure que des phénomènes d'adsorptions des toxines sur les billes de résines ont bien lieu. La récupération des billes est une étape peu répétable dans l'état, il n'est donc pas envisageable de discuter des différences quantitatives observées entre les deux conditions. Par ailleurs, le prorata entre bactéries présentes et protéines adsorbées engendrerait un biais dans la normalisation. De plus, l'objectif de l'expérience était l'obtention rapide de l'information quant à l'adsorption possible des toxines sur les billes, l'aspect quantitatif n'entrait pas en compte. Le protocole d'extraction utilisé lors de la manipulation n'a pas été optimisé. Des rendements d'extractions supérieurs seraient accessibles en

adaptant les solvants de lavages, tout en restant en adéquation avec la préparation à réaliser par la suite.

c. Impact milieu de culture

Il a été choisi dans une dernière manipulation (Figure 98) d'utiliser pour la souche de *S. aureus* ST20150295 deux flacons d'hémocultures différents. Les flacons BacT/ALERT® et BacT/ALERT FAN Plus®. La grande divergence entre les deux types de flacons est la présence de billes de résines dans les seconds. De plus, les flacons FAN Plus contiennent un nouveau milieu de culture favorisant la croissance bactérienne. La première différence observée est temps pour lequel le flacon a été considéré comme positif par l'automate. Le flacon BacT/ALERT FAN plus est détecté positif au bout de 9 h 35 de croissance, alors que le BacT/ALERT a été estimé positif après 12 h 40 minutes de croissance, soit 3 heures de différence. Les valeurs des protéines ribosomiques (

Figure 98 C) montrent que malgré une détection plus rapide, les nouveaux flacons contiennent un plus grand nombre de bactéries. En revanche, les toxines qui ne sont toujours pas détectées à temps 0 h (B) pour les flacons avec les billes de résines, le sont avec les anciens flacons (A). Les résultats présentés sur la

Figure 98 illustrent la différence d'expression pour la toxine HLGB. Des résultats identiques sont retrouvés pour les facteurs de virulences HLGC, HLD, HLA, PSM1 et PSM4. L'hypothèse la plus probable est que la perte d'information concernant les toxines chez *S. aureus* proviendrait de l'utilisation d'un milieu de culture inadapté ne favorisant pas l'expression de ces facteurs de virulences. Le milieu des flacons BacT/ALERT FAN Plus se veut très riche pour permettre une croissance optimale et ainsi accélérer la détection de la présence d'une bactériémie. La conséquence de cette croissance rapide est que le flacon devient détecté avant la fin de la phase exponentielle de croissance, ce qui limite la quantité de toxine exprimée dans le milieu. De plus l'absence de stress pour la bactérie ne conditionnera pas l'expression des différentes toxines. À cela se rajoute la présence de billes de résines qui adsorbent une partie des protéines excrétées par la bactérie.

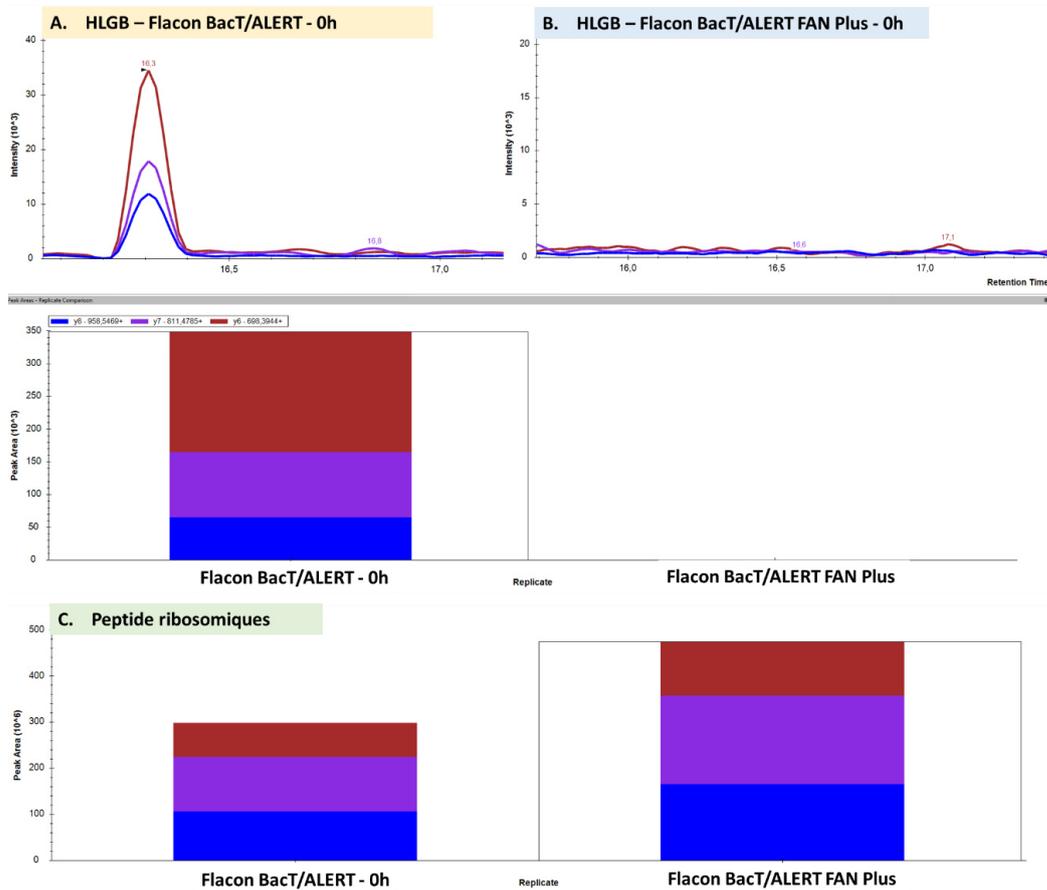


Figure 98 : Comparaison des flacons d'hémocultures BacT/ALERT® et BacT/ALERT FAN Plus® pour la protéine HLGB et un peptide ribosomique. En A. et B. sont représentés les chromatogrammes reconstitués pour les deux flacons. Une absence d'expression est observée pour les flacons BacT/ALERT FAN Plus®. En C. Les histogrammes des aires des transitions du peptide rapporteur d'une protéine ribosomique démontrent une plus grande quantité de bactéries dans les flacons BacT/ALERT FAN Plus®.

Plusieurs pistes potentielles peuvent être envisagées pour favoriser la détection des toxines en hémoculture. La plus simple, serait d'utiliser un autre milieu de culture permettant la surexpression des toxines. Malheureusement, cela conduit à l'heure actuelle, à l'augmentation du temps de croissance, et retarde ainsi le diagnostic clinique. La création d'un nouveau flacon serait possible, mais cela induirait un fort coût de développement. Par ailleurs, un nouveau milieu entraîne de nombreux changements, qui pourraient avoir un impact sur la croissance d'autres espèces bactériennes. Pour finir, il serait indispensable d'effectuer un nombre conséquent de tests pour valider l'utilisation de ces nouveaux tubes. Il est aussi possible d'envisager de garder le flacon d'hémoculture à l'étuve après qu'il est été détecté

positif par l'automate. Une fois l'analyse conduite, si une bactériémie à *S. aureus* est avéré et que le cas le nécessite, une seconde analyse est réalisée pour caractériser la virulence de la souche.

V. Évolution et perspective de la méthode

La méthode Scout-MRM permet l'analyse d'un grand multiplexe pour l'identification bactérienne et la caractérisation des résistances aux antibiotiques. Cependant, l'analyse d'une hémoculture est sans *a priori*, ce qui demande dans le cas d'une approche ciblée d'avoir une technique unique couvrant tous les composés souhaités. Dans le cadre de notre étude préliminaire, la méthode reste restreinte et ne se focalise seulement sur les aspects prioritaires des infections bactériennes à l'hôpital. Cependant, pour une application clinique future, il serait souhaitable de couvrir tous les mécanismes de résistances, avec l'ensemble des variants décrit pour les différentes bactéries pathogènes rencontrées. Malheureusement, une telle méthode représente un multiplexe trop important pour une approche LC-MS/MS de 20 minutes. C'est pourquoi nous avons effectué la preuve de concept d'un nouveau mode d'acquisition permettant l'adaptation en temps réel de l'analyse.

A. Adaptation en temps réel de la méthode Scout-MRM

Dans l'optique de création d'une méthode unique, facilement transférable, hautement multiplexée permettant l'identification des bactéries et couvrant tous les mécanismes de résistance et au final rapide, toute une réflexion a été menée entre l'équipe et la société Sciex® afin de proposer un pilotage de la méthode Scout-MRM en temps réel en fonction des protéines sentinelles détectées (brevet n° FR2000471, « Procédé d'identification et de caractérisation d'une population microbienne par spectrométrie de masse »). L'idée est de déterminer les transitions à suivre en fonction de ce qui a déjà été détecté. On ne suivra donc pas inutilement toutes les transitions possibles et la « taille » de la méthode sera adaptée en temps réel en suivant un arbre décisionnel construit à partir des connaissances sur les différentes souches.

1. Principe de fonctionnement

Il est possible de découper l'acquisition en 2 parties distinctes (Figure 99). Premièrement, le début de l'analyse se focalise sur le suivi des transitions des peptides ribosomiques spécifiques de chaque genre et espèces bactériennes. En effet, pour chaque bactéries ou familles envisagée dans la méthode, 3 à 4 peptides (9 à 12 transitions) sont suivis dans les premières

minutes de la séparation. Ainsi, en fonction des transitions spécifiques détectées (dans l'exemple : transitions rouges spécifiques de la bactérie Y), le suivi des transitions caractéristiques des mécanismes de résistances associés à cette bactérie sera déclenché. Cela permet d'abandonner le suivi de certaines transitions et ainsi de restreindre la taille du multiplexe nécessaire. La méthode est donc construite sur la base d'un arbre décisionnelle qui dirige l'analyse en fonction de ce qui est détecté dans l'échantillon. En opposition aux approches ciblées classiques, ce mode d'acquisition permet de suivre certains composés précis au sein d'un grand nombre au lieu de suivre l'ensemble possible.

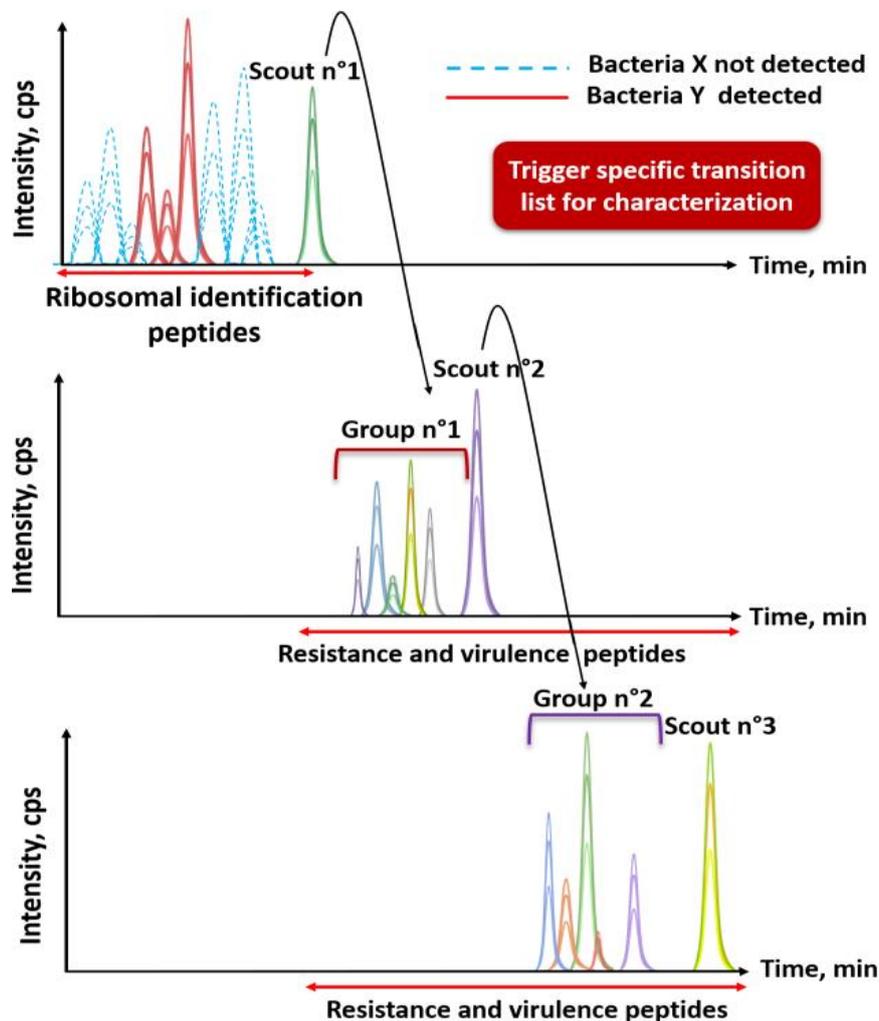


Figure 99 : Schéma de fonctionnement du nouveau principe d'acquisition. La première partie du gradient de séparation est réservée à la présence de peptides rapporteurs des protéines ribosomiques. Ces peptides sont considérés comme des scouts qui lorsqu'ils seront détectés déclencheront une sous-méthode associée à la bactérie. Dans le cas présenté, au moment de la détection de la combinaison de peptides (minimum 2) de la bactérie Y (rouge), la méthode associée est à ce moment-là lancée. Celle-ci permet par la suite le suivi sous plusieurs groupes de peptides permettant la confirmation de l'identification, ainsi que la caractérisation des mécanismes de virulence de la souche bactérienne (Adaptée du brevet n° FR2000471, « Procédé d'identification et de caractérisation d'une population microbienne par spectrométrie de masse »).

Dans la seconde partie de l'analyse, les transitions suivies permettront la caractérisation plus fine la bactérie. Des peptides rapporteurs des protéines ribosomiques supplémentaires sont recherchés afin de confirmer l'identification. De plus, ces peptides peuvent servir de nœud décisionnel pour la suite de l'analyse ainsi que de normalisateur interne pour la quantification relative. C'est d'ailleurs pourquoi il est essentiel d'avoir des peptides ribosomiques répartis de manière homogène sur l'intégralité du gradient chromatographique. Associés à ces peptides, on retrouve l'ensemble des peptides rapporteurs des mécanismes de résistance et virulence. Il est donc possible de suivre un arbre décisionnel préétabli pour affiner de plus en plus l'analyse et suivre un nombre très important de transitions à travers la méthode.

2. Précision dans l'architecture de la méthode

Pour une plus grande robustesse de l'analyse, chaque peptide relatif à l'identification et à chaque nœud de l'arbre est présent par pair, élué au même temps de rétention. De ce fait, quand une mutation apparaît sur un de ces peptides, l'analyse est en mesure de continuer. Afin de contrebalancer la présence d'interférence, tout déclenchement de décision dans la méthode dépend de la détection d'un minimum de 2 transitions du peptide au-dessus d'un seuil d'intensité pré établi. Cela permet de s'affranchir d'un déclenchement inopportun dans l'analyse.

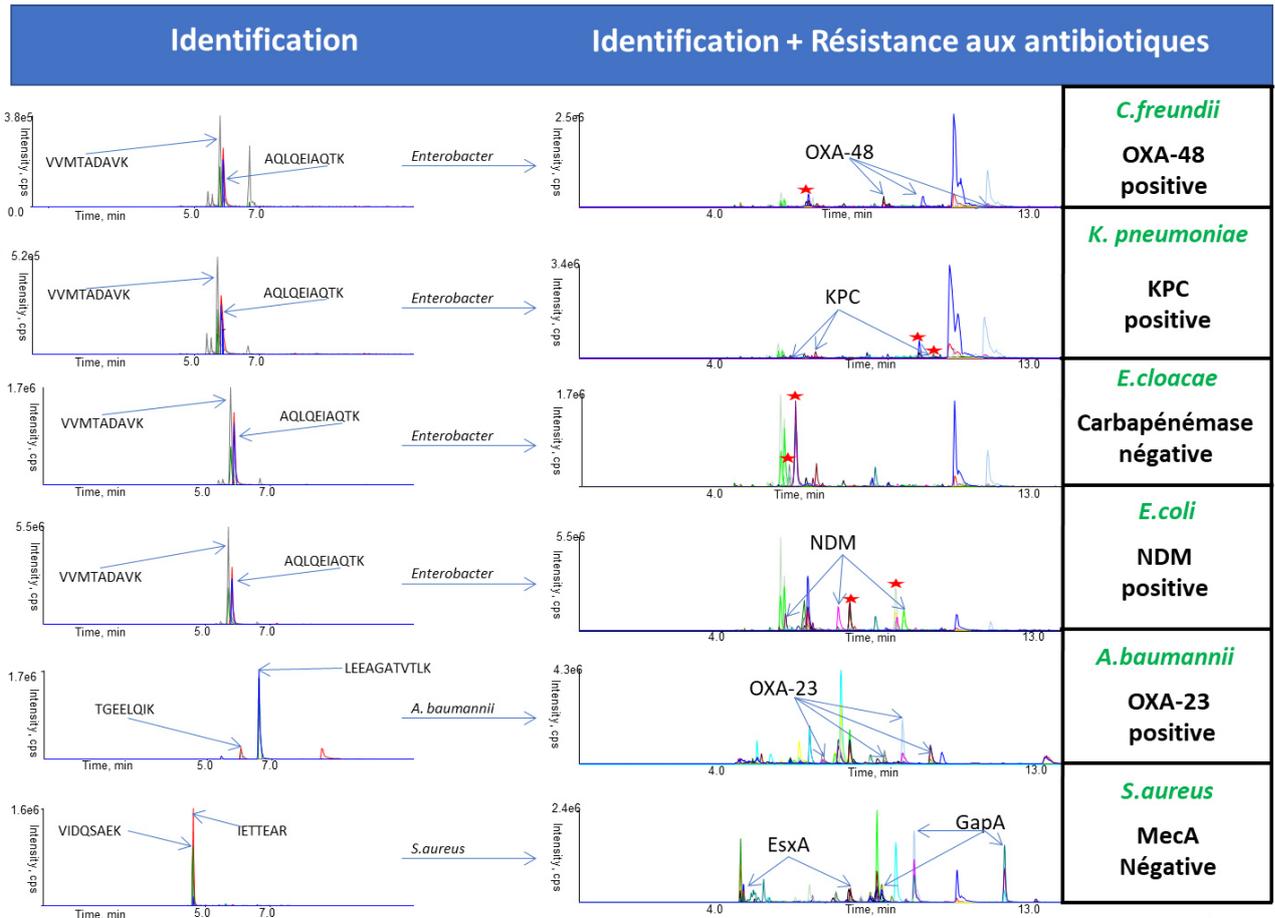
Il est préférable que la majeure partie des peptides spécifiques aux mécanismes de résistances soient distribués dans la seconde partie du gradient. Cependant, certains peptides rapporteurs de mécanismes peuvent être élués dans les premières minutes. Dans la grande majorité des cas, le nombre de peptides spécifiques en seconde partie est suffisant et les premiers peptides peuvent être éliminés. Toutefois, certains de ces peptides sont déterminants, car ils permettent de mettre en évidence une activité différente pour un mécanisme, ou permettre d'identifier un variant important. Dans ce cas précis, ils sont alors inscrits dans le groupe d'identification, mais ne vont pas impacter l'évolution en temps réel de l'analyse.

B. Preuve de concept

Une preuve de concept pour la viabilité de ce nouveau mode d'acquisition a été développée sur des hémocultures de synthèses à l'aide du protocole de préparation d'échantillon présenté dans ce chapitre. L'expérience a pour but de montrer la possibilité d'accomplir une identification précoce en début d'analyse pour permettre par la suite une caractérisation de la résistance aux antibiotiques lors d'une approche unique. La technologie d'arbre décisionnelle étant en cours de développement par la société Sciex, la preuve de concept a été réalisée sur une méthode Scout MRM. Le premier groupe de transitions correspond aux peptides ribosomiques utilisés pour l'identification précoce de l'espèce ou de la famille bactérienne. La suite du gradient est découpée par des composés Scouts spécifiques, non présents chez les bactéries, ajoutés en fin de préparation d'échantillon.

Les hémocultures ont été créées à partir de souches bactériennes issues de billes de conservations, fournies par l'Hôpital de la Croix-Rousse à Lyon. Ces souches avaient été préalablement caractérisées par MALDI-TOF dans le but d'assurer leurs identités et des séquençages ont été réalisés pour définir les mécanismes de résistances présents. Les premières analyses comprenaient 6 espèces différentes (*C. freundii*, *K. pneumonia*, *E. Cloacae*, *E. coli*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*). Pour ces différentes espèces les mécanismes identifiés par séquençage étaient : OXA-48, KPC, NDM et OXA-23. Deux souches bactériennes, *S. aureus* et *E. coli* ne présentaient pas de mécanismes de résistances recherchés.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 100.



★ Espèce – Peptides ribosomiques spécifiques

Figure 100 : Récapitulatif des analyses réalisées pour la preuve de concept. À gauche est représentée la partie identification de l'analyse qui s'effectue entre 4.5 et 7 minutes. En fonction des peptides détectés, l'identification est réalisée. Dans les 4 premières analyses, les peptides VVMTADAVK et AQLQEIAQTK permettent de déterminer l'appartenance à la famille des entérobactéries. L'identification fine est alors réalisée dans la seconde partie de l'analyse avec la présence de peptides spécifiques à l'espèce (étoiles rouges).

Les analyses ont été réalisées en aveugle pour démontrer la spécificité de la méthode. La présentation des résultats est séparée en deux parties, correspondant aux deux étapes qui structurent l'analyse, avec à gauche, l'étape d'identification préalable de début de gradient, effectuée par la détection des peptides rapporteurs des protéines ribosomiques. L'étape de dessalage en ligne augmente le temps mort de l'analyse, le portant à 4 minutes. L'identification s'opère alors sur les 3 premières minutes du gradient entre 4,5 minutes et 7 minutes. Dans les 4 premiers exemples, la bactérie appartient à la famille des entérobactéries et est identifiée par la présence des deux peptides VVMTADAVK et AQLQEIAQTK. Dans le cas de la méthode finale, la présence des deux peptides enclencherait la sous-méthode associée à la famille pour la suite de l'analyse. Cette sous-méthode (partie droite de la figure) comprend des peptides scouts associés à des groupes de transitions

spécifiques des mécanismes de résistances et de confirmation d'identification. Pour le développement de la preuve de concept, la méthode Scout englobe l'ensemble des transitions suivies, les sous-méthodes ne pouvant pas encore être utilisées.

Toutefois, pour la famille des entérobactéries, il est difficile, compte tenu de la grande similarité génétique, d'identifier directement les espèces composant cette famille. Le choix a été d'identifier la famille au sens large, puis de diriger l'analyse vers une sous méthode, comprenant des peptides permettant d'affiner l'identification (Figure 4). Ces peptides spécifiques sont représentés par une étoile rouge dans la seconde partie de l'analyse. Actuellement, cette identification tardive n'est pas contraignante, car les mécanismes de résistances sont partagés par la plupart des espèces de la famille, ce qui n'engendre pas une augmentation massive de la capacité de multiplexage requise. En revanche, si des mécanismes uniques à chaque espèce venaient à être ajoutés, il faudrait faire en sorte d'effectuer une identification préalable plus précise afin de pouvoir diviser l'analyse en diverses sous-méthodes. Une autre possibilité serait de suivre de façon globale les mécanismes communs et de séparer spécifiquement vers une nouvelle branche de l'analyse une fois la présence de peptides spécifiques détectés. Dans les exemples présentés ci-dessus, la présence de deux peptides spécifiques permet dans chaque cas d'affiner l'identification vers l'espèce bactérienne présente, ce qui a permis de fournir une identification juste. La méthode a aussi permis dans l'intégralité des essais d'identifier la présence ou l'absence des mécanismes de résistances attendus.

Pour la 5^e analyse, la présence des deux peptides TGEELQIK et LEEAGATVTLK conduit à l'identification de *A. baumannii*. La suite de l'analyse permet le suivi des mécanismes de résistance associés à l'espèce. Il est alors possible d'identifier la présence du mécanisme OXA-23.

La dernière souche correspond à une *S. aureus* identifié par VIDQSAEK et IETTEAR. L'absence des pics correspondant aux peptides rapporteurs de MecA permet de caractériser la souche comme MSSA, ce qui était le résultat attendu. La présence de protéines tierces comme EsxA (porine) et GapA (métabolisme du glucose et impliqué dans la virulence²⁴²) sont observés. Cependant, il est à noter l'absence sur le chromatogramme reconstitué de peptides

rapporteurs de toxines pour lesquelles l'analyse en hémoculture, à $t=0$, dans les conditions actuelles, semble compromise.

Ces expériences prouvent la possibilité d'accomplir une analyse sans *a priori*. Grâce à l'adaptation en temps réel *via* la détection rapide de peptides ribosomiques spécifiques, il est possible d'orienter l'analyse vers la caractérisation des mécanismes de résistance.

VI. Conclusion et perspectives

Ce chapitre a présenté le développement et la création d'une preuve de concept permettant l'identification et la caractérisation de la résistance d'une souche bactérienne, sans *a priori*, dans une hémoculture en moins d'une heure par LC-MS/MS. L'ensemble de l'approche se base sur l'utilisation d'un mode d'acquisition issu de Scout-MRM permettant une augmentation importante de la capacité de multiplexage ainsi qu'une adaptation de l'analyse en temps réel en fonction des composés présents dans l'échantillon. Les premiers résultats obtenus ont montré que la stratégie utilisée a permis l'identification de plus de 11 espèces bactériennes différentes composant le groupe ESKAPE. La méthode a été focalisée dans un premier temps sur les mécanismes prépondérants et considérés comme prioritaires. Elle permet de couvrir les carbapénèmases (VIM, NDM, KPC, OXA-48), céphalosporinases (AMPC, CMY, DHA) pénicillinases (SHV, TEM, GES) et les BLSE (CTX-M, IMP, OXA-1, OXA2, OXA-10, Oxy, PER, VEB), MecA pour *S. aureus* et OXA-23 pour *A. baumannii*.

Cependant, à ce stade de l'approche, la caractérisation de la virulence chez *S. aureus* est limitée, notamment dans le cas des toxines principales (HLA, HLD, HLGA, B, C et les leukocidines à deux composantes). Un compromis entre vitesse de croissance et information sur la virulence est imposé par l'utilisation de milieu de culture à croissance rapide. Cette problématique concerne principalement *S. aureus*, mais se doit d'être vérifié pour les autres bactéries exprimant des toxines, comme *E.coli* ou *P. aeruginosa*.

À la suite de cette preuve de concept, le projet RHU (Recherche hospitalo-universitaire) IDBIORIV porté par l'Institut des agents infectieux des Hospices Civils de Lyon/Centre international de recherche en infectiologie (Prof. F. Vandenesch), l'Institut des Sciences Analytiques (Prof. J. Lemoine) de l'Université Claude Bernard Lyon 1 et la société SCIEX a été déposé à l'ANR et financé par la suite. L'objectif du projet (durée de 5 ans) est de développer des nouveaux outils de diagnostic ultrarapide dans les infections, en détectant en moins d'une heure les résistances et la virulence des bactéries. Afin de pouvoir réaliser cet objectif, il sera indispensable de faire évoluer l'approche sur de nombreux points. Le premier est l'établissement de banques de données contenant l'intégralité de l'information en lien avec l'identification et les mécanismes de résistances aux antibiotiques. Ces banques ont pour but

de permettre la réalisation de l'ensemble des sous-méthodes nécessaire à la construction de l'arbre décisionnel. Il est essentiel que l'approche couvre la totalité des espèces et des mécanismes de résistances aux antibiotiques prépondérants retrouvés dans les infections nosocomiales. A l'heure actuelle, la méthode comporte plus de 300 peptides reliés à l'identification et 300 peptides pour les mécanismes de résistances. De plus, de nombreuses pistes d'amélioration des protocoles de préparation d'échantillon sont réfléchies. Notamment, pour augmenter l'efficacité de la lyse bactérienne ainsi que pour permettre l'automatisation de la préparation d'échantillon.

Conclusion générale

Le premier objectif de la thèse a été de créer une méthode ayant pour but de quantifier 50 mécanismes de virulence chez *S. aureus*. L'approche a été développée dans l'optique d'une application clinique, dont les principales contraintes analytiques reposent sur le temps, la quantification, le multiplexage et la simplicité de mise en place. Nous avons pu montrer dans ces travaux de thèse que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) permettait en moins d'une heure l'analyse ciblée et une quantification multiplexée importante de 163 peptides (469 transitions). En effet, l'utilisation d'une géométrie de type triple quadripôle et du mode d'acquisition MRM permettent d'obtenir une quantification très robuste et spécifique, nécessaire pour ce type d'études.

Le premier axe de travail pour l'élaboration de l'approche sur *S. aureus* a été la diminution du temps requis pour obtenir l'information souhaitée depuis l'échantillon bactérien. L'ensemble de la procédure repose majoritairement sur la préparation d'échantillon ainsi que sur l'analyse en elle-même. Dans le cas d'analyses ciblées, la durée des méthodes sont généralement inférieures à 30 minutes, avec des gradients plus ou moins courts, en fonction du nombre de protéines a étudié. En conséquence, afin de maintenir le temps total en moins d'une heure, la préparation d'échantillon dans son ensemble ne peut excéder 30 minutes. Or, c'est une étape qui demande beaucoup de temps pour la réalisation de ses multiples composantes (lyse, dénaturation, digestion, purification). La principale optimisation dans ces travaux de thèse a été de réaliser les étapes de lyse et de digestion simultanément dans un bain à ultrason thermostaté à 50 °C. La température importante associée aux ultrasons a permis l'extraction des peptides d'intérêt en seulement 10 min. Par ailleurs, il a été noté que pour un grand nombre de protéines, une digestion de 2 minutes à 50°C suffit à les détecter, ce qui pourrait être employé pour des méthodes d'identification rapides *via* l'analyse des protéines ribosomiques présentes en grandes quantités. Ces temps courts sont en revanche incompatibles avec des méthodes de quantification, car ils entraînent une perte significative de robustesse de la méthode. Une seconde source de gain consiste en l'élimination des étapes contraignantes de la dénaturation et de l'alkylation. Ce choix permet de gagner plus d'une

heure de temps de préparation avec comme seule contrepartie l'impossibilité d'analyser des peptides comportant une cystéine. La dernière étape d'optimisation est la réalisation de l'étape de SPE directement en ligne, ce qui permet un gain de plusieurs heures par rapport à une SPE classique. Cependant, la SPE en ligne ne sera pas aussi efficace qu'une SPE classique, ce qui force une injection d'un volume d'échantillon plus important (40 à 80 μL) pour une sensibilité égale (absence d'étape de pré-concentration). De ce fait, l'encrassement de l'appareillage s'en retrouve accéléré. Il est nécessaire de diminuer le volume digéré et injecté pour ne pas encrasser l'appareillage trop rapidement (~ 300 échantillons), mais la sensibilité s'en retrouve elle aussi diminuée.

Le second axe de développement est l'aspect quantitatif de la méthode. Pour des raisons de simplicité et de coût de la méthode, la quantification relative a été choisie pour notre approche. L'utilisation des protéines ribosomiques comme normalisateurs internes permet de comparer directement l'expression des toxines entre les souches de *S. aureus* et ouvre une nouvelle dimension d'analyse et d'interprétation. C'est une caractéristique importante de la méthode qui offrira une complémentarité très intéressante aux approches génomiques déjà mises en place. Ce type d'approche demande cependant la maîtrise d'un grand nombre de paramètres qui vont influencer la quantification, comme les écarts de temps de digestion, le ratio échantillon/trypsine, les effets matrices, ainsi que les conditions de culture comme la nature du milieu et le temps de croissance. C'est pourquoi il a été nécessaire de mettre en place des outils de contrôle comme les ratios entre les peptides et les ratios des protéines ribosomiques afin d'obtenir des informations pertinentes. La méthode ainsi créée est très robuste sur les protéines suivies avec des CV inférieurs à 20 % et permet d'établir des profils d'expression des facteurs de virulence d'intérêt. Grâce à ces profils, il est envisageable de distinguer des différences d'expression entre 2 souches, au-delà d'un facteur 2. Les résultats obtenus lors d'analyses de souches de *S. aureus* mettent en évidence des différences d'expression s'étendant sur plus de 3 décades, démontrant par la même occasion que la quantification est en adéquation avec les différences observables.

En parallèle du développement de la méthode, il a été indispensable de penser méthodiquement le retraitement des données des analyses. En effet, devant la complexité des échantillons et du grand nombre de données générées, il a été nécessaire de mettre en

place une solution spécifique de retraitement automatique ainsi que des outils de validation post-analytiques (TVA, ratio de peptide ...). La solution a été développée à l'aide des logiciels Knime et MultiQuant pour permettre un retraitement spécifique à chaque peptide de la méthode. Cette base de travail a conduit à la création d'un logiciel, en cours de développement par une entreprise spécialisée. Celui-ci aura pour but de permettre la mise en place d'un système d'amélioration continu de la méthode avec une optimisation au cours du temps de l'intégralité des filtres.

La qualité analytique de l'approche a été validée à plus grande échelle grâce à l'analyse d'une cohorte de 300 souches cliniques de *S. aureus*. L'étude a confirmé l'importance des conditions pré-analytique (milieu de culture, temps de croissance) dans l'étude de la virulence et l'impact significatif sur les informations obtenues. L'évaluation de la méthode a montré une très bonne spécificité et sensibilité, et a confirmé que la robustesse de la méthode est cohérente avec les variations d'expression observées sur une grande cohorte de souches bactériennes. De plus, la réalisation de séquençages et d'analyses protéomiques simulées a permis de corriger des problèmes d'analyse et de retraitement tout en améliorant la méthode par l'ajout de 60 peptides pour couvrir les principaux variants rencontrés. En effet, la construction des méthodes ciblées se base essentiellement sur les bases de données où très peu de variants sont recensés. Ces processus sont les premières étapes pour l'amélioration continue que requiert ce type de méthodes. La cohorte a également permis de valider l'approche quantitative au niveau biologique, avec l'observation de corrélations attendues entre l'expression de certains facteurs de virulence. De plus, lors de cette étude, il a été possible de mettre en évidence l'étendue de la gamme dynamique de concentration, s'étalant sur près de 6 décades, confirmant la pertinence et l'intérêt de la réalisation de profils d'expression.

La méthode semi quantitative sur *S. aureus* est une base solide pour des études approfondies de la virulence des souches de *S. aureus* et pour compléter les informations obtenues lors d'études génomiques. Par exemple, grâce aux profils d'expression collectés lors de l'analyse de la cohorte et des données cliniques associées, il serait possible de relier l'expression de certains facteurs à la mortalité ou à la sévérité de la souche. Au-delà des résultats présentés dans ce mémoire, la méthode a également été employée pour la caractérisation de la régulation de la virulence en présence d'un plasmide spécifique dans des souches de

référence. Grâce à l'aspect quantitatif, la méthode est un outil pour accroître nos connaissances sur divers points impactant les souches bactériennes. La méthode a ainsi été appliquée à différentes études, comme la détermination de la régulation de la virulence en présence ou non d'un plasmide spécifique dans des souches de références, ou encore celle de l'impact d'un composé dans le milieu de culture.

La suite logique de cette première approche focalisée sur la virulence est l'application au diagnostic clinique. En effet, la réalisation de tests de diagnostics rapides directement en hémoculture est un des aspects essentiels dans le combat contre les infections bactériennes. C'est pourquoi la seconde partie de la thèse a été dédiée à la transposition de l'approche effectuée sur *S. aureus* aux bactéries du groupe ESKAPE. L'objectif de la méthode est de permettre l'identification de l'espèce et du genre ainsi que des principaux mécanismes de résistances directement à partir d'hémocultures en moins d'une heure. Pour ce faire, une méthode Scout-MRM a été développée permettant l'analyse d'un grand nombre de protéines sans se soucier des décalages en temps de rétention (effets matrices). Après de nouvelles étapes de choix et validations de peptides pour l'identification (peptides ribosomiques) et les mécanismes de résistances aux antibiotiques, le protocole a été ajusté pour travailler en milieu sanguin en maintenant un temps total inférieur à une heure. Ce protocole a été appliqué lors de l'analyse de 63 hémocultures de synthèse et a permis de valider la viabilité de ce genre d'approche avec une spécificité parfaite pour l'identification. Le principal avantage de cette méthode unique est de fournir l'ensemble de l'information souhaitée, contrairement aux méthodes mises en place actuellement qui requièrent par ailleurs un temps trop important (entre 6 et 36 h). L'évolution suivante de la méthode est l'analyse de l'ensemble des bactéries avec la totalité des mécanismes de résistances d'intérêt. Deux solutions sont alors possibles : soit on augmente le multiplexage afin d'analyser l'ensemble des protéines, soit on utilise une voie alternative. Dans cette optique, toute une réflexion a été menée entre l'équipe et la société Sciex® afin de proposer un pilotage de la méthode Scout-MRM en temps réel en fonction des protéines sentinelles détectées (brevet n° FR2000471, « Procédé d'identification et de caractérisation d'une population microbienne par spectrométrie de masse »). Le mode de pilotage sous forme d'arbre décisionnel permet une adaptation en temps réel de l'analyse en fonction de la détection de

composés d'intérêt. Il en résulte alors une démultiplication de la capacité de multiplexage de la méthode. La preuve de concept effectué durant ces travaux de thèse a permis d'assurer le fonctionnement d'une telle approche.

Néanmoins, des limitations concernant l'expression des facteurs de virulence comme les toxines chez *S. aureus* dans les hémocultures subsistent. Il serait possible de pallier ce problème en changeant le milieu contenu dans les hémocultures ou en laissant incuber quelques heures supplémentaires l'échantillon pour des patients atteints de sepsis à *S. aureus* graves. Les mécanismes inductibles sont aussi un problème, car l'absence de l'inducteur entraîne une non- ou une sous-expression du mécanisme. Certaines expériences réalisées avec le gène *MecA* montrent cependant qu'il est possible d'induire rapidement l'expression du gène. La dernière limitation concerne le manque de connaissances sur les modifications post-traductionnelles que peuvent subir les protéines, ce qui peut induire des biais dans l'analyse.

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse ont ouvert la voie à la création d'un projet RHU (Recherche Hospitalo-Universitaire en santé 4^{ème} édition) entre la société Sciex, les Hospices civils de Lyon et l'Université Claude-Bernard Lyon 1, subventionné par le programme d'investissement d'avenir de l'Agence nationale de la recherche. L'objectif est de créer et mettre en place une solution innovante clé en main dans les hôpitaux pour le diagnostic rapide des infections bactériennes. Le logiciel de retraitement automatique a été construit pour cette nouvelle méthode et devrait être testé très prochainement. Cependant, de nombreuses étapes restent à franchir, notamment avec la validation à grande échelle, directement à l'hôpital. En parallèle, une étude sera menée pour fournir un algorithme permettant de relier l'expression des différents mécanismes d'une souche à sa CMI réelle, permettant potentiellement de s'affranchir dans le futur de la réalisation d'antibiogrammes.

Valorisation

1] Dépôt de brevet pour le pilotage de la méthode Scout-MRM en temps réel en fonctions des protéines sentinelles détectées lors de l'analyse.

Brevet n° FR2000471, « Procédé d'identification et de caractérisation d'une population microbienne par spectrométrie de masse ».

Jérôme Lemoine, Romain Carrière and Nicolas Mouton.

2] Oral à l'European Mass Spectrometry Conference (EMSC) 2018, Saarbrücken Allemagne.

Characterization of the virulome of *Staphylococcus aureus* by a highly multiplexed approach with Scout-MRM.

Nicolas Mouton, Romain Carrière , Sophie Ayciriex, Fabien Chirot, François Vandenesch and Jérôme Lemoine.

3] Oral à Mass Spectrometry & Advances in the Clinical Lab (MSACL), 2018, Salzburg Autriche.

Characterization of the virulome of *Staphylococcus aureus* and application to blood culture sample for carbapenemase (Oxa, Ampc, KPC)

Nicolas Mouton, Romain Carrière , Olivier Dauwalder, Sophie Ayciriex, Fabien Chirot, François Vandenesch and Jérôme Lemoine.

4] Article en cours de soumissions, ACS : Infectious Diseases

Streamlined antimicrobial resistance detection directly from blood culture with multiplexed Scout-MRM-based targeted mass spectrometry assay.

Nicolas Mouton^{1,‡}, Romain Carrière^{1,‡}, Frédéric Robin^{2,3,4}, Laurent Dortet^{5,6,7}, Patrick Plésiat^{8,9}, Olivier Dauwalder¹⁰, Sophie Ayciriex¹, Fabien Chirot¹, François Vandenesch^{10,11} and Jérôme Lemoine^{1,*}.

5] Articles scientifiques futures sur les résultats concernant les facteurs de virulence et leurs corrélations avec les données cliniques, ainsi que sur l'impact de l'ajout d'un plasmide impactant la régulation de la virulence chez *S. aureus*. Données en lien avec le Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI).

Nicolas Mouton, Marianne Pivard, Sylvère Bastient, Sophie Ayciriex, Fabien Chirot, François Vandenesch and Jérôme Lemoine.

Bibliographie

- (1) Economic Effects of Coronavirus Outbreak (COVID-19) on the World Economy by Nuno Fernandes :: SSRN https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3557504 (accessed Mar 30, 2020).
- (2) OMS | Premier rapport de l’OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d’ampleur mondiale <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/> (accessed Apr 9, 2020).
- (3) Kohanski, M. A.; DePristo, M. A.; Collins, J. J. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. *Mol. Cell* **2010**, *37* (3), 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>.
- (4) Rhodes, A.; Evans, L. E.; Alhazzani, W.; Levy, M. M.; Antonelli, M.; Ferrer, R.; Kumar, A.; Sevransky, J. E.; Sprung, C. L.; Nunnally, M. E.; Rochwerg, B.; Rubenfeld, G. D.; Angus, D. C.; Annane, D.; Beale, R. J.; Bellingham, G. J.; Bernard, G. R.; Chiche, J.-D.; Coopersmith, C.; De Backer, D. P.; French, C. J.; Fujishima, S.; Gerlach, H.; Hidalgo, J. L.; Hollenberg, S. M.; Jones, A. E.; Karnad, D. R.; Kleinpell, R. M.; Koh, Y.; Lisboa, T. C.; Machado, F. R.; Marini, J. J.; Marshall, J. C.; Mazuski, J. E.; McIntyre, L. A.; McLean, A. S.; Mehta, S.; Moreno, R. P.; Myburgh, J.; Navalesi, P.; Nishida, O.; Osborn, T. M.; Perner, A.; Plunkett, C. M.; Ranieri, M.; Schorr, C. A.; Seckel, M. A.; Seymour, C. W.; Shieh, L.; Shukri, K. A.; Simpson, S. Q.; Singer, M.; Thompson, B. T.; Townsend, S. R.; Van der Poll, T.; Vincent, J.-L.; Wiersinga, W. J.; Zimmerman, J. L.; Dellinger, R. P. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit. Care Med.* **2017**, *45* (3), 486–552. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002255>.
- (5) de Kraker, M. E. A.; Davey, P. G.; Grundmann, H.; BURDEN study group. Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. *PLoS Med.* **2011**, *8* (10), e1001104. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001104>.
- (6) Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K. M.; Wertheim, H. F. L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H.; Greko, C.; So, A. D.; Bigdeli, M.; Tomson, G.; Woodhouse, W.; Ombaka, E.; Peralta, A. Q.; Qamar, F. N.; Mir, F.; Kariuki, S.; Bhutta, Z. A.; Coates, A.; Bergstrom, R.; Wright, G. D.; Brown, E. D.; Cars, O. Antibiotic Resistance-the Need for Global Solutions. *Lancet Infect Dis* **2013**, *13* (12), 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).
- (7) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908 <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/summary/> (accessed Aug 28, 2020).
- (8) Une Découverte Oubliée : La Thèse de Médecine Du Docteur Ernest Duchesne (1874-1912).

- (9) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1939 <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1939/summary/> (accessed Aug 28, 2020).
- (10) Abraham, E. P.; Newton, G. G. F. The Structure of Cephalosporin C. *Biochem J* **1961**, *79* (2), 377–393.
- (11) M. Awad, H.; Y. I. EL-Shahed, K.; Aziz, R.; Sarmidi, M. R.; A. El-Enshasy, H. Antibiotics as Microbial Secondary Metabolites: Production and Application. *Jurnal Teknologi* **2013**, *59* (1). <https://doi.org/10.11113/jt.v59.1593>.
- (12) Gaynor, M.; Mankin, A. S. Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2003**, *3* (9), 949–960. <https://doi.org/10.2174/1568026033452159>.
- (13) Bartholomew, J. W.; Mittwer, T. THE GRAM STAIN. *Bacteriol Rev* **1952**, *16* (1), 1–29.
- (14) Kardos, N.; Demain, A. L. Ernst Chain: A Great Man of Science. *Appl Microbiol Biotechnol* **2013**, *97* (15), 6613–6622. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5017-4>.
- (15) Kaasgaard, S. G.; Poulsen, P. B. Production of Beta-Lactams: A Mixture of Organic Synthesis Processes and Enzymatic Processes. In *Bioorganic Chemistry in Healthcare and Technology*; Pandit, U. K., Alderweireldt, F. C., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1991; pp 149–160. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1354-0_12.
- (16) Van Boeckel, T. P.; Gandra, S.; Ashok, A.; Caudron, Q.; Grenfell, B. T.; Levin, S. A.; Laxminarayan, R. Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: An Analysis of National Pharmaceutical Sales Data. *The Lancet Infectious Diseases* **2014**, *14* (8), 742–750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7).
- (17) Deshpande, A.; Baheti, K.; Chatterjee, N. Degradation of β -Lactam Antibiotics. *Current Science* **2004**, *87*.
- (18) Kong, K.-F.; Schneper, L.; Mathee, K. Beta-Lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology: BETA-LACTAM RESISTANCE. *APMIS* **2010**, *118* (1), 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>.
- (19) Pitout, J. D. D.; Laupland, K. B. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: An Emerging Public-Health Concern. *Lancet Infect Dis* **2008**, *8* (3), 159–166. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0).
- (20) Livermore, D. M.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G. M.; Arlet, G.; Ayala, J.; Coque, T. M.; Kern-Zdanowicz, I.; Luzzaro, F.; Poirel, L.; Woodford, N. CTX-M: Changing the Face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59* (2), 165–174. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl483>.
- (21) Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74* (3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>.
- (22) Saga, T.; Yamaguchi, K. History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. **2009**, *52* (2), 6.
- (23) Davies, J. Origins, Acquisition and Dissemination of Antibiotic Resistance Determinants; 2007; pp 15–35. <https://doi.org/10.1002/9780470515358.ch2>.

- (24) Nikaido, H. Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. *Science* **1994**, *264* (5157), 382–388. <https://doi.org/10.1126/science.8153625>.
- (25) Fajardo, A.; Martínez-Martín, N.; Mercadillo, M.; Galán, J. C.; Ghysels, B.; Matthijs, S.; Cornelis, P.; Wiehlmann, L.; Tümmler, B.; Baquero, F.; Martínez, J. L. The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. *PLoS ONE* **2008**, *3* (2), e1619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001619>.
- (26) Thomas, C. M.; Nielsen, K. M. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>.
- (27) Zienkiewicz, M.; Kern-Zdanowicz, I.; Gołębiewski, M.; Zylińska, J.; Mieczkowski, P.; Gniadkowski, M.; Bardowski, J.; Cegłowski, P. Mosaic Structure of P1658/97, a 125-Kilobase Plasmid Harboring an Active Amplicon with the Extended-Spectrum Beta-Lactamase Gene BlaSHV-5. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (4), 1164–1171. <https://doi.org/10.1128/AAC.00772-06>.
- (28) Munita, J. M.; Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* **2016**, *4* (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- (29) Pagès, J.-M.; James, C. E.; Winterhalter, M. The Porin and the Permeating Antibiotic: A Selective Diffusion Barrier in Gram-Negative Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6* (12), 893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>.
- (30) Poole, K. Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56* (1), 20–51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>.
- (31) Yasufuku, T.; Shigemura, K.; Shirakawa, T.; Matsumoto, M.; Nakano, Y.; Tanaka, K.; Arakawa, S.; Kinoshita, S.; Kawabata, M.; Fujisawa, M. Correlation of Overexpression of Efflux Pump Genes with Antibiotic Resistance in Escherichia Coli Strains Clinically Isolated from Urinary Tract Infection Patients. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49* (1), 189–194. <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-10>.
- (32) Leclercq, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34* (4), 482–492. <https://doi.org/10.1086/324626>.
- (33) Dönhöfer, A.; Franckenberg, S.; Wickles, S.; Berninghausen, O.; Beckmann, R.; Wilson, D. N. Structural Basis for TetM-Mediated Tetracycline Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109* (42), 16900–16905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208037109>.
- (34) Bonomo, R. A. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>.
- (35) Hiramatsu, K.; Ito, T.; Tsubakishita, S.; Sasaki, T.; Takeuchi, F.; Morimoto, Y.; Katayama, Y.; Matsuo, M.; Kuwahara-Arai, K.; Hishinuma, T.; Baba, T. Genomic Basis for Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus. *Infect Chemother* **2013**, *45* (2), 117–136. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.2.117>.
- (36) Massova, I.; Mobashery, S. Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42* (1), 1–17.

- (37) Medeiros, A. A. Evolution and Dissemination of Beta-Lactamases Accelerated by Generations of Beta-Lactam Antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24 Suppl 1*, S19-45. https://doi.org/10.1093/clinids/24.supplement_1.s19.
- (38) Perez, F.; Endimiani, A.; Hujer, K. M.; Bonomo, R. A. The Continuing Challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* **2007**, *7* (5), 459–469. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.08.003>.
- (39) Bush, K.; Jacoby, G. A. Updated Functional Classification of Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.
- (40) Jacoby, G. A. β -Lactamase Nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, *50* (4), 1123–1129. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1123-1129.2006>.
- (41) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three Decades of Beta-Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (1), 160–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>.
- (42) Paterson, D. L.; Bonomo, R. A. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: A Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18* (4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.
- (43) Bauernfeind, A.; Grimm, H.; Schweighart, S. A New Plasmidic Cefotaximase in a Clinical Isolate of Escherichia Coli. *Infection* **1990**, *18* (5), 294–298. <https://doi.org/10.1007/bf01647010>.
- (44) Bonnet, R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. *AAC* **2004**, *48* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>.
- (45) Cantón, R.; González-Alba, J. M.; Galán, J. C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* **2012**, *3*, 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>.
- (46) Coque, T. M.; Novais, A.; Carattoli, A.; Poirel, L.; Pitout, J.; Peixe, L.; Baquero, F.; Cantón, R.; Nordmann, P. Dissemination of Clonally Related Escherichia Coli Strains Expressing Extended-Spectrum Beta-Lactamase CTX-M-15. *Emerging Infect. Dis.* **2008**, *14* (2), 195–200. <https://doi.org/10.3201/eid1402.070350>.
- (47) D’Andrea, M. M.; Arena, F.; Pallecchi, L.; Rossolini, G. M. CTX-M-Type β -Lactamases: A Successful Story of Antibiotic Resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, *303* (6–7), 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>.
- (48) Zhao, W.-H.; Hu, Z.-Q. Epidemiology and Genetics of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases in Gram-Negative Bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **2013**, *39* (1), 79–101. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>.
- (49) Doi, Y.; Park, Y. S.; Rivera, J. I.; Adams-Haduch, J. M.; Hingwe, A.; Sordillo, E. M.; Lewis, J. S.; Howard, W. J.; Johnson, L. E.; Polsky, B.; Jorgensen, J. H.; Richter, S. S.; Shutt, K. A.; Paterson, D. L. Community-Associated Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia Coli Infection in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56* (5), 641–648. <https://doi.org/10.1093/cid/cis942>.
- (50) Smet, A.; Martel, A.; Persoons, D.; Dewulf, J.; Heyndrickx, M.; Claeys, G.; Lontie, M.; Van Meensel, B.; Herman, L.; Haesebrouck, F.; Butaye, P. Characterization of

- Extended-Spectrum Beta-Lactamases Produced by Escherichia Coli Isolated from Hospitalized and Nonhospitalized Patients: Emergence of CTX-M-15-Producing Strains Causing Urinary Tract Infections. *Microb. Drug Resist.* **2010**, *16* (2), 129–134. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0132>.
- (51) Chaubey, V. P.; Pitout, J. D.; Dalton, B.; Ross, T.; Church, D. L.; Gregson, D. B.; Laupland, K. B. Clinical Outcome of Empiric Antimicrobial Therapy of Bacteremia Due to Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae. *BMC Res Notes* **2010**, *3*, 116. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-116>.
- (52) Guenther, S.; Ewers, C.; Wieler, L. H. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing E. Coli in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Front Microbiol* **2011**, *2*, 246. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00246>.
- (53) Sacha, P.; Ostas, A.; Jaworowska, J.; Wieczorek, P.; Ojdana, D.; Ratajczak, J.; Trynieszewska, E. The KPC Type Beta-Lactamases: New Enzymes That Confer Resistance to Carbapenems in Gram-Negative Bacilli. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2009**, *47* (4), 537–543. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0079-y>.
- (54) Papp-Wallace, K. M.; Bethel, C. R.; Distler, A. M.; Kasuboski, C.; Taracila, M.; Bonomo, R. A. Inhibitor Resistance in the KPC-2 Beta-Lactamase, a Preeminent Property of This Class A Beta-Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (2), 890–897. <https://doi.org/10.1128/AAC.00693-09>.
- (55) Yigit, H.; Queenan, A. M.; Anderson, G. J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J. W.; Steward, C. D.; Alberti, S.; Bush, K.; Tenover, F. C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of Klebsiella Pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>.
- (56) Mushtaq, S.; Ge, Y.; Livermore, D. M. Comparative Activities of Doripenem versus Isolates, Mutants, and Transconjugants of Enterobacteriaceae and Acinetobacter Spp. with Characterized Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (4), 1313–1319. <https://doi.org/10.1128/aac.48.4.1313-1319.2004>.
- (57) Doi, Y.; Paterson, D. L. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Semin Respir Crit Care Med* **2015**, *36* (1), 74–84. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1544208>.
- (58) Anderson, K. F.; Lonsway, D. R.; Rasheed, J. K.; Biddle, J.; Jensen, B.; McDougal, L. K.; Carey, R. B.; Thompson, A.; Stocker, S.; Limbago, B.; Patel, J. B. Evaluation of Methods to Identify the Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45* (8), 2723–2725. <https://doi.org/10.1128/JCM.00015-07>.
- (59) Tsakris, A.; Kristo, I.; Poulou, A.; Themeli-Digalaki, K.; Ikonomidis, A.; Petropoulou, D.; Pournaras, S.; Sofianou, D. Evaluation of Boronic Acid Disk Tests for Differentiating KPC-Possessing Klebsiella Pneumoniae Isolates in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol* **2009**, *47* (2), 362–367. <https://doi.org/10.1128/JCM.01922-08>.
- (60) Tenover, F. C.; Kalsi, R. K.; Williams, P. P.; Carey, R. B.; Stocker, S.; Lonsway, D.; Rasheed, J. K.; Biddle, J. W.; McGowan, J. E.; Hanna, B. Carbapenem Resistance in Klebsiella Pneumoniae Not Detected by Automated Susceptibility Testing. *Emerging Infect. Dis.* **2006**, *12* (8), 1209–1213. <https://doi.org/10.3201/eid1208.060291>.

- (61) Queenan, A. M.; Bush, K. Carbapenemases: The Versatile Beta-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20* (3), 440–458, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.
- (62) Cornaglia, G.; Giamarellou, H.; Rossolini, G. M. Metallo- β -Lactamases: A Last Frontier for β -Lactams? *Lancet Infect Dis* **2011**, *11* (5), 381–393. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1).
- (63) Harris, P. N. A. Clinical Management of Infections Caused by Enterobacteriaceae That Express Extended-Spectrum β -Lactamase and AmpC Enzymes. *Semin Respir Crit Care Med* **2015**, *36* (1), 56–73. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1398387>.
- (64) Jacoby, G. A. AmpC Beta-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (1), 161–182, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>.
- (65) Freitas, F.; Machado, E.; Ribeiro, T. G.; Novais, Â.; Peixe, L. Long-Term Dissemination of Acquired AmpC β -Lactamases among *Klebsiella* Spp. and *Escherichia Coli* in Portuguese Clinical Settings. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *33* (4), 551–558. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1983-9>.
- (66) Reuland, E. A.; Hays, J. P.; Jongh, D. M. C. de; Abdelrehim, E.; Willemsen, I.; Kluytmans, J. a. J. W.; Savelkoul, P. H. M.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; Naiemi, N. al. Detection and Occurrence of Plasmid-Mediated AmpC in Highly Resistant Gram-Negative Rods. *PLOS ONE* **2014**, *9* (3), e91396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091396>.
- (67) Rodríguez-Baño, J.; Miró, E.; Villar, M.; Coelho, A.; Gozalo, M.; Borrell, N.; Bou, G.; Conejo, M. C.; Pomar, V.; Aracil, B.; Larrosa, N.; Agüero, J.; Oliver, A.; Fernández, A.; Oteo, J.; Pascual, A.; Navarro, F. Colonisation and Infection Due to Enterobacteriaceae Producing Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases. *J. Infect.* **2012**, *64* (2), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.11.016>.
- (68) Evans, B. A.; Amyes, S. G. B. OXA β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27* (2), 241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>.
- (69) OMS | Premier rapport de l’OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d’ampleur mondiale <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/> (accessed Mar 30, 2020).
- (70) Felden, B.; Vandenesch, F.; Bouloc, P.; Romby, P. The *Staphylococcus Aureus* RNome and Its Commitment to Virulence. *PLOS Pathogens* **2011**, *7* (3), e1002006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002006>.
- (71) Ma, Y.; Xu, Y.; Yestrepky, B. D.; Sorenson, R. J.; Chen, M.; Larsen, S. D.; Sun, H. Novel Inhibitors of *Staphylococcus Aureus* Virulence Gene Expression and Biofilm Formation. *PLoS ONE* **2012**, *7* (10), e47255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047255>.
- (72) Kurlenda, J.; Grinholc, M. Alternative Therapies in *Staphylococcus Aureus* Diseases. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59* (2), 171–184.
- (73) Cegelski, L.; Marshall, G. R.; Eldridge, G. R.; Hultgren, S. J. The Biology and Future Prospects of Antivirulence Therapies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6* (1), 17–27. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1818>.

- (74) Ogston, A. Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol* **1882**, 16 (Pt 4), 526–567.
- (75) Le Moing, V.; Alla, F.; Doco-Lecompte, T.; Delahaye, F.; Piroth, L.; Chirouze, C.; Tattevin, P.; Lavigne, J.-P.; Erpelding, M.-L.; Hoen, B.; Vandenesch, F.; Duval, X.; VIRSTA study group. Staphylococcus Aureus Bloodstream Infection and Endocarditis--A Prospective Cohort Study. *PLoS ONE* **2015**, 10 (5), e0127385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127385>.
- (76) Al-Mebairik, N. F.; El-Kersh, T. A.; Al-Sheikh, Y. A.; Marie, M. A. M. A Review of Virulence Factors, Pathogenesis, and Antibiotic Resistance in Staphylococcus Aureus. *Reviews in Medical Microbiology* **2016**, 27 (2), 50–56. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000067>.
- (77) Zecconi, A.; Scali, F. Staphylococcus Aureus Virulence Factors in Evasion from Innate Immune Defenses in Human and Animal Diseases. *Immunology Letters* **2013**, 150 (1–2), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.01.004>.
- (78) George, N. P. E.; Wei, Q.; Shin, P. K.; Konstantopoulos, K.; Ross, J. M. Staphylococcus Aureus Adhesion via Spa, ClfA, and SdrCDE to Immobilized Platelets Demonstrates Shear-Dependent Behavior. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, 26 (10), 2394–2400. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000237606.90253.94>.
- (79) Foster, T. J.; Geoghegan, J. A.; Ganesh, V. K.; Höök, M. Adhesion, Invasion and Evasion: The Many Functions of the Surface Proteins of Staphylococcus Aureus. *Nat Rev Microbiol* **2014**, 12 (1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.
- (80) Votintseva, A. A.; Fung, R.; Miller, R. R.; Knox, K.; Godwin, H.; Wyllie, D. H.; Bowden, R.; Crook, D. W.; Walker, A. S. Prevalence of Staphylococcus Aureus Protein A (Spa) Mutants in the Community and Hospitals in Oxfordshire. *BMC Microbiol.* **2014**, 14, 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-63>.
- (81) Olivier, A. C.; Lemaire, S.; Van Bambeke, F.; Tulkens, P. M.; Oldfield, E. Role of RsbU and Staphyloxanthin in Phagocytosis and Intracellular Growth of Staphylococcus Aureus in Human Macrophages and Endothelial Cells. *J Infect Dis* **2009**, 200 (9), 1367–1370. <https://doi.org/10.1086/606012>.
- (82) Sonnen, A. F.-P.; Henneke, P. Role of Pore-Forming Toxins in Neonatal Sepsis. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 2013, 608456. <https://doi.org/10.1155/2013/608456>.
- (83) Burnside, K.; Lembo, A.; de Los Reyes, M.; Iliuk, A.; Binhtran, N.-T.; Connelly, J. E.; Lin, W.-J.; Schmidt, B. Z.; Richardson, A. R.; Fang, F. C.; Tao, W. A.; Rajagopal, L. Regulation of Hemolysin Expression and Virulence of Staphylococcus Aureus by a Serine/Threonine Kinase and Phosphatase. *PLoS ONE* **2010**, 5 (6), e11071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011071>.
- (84) 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. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00012>.

- (85) Vijayalakshmi, P.; Nisha, J.; Rajalakshmi, M. Virtual Screening of Potential Inhibitor against FtsZ Protein from Staphylococcus Aureus. *Interdiscip Sci* **2014**, *6* (4), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s12539-012-0229-3>.
- (86) Labandeira-Rey, M.; Couzon, F.; Boisset, S.; Brown, E. L.; Bes, M.; Benito, Y.; Barbu, E. M.; Vazquez, V.; Höök, M.; Etienne, J.; Vandenesch, F.; Bowden, M. G. Staphylococcus Aureus Panton-Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. *Science* **2007**, *315* (5815), 1130–1133. <https://doi.org/10.1126/science.1137165>.
- (87) Lowy, F. D. Antimicrobial Resistance: The Example of Staphylococcus Aureus. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111* (9), 1265–1273. <https://doi.org/10.1172/JCI18535>.
- (88) Grundmann, H.; Aires-de-Sousa, M.; Boyce, J.; Tiemersma, E. Emergence and Resurgence of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus as a Public-Health Threat. *Lancet* **2006**, *368* (9538), 874–885. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68853-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68853-3).
- (89) Daum, R. S.; Ito, T.; Hiramatsu, K.; Hussain, F.; Mongkolrattanothai, K.; Jamklang, M.; Boyle-Vavra, S. A Novel Methicillin-Resistance Cassette in Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Isolates of Diverse Genetic Backgrounds. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186* (9), 1344–1347. <https://doi.org/10.1086/344326>.
- (90) Romero-Tabarez, M.; Jansen, R.; Sylla, M.; Lünsdorf, H.; Häussler, S.; Santosa, D. A.; Timmis, K. N.; Molinari, G. 7-O-Malonyl Macrolactin A, a New Macrolactin Antibiotic from Bacillus Subtilis Active against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus, Vancomycin-Resistant Enterococci, and a Small-Colony Variant of Burkholderia Cepacia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50* (5), 1701–1709. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1701-1709.2006>.
- (91) Bal, A. M.; Gould, I. M. Antibiotic Resistance in Staphylococcus Aureus and Its Relevance in Therapy. *Expert Opin Pharmacother* **2005**, *6* (13), 2257–2269. <https://doi.org/10.1517/14656566.6.13.2257>.
- (92) Gordon, R. J.; Lowy, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infection. *Clin Infect Dis* **2008**, *46* (Suppl 5), S350–S359. <https://doi.org/10.1086/533591>.
- (93) van Belkum, A.; Dunne, W. M. Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51* (7), 2018–2024. <https://doi.org/10.1128/JCM.00313-13>.
- (94) Sutton, J. P.; Friedman, B. Trends in Septicemia Hospitalizations and Readmissions in Selected HCUP States, 2005 and 2010: Statistical Brief #161. In *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*; Agency for Healthcare Research and Quality (US): Rockville (MD), 2006.
- (95) Kumar, A.; Roberts, D.; Wood, K. E.; Light, B.; Parrillo, J. E.; Sharma, S.; Suppes, R.; Feinstein, D.; Zanotti, S.; Taiberg, L.; Gurka, D.; Kumar, A.; Cheang, M. Duration of Hypotension before Initiation of Effective Antimicrobial Therapy Is the Critical Determinant of Survival in Human Septic Shock. *Crit. Care Med.* **2006**, *34* (6), 1589–1596. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>.
- (96) Bauer, K. A.; West, J. E.; Balada-Llasat, J.-M.; Pancholi, P.; Stevenson, K. B.; Goff, D. A. 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**, *51* (9), 1074–1080. <https://doi.org/10.1086/656623>.
- (97) Kang, C.-I.; Kim, S.-H.; Park, W. B.; Lee, K.-D.; Kim, H.-B.; Kim, E.-C.; Oh, M.-D.; Choe, K.-W. Bloodstream Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli: Risk Factors for Mortality and Impact of Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy on Outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (2), 760–766. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.760-766.2005>.
- (98) Micek, S. T.; Lloyd, A. E.; Ritchie, D. J.; Reichley, R. M.; Fraser, V. J.; Kollef, M. H. Pseudomonas Aeruginosa Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (4), 1306–1311. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1306-1311.2005>.
- (99) Cheong, H. S.; Kang, C.-I.; Wi, Y. M.; Ko, K. S.; Chung, D. R.; Lee, N. Y.; Song, J.-H.; Peck, K. R. Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy as a Risk Factor for Mortality in Patients with Community-Onset Pseudomonas Aeruginosa Bacteraemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *27* (12), 1219–1225. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0568-5>.
- (100) Southern, T. R.; VanSchooneveld, T. C.; Bannister, D. L.; Brown, T. L.; Crismon, A. S.; Buss, S. N.; Iwen, P. C.; Fey, P. D. Implementation and Performance of the BioFire FilmArray® Blood Culture Identification Panel with Antimicrobial Treatment Recommendations for Bloodstream Infections at a Midwestern Academic Tertiary Hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *81* (2), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.11.004>.
- (101) Buchan, B. W.; Ledebouer, N. A. Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27* (4), 783–822. <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-14>.
- (102) Skvarc, M.; Stubljär, D.; Rogina, P.; Kaasch, A. J. Non-Culture-Based Methods to Diagnose Bloodstream Infection: Does It Work? *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* **2013**, *3* (2), 97–104. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.3.2013.2.2>.
- (103) Stefani, S. Diagnostic Techniques in Bloodstream Infections: Where Are We Going? *International Journal of Antimicrobial Agents* **2009**, *34*, S9–S12. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(09\)70558-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70558-8).
- (104) Wilson, M. L.; Clinical and Laboratory Standards Institute. *Principles and Procedures for Blood Cultures: Approved Guideline*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pa., 2007.
- (105) Reimer, L. G.; Wilson, M. L.; Weinstein, M. P. Update on Detection of Bacteremia and Fungemia. *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10* (3), 444–465.
- (106) Lamy, B.; Dargère, S.; Arendrup, M. C.; Parienti, J.-J.; Tattevin, P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 697. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00697>.

- (107) Accelerated tryptic digestion of proteins in plasma for absolute quantitation using a protein internal standard by liquid chromatography/tandem mass spectrometry <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3016225/> (accessed Apr 17, 2020).
- (108) Anderson, N. L.; Anderson, N. G. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Mol. Cell Proteomics* **2002**, *1* (11), 845–867. <https://doi.org/10.1074/mcp.r200007-mcp200>.
- (109) Søggaard, M.; Nørgaard, M.; Pedersen, L.; Sørensen, H. T.; Schønheyder, H. C. Blood Culture Status and Mortality among Patients with Suspected Community-Acquired Bacteremia: A Population-Based Cohort Study. *BMC Infectious Diseases* **2011**, *11* (1), 139. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-139>.
- (110) Mirrett, S.; Hanson, K. E.; Reller, L. B. Controlled Clinical Comparison of VersaTREK and BacT/ALERT Blood Culture Systems. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45* (2), 299–302. <https://doi.org/10.1128/JCM.01697-06>.
- (111) Hardy, D. J.; Hulbert, B. B.; Migneault, P. C. Time to Detection of Positive BacT/Alert Blood Cultures and Lack of Need for Routine Subculture of 5- to 7-Day Negative Cultures. *J Clin Microbiol* **1992**, *30* (10), 2743–2745.
- (112) Wang, M.-C.; Lin, W.-H.; Yan, J.-J.; Fang, H.-Y.; Kuo, T.-H.; Tseng, C.-C.; Wu, J.-J. Early Identification of Microorganisms in Blood Culture Prior to the Detection of a Positive Signal in the BACTEC FX System Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Microbiol Immunol Infect* **2015**, *48* (4), 419–424. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.10.006>.
- (113) Opota, O.; Croxatto, A.; Prod'hom, G.; Greub, G. Blood Culture-Based Diagnosis of Bacteraemia: State of the Art. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21* (4), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.003>.
- (114) Perry, J. D.; Freydière, A. M. The Application of Chromogenic Media in Clinical Microbiology. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103* (6), 2046–2055. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x>.
- (115) Snyder, J. W.; Munier, G. K.; Johnson, C. L. Direct Comparison of the BD Phoenix System with the MicroScan WalkAway System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterobacteriaceae and Nonfermentative Gram-Negative Organisms. *J Clin Microbiol* **2008**, *46* (7), 2327–2333. <https://doi.org/10.1128/JCM.00075-08>.
- (116) Brisse, S.; Stefani, S.; Verhoef, J.; Van Belkum, A.; Vandamme, P.; Goessens, W. Comparative Evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 Automated Instruments for Identification of Isolates of the Burkholderia Cepacia Complex. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40* (5), 1743–1748. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1743-1748.2002>.
- (117) Carroll, K. C.; Borek, A. P.; Burger, C.; Glanz, B.; Bhally, H.; Henciak, S.; Flayhart, D. C. Evaluation of the BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Staphylococci and Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44* (6), 2072–2077. <https://doi.org/10.1128/JCM.02636-05>.

- (118) Clark, A. E.; Kaleta, E. J.; Arora, A.; Wolk, D. M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: A Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26* (3), 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>.
- (119) Winstanley, T.; Courvalin, P. Expert Systems in Clinical Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24* (3), 515–556. <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-10>.
- (120) Beuving, J.; van der Donk, C. F. M.; Linszen, C. F. M.; Wolffs, P. F. G.; Verbon, A. Evaluation of Direct Inoculation of the BD PHOENIX System from Positive BACTEC Blood Cultures for Both Gram-Positive Cocci and Gram-Negative Rods. *BMC Microbiol.* **2011**, *11*, 156. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-156>.
- (121) Gherardi, G.; Angeletti, S.; Panitti, M.; Pompilio, A.; Di Bonaventura, G.; Crea, F.; Avola, A.; Fico, L.; Palazzo, C.; Sapia, G. F.; Visaggio, D.; Dicuonzo, G. Comparative Evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix Systems for Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing Directly from Blood Cultures of Gram-Negative and Gram-Positive Isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *72* (1), 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.015>.
- (122) Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2016. V1.0. *Société Française de Microbiologie*, 2019.
- (123) Harris, D. M.; Hata, D. J. Rapid Identification of Bacteria and Candida Using PNA-FISH from Blood and Peritoneal Fluid Cultures: A Retrospective Clinical Study. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2013**, *12*, 2. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-2>.
- (124) Makristathis, A.; Riss, S.; Hirschl, A. M. A Novel Fluorescence in Situ Hybridization Test for Rapid Pathogen Identification in Positive Blood Cultures. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20* (10), 0760-763. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12561>.
- (125) Wojewoda, C. M.; Sercia, L.; Navas, M.; Tuohy, M.; Wilson, D.; Hall, G. S.; Procop, G. W.; Richter, S. S. Evaluation of the Verigene Gram-Positive Blood Culture Nucleic Acid Test for Rapid Detection of Bacteria and Resistance Determinants. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51* (7), 2072–2076. <https://doi.org/10.1128/JCM.00831-13>.
- (126) Markoulatos, P.; Siafakas, N.; Moncany, M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *J. Clin. Lab. Anal.* **2002**, *16* (1), 47–51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>.
- (127) Findlay, J.; Hopkins, K. L.; Meunier, D.; Woodford, N. Evaluation of Three Commercial Assays for Rapid Detection of Genes Encoding Clinically Relevant Carbapenemases in Cultured Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70* (5), 1338–1342. <https://doi.org/10.1093/jac/dku571>.
- (128) Cuzon, G.; Naas, T.; Bogaerts, P.; Glupczynski, Y.; Nordmann, P. Evaluation of a DNA Microarray for the Rapid Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases (TEM, SHV and CTX-M), Plasmid-Mediated Cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and Carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67* (8), 1865–1869. <https://doi.org/10.1093/jac/dks156>.

- (129) Lutgring, J. D.; Limbago, B. M. The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54* (3), 529–534. <https://doi.org/10.1128/JCM.02771-15>.
- (130) Clerc, O.; Prod'hom, G.; Senn, L.; Jaton, K.; Zanetti, G.; Calandra, T.; Greub, G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and PCR-Based Rapid Diagnosis of Staphylococcus Aureus Bacteraemia. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20* (4), 355–360. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12329>.
- (131) Wareham, D. W.; Shah, R.; Betts, J. W.; Phee, L. M.; Momin, M. H. F. A. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* **2016**, *54* (2), 471–473. <https://doi.org/10.1128/JCM.02900-15>.
- (132) Kolenda, C.; Benoit, R.; Carricajo, A.; Bonnet, R.; Dauwalder, O.; Laurent, F. Evaluation of the New Multiplex Immunochromatographic O.K.N.V. K-SeT Assay for Rapid Detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM Carbapenemases. *J Clin Microbiol* **2018**, *56* (11). <https://doi.org/10.1128/JCM.01247-18>.
- (133) Dortet, L.; Jousset, A.; Sainte-Rose, V.; Cuzon, G.; Naas, T. Prospective Evaluation of the OXA-48 K-SeT Assay, an Immunochromatographic Test for the Rapid Detection of OXA-48-Type Carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* **2016**, *71* (7), 1834–1840. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw058>.
- (134) Glupczynski, Y.; Evrard, S.; Ote, I.; Mertens, P.; Huang, T.-D.; Leclipteux, T.; Bogaerts, P. Evaluation of Two New Commercial Immunochromatographic Assays for the Rapid Detection of OXA-48 and KPC Carbapenemases from Cultured Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71* (5), 1217–1222. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv472>.
- (135) Khreich, N.; Lamourette, P.; Boutal, H.; Devilliers, K.; Créminon, C.; Volland, H. Detection of Staphylococcus Enterotoxin B Using Fluorescent Immunoliposomes as Label for Immunochromatographic Testing. *Anal. Biochem.* **2008**, *377* (2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.032>.
- (136) Charnot-Katsikas, A.; Tesic, V.; Love, N.; Hill, B.; Bethel, C.; Boonlayangoor, S.; Beavis, K. G. Use of the Accelerate Pheno System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Pathogens in Positive Blood Cultures and Impact on Time to Results and Workflow. *J Clin Microbiol* **2017**, *56* (1). <https://doi.org/10.1128/JCM.01166-17>.
- (137) Pancholi, P.; Carroll, K. C.; Buchan, B. W.; Chan, R. C.; Dhiman, N.; Ford, B.; Granato, P. A.; Harrington, A. T.; Hernandez, D. R.; Humphries, R. M.; Jindra, M. R.; Ledebor, N. A.; Miller, S. A.; Mochon, A. B.; Morgan, M. A.; Patel, R.; Schreckenberger, P. C.; Stamper, P. D.; Simner, P. J.; Tucci, N. E.; Zimmerman, C.; Wolk, D. M. Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. *J Clin Microbiol* **2018**, *56* (4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01329-17>.
- (138) Croxatto, A.; Prod'hom, G.; Greub, G. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36* (2), 380–407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>.

- (139) Welker, M.; Moore, E. R. B. Applications of Whole-Cell Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Systematic Microbiology. *Syst. Appl. Microbiol.* **2011**, *34* (1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.013>.
- (140) Hrabák, J.; Chudácková, E.; Walková, R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (Maldi-Tof) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: From Research to Routine Diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26* (1), 103–114. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-12>.
- (141) Hrabák, J.; Studentová, V.; Walková, R.; Zemlicková, H.; Jakubu, V.; Chudácková, E.; Gniadkowski, M.; Pfeifer, Y.; Perry, J. D.; Wilkinson, K.; Bergerová, T. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 Carbapenemases by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50* (7), 2441–2443. <https://doi.org/10.1128/JCM.01002-12>.
- (142) Gray, T. J.; Thomas, L.; Olma, T.; Iredell, J. R.; Chen, S. C.-A. Rapid Identification of Gram-Negative Organisms from Blood Culture Bottles Using a Modified Extraction Method and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *77* (2), 110–112. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.016>.
- (143) Rodríguez-Sánchez, B.; Sánchez-Carrillo, C.; Ruiz, A.; Marín, M.; Cercenado, E.; Rodríguez-Créixems, M.; Bouza, E. Direct Identification of Pathogens from Positive Blood Cultures Using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20* (7), O421-427. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12455>.
- (144) Prod'hom, G.; Bizzini, A.; Durussel, C.; Bille, J.; Greub, G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48* (4), 1481–1483. <https://doi.org/10.1128/JCM.01780-09>.
- (145) Clerc, O.; Prod'hom, G.; Vogne, C.; Bizzini, A.; Calandra, T.; Greub, G. Impact of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry on the Clinical Management of Patients with Gram-Negative Bacteremia: A Prospective Observational Study. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56* (8), 1101–1107. <https://doi.org/10.1093/cid/cis1204>.
- (146) Perez, K. K.; Olsen, R. J.; Musick, W. L.; Cernoch, P. L.; Davis, J. R.; Peterson, L. E.; Musser, J. M. Integrating Rapid Diagnostics and Antimicrobial Stewardship Improves Outcomes in Patients with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteremia. *J. Infect.* **2014**, *69* (3), 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.05.005>.
- (147) Martinez, R. M.; Bauerle, E. R.; Fang, F. C.; Butler-Wu, S. M. Evaluation of Three Rapid Diagnostic Methods for Direct Identification of Microorganisms in Positive Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **2014**, *52* (7), 2521–2529. <https://doi.org/10.1128/JCM.00529-14>.
- (148) Bauer, K. A.; Perez, K. K.; Forrest, G. N.; Goff, D. A. Review of Rapid Diagnostic Tests Used by Antimicrobial Stewardship Programs. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59 Suppl 3*, S134-145. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu547>.

- (149) Cecchini, T.; Yoon, E.-J.; Charretier, Y.; Bardet, C.; Beaulieu, C.; Lacoux, X.; Docquier, J.-D.; Lemoine, J.; Courvalin, P.; Grillot-Courvalin, C.; Charrier, J.-P. Deciphering Multifactorial Resistance Phenotypes in *Acinetobacter Baumannii* by Genomics and Targeted Label-Free Proteomics. *Mol Cell Proteomics* **2018**, *17* (3), 442–456. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000107>.
- (150) Charretier, Y.; Dauwalder, O.; Franceschi, C.; Degout-Charmette, E.; Zambardi, G.; Cecchini, T.; Bardet, C.; Lacoux, X.; Dufour, P.; Veron, L.; Rostaing, H.; Lanet, V.; Fortin, T.; Beaulieu, C.; Perrot, N.; Dechaume, D.; Pons, S.; Girard, V.; Salvador, A.; Durand, G.; Mallard, F.; Theretz, A.; Broyer, P.; Chatellier, S.; Gervasi, G.; Van Nuenen, M.; Ann Roitsch, C.; Van Belkum, A.; Lemoine, J.; Vandenesch, F.; Charrier, J.-P. Rapid Bacterial Identification, Resistance, Virulence and Type Profiling Using Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Sci Rep* **2015**, *5* (1), 13944. <https://doi.org/10.1038/srep13944>.
- (151) Aebersold, R.; Mann, M. Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Nature* **2003**, *422* (6928), 198–207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>.
- (152) Donnan, F. G. Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analyses. By Sir J. J. Thomson, O. M. F.R.S. Second Edition. Pp. x + 237. London: Longmans, Green and Co., 1921. Price 16s. *Journal of the Society of Chemical Industry* **1923**, *42* (36), 861–861. <https://doi.org/10.1002/jctb.5000423614>.
- (153) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2* (8), 151–153. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290020802>.
- (154) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* **1989**, *246* (4926), 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>.
- (155) Edman, P. A Method for the Determination of Amino Acid Sequence in Peptides. *Arch Biochem* **1949**, *22* (3), 475.
- (156) Liu, X.; Sirotkin, Y.; Shen, Y.; Anderson, G.; Tsai, Y. S.; Ting, Y. S.; Goodlett, D. R.; Smith, R. D.; Bafna, V.; Pevzner, P. A. Protein Identification Using Top-Down Spectra. *Molecular & Cellular Proteomics* **2012**, *11* (6). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.008524>.
- (157) Wright, E. P.; Partridge, M. A.; Padula, M. P.; Gauci, V. J.; Malladi, C. S.; Coorsen, J. R. Top-down Proteomics: Enhancing 2D Gel Electrophoresis from Tissue Processing to High-Sensitivity Protein Detection. *Proteomics* **2014**, *14* (7–8), 872–889. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300424>.
- (158) Bateman, R. J.; Munsell, L. Y.; Chen, X.; Holtzman, D. M.; Yarasheski, K. E. Stable Isotope Labeling Tandem Mass Spectrometry (SILT) to Quantify Protein Production and Clearance Rates. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18* (6), 997–1006. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.02.009>.

- (159) Megger, D. A.; Bracht, T.; Meyer, H. E.; Sitek, B. Label-Free Quantification in Clinical Proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2013**, *1834* (8), 1581–1590. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.001>.
- (160) Chait, B. T. Chemistry. Mass Spectrometry: Bottom-up or Top-Down? *Science* **2006**, *314* (5796), 65–66. <https://doi.org/10.1126/science.1133987>.
- (161) Gershon, P. D. Cleaved and Missed Sites for Trypsin, Lys-C, and Lys-N Can Be Predicted with High Confidence on the Basis of Sequence Context. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (2), 702–709. <https://doi.org/10.1021/pr400802z>.
- (162) Siepen, J. A.; Keevil, E.-J.; Knight, D.; Hubbard, S. J. Prediction of Missed Cleavage Sites in Tryptic Peptides Aids Protein Identification in Proteomics. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (1), 399–408. <https://doi.org/10.1021/pr060507u>.
- (163) Olsen, J. V.; Ong, S.-E.; Mann, M. Trypsin Cleaves Exclusively C-Terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics* **2004**, *3* (6), 608–614. <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>.
- (164) Roux-Dalvai, F.; Gotti, C.; Leclercq, M.; Hélie, M.-C.; Boissinot, M.; Arrey, T. N.; Daully, C.; Fournier, F.; Kelly, I.; Marcoux, J.; Bestman-Smith, J.; Bergeron, M. G.; Droit, A. Fast and Accurate Bacterial Species Identification in Urine Specimens Using LC-MS/MS Mass Spectrometry and Machine Learning. *Mol. Cell Proteomics* **2019**, *18* (12), 2492–2505. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR119.001559>.
- (165) Kebarle, P.; Verkerk, U. H. Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now. *Mass Spectrom Rev* **2009**, *28* (6), 898–917. <https://doi.org/10.1002/mas.20247>.
- (166) Percy, A. J.; Chambers, A. G.; Yang, J.; Domanski, D.; Borchers, C. H. Comparison of Standard- and Nano-Flow Liquid Chromatography Platforms for MRM-Based Quantitation of Putative Plasma Biomarker Proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404* (4), 1089–1101. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6010-y>.
- (167) Washburn, M. P.; Wolters, D.; Yates, J. R. Large-Scale Analysis of the Yeast Proteome by Multidimensional Protein Identification Technology. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (3), 242–247. <https://doi.org/10.1038/85686>.
- (168) Wolters, D. A.; Washburn, M. P.; Yates, J. R. An Automated Multidimensional Protein Identification Technology for Shotgun Proteomics. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (23), 5683–5690. <https://doi.org/10.1021/ac010617e>.
- (169) Barnidge, D. R.; Dratz, E. A.; Martin, T.; Bonilla, L. E.; Moran, L. B.; Lindall, A. Absolute Quantification of the G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin by LC/MS/MS Using Proteolysis Product Peptides and Synthetic Peptide Standards. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (3), 445–451. <https://doi.org/10.1021/ac026154+>.
- (170) Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P. Absolute Quantification of Proteins and Phosphoproteins from Cell Lysates by Tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100* (12), 6940–6945. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832254100>.

- (171) Domon, B.; Aebersold, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* **2006**, *312* (5771), 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>.
- (172) Picotti, P.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring-Based Proteomics: Workflows, Potential, Pitfalls and Future Directions. *Nat. Methods* **2012**, *9* (6), 555–566. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2015>.
- (173) Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring for Quantitative Proteomics: A Tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 222. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.61>.
- (174) Strich, J. R.; Wang, H.; Cissé, O. H.; Youn, J.-H.; Drake, S. K.; Chen, Y.; Rosenberg, A. Z.; Gucek, M.; McGann, P. T.; Dekker, J. P.; Suffredini, A. F. Identification of the OXA-48 Carbapenemase Family by Use of Tryptic Peptides and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* **2019**, *57* (5), e01240-18, /jcm/57/5/JCM.01240-18.atom. <https://doi.org/10.1128/JCM.01240-18>.
- (175) Burgess, M. W.; Keshishian, H.; Mani, D. R.; Gillette, M. A.; Carr, S. A. Simplified and Efficient Quantification of Low-Abundance Proteins at Very High Multiplex via Targeted Mass Spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* **2014**, *13* (4), 1137–1149. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.034660>.
- (176) Schilling, B.; MacLean, B.; Held, J. M.; Sahu, A. K.; Rardin, M. J.; Sorensen, D. J.; Peters, T.; Wolfe, A. J.; Hunter, C. L.; MacCoss, M. J.; Gibson, B. W. Multiplexed, Scheduled, High-Resolution Parallel Reaction Monitoring on a Full Scan QqTOF Instrument with Integrated Data-Dependent and Targeted Mass Spectrometric Workflows. *Anal Chem* **2015**, *87* (20), 10222–10229. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02983>.
- (177) Liu, H.; Sadygov, R. G.; Yates, J. R. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (14), 4193–4201. <https://doi.org/10.1021/ac0498563>.
- (178) Bantscheff, M.; Schirle, M.; Sweetman, G.; Rick, J.; Kuster, B. Quantitative Mass Spectrometry in Proteomics: A Critical Review. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *389* (4), 1017–1031. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>.
- (179) Chang, C.-J.; Lin, J.-H.; Chang, K.-C.; Lai, M.-J.; Rohini, R.; Hu, A. Diagnosis of β -Lactam Resistance in *Acinetobacter Baumannii* Using Shotgun Proteomics and LC-Nano-Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (5), 2802–2808. <https://doi.org/10.1021/ac303326a>.
- (180) Karlsson, R.; Thorsell, A.; Gomila, M.; Salvà-Serra, F.; Jakobsson, H. E.; Gonzales-Siles, L.; Jaén-Luchoro, D.; Skovbjerg, S.; Fuchs, J.; Karlsson, A.; Boulund, F.; Johnning, A.; Kristiansson, E.; Moore, E. Discovery of Species-Unique Peptide Biomarkers of Bacterial Pathogens by Tandem Mass Spectrometry-Based Proteotyping. *Molecular & Cellular Proteomics* **2020**. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001667>.
- (181) Billing, A. M.; Knudsen, K. B.; Chetwynd, A. J.; Ellis, L.-J. A.; Tang, S. V. Y.; Berthing, T.; Wallin, H.; Lynch, I.; Vogel, U.; Kjeldsen, F. Fast and Robust Proteome Screening Platform Identifies Neutrophil Extracellular Trap Formation in the Lung in Response to Cobalt Ferrite Nanoparticles. *ACS Nano* **2020**, *14* (4), 4096–4110. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08818>.

- (182) Foudraine, D. E.; Dekker, L. J. M.; Strepis, N.; Bexkens, M. L.; Klaassen, C. H. W.; Luider, T. M.; Goessens, W. H. F. Accurate Detection of the Four Most Prevalent Carbapenemases in *E. Coli* and *K. Pneumoniae* by High-Resolution Mass Spectrometry. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2760. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02760>.
- (183) Wang, H.; Drake, S. K.; Youn, J.-H.; Rosenberg, A. Z.; Chen, Y.; Gucek, M.; Suffredini, A. F.; Dekker, J. P. Peptide Markers for Rapid Detection of KPC Carbapenemase by LC-MS/MS. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 2531. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02749-2>.
- (184) Otto, A.; Biran, D.; Sura, T.; Becher, D.; Ron, E. Z. Proteomics of Septicemic *Escherichia Coli*. *Prot. Clin. Appl.* **2016**, *10* (9–10), 1020–1024. <https://doi.org/10.1002/prca.201600049>.
- (185) Hayoun, K.; Gouveia, D.; Grenga, L.; Pible, O.; Armengaud, J.; Alpha-Bazin, B. Evaluation of Sample Preparation Methods for Fast Proteotyping of Microorganisms by Tandem Mass Spectrometry. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01985>.
- (186) Abbatiello, S. E.; Mani, D. R.; Schilling, B.; Maclean, B.; Zimmerman, L. J.; Feng, X.; Cusack, M. P.; Sedransk, N.; Hall, S. C.; Addona, T.; Allen, S.; Dodder, N. G.; Ghosh, M.; Held, J. M.; Hedrick, V.; Inerowicz, H. D.; Jackson, A.; Keshishian, H.; Kim, J. W.; Lyssand, J. S.; Riley, C. P.; Rudnick, P.; Sadowski, P.; Shaddock, K.; Smith, D.; Tomazela, D.; Wahlander, A.; Waldemarson, S.; Whitwell, C. A.; You, J.; Zhang, S.; Kinsinger, C. R.; Mesri, M.; Rodriguez, H.; Borchers, C. H.; Buck, C.; Fisher, S. J.; Gibson, B. W.; Liebler, D.; Maccoss, M.; Neubert, T. A.; Paulovich, A.; Regnier, F.; Skates, S. J.; Tempst, P.; Wang, M.; Carr, S. A. Design, Implementation and Multisite Evaluation of a System Suitability Protocol for the Quantitative Assessment of Instrument Performance in Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring-MS (LC-MRM-MS). *Mol. Cell Proteomics* **2013**, *12* (9), 2623–2639. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.027078>.
- (187) Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring for Quantitative Proteomics: A Tutorial. *Mol Syst Biol* **2008**, *4*, 222. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.61>.
- (188) Dalla Serra, M.; Coraiola, M.; Viero, G.; Comai, M.; Potrich, C.; Ferreras, M.; Baba-Moussa, L.; Colin, D. A.; Menestrina, G.; Bhakdi, S.; Prévost, G. Staphylococcus Aureus Bicomponent Gamma-Hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, Can Form Mixed Pores Containing All Components. *J Chem Inf Model* **2005**, *45* (6), 1539–1545. <https://doi.org/10.1021/ci050175y>.
- (189) Rooijackers, S. H. M.; Ruyken, M.; van Roon, J.; van Kessel, K. P. M.; van Strijp, J. A. G.; van Wamel, W. J. B. Early Expression of SCIN and CHIPS Drives Instant Immune Evasion by Staphylococcus Aureus. *Cell. Microbiol.* **2006**, *8* (8), 1282–1293. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00709.x>.
- (190) Deutsch, E. W.; Lam, H.; Aebersold, R. PeptideAtlas: A Resource for Target Selection for Emerging Targeted Proteomics Workflows. *EMBO Rep.* **2008**, *9* (5), 429–434. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.56>.

- (191) Craig, R.; Cortens, J. P.; Beavis, R. C. Open Source System for Analyzing, Validating, and Storing Protein Identification Data. *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (6), 1234–1242. <https://doi.org/10.1021/pr049882h>.
- (192) Jones, P.; Côté, R. G.; Cho, S. Y.; Klie, S.; Martens, L.; Quinn, A. F.; Thorneycroft, D.; Hermjakob, H. PRIDE: New Developments and New Datasets. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (suppl_1), D878–D883. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1021>.
- (193) UniProt Consortium, T. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46* (5), 2699–2699. <https://doi.org/10.1093/nar/gky092>.
- (194) UniProt Tools. - Abstract - Europe PMC <https://europepmc.org/article/MED/27010333> (accessed Apr 27, 2020).
- (195) Badarau, A.; Rouha, H.; Malafa, S.; Logan, D. T.; Håkansson, M.; Stulik, L.; Dolezilkoval, I.; Teubenbacher, A.; Gross, K.; Maierhofer, B.; Weber, S.; Jägerhofer, M.; Hoffman, D.; Nagy, E. Structure-Function Analysis of Heterodimer Formation, Oligomerization, and Receptor Binding of the Staphylococcus Aureus Bi-Component Toxin LukGH. *J Biol Chem* **2015**, *290* (1), 142–156. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.598110>.
- (196) Coleman, G.; Abbas-Ali, B. Comparison of the Patterns of Increased in Alpha-Toxin and Total Extracellular Protein by Staphylococcus Aureus (Wood 46) Grown in Media Supporting Widely Differing Growth Characteristics. *Infect. Immun.* **1977**, *17* (2), 278–281.
- (197) Czop, J. K.; Bergdoll, M. S. Staphylococcal Enterotoxin Synthesis During the Exponential, Transitional, and Stationary Growth Phases. *Infection and Immunity* **1974**, *9* (2), 229–235. <https://doi.org/10.1128/IAI.9.2.229-235.1974>.
- (198) Scott, M.; Hwa, T. Bacterial Growth Laws and Their Applications. *Current Opinion in Biotechnology* **2011**, *22* (4), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.014>.
- (199) Proteomics Application Notes - Pressure BioSciences - Pressure BioSciences Inc. - A Life Sciences Company <https://www.pressurebiosciences.com/documentsbytype/publications-by-type/proteomics-application-notes> (accessed Apr 30, 2020).
- (200) Hedrick, V. E.; LaLand, M. N.; Nakayasu, E. S.; Paul, L. N. Digestion, Purification, and Enrichment of Protein Samples for Mass Spectrometry. *Current Protocols in Chemical Biology* **2015**, *7* (3), 201–222. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch140272>.
- (201) Talib, J.; Hains, P. G.; Tumanov, S.; Hodson, M. P.; Robinson, P. J.; Stocker, R. Barocycler-Based Concurrent Multiomics Method To Assess Molecular Changes Associated with Atherosclerosis Using Small Amounts of Arterial Tissue from a Single Mouse. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (20), 12670–12679. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01842>.
- (202) Qiao, L.; Liu, Y.; Hudson, S. P.; Yang, P.; Magner, E.; Liu, B. A Nanoporous Reactor for Efficient Proteolysis. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14* (1), 151–157. <https://doi.org/10.1002/chem.200701102>.

- (203) Marinelli, P.; Pallares, I.; Navarro, S.; Ventura, S. Dissecting the Contribution of Staphylococcus Aureus α -Phenol-Soluble Modulins to Biofilm Amyloid Structure. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep34552>.
- (204) Zhu, A.; Miller, C. Targeted Protein and Peptide Quantitation Using Skyline Software. **2014**, 55.
- (205) Law, K. P.; Lim, Y. P. Recent Advances in Mass Spectrometry: Data Independent Analysis and Hyper Reaction Monitoring. *Expert Rev Proteomics* **2013**, *10* (6), 551–566. <https://doi.org/10.1586/14789450.2013.858022>.
- (206) Reiter, L.; Rinner, O.; Picotti, P.; Hüttenhain, R.; Beck, M.; Brusniak, M.-Y.; Hengartner, M. O.; Aebersold, R. MProphet: Automated Data Processing and Statistical Validation for Large-Scale SRM Experiments. *Nat. Methods* **2011**, *8* (5), 430–435. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1584>.
- (207) Aiche, S.; Sachsenberg, T.; Kenar, E.; Walzer, M.; Wiswedel, B.; Kristl, T.; Boyles, M.; Duschl, A.; Huber, C. G.; Berthold, M. R.; Reinert, K.; Kohlbacher, O. Workflows for Automated Downstream Data Analysis and Visualization in Large-Scale Computational Mass Spectrometry. *Proteomics* **2015**, *15* (8), 1443–1447. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400391>.
- (208) Pinchuk, I. V.; Beswick, E. J.; Reyes, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins (Basel)* **2010**, *2* (8), 2177–2197. <https://doi.org/10.3390/toxins2082177>.
- (209) Tatini, S. R. INFLUENCE OF FOOD ENVIRONMENTS ON GROWTH OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND PRODUCTION OF VARIOUS ENTEROTOXINS. *Journal of Milk and Food Technology* **1973**, *36* (11), 559–563. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-36.11.559>.
- (210) Boisset, S.; Geissmann, T.; Huntzinger, E.; Fechter, P.; Bendridi, N.; Possedko, M.; Chevalier, C.; Helfer, A. C.; Benito, Y.; Jacquier, A.; Gaspin, C.; Vandenesch, F.; Romby, P. Staphylococcus Aureus RNAIII Coordinately Represses the Synthesis of Virulence Factors and the Transcription Regulator Rot by an Antisense Mechanism. *Genes Dev.* **2007**, *21* (11), 1353–1366. <https://doi.org/10.1101/gad.423507>.
- (211) Quincampoix, J. C.; Mainardi, J. L. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. 9.
- (212) Weiss, A.; Broach, W. H.; Shaw, L. N. Characterizing the Transcriptional Adaptation of Staphylococcus Aureus to Stationary Phase Growth. *Pathog Dis* **2016**, *74* (5). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw046>.
- (213) Lebeau, C.; Vandenesch, F.; Greenland, T.; Novick, R. P.; Etienne, J. Coagulase Expression in Staphylococcus Aureus Is Positively and Negatively Modulated by an Agr-Dependent Mechanism. *J Bacteriol* **1994**, *176* (17), 5534–5536.
- (214) Okolie, C. E.; Cockayne, A.; Penfold, C.; James, R. Engineering of the LukS-PV and LukF-PV Subunits of Staphylococcus Aureus Pantone-Valentine Leukocidin for Diagnostic and Therapeutic Applications. *BMC Biotechnol* **2013**, *13*, 103. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-103>.
- (215) Xiong, Y. Q.; Willard, J.; Yeaman, M. R.; Cheung, A. L.; Bayer, A. S. Regulation of Staphylococcus Aureus α -Toxin Gene (Hla) Expression by Agr, SarA and Sae In Vitro

- and in Experimental Infective Endocarditis. *J Infect Dis* **2006**, *194* (9), 1267–1275. <https://doi.org/10.1086/508210>.
- (216) Stedt, J.; Bonnedahl, J.; Hernandez, J.; Waldenström, J.; McMahon, B. J.; Tolf, C.; Olsen, B.; Drobni, M. Carriage of CTX-M Type Extended Spectrum β -Lactamases (ESBLs) in Gulls across Europe. *Acta Vet Scand* **2015**, *57* (1), 74. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0166-3>.
- (217) (6) (PDF) Scout-MRM: Multiplexed Targeted Mass Spectrometry-Based Assay without Retention Time Scheduling Exemplified by *Dickeya dadantii* Proteomic Analysis during Plant Infection https://www.researchgate.net/publication/311940671_Scout-MRM_Multiplexed_Targeted_Mass_Spectrometry-Based_Assay_without_Retention_Time_Scheduling_Exemplified_by_Dickeya_dadantii_Proteomic_Analysis_during_Plant_Infection (accessed Jun 17, 2020).
- (218) J.C. Yves Le Blanc; Jérôme Lemoine; David M. Cox; Blandine Rougemon; Romain Carrière. Scout-MRM; a Method to Acquire Large Numbers of MRM without Retention Time.
- (219) Vincent, J.-L.; Bihari, D. J.; Suter, P. M.; Bruining, H. A.; White, J.; Nicolas-Chanoin, M.-H.; Wolff, M.; Spencer, R. C.; Hemmer, M. The Prevalence of Nosocomial Infection in Intensive Care Units in Europe: Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. *JAMA* **1995**, *274* (8), 639–644. <https://doi.org/10.1001/jama.1995.03530080055041>.
- (220) Krieg, R. E.; Lockhart, W. R. Classification of Enterobacteria Based on Overall Similarity 1. *J Bacteriol* **1966**, *92* (5), 1275–1280.
- (221) Richter, S. S.; Sercia, L.; Branda, J. A.; Burnham, C.-A. D.; Bythrow, M.; Ferraro, M. J.; Garner, O. B.; Ginocchio, C. C.; Jennemann, R.; Lewinski, M. A.; Manji, R.; Mochon, A. B.; Rychert, J. A.; Westblade, L. F.; Procop, G. W. Identification of Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Using the VITEK MS System. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2013**, *32* (12), 1571–1578. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1912-y>.
- (222) ULRICH EIGNER; MARTIN HOLFELDER; KLAUS OBERDORFER; ULRIKE BETZ-WILD; DANIELA BERTSCH; ANNE-MARIE FAHR. Performance of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry System for the Identification of Bacterial Isolates in the Clinical Routine Laboratory. *Clin. Lab.* **9**.
- (223) Chaïbi, E. B.; Sirot, D.; Paul, G.; Labia, R. Inhibitor-Resistant TEM β -Lactamases: Phenotypic, Genetic and Biochemical Characteristics. *J Antimicrob Chemother* **1999**, *43* (4), 447–458. <https://doi.org/10.1093/jac/43.4.447>.
- (224) Thomson, C. J.; Amyes, S. G. B. Selection of Variants of the TEM-1 β Lactamase, Encoded by a Plasmid of Clinical Origin, with Increased Resistance to β -Lactamase Inhibitors. *J Antimicrob Chemother* **1993**, *31* (5), 655–664. <https://doi.org/10.1093/jac/31.5.655>.
- (225) Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B. I. Beta-Lactamase Database (BLDB) – Structure and Function. *Journal of*

- Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2017**, *32* (1), 917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>.
- (226) Chiu, M. L.; Lawi, W.; Snyder, S. T.; Wong, P. K.; Liao, J. C.; Gau, V. Matrix Effects—A Challenge toward Automation of Molecular Analysis: *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation* **2010**. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2010.02.001>.
- (227) Fang, N.; Yu, S.; Ronis, M. J.; Badger, T. M. Matrix Effects Break the LC Behavior Rule for Analytes in LC-MS/MS Analysis of Biological Samples. *Exp Biol Med (Maywood)* **2015**, *240* (4), 488–497. <https://doi.org/10.1177/1535370214554545>.
- (228) Latosinska, A.; Frantzi, M.; Merseburger, A. S.; Mischak, H. Promise and Implementation of Proteomic Prostate Cancer Biomarkers. *Diagnostics (Basel)* **2018**, *8* (3). <https://doi.org/10.3390/diagnostics8030057>.
- (229) Escher, C.; Reiter, L.; MacLean, B.; Ossola, R.; Herzog, F.; Chilton, J.; MacCoss, M. J.; Rinner, O. Using IRT, a Normalized Retention Time for More Targeted Measurement of Peptides. *Proteomics* **2012**, *12* (8), 1111–1121. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100463>.
- (230) Carriere, R.; Rougemont, B.; Margoum, C.; Dreau, M. L.; Cox, D.; Blanc, Y. L.; Lemoine, J. Multiplexed Analysis of 215 Pesticides with Using Scout-MRM; 2016; p 2.
- (231) Björhall, K.; Miliotis, T.; Davidsson, P. Comparison of Different Depletion Strategies for Improved Resolution in Proteomic Analysis of Human Serum Samples. *Proteomics* **2005**, *5* (1), 307–317. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400900>.
- (232) wan Azman, W. N.; Omar, J.; Koon, T. S.; Tuan Ismail, T. S. Hemolyzed Specimens: Major Challenge for Identifying and Rejecting Specimens in Clinical Laboratories. *Oman Med J* **2019**, *34* (2), 94–98. <https://doi.org/10.5001/omj.2019.19>.
- (233) Poulain, D. Candida albicans, plasticité et pathogénie. *Revue Francophone des Laboratoires* **2013**, *2013* (450), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)71945-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)71945-2).
- (234) (5) Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure | Request PDF https://www.researchgate.net/publication/12590095_Hemolysis_of_human_erythrocytes_with_saponin_affects_the_membrane_structure (accessed Jun 23, 2020).
- (235) Kayin, M.; Mert, B.; Aydemir, S.; Özenci, V. Comparison of Rapid BACpro® II, Sepsityper® Kit and in-House Preparation Methods for Direct Identification of Bacteria from Blood Cultures by MALDI-TOF MS with and without Sepsityper® Module Analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2019**, *38* (11), 2133–2143. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03654-4>.
- (236) Meex, C.; Neuville, F.; Descy, J.; Huynen, P.; Hayette, M.-P.; De Mol, P.; Melin, P. Direct Identification of Bacteria from BacT/ALERT Anaerobic Positive Blood Cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper Kit versus an in-House Saponin Method for Bacterial Extraction. *Journal of Medical Microbiology*, **2012**, *61* (11), 1511–1516. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.044750-0>.

- (237) Goncheva, M. I.; Flannagan, R. S.; Sterling, B. E.; Laakso, H. A.; Friedrich, N. C.; Kaiser, J. C.; Watson, D. W.; Wilson, C. H.; Sheldon, J. R.; McGavin, M. J.; Kiser, P. K.; Heinrichs, D. E. Stress-Induced Inactivation of the *Staphylococcus Aureus* Purine Biosynthesis Repressor Leads to Hypervirulence. *Nature Communications* **2019**, *10* (1), 775. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08724-x>.
- (238) Trivier, D.; Courcol, R. J. Iron Depletion and Virulence in *Staphylococcus Aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **1996**, *141* (2–3), 117–127. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08373.x>.
- (239) BioMerieux. BD BACTECTMPLUS Resin Media. *Newsletter*.
- (240) Smith, S. M.; Eng, R. H. In Vitro Evaluation of the BACTEC Resin-Containing Blood Culture Bottle. *J Clin Microbiol* **1983**, *17* (6), 1120–1126.
- (241) Fiori, B.; D’Inzeo, T.; Di Florio, V.; De Maio, F.; De Angelis, G.; Giaquinto, A.; Campana, L.; Tanzarella, E.; Tumbarello, M.; Antonelli, M.; Sanguinetti, M.; Spanu, T. Performance of Two Resin-Containing Blood Culture Media in Detection of Bloodstream Infections and in Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Broth Assays for Isolate Identification: Clinical Comparison of the BacT/Alert Plus and Bactec Plus Systems. *J Clin Microbiol* **2014**, *52* (10), 3558–3567. <https://doi.org/10.1128/JCM.01171-14>.
- (242) Purves, J.; Cockayne, A.; Moody, P. C. E.; Morrissey, J. A. Comparison of the Regulation, Metabolic Functions, and Roles in Virulence of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Homologues GapA and GapB in *Staphylococcus Aureus*. *Infect. Immun.* **2010**, *78* (12), 5223–5232. <https://doi.org/10.1128/IAI.00762-10>.