



**HAL**  
open science

# Détection et caractérisation des entérotoxines staphylococciques dans les aliments par couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse

Donatien Lefebvre

► **To cite this version:**

Donatien Lefebvre. Détection et caractérisation des entérotoxines staphylococciques dans les aliments par couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASF045 . tel-03917536

**HAL Id: tel-03917536**

**<https://theses.hal.science/tel-03917536>**

Submitted on 2 Jan 2023

**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.

Détection et caractérisation des entérotoxines  
staphylococciques dans les aliments par couplage  
chromatographie liquide-spectrométrie de masse

*Detection and characterization of staphylococcal  
enterotoxins in foods by liquid chromatography  
coupled with tandem mass spectrometry*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°571 : sciences chimiques : molécules, matériaux,  
instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Médicaments et Technologies  
pour la Santé, 91191, Gif-sur-Yvette, France

Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,  
le 7 décembre 2021, par**

**Donatien LEFEBVRE**

### Composition du Jury

<b>Guillaume VAN DER REST</b> Professeur des Universités, Université Paris-Saclay	Président
<b>Yves LE-LOIR</b> Directeur de recherche, INRAE Université de Rennes 1	Rapporteur & Examineur
<b>Laurence SABATIER</b> Professeure des Universités, Université de Strasbourg	Rapporteuse & Examinatrice
<b>Julien MASQUELIER</b> Docteur, Sciensano	Examineur

### Direction de la thèse

<b>François BECHER</b> Ingénieur chercheur, CEA Saclay Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
<b>Yacine NIA</b> Docteur, ANSES Maison Alfort	Co-Encadrant

**Titre :** Détection et caractérisation des entérotoxines staphylococciques dans les aliments par couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse.

**Mots clés :** Entérotoxines staphylococciques, Spectrométrie de masse, Immunocapture

**Résumé :** Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à staphylocoques sont causées par l'ingestion d'aliments contaminés par des entérotoxines staphylococciques (ES), produites par certaines souches de staphylocoques à coagulase positive. À ce jour, 35 ESs sont décrites dans la littérature (SEA à SEI33) mais seules cinq types, SEA à SEE, sont détectables en routine. Lors d'épisodes de TIAC, il arrive régulièrement qu'aucune ES de type SEA-SEE ne soit détectée alors qu'une symptomatologie typique d'intoxication à staphylocoques a été identifiée. De plus, les données épidémiologiques soulignent la présence fréquente d'autres gènes types *seg*, *seh* et *sei* dans des souches de *S. aureus* issues de TIAC. Il est donc impératif de disposer d'outils d'analyse et de confirmations capables de viser une large gamme d'ESs.

La spectrométrie de masse (MS) apporte une grande spécificité d'analyse au sein de milieux complexes et une capacité élevée de multiplexage des analyses. D'autre part, elle ne nécessite pas obligatoirement la production d'anticorps spécifiques de chaque ES (sauf formats particuliers, type immunocapture). Ainsi, la MS apparaît comme une alternative pertinente, particulièrement pour la détection des ESs connues ou récemment décrites pour lesquelles il n'existe pas d'anticorps spécifiques.

Lors de cette thèse, une méthode par MS a tout d'abord été développée pour la quantification et la caractérisation des huit premières ESs (SEA-SEE et SEG-SEI) en matrice alimentaire. Cette méthode utilise l'approche analytique la plus sensible d'après la littérature, c.a.d. une extraction des ESs par immunocapture (anticorps commerciaux ou produits au CEA) suivie d'une digestion trypsique (bottom-up). La spécificité de notre méthode a permis de détecter les huit ESs dans des matrices alimentaires, et nous avons pu atteindre une limite de détection comprise entre 0,1 et 0,5 ng/g. Ces concentrations correspondent aux concentrations retrouvées lors des investigations d'épisodes de TIAC. Cette méthode LC-MS a été appliquée avec succès à des matrices variées issues de TIAC, donnant des résultats concordants avec les tests ELISA disponibles et les analyses PCR (Polymerase Chain Reaction).

En parallèle, et de manière à mieux discriminer les variants de séquence, une quantification par approche top-down (analyse de protéine intacte) a été développée. L'analyse top-down permet une analyse globale de la séquence de l'ES ciblée à l'inverse de l'approche bottom-up qui ne détecte que certains peptides. Une optimisation des paramètres MS et du traitement des données a été réalisée et un étalon interne a été sélectionné. Cela nous a permis d'obtenir, pour la SEA, une méthode de quantification absolue avec une sensibilité proche de la technique bottom-up. La méthode a finalement été confrontée à des analyses génomiques et ELISA lors de l'analyse de 13 souches productrices de variants de SEA.

Enfin, nous avons souhaité élargir la quantification des ESs au-delà des huit premières. Ainsi nous avons optimisé une méthode de préparation de l'échantillon sans anticorps. La méthode a été appliquée à des ESs produites par des souches de *S. aureus* en milieu de culture. Nous avons pu identifier pour la première fois 24 types d'ESs et plus de 162 variants. Des peptides spécifiques à chaque type et communs à l'ensemble des variants ont pu être identifiés. Par la suite, une méthode de quantification « label free » a été proposée, basée sur le principe « Hi3 » où le signal des trois peptides les plus intenses de chaque ES est exploité. A l'aide de cette méthode, nous avons pu identifier les ESs produites en forte quantité et établir leur cinétique de production par le *S. aureus* en milieu de culture, donnant de nouvelles indications sur les ESs à rechercher en priorité lors d'épisodes de TIAC.

**Title:** Detection and characterization of staphylococcal enterotoxins in foods by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

**Keywords:** Staphylococcal enterotoxins, Mass spectrometry, Immunocapture

**Abstract:** Staphylococcal food poisoning outbreaks (SFPO) are caused by the ingestion of food contaminated with staphylococcal enterotoxins (SE), produced by certain strains of coagulase-positive staphylococci. To date, 35 SE are described in the literature (SEA to SEI33) but only five types, SEA to SEE, are routinely detectable via the EN ISO 19020 standard or ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) techniques because specific antibodies are not available for all SE. During an SFPO, it regularly happens that no SEA-SEE type SE is found even though a typical symptomatology of staphylococcal poisoning has been identified. In addition, epidemiological data highlight the frequent presence of other seg, seh and sei type genes in *S. aureus* strains derived from SFPO. It is therefore necessary to develop analytical and confirmatory tools targeting a wide range of SE.

Mass spectrometry (MS) provides a high specificity in complex media and ability for multiplex analyses. Moreover, it does not necessarily requires the production of specific antibodies for each SE (except for particular formats, such as immunocapture). Thus, MS appears to be a relevant alternative, particularly for the detection of known or recently described SE for which no specific antibodies exist.

During this doctoral thesis, a very sensitive MS method was developed first for the quantification and characterization of the first eight SE (SEA-SEE and SEG-SEI) in food matrix. This method uses an extraction step of SE by immunocapture (commercial or CEA antibodies) followed by a trypsin digestion (bottom-up). The specificity of our method allowed the detection of all eight SE in food matrices. This method was optimized to reach a limit of detection between 0.1 and 0.5 ng/g. These concentrations correspond to the concentrations found during SFPO episodes. This MS method was successfully applied to a variety of SFPO matrices, giving results consistent with available ELISA and PCR (Polymerase Chain Reaction) tests.

In the meantime, in order to obtain more information on variants and their sequence, a top-down analysis (intact protein) was developed. The top-down analysis allows a global analysis of the sequence of the targeted SE as opposed to the bottom-up mode which only detects certain peptides. An optimization of MS parameters and data processing was performed and an internal standard was selected. This allowed us to obtain an absolute quantification method for SEA with a sensitivity close to the bottom-up technique. To illustrate the interest of this new method, it was applied to 13 SEA variant-producing strains, in parallel with genomic analyses.

Finally, we decided to extend the quantification beyond the first eight SE. Thus, we optimized a sample preparation method that does not use antibodies. The method was applied to SE produced by *S. aureus* strains in culture medium. We were able to identify 24 SE types and more than 162 variants for the first time. Peptides specific of each type and common to all variants were identified. Subsequently, a "label free" quantification method was proposed, based on the "Hi3" protocol, which consists in using the three most intense peptides of each SE for the quantification. By using this method, we were able to identify the ES produced in high quantity and to establish their kinetics of production by *S. aureus* in culture medium, giving new indications on the priority SE during SFPO.

## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire d'Etudes du Métabolisme des Médicaments (LEMM) du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Saclay et dans l'unité Staphylococcus, Bacillus, Clostridium (SBCL) de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) de Maisons-Alfort. Je tiens à tout d'abord à remercier **François Fenaille** responsable du LEMM et **Jacques-Antoine Hennekinne** chef de l'unité SBCL, pour m'avoir permis de bénéficier des moyens techniques et des compétences humaines et scientifiques au cours de ces trois années dans leurs laboratoires respectifs.

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres du jury, **Laurence Sabatier** et **Yves Le Loir** en tant que rapporteurs, **Julien Masquelier** et **Guillaume van der Rest** en tant qu'examineurs, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont à mes deux encadrants : **François Becher** mon directeur de thèse aux côtés duquel j'ai appris tellement de choses grâce à son expertise scientifique et à son immense implication dans ce travail; et **Yacine Nia**, pour son soutien et sa confiance accordés tout au long de ma thèse. Merci à vous deux pour vos encouragements ainsi que pour l'ensemble des conseils que vous m'avez donnés durant mon doctorat.

Je tiens à remercier **Julia Chamot-Rooke** de l'Institut Pasteur de Paris et **Thomas Berger** d'Agroscope, situé à Berne, pour les discussions et leur implication lors des comités de suivi de thèse.

Aussi, je voudrais remercier **Stéphanie Simon** pour la collaboration que nous avons eue avec le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse (LERI) du CEA de Saclay qu'elle dirige, et de ces conseils lors des comités de suivi de thèse. De plus, j'ai eu le plaisir de travailler avec **Cécile Feraudet-Tarisse** lors de cette collaboration, à qui je voudrais dire un grand merci pour le temps qu'elle a consacré à m'expliquer l'immunologie et pour sa disponibilité.

Un immense merci à toute l'équipe Staphylococcus de l'ANSES, **Florence, Sabine, Isabelle, Anne-Cécile, Laurence, Pascal, Marina, Catherine, Abdou, Noémie, Abdel, Rémi** et les anciens **Manon, Clément, Berivan, Déborah, Barthélémy** pour leur aide, leurs conseils avisés en biologie, leur gentillesse et leur bonne humeur au laboratoire.

Je tiens également à remercier l'équipe du SATAL de l'ANSES et tout particulièrement **Samy** pour sa bonne humeur et de nous avoir sauvés à plusieurs reprises quand on avait oublié de faire les commandes de BHI... ainsi que l'équipe de Bacillus, Clostridium dirigé par **Olivier Firmesse** avec qui j'ai pu échanger durant toute cette période sur des problématiques de biologie et de place de moto ! Dans la même équipe je tiens à remercier chaleureusement **Sophie** avec qui j'ai eu la chance d'échanger : encore merci pour tous tes bons conseils en protéomique. J'aimerais remercier **Julien, Ronel** et **Vincent** de l'unité PBM pour m'avoir partagé leur connaissance en spectrométrie de masse. Un grand merci à **Madeleine** pour les discussions de thésards (enfin quelqu'un qui me comprend !) bon courage pour la fin et **Mai**

**Lan** pour ta bonne humeur, les discussions autour d'un café dans l'open space et ta bienveillance.

Je souhaiterais remercier **Amine** et **Nina**, les deux stagiaires de M2 que j'ai eu la chance d'encadrer. Ça n'a pas toujours été facile entre les confinements et les pannes du Qex, mais vous avez tenu bon. Bonne chance pour vos thèses, ce n'est pas si terrible que ça.

Et non **Kevin** je ne t'ai pas oublié, merci d'avoir toujours été là du début à la fin. J'ai toujours pu compter sur ton aide dans nos recherches. Nous nous sommes très vite fait confiance et c'est ce qui a cimenté notre duo de choc. J'ai toujours apprécié nos discussions sur tout et rien comment sur créer une entreprise au Salvador ou sur tes analyses du cours du Bitcoin. Encore un grand merci pour ton aide et ton soutien.

Je voudrais remercier tout le personnel du Service de Pharmacologie et Immunoanalyse dirigé par **Christophe Junot** et plus particulièrement le laboratoire du LEMM avec **François, Jihene, Florence, Sophie, Céline, Emeline, Benoit, Anne-Laure, Sylvain, Jean-Claude, Ana-Rita, Thibaud, Anaïs, Paloma, Vincent, Anne-Sophie, Ahmad, Marie-Françoise, Sadia, Antoine, Alain, Frédéric, Etienne, Éric** et les anciens **Daniel, Christelle, Yasmina, Helene, Nihel, Thaïs, Sandrine**, Les anciens de *medDay*, mais également **Jessica** pour m'avoir supporté comme voisin de bureau. Merci également à **Maxence** pour avoir su ajouter un peu de classe et d'élégance à ce bureau, et pour les pauses café bien méritées.

Je ne pouvais faire l'économie d'un grand merci à la team **Julien, Chloé, Justyna, Marie** et **Kathleen** pour tous les bons moments au travail ou en soirée. Et oui : j'aime bien les accras de morue. Et non : je n'irai plus chez *Saadi l'artiste* pour ma coupe de cheveux. Encore un grand merci pour votre soutien et votre bonne humeur.

Je tiens également à remercier mes professeurs de master **Christophe Mariller** et **Coralie Bompard** pour m'avoir poussé sur la voie du thésard.

Je remercie également mes parents de m'avoir permis d'arriver jusque-là grâce à leurs encouragements. Ainsi que mes frères et ma sœur qui m'ont toujours poussé de l'avant et ont toujours cru en moi. Il y a aussi mes amis du Nord et d'ailleurs, que je reviens voir le plus souvent pour décompresser de la vie parisienne : merci d'avoir toujours été là.

Et finalement, merci **Violaine** pour avoir été présente à mes côtés durant ma thèse. Qui aurait cru que lors de ce stage de M1 je rencontrerai la thésarde avec qui je partage ma vie depuis plus de 4 ans. Merci pour ta complicité, ton soutien, ton aide précieuse au quotidien et enfin pour tout ton amour.

# Table des matières

<b>I</b>	<b>Introduction</b>	<b>18</b>
<b>I.A</b>	<b>Entérotoxine staphylococcique (ES)</b>	<b>19</b>
I.A.1	Historique et généralités	19
I.A.1.1	Découverte du <i>S. aureus</i>	19
I.A.1.2	Découverte des entérotoxines staphylococciques	19
I.A.1.3	Effet des entérotoxines staphylococciques	21
I.A.1.4	Diversité des entérotoxines staphylococciques	22
I.A.1.5	Structure des différentes entérotoxines staphylococciques	24
I.A.1.6	Gènes des entérotoxines staphylococciques	24
I.A.1.7	Mécanisme de l'activité des entérotoxines staphylococciques	27
I.A.1.7.1	L'activité émétique	27
I.A.1.7.2	L'activité super antigénique	28
I.A.1.8	Production des entérotoxines staphylococciques dans la matrice alimentaire	29
I.A.2	Toxi-infection alimentaire collective (TIAC)	30
I.A.2.1	TIAC a Staphylocoques dans l'Union européenne	31
I.A.2.2	TIAC a Staphylocoques en France	32
I.A.2.3	Les conditions de déclenchement d'une TIAC à staphylocoques	33
I.A.2.4	Processus de déclaration d'une TIAC	35
I.A.2.5	Impact économique des TIACs à <i>S. aureus</i>	36
<b>I.B</b>	<b>Techniques d'analyse des échantillons impliqués dans une TIAC à SCP</b>	<b>38</b>
I.B.1	Outils de détection du SCP et des gènes de pathogénicités	38
I.B.1.1	Détection des staphylocoques à coagulase positive (SCP)	38
I.B.1.2	Analyse de l'ADN par PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)	39
I.B.1.3	Analyse de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)	39
I.B.1.4	Analyse de l'ADN par séquençage génomique WGS (Whole Genome Sequencing)	40
I.B.1.5	Analyse de l'ARNm par qRT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)	41
I.B.2	Outils de détection des entérotoxines staphylococciques	42
I.B.2.1	Analyse des entérotoxines staphylococciques par la norme NF EN ISO 19020	42
I.B.2.2	Analyse des entérotoxines staphylococciques par les méthodes ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	43
I.B.2.3	Analyse des entérotoxines staphylococciques par les tests de flux latéral LFA (Lateral flow assay)	46
I.B.2.4	Analyse des entérotoxines staphylococciques par la méthode agglutination passive inversée au latex : RPLA (reversed passive latex agglutination)	47
I.B.2.5	Analyse des entérotoxines staphylococciques par la méthode de résonance plasmonique de surface ou SPR (Surface plasmon resonance)	47
I.B.2.6	Analyse des entérotoxines staphylococciques par les techniques des immuno-empreintes (Western Blot : WB)	47
I.B.2.7	Analyse des entérotoxines staphylococciques par la méthode de cytométrie en flux	48
I.B.2.8	Analyse des entérotoxines staphylococciques via l'utilisation d'Aptamères (Aptamer)	48
I.B.2.9	Analyse des entérotoxines staphylococciques par les tests sur animaux	49
I.B.2.10	Détection des entérotoxines staphylococciques par LC-MS	50
<b>I.C</b>	<b>Analyses protéomiques par spectrométrie de masse, applications aux ESs</b>	<b>51</b>
I.C.1	Principe de la spectrométrie de masse (MS)	51
I.C.1.1	Instrumentation	52
I.C.1.1.1	Source d'ionisation	52
I.C.1.1.2	Analyseur	53
I.C.1.1.3	Détecteur	54
I.C.1.1.4	Fragmentation	54
I.C.1.1.5	Instrument utilisé durant les travaux de thèse	55
I.C.2	Apport de la spectrométrie de masse pour l'analyse des protéines et stratégies analytiques	56
I.C.2.1	Stratégie analytique et mode d'acquisition des données	57
I.C.2.1.1	Stratégie bottom-up	57

I.C.2.1.2	Stratégie top-down	60
I.C.2.2	Les modes d'acquisition des données pour la protéomique (LC-MS)	62
I.C.2.2.1	Mode Selected Reaction Monitoring (SRM et MRM)	63
I.C.2.2.2	Mode parallel reaction monitoring (PRM)	64
I.C.2.2.3	Mode Data Dependent Acquisition (DDA)	66
I.C.2.2.4	Mode Data-independent acquisition (DIA)	67
I.C.3	Analyses protéomiques en matrices complexes	68
I.C.3.1	Effets de matrice et normalisation du signal	68
I.C.3.2	Préparation d'échantillons	69
I.C.3.2.1	Gel SDS-PAGE	69
I.C.3.2.2	Précipitation protéique (séparation en fonction du point isoélectrique)	70
I.C.3.2.3	Filtration / dialyse	70
I.C.3.2.4	Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation (SP3)	71
I.C.3.2.5	Chromatographie liquide et SPE pour le fractionnement	71
I.C.3.2.6	L'immuno-enrichissement ou immunocapture	72
I.C.4	Les approches de quantification par spectrométrie de masse	74
I.C.4.1	Quantification relative par spectrométrie de masse	74
I.C.4.1.1	Quantification relative par comptage spectral (sans marquage).	75
I.C.4.1.2	Quantification relative par marquage isotopique de l'échantillon	75
I.C.4.2	Quantification absolue des protéines	77
I.C.4.3	Quantification par un étalon non marqué aux isotopes stables	78
I.C.4.3.1	Gamme d'étalonnage externe	78
I.C.4.3.2	Gamme d'étalonnage par ajout dosé	79
I.C.4.4	Quantification par un étalon marqué aux isotopes stables	80
I.C.4.4.1	Peptides alourdis « AQUA »	81
I.C.4.4.2	Quantification concatamer « QconCAT »	82
I.C.4.4.3	Protein Standard Absolute Quantification « PSAQ »	82
I.C.4.5	Quantification absolue sans étalon dédié.	83
I.C.4.5.1	Quantification par l'intensité du pic chromatographique	83
I.C.4.5.2	Méthode Hi3	84
I.C.4.5.3	L'indice d'abondance des protéines (PAI)	84
I.C.4.6	Validation des méthodes de quantification absolue	85
I.C.5	Détection des entérotoxines par spectrométrie de masse	85
I.C.5.1	Les premières analyses en LC-MS des entérotoxines	85
I.C.5.2	Analyse des ESs par LC-MS après culture de <i>S. aureus</i>	86
I.C.5.3	Analyse des ESs par LC-MS dans les matrices biologiques	87
I.C.5.4	Analyse des ESs par LC-MS dans les matrices alimentaires	87
<b>I.D</b>	<b>Conclusion de l'étude bibliographique et objectifs de la thèse</b>	<b>90</b>
<b>II</b>	<b>Résultats &amp; Discussion</b>	<b>94</b>
<b>II.A</b>	<b>Résultats partie A: Détection et quantification des ESs dans les matrices alimentaires par immunocapture par protéomique bottom-up multiplexe</b>	<b>95</b>
II.A.1	Introduction partie A	95
II.A.2	Article 1: Quantitative Determination of <i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxins Types A to I and Variants in Dairy Food Products by Multiplex Immuno-LC-MS/MS.	97
II.A.3	Conclusion et discussion de l'article 1	114
II.A.4	Etudes complémentaires en lien avec l'article 1	115
II.A.4.1	Affinité des anticorps monoclonaux et cas des variants de séquence	115
II.A.4.2	Affinité des anticorps polyclonaux et cas des types, extension de la méthode à la toxine SEP	118
II.A.4.3	Analyse d'échantillons réels	123
II.A.4.3.1	Échantillons issus d'autocontrôles	123
II.A.4.3.2	Échantillons issus de TIACs	124
II.A.5	Conclusion et perspective partie A	126
<b>II.B</b>	<b>Résultat partie B : Analyse top-down des entérotoxines staphylococciques</b>	<b>129</b>
II.B.1	Introduction partie B	129
II.B.2	Article 2 Top-down mass spectrometry for trace level quantification of enterotoxin variants.	131
II.B.3	Conclusion et discussion de l'article 2	162

II.B.4	Etudes complémentaires en lien avec l'article 2	163
II.B.4.1	Optimisation de l'élution des toxines	163
II.B.4.2	Analyse par protéomique top-down des protéines SE A, B, C, D, E et rA, rG, rH, rI en tampon.	164
II.B.5	Conclusion et perspective partie B	172
<b>II.C</b>	<b>Résultats partie C : Détection et quantification d'un large panel d'entérotoxines sans l'utilisation d'anticorps, et applications.</b>	<b>173</b>
II.C.1	Introduction partie C	173
II.C.2	Article 3: Multiplex detection of 24 staphylococcal enterotoxins in culture supernatant using Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry (LC-MS)	175
II.C.3	Conclusion et discussion de l'article 3	200
II.C.4	Étude cinétique d'expression des ESS dans du milieu de culture BHI	202
II.C.4.1	Protocole de cinétique de production des ESS.	203
II.C.4.2	Sélection des souches de <i>S. aureus</i>	203
II.C.4.3	Résultat de la croissance bactérienne	204
II.C.4.4	Résultats des cinétiques de production des ESS	205
II.C.5	Conclusion et perspective partie C	209
<b>III</b>	<b>Conclusion</b>	<b>210</b>
	Annexes	217
	Références	253

## Table des figures

Figure 1 Arbre phylogénétique des entérotoxines, en rouge les toxines appartenant au groupe SEA, en noir les toxines appartenant au groupe SEB, en vert les toxines appartenant au groupe SEI et en bleu les toxines n'appartenant à aucun groupe. Proposer par Dong-Liang Hu et al 2021.....	23
Figure 2 Structure tridimensionnelle des entérotoxines de type SEA <sup>58</sup> , SEB <sup>59</sup> , SEC2 <sup>60</sup> , SEC3 <sup>61</sup> , SEG <sup>62</sup> , SEH <sup>63</sup> , SEI <sup>64</sup> , SEK <sup>53</sup> provenant de la revue de Hennekinne et al, 2012 <sup>65</sup> .....	24
Figure 3 Mécanisme physiologique, proposé par Fisher et al, 2018 <sup>82</sup> , à l'origine des vomissements induits par les entérotoxines. ....	27
Figure 4 Mécanisme de l'activation de la réponse antigénique par les entérotoxines : A) activation superantigénique (à gauche) et activation antigénique normal (à droite) se liant au CMH de classe II de l'APC et au récepteur des cellules T. B) Activités superantigéniques des enterotoxines (SAg), qui induisent une production massive de cytokines et provoquent ensuite une inflammation et un choc toxique chez les humains et les animaux. APC, cellules présentatrices d'antigènes ; MHC, complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR, récepteur d'antigènes des cellules T. Proposé par Dong-Liang Hu et al, 2021 <sup>56</sup> .....	28
Figure 5 Fréquence des agents associés à des foyers de TIACs confirmés, par type alimentaire, dans les États membres de l'UE déclarants, chiffre sur l'année 2019 (EFSA 2021) <sup>107</sup> .....	30
Figure 6 Graphique des quantités de SEA dans le lait, ingérée et provoquant des symptômes pour 44 cas. Asao et al 2003 .....	31
Figure 7 Répartition des foyers de TIACs confirmés, par lieu d'exposition et par agent causal, dans les États membres de l'UE déclarants, 2019 (EFSA 2021) <sup>107</sup> .....	32
Figure 8 Nombre de TIACs déclarées en France entre 1987 et 2019 (SPF 2021) <sup>110</sup> .....	32
Figure 9 Nombre de TIAC selon l'agent pathogène suspecté ou confirmé en France entre 2006 et 2019 (SPF 2021) .....	33
Figure 10 Exemple d'une contamination par le S. aureus d'un aliment provoquant une TIAC. 34	
Figure 11 Organigramme du système de déclaration des TIACs à SCP .....	36
Figure 12 Schéma de fonctionnement de la méthode PCR (origine addgener protocols) .....	40
Figure 13 Schéma de fonctionnement de la méthode WGS.....	41
Figure 14 Schéma des 4 modes les plus classiques de fonctionnement de la méthode ELISA	43
Figure 15 Schéma de fonctionnement de la méthode LFA proposée par la NASA .....	46

Figure 16 (a) Bille (b) AC de capture anti-entérotoxine (c) entérotoxine (d) AC de détection anti-entérotoxine biotinylée. (e) SA-PE. Provenant de Shepelyakovskaya et al en 2020 .....	48
Figure 17 Mesure des concentrations de SEA, SEB, et SEH dans un mélange incubé avec des AC de détection biotinylés et révélées avec SA-PE. Provenant de Shepelyakovskaya et al en 2020.....	48
Figure 18 Description d'un spectromètre de masse .....	52
Figure 19 Description par Gates et al 2014 d'une source d'ionisation ESI .....	52
Figure 20 Schéma descriptif d'un analyseur Orbitrap Thermo Fisher Scientific.....	54
Figure 21 Fragmentation sur les liaisons peptidiques induisant des ions fragments Roepstorff et Fohlman en 1984 .....	55
Figure 22 Description par Gates et al 2014 d'une cellule de collision de type HCD.....	55
Figure 23 Représentation schématique d'un Q Exactive par Michalski et al 2011.....	56
Figure 24 Réaction chimique du DTT et l'IAA sur les ponts disulfures Fremout et al, 2014....	58
Figure 25 Fréquence des sites de coupure de la trypsine pour les 45 paires d'acides aminés d'après Rodriguez et al, 2008.....	59
Figure 26 (A) Spectre full MS de deux protéines avec le profil d'état de charge. (B) Déconvolution du spectre full MS indiquant la masse exacte des deux protéines. Figure proposée par Marty et al, 2020 <sup>178</sup> .....	60
Figure 27 (À gauche) spectre full MS <sup>2</sup> d'une protéine avec les rapports m/z des fragments observés. (À droite) identification des fragments permettant le séquençage protéique. Figure proposé par Kafader et al, 2020.....	61
Figure 28 Description schématique de l'approche bottom-up et top-down. Adapté de scherl et al, 2015 .....	62
Figure 29 Vue d'ensemble de la méthode LC-SRM-MS. Adapté de Burnum-Johnson et al 2016 <sup>195</sup> .....	63
Figure 30 Vue d'ensemble de la méthode LC-PRM-MS. Adapté de Burnum-Johnson et al, <sup>195</sup> 2016.....	64
Figure 31 Vue d'ensemble de la méthode LC-PRM-MS en mode MSX (n=3). .....	65
Figure 32 Vue d'ensemble de la méthode LC-PRM-MS en mode broad-band.....	65
Figure 33 Vue d'ensemble d'un cycle de la méthode LC-DDA-MS (N=3). .....	66
Figure 34 Vue d'ensemble d'un cycle de la méthode LC-DIA-MS.....	67
Figure 35 Protocole FASPe proposé par Erde et al 2014 .....	71

Figure 36 Schéma du plan expérimental de Shi et al 2012 <sup>237</sup> pour le fractionnement du plasma humain par colonne C18. ....	72
Figure 37 Protocole de préparation des échantillons basé sur l'immuno-enrichissement multiplexé proposé par Dupré et al, 2015 .....	74
Figure 38 Les 3 méthodes de quantification relative avec marquage isotopique : SILAC, ICAT, H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O proposé par Aebersold et al, 2003 <sup>207</sup> .....	76
Figure 39 Méthode de quantification relative avec marquage : iTRAQ proposé par Sciex.....	77
Figure 40 Représentation de la justesse et de la fidélité en schéma.....	77
Figure 41 Méthode de quantification par étalonnage externe .....	79
Figure 42 Méthode des ajouts dosés proposé par INRS MétroPol.....	79
Figure 43 Trois stratégies de quantification absolue PQSA, QconCAT, AQUA peptide proposé par Brun et al, 2009.....	80
Figure 44 Principe général de la quantification par méthode QconCAT, proposé par Pratt et al 2006.....	82
Figure 45 Formule de quantification de l'analyte par la méthode Hi3.....	84
Figure 46 Alignement de séquence des 4 variants de SEA par le logiciel Clustal Omega version 1.2.4. Le peptide signal est en surlignage jaune, les mutations par rapport au variant de référence SEA <sub>3</sub> sont en bleu. Les * indiquent une homologie, les autres symboles indiquent une absence d'homologie. ....	116
Figure 47 Séquence de la toxine SEB (Uniprot P01552) avec la position des fragments b et y observés. ....	165
Figure 48 Séquence de la toxine SEC (Uniprot P34071) avec la position des fragments b et y observés. ....	165
Figure 49 Séquence de la toxine SED <sub>3</sub> (provenant du souchier de l'ANSES) avec la position des fragments b et y observés.....	166
Figure 50 Graphique de prédiction du peptide signal de la toxine SEE par le logiciel SignalP version 4.1. Le C-score permet de distinguer les sites de clivage du peptide signal, le Y-score indique les potentielles positions de fin du peptide, le S-score est une prédiction lissée du site de clivage provenant du C-score brut. ....	166
Figure 51 Séquence de la toxine SEE (Uniprot P12993 + SEK) avec la position des fragments b et y observés. ....	167
Figure 52 Déconvolution du signal de rSEA et schéma de la molécule AEBFS. ....	167

Figure 53 Séquence de la toxine rSEA (Uniprot POA0L2 + tag his) avec la position des fragments b et y observés. ....	168
Figure 54 Séquence de la toxine rSEG (Uniprot POA0L8 + met + tag his) avec la position des fragments b et y observés. ....	168
Figure 55 Déconvolution du signal de rSEH et schéma de la molécule AEBFS. ....	169
Figure 56 Séquence de la toxine rSEH (Uniprot Q6VAM8 + met + sans tag his) avec la position des fragments b et y observés. ....	169
Figure 57 Déconvolution du signal de rSEH et schéma de la molécule AEBFS. ....	169
Figure 58 Séquence de la toxine rSEI (Uniprot Q7X0E6 + met + tag his) avec la position des fragments b et y observés et en bleu le recouvrement de séquence en analyse bottom-up (par digestion trypsique).....	170
Figure 59 Probabilité d’observer les fragments b en fonction de l’acide aminé précédent, d’après Ives et al 2020.....	170
Figure 60 Spectre de fragmentation de la toxine SEB, identification des fragments majoritaires .....	171
Figure 61 Probabilité d’observer les fragments y en fonction de l’acide aminé précédent, d’après Ives et al 2020.....	171
Figure 62 Spectre de fragmentation de la toxine rSEA, identification du fragment b11 .....	172
Figure 63 Graphique logarithmique représentant la cinétique de croissance bactérienne des 6 souches étudiées par la densité optique (DO) sur 24h.....	204
Figure 65 Représentation graphique de la quantité d’ESs produites au cours de la cinétique par type de profils. Figure A comparaison entre deux souches productrices de SEB représentant le premier profil, Figure B comparaison entre deux souches productrices de SEQ représentant le second profil.....	206
Figure 64 Cinétique de production des ESs par la souche 05CEB52, l’axe vertical de droite représente la concentration des ESs en ng/mL de BHI et l’axe vertical de gauche représente la DO à 600nm avec une échelle logarithmique. Le cadre noir représente le zoom du deuxième graphique. ....	206
Figure 66 Figure A production de SEG, SEI et SEM par la souche 15SBCL1151, Figure B production de SEG, SEI et SEM par la souche 05CEB52. Représentant le troisième profil. ..	207
Figure 67 Graphique théorique représentant les trois profils identifiés pour la production des ESs, et en noir la production de <i>S. aureus</i> .....	207
Figure 68 : Protocole d’extraction des ESs sans anticorps (AP agent précipitant) .....	220

Figure 69: Résultat des gammes de sensibilité des 8 ESs dans le lait par la méthode gel SDS-PAGE .....	221
Figure 70 Cinétique de production des ESs par la souche 15SBCL1151 .....	249
Figure 71 Zoom Cinétique de production des ESs par la souche 15SBCL1151 .....	249
Figure 72 Cinétique de production des ESs par la souche 17SBCL693 .....	250
Figure 73 Cinétique de production des ESs par la souche 09CEB303 .....	250
Figure 74 Cinétique de production des ESs par la souche 46A .....	251
Figure 75 Cinétique de production des ESs par la souche 18SBCL855 .....	251
Figure 76 Zoom cinétique de production des ESs par la souche 18SBCL855 .....	252

## Table des tableaux

Tableau 1 Référencement des entérotoxines en fonction de leur année de découverte.....	20
Tableau 2 La liste des Entérotoxines staphylococciques pour lesquelles une activité émétique a été démontrée sur animaux.....	21
Tableau 3 Localisation chromosomique des gènes codant pour les entérotoxines staphylococciques .....	25
Tableau 4 Facteurs affectant la croissance et la production d'entérotoxines par <i>Staphylococcus aureus</i> (Tatini, 1973) <sup>104</sup> .....	29
Tableau 5 Aperçu des spectromètres de masse les plus couramment utilisés (Junot et al 2014) .....	53
Tableau 6 Site de coupure des principales enzymes utilisées pour l'analyse des protéines par spectrométrie de masse.....	60
Tableau 7 Entérotoxines étudiées par MS issues d'une production par le <i>S. aureus</i> dans un milieu de culture. ....	86
Tableau 8 Entérotoxines étudiées par MS dans des matrices biologiques. ....	87
Tableau 9 Entérotoxines étudiées par MS dans des matrices alimentaires .....	89
Tableau 10 Détection des variants pour les toxines SEA, SEB, SEG, SEH et SEI provenant de 38 souches (colonne de gauche) avec les méthodes ELISA monoclonaux (colonne du milieu) et Immunocapture LC-MS (colonne de droite). Le numéro indique la présence du gène et la référence du variant, la couleur verte indique que la méthode a identifié la toxine et le rouge la non détection. ....	117
Tableau 11 Matrice d'identité de 26 types d'ESs avec des séquences provenant d'Uniprot, rouge >84%, bleu entre 70-84%, vert entre 60-70%, marron entre 50-60%, blanc <50% d'identité. ....	119
Tableau 12 Analyse ELISA des réactions croisées des anticorps polyclonaux anti-SEA et anti-SEE contre les toxines SEA, SEE et SEP. Standard concentré à 20 ng/mL.....	120
Tableau 13 Résultat de la sélection et de l'optimisation des peptides de SEP.....	121
Tableau 14 Analyse LC-MS des réactions croisées des anticorps polyclonaux anti-SEA et anti-SEE contre les toxines SEA, SEE et SEP. Etalon concentré à 20 ng/mL. Si détection positive, la toxine identifiée est indiquée. ....	122
Tableau 15 Analyse par immunocapture LC-MS des réactions croisées de l'anticorps commercial monoclonal MBS211928 anti-SEA à SEE, avec les pourcentages d'affinité indiqués	

par le fabricant par rapport à SEB. Ac Spé SEB et SEI sont les anticorps spécifiques de la méthode de l'article 1. En vert la détection des toxines, en vert claire la détection des toxines avec peu d'intensité. Les 8 étalons sont surchargés à 20 ng/mL.....	122
Tableau 16 Résumé des résultats obtenus sur les autocontrôles avec les différentes méthodes : dénombrement, PCR, ELISA, et LC-MS.....	124
Tableau 17 Résumé des résultats obtenus pour les échantillons de TIACs avec les différentes méthodes dénombrement, PCR, ELISA, et LC-MS.....	126
Tableau 18 Résultats et conditions de l'optimisation de l'élution de la SEA après immunocapture.....	164
Tableau 19 Souches sélectionnées avec les gènes des ESs identifiés par WGS .....	203

## Liste des abreviations

<b>AB50</b>	Ammonium bicarbonate 50 mM
<b>AB500</b>	Ammonium bicarbonate 500 mM
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AF</b>	Acide Formique
<b>ANSES</b>	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail
<b>ANSM</b>	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
<b>ARNm</b>	Acide RiboNucléique messenger
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CDC</b>	Center of Disease Control
<b>CE</b>	commission européenne
<b>CEA</b>	Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
<b>CID</b>	Collision-induced dissociation
<b>CMH</b>	complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPA</b>	cellules présentatrices d'antigènes
<b>Da</b>	Dalton
<b>DD(CS)PP</b>	direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations
<b>DDA</b>	Data Dependent Acquisition
<b>DGAL</b>	Direction générale de l'alimentation
<b>DIA</b>	Data-independent acquisition
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EFSA</b>	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>EN</b>	European Norm
<b>ES</b>	Entérotoxines Staphylococciques
<b>ESI</b>	Electrospray Ionization
<b>HCD</b>	High energy collision dissociation
<b>Hi3</b>	High three ion intensity approach
<b>IAA</b>	Iodoacétamide
<b>IS</b>	standard interne / étalon interne
<b>ISO</b>	International Standard Organization
<b>kV</b>	kiloVolt
<b>LB</b>	lysogeny broth
<b>LC-MS</b>	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
<b>LFA</b>	Tests de flux latéral
<b>LNR</b>	Laboratoire National de Référence
<b>LOD</b>	Limit Of Detection
<b>LLOQ</b>	Low Limit Of Quantification
<b>LRUE</b>	Laboratoire de Référence de l'Union Européenne
<b>LSAI</b>	Laboratoire de Sécurité des Aliments
<b>m/z</b>	Rapport masse (m) sur charge (z)

<b>MALDI</b>	Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice
<b>MSXn</b>	multiplex
<b>NAuRA</b>	Nice automatic Research of alleles
<b>OD</b>	Optical Density
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PFGE</b>	Pulsed-field Gel Electrophoresis
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>PRM</b>	Parallel Reaction Monitoring
<b>PSAQ</b>	Protein Standard Absolute Quantification
<b>PTM</b>	modifications post-traductionnelles
<b>RPLA</b>	Rapid latex agglutination
<b>rpm</b>	rotation par minute
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SBCL</b>	Staphylocoques, Bacillus, Clostridies
<b>SCP</b>	Staphylocoques à Coagulase Positive
<b>SDS-PAGE</b>	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SE</b>	Staphylocoque Enterotoxin
<b>SM</b>	Spectrométrie de Masse
<b>SP3</b>	Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation
<b>SPE</b>	solid-phase extraction
<b>SPF</b>	Santé Publique France
<b>SPR</b>	Résonance plasmonique de surface
<b>SRM/MRM</b>	Selected Reaction Monitoring
<b>TCA</b>	Acide trichloroacétique
<b>TCR</b>	récepteur d'antigène des cellules T
<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>TIAC</b>	Toxi-Infection Alimentaire Collective
<b>TOF</b>	Time of flight
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth
<b>WB</b>	Western blot
<b>WGS</b>	Whole Genome Sequencing

# I Introduction

# I.A Entérotoxine staphylococcique (ES)

## I.A.1 Historique et généralités

### I.A.1.1 Découverte du *S. aureus*

En 1878, Robert Koch, un médecin allemand, décrit pour la première fois des grappes de coques dans du pus d'origine humaine. Dans la décennie suivante (1881), Alexander Ogston professeur de médecine écossais, propose le nom "*Staphylococcus*" et différencie *Staphylococcus* de *Streptococcus*. Vaughan et Sternberg décrivent en 1884 pour la première fois, suite à la consommation de fromage dans le Michigan, le lien entre une toxoinfection alimentaire collective (TIAC) et le staphylocoque<sup>1</sup>. En 1914, Barber a été le premier à établir un lien entre une TIAC à staphylocoques et une substance toxique produite par les staphylocoques<sup>2</sup>. En effet, les auteurs ont prouvé que la consommation de lait d'une vache porteuse de mammite à Staphylocoques provoquait une maladie lorsque ce lait n'était pas conservé en conditions réfrigérées. Lors du siège de Verdun (printemps 1918), Baerthlein<sup>3</sup> décrit en 1922 un épisode toxique lié à la consommation de saucisses. La mise en évidence de coques et la description des symptômes spécifiques d'une intoxication par toxines microbiennes ont permis d'attribuer la cause de cette TIAC aux entérotoxines staphylococciques (ES). En 1929, Dack a mis en évidence le rôle des staphylocoques dans les intoxications alimentaires collectives suite à l'intoxication de 11 personnes ayant consommés deux gâteaux de Noël à base de génoise et fourrés à la crème épaisse<sup>4</sup>. Ces gâteaux ont été cuits probablement un jour avant la livraison puis consommés deux jours plus tard. A l'aide de volontaires humains, Dack et ses associés ont montré que la génoise était l'aliment responsable de l'intoxication. En effet, les auteurs ont conclu que les staphylocoques isolés ont produit « *une substance toxique* » qui a provoqué les symptômes typiques d'une intoxication alimentaire chez les volontaires humains, sans la nommée entérotoxine. Cette étude a permis de débiter la recherche sur l'implication des toxines staphylococciques dans l'intoxication alimentaire.

### I.A.1.2 Découverte des entérotoxines staphylococciques

Les staphylocoques peuvent produire des protéines appelées entérotoxines staphylococciques (ES), apparentées mais sérologiquement distinctes. Actuellement, 35 types d'ESs sont décrites dans la littérature et sont différenciées par une lettre de l'alphabet suivant les lettres « SE » (pour Staphylococcal Enterotoxins, comme SEA pour le type A) incrémentées selon l'année de la découverte, voir le Tableau 1. Une fois la nomenclature alphabétique terminée en 2015, et suite à l'absence de concertation entre les auteurs, deux nouvelles nomenclatures ont été utilisées dans la littérature : l'une note les nouvelles entérotoxines dans un ordre numérique à partir de 01 et l'autre note également les nouvelles entérotoxines dans un ordre numérique mais à partir de 26 (pour la suite de l'alphabet).

Tableau 1 Référencement des entérotoxines en fonction de leur année de découverte

Type de l'entérotoxine staphylococcique	Année de découverte	Référence
A (SEA) et B (SEB)	1963	Casman et al, 1963 <sup>5</sup>
C (SEC)	1965	Bergdoll et al, 1965 <sup>6</sup>
D (SED)	1967	Casman et al, 1967 <sup>7</sup>
E (SEE)	1971	Bergdoll et al, 1971 <sup>8</sup>
G (SEG)	1998	Munson et al, 1998 <sup>9</sup>
H (SEH)	1994	Ren et al, 1994 <sup>10</sup> Su et Wong, 1996 <sup>11</sup>
I (SEI)	1995	Munson et al, 1998 <sup>9</sup>
J (SEIJ)	1998	Zhang et al, 1998 <sup>12</sup>
K (SEK)	2001	Jarraud et al, 2001 <sup>13</sup> Orwin et al, 2001 <sup>14</sup>
L (SEL), M (SEM), N (SEN) et O (SEO)	2001	Jarraud et al, 2001 <sup>13</sup>
P (SEP)	2001	Kuroda et al, 2001 <sup>15</sup>
Q (SEQ)	2002	Jarraud et al, 2002 <sup>16</sup>
R (SER)	2003	Omoe et al, 2003 <sup>17</sup>
S (SES), T (SET)	2008	Ono et al, 2008 <sup>18</sup>
U (SEIU)	2003	Letertre et al, 2003 <sup>19</sup>
V (SEIV), U2 (SEIU2) -> W (SEIW)	2006	Thomas et al, 2006 <sup>20</sup> Argudin et al, 2010 <sup>21</sup>
X (SEIX)	2011	Wilson et al, 2011 <sup>22</sup>
Y (SEY)	2015	Ono et al, 2015 <sup>23</sup>
Z (SEIZ)	2015	Spoor et al, 2015 <sup>24</sup>
01 (SEI01)	2017	Hisatsune et al, 2017 <sup>25</sup>
26 (SEI26) et 27 (SEI27)	2018	Zhang et al, 2018 <sup>26</sup>
02 (SE02)	2020	Suzuki et al, 2020 <sup>27</sup>
28 (SEI28), 29 (SEI29), 30 (SEI30), 31 (SEI31), 32 (SEI32) et 33 (SEI33)	2021	Dicks et al, 2021 <sup>28</sup>

A noter, l'entérotoxine F (SEF) a été retirée de la liste des ESs car la toxine du syndrome du choc toxique (TSST) a été identifiée à tort comme SEF lorsqu'elle a été isolée pour la première fois<sup>29</sup>. L'entérotoxine SEIU2 a été renommée en 2010 par Argudin et al, 2010<sup>21</sup> (10.3390/toxins2071751) en SEIW car elle possède une différence de séquence génomique distincte avec SEIU<sup>30</sup>.

La SEB a été particulièrement étudiée pour sa forte production par le *S. aureus*. Suite à des études réalisées dans les années 70 aux Etats-Unis lors d'un programme militaire sur la stabilité et la capacité de dispersion par aérosol, la SEB a été classée par le CDC (Center of Disease Control) comme agent incapacitant utilisable dans un cadre bioterroriste. Elle est de ce fait considérée comme agent de la menace<sup>31</sup>. En France, depuis 2001, la possession, la cession, la production et la mise en œuvre de la SEB sont soumises à une réglementation

stricte<sup>32</sup>. Les autorisations de détention et de mise en œuvre de la SEB sont délivrées par l'ANSM après la validation du dossier administratif et inspection des lieux du demandeur (L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé).

### I.A.1.3 Effet des entérotoxines staphylococciques

Les ESs ont, pour la majorité, un effet émétique démontré qui se traduit par des symptômes de vomissement, diarrhée et nausée se manifestant rapidement après ingestion, entre 30 min et 8 h. Cette vitesse d'apparition des premiers symptômes est généralement spécifique à l'ingestion de certains types de toxines bactériennes. La dose émétique provoquant les symptômes dépend de l'espèce et de l'individu. Chez l'humain, des études sur des TIACs ont permis d'établir des doses émétiques comprises entre 20 à 100 ng de SEA/individu<sup>33</sup>. Cependant, d'autres études indiquent des doses plus importantes<sup>34</sup> ou plus faibles<sup>35</sup>. De plus, aucune étude n'a été réalisée sur l'homme afin d'évaluer l'influence du type de l'ES ingérée ou de l'ingestion simultanée de plusieurs types d'ESs. En effet, les souches isolées des épisodes de TIACs possèdent généralement entre un à 13 gènes codant pour des ESs<sup>36</sup>.

Actuellement, les tests sur les animaux ou plus récemment sur cellule<sup>37,38</sup> ont permis de confirmer l'activité émétique d'une vingtaine d'ESs. A l'inverse la lettre « I » est ajoutée à l'acronyme pour les ESs dont l'activité émétique n'a pas été démontrée à ce jour (comme SEIJ par exemple). Le Tableau 2 présente une liste d'une sélection des études réalisées sur les effets émétiques des ESs. Elle évolue régulièrement de par l'identification de nouvelles ESs et de par la démonstration de leurs activités émétiques. La liste proposée dans le Tableau 2 n'est pas exhaustive.

*Tableau 2 La liste des Entérotoxines staphylococciques pour lesquelles une activité émétique a été démontrée sur animaux*

Toxine	Animal	Administration	Dose émétique	Références
SEA	singe	orale	5-20 µg/animal	Bergdoll et al, 1988 <sup>39</sup>
SEB	singe	orale	5-20 µg/animal	Bergdoll et al, 1988 <sup>39</sup>
SEC	singe	orale	5-20 µg/animal	Bergdoll et al, 1988 <sup>39</sup>
SED	singe	orale	5-20 µg/animal	Bergdoll et al, 1988 <sup>39</sup>
SEE	singe	orale	5-20 µg/animal	Bergdoll et al, 1988 <sup>39</sup>
SEG	singe	nasogastrique	80 µg/kg	Munson et al, 1998 <sup>9</sup>
SEH	singe	orale	30 µg/animal	Su et Wong et al, 1995 <sup>11</sup>
SEI	singe	nasogastrique	150 µg/kg	Munson et al, 1998 <sup>9</sup>
SEK	musaraigne	intraperitoneal	100-1000 µg/animal	Ono et al, 2017 <sup>40</sup>
SEL	musaraigne	intraperitoneal	100-1000 µg/animal	Ono et al, 2017 <sup>40</sup>
SEM	musaraigne	intraperitoneal	100-1000 µg/animal	Ono et al, 2017 <sup>40</sup>
SEN	musaraigne	intraperitoneal	100-1000 µg/animal	Ono et al, 2017 <sup>40</sup>

SEO	musaraigne	intraperitoneal	100-1000 µg/animal	Ono et al, 2017 <sup>40</sup>
SEP	singe	nasogastrique	10-100 µg/kg	Omoe et al, 2013 <sup>41</sup>
SEQ	singe	nasogastrique	10-100 µg/kg	Omoe et al, 2013 <sup>41</sup>
SER	musaraigne singe	intragastric	100 µg/kg	Ono et al, 2008 <sup>18</sup>
SES	musaraigne singe	intragastric	100 µg/kg	Ono et al, 2008 <sup>18</sup>
SET	musaraigne singe	intragastric	100 µg/kg	Ono et al, 2008 <sup>18</sup>
SEY	ouistitis	intragastric	50-250 µg/kg	Ono et al, 2019 <sup>42</sup>
SE02	ouistitis	intragastric	250 µg/kg	Suzuki et al, 2020 <sup>27</sup>

L'absence de modèle animal capable de reproduire précisément la réponse clinique chez l'humain lors d'une TIAC est l'un des facteurs limitant les études de toxicité des ESs. Les modèles animaux classiques comme la souris, le rat ou le lapin ne possèdent pas la même sensibilité que celle retrouvée chez l'humain, à l'inverse du chien qui s'est avéré trop sensible. Par ailleurs, l'utilisation du primate présente de nombreux avantages car la réponse clinique est proche de celle observée chez l'humain. Cependant, ce modèle reste très coûteux et contraignant : en effet, l'animal refuse de s'alimenter après la première consommation de l'aliment contaminé ou l'administration de l'entérotoxine <sup>43,44</sup>, de plus l'utilisation d'animaux pose des problématiques éthiques.

Les ESs ont également une activité super antigénique permettant la stimulation d'un grand nombre de lymphocytes T et de provoquer une réponse immunitaire.

#### I.A.1.4 Diversité des entérotoxines staphylococciques

En plus de la diversité liée aux types, il existe une diversité de séquence protéique sous forme de variants « sous- types ». Chaque type d'ES possède des variants contenant quelques modifications en acides aminés (1 à environ 50 acides aminés de différence)<sup>45</sup>. Merda et al, 2020<sup>36</sup> ont proposé un seuil de 84% d'identité pour discriminer les types d'ESs, si l'identité est supérieure à ce seuil nous parlerons de variant. Pour certaines ESs, comme pour la SEIX, il existe plus de 50 variants décrits tandis que d'autres n'en présentent que 3 comme dans le cas de la SEE (NAuRA : Nice automatic Research of alleles). Les variants des ESs sont peu étudiés globalement et toute l'identification des variants n'a été réalisée que sur leurs gènes codant par séquençage génomique. Ceci est dû au manque d'outils d'analyses protéomiques. Par comparaison, les variants de la toxine bactérienne de *Clostridium botulinum* sont relativement mieux décrits aussi bien au niveau génomique<sup>46</sup>, que protéomique<sup>47</sup>. Pour la toxine botulique, il a été décrit que les variations de séquences peuvent biaiser aussi bien les analyses PCR que les méthodes utilisant des anticorps <sup>48,49</sup>. Cet effet des variants sur la détection de la toxine botulique pourrait être extrapolé aux ESs.

Parmi les 35 ESs décrites dans la littérature, il existe des homologies de séquences plus ou moins proches entre certains types d'ESs (entre 20 - 84% d'homologie au niveau protéique).

Selon l'homologie de séquence, les ESs peuvent être classées en plusieurs groupes (Figure 1).

- Le groupe SEA comprenant les types SEA, SED, SEE, SEH, SEIJ, SEN, SEO, SEP, SES et SE01. Ces ESs contiennent une boucle de cystéines avec 9 acides aminés<sup>50,51</sup>.
- Le groupe SEB qui comprend les types SEB, SEC, SEG, SER, SEIU, SEIW, SEIZ et SE02. Il a une structure superantigénique centrale en plus d'une boucle de cystéines qui a une séquence variable de 10 à 19 acides aminés<sup>50,52</sup>.
- Le groupe SEI qui comprend les types SEI, SEK, SEL, SEM, SEQ et SEIV. Les ESs de ce groupe sont dépourvues de la boucle de cystéines<sup>11,14,53-55</sup>.

Un arbre phylogénétique proposé par Hu et al, 2021<sup>56</sup> a permis d'identifier ces groupes Figure 1.

Actuellement, les ESs SEI26 à SEI33 n'ont pas encore été associées à un groupe.

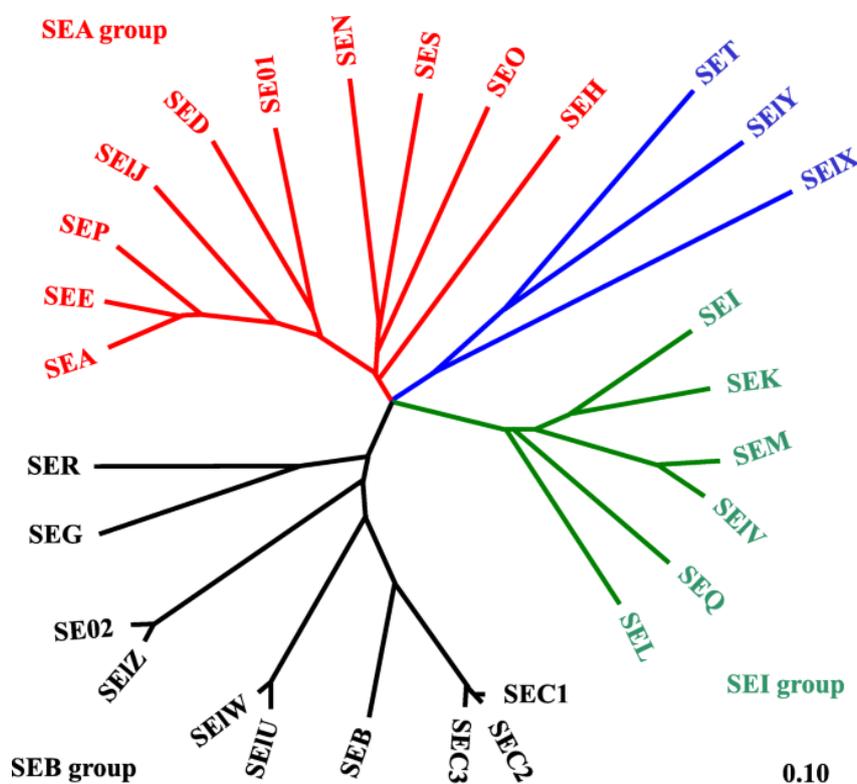


Figure 1 Arbre phylogénétique des entérotoxines, en rouge les toxines appartenant au groupe SEA, en noir les toxines appartenant au groupe SEB, en vert les toxines appartenant au groupe SEI et en bleu les toxines n'appartenant à aucun groupe. Proposer par Dong-Liang Hu et al 2021

### I.A.1.5 Structure des différentes entérotoxines staphylococciques

Les ESs sont des protéines riches en lysines, acides aspartiques, acides glutamiques et tyrosines et possèdent une structure en 3 dimensions (3D) comme illustré Figure 2 (Illustration de la structure 3D de SEA, SEB, SEC, SEG, SEH, SEI, SEK). Le repliement de des protéines est dû à un pont disulfure très souvent présent et conservé entre les ESs.

Les ESs sont très stables, résistantes à la plupart des enzymes protéolytiques telles que la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, la rénine ou la papaïne et gardent ainsi leur activité après ingestion d'aliments contaminés dans le tube digestif. De plus, elles sont très résistantes à la précipitation acide, à des hautes températures (résistance à 120°C durant 30min) et ainsi elles ne sont généralement pas détruites dans l'aliment contaminé lors de sa cuisson<sup>57</sup>. Cependant, le *S. aureus* est beaucoup plus sensible à la température, il peut donc être dégradé lors de la préparation des aliments contaminés, il est donc possible de produire des aliments contenant uniquement des ESs sans trace de la souche productrice.

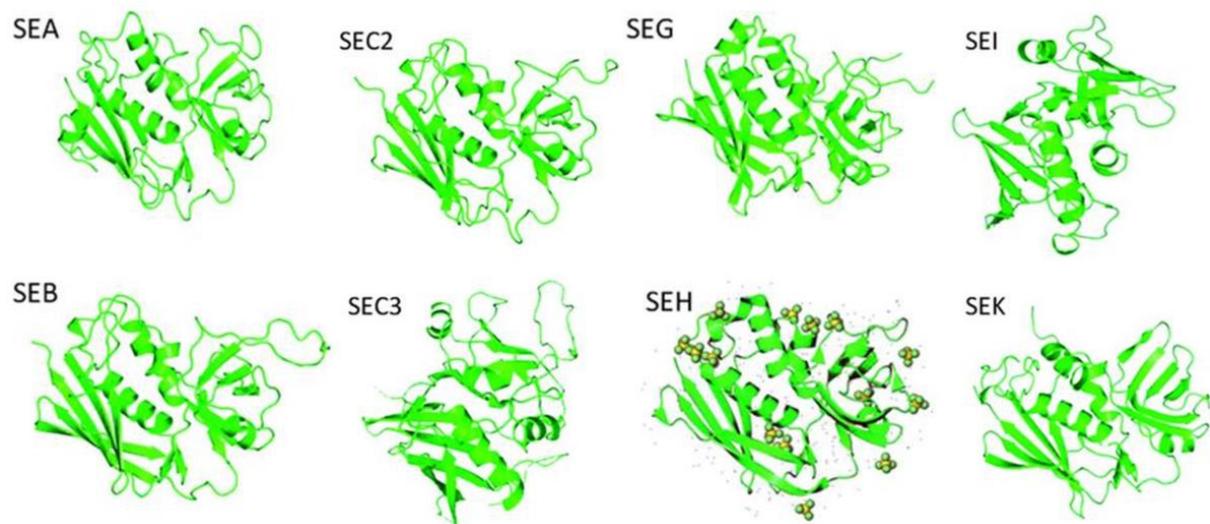


Figure 2 Structure tridimensionnelle des entérotoxines de type SEA<sup>58</sup>, SEB<sup>59</sup>, SEC2<sup>60</sup>, SEC3<sup>61</sup>, SEG<sup>62</sup>, SEH<sup>63</sup>, SEI<sup>64</sup>, SEK<sup>53</sup> provenant de la revue de Hennekinne et al, 2012<sup>65</sup>

### I.A.1.6 Gènes des entérotoxines staphylococciques

Les gènes des entérotoxines staphylococciques (*es*) sont localisés au sein de différentes régions du génome, ils peuvent être intégrés dans le chromosome bactérien ou sur des plasmides, qui sont des petits fragments d'ADN circulaires très facilement transmissibles entre les bactéries. La localisation au sein du chromosome bactérien peut varier en fonction du type d'ES comme des îlots de pathogénicité, fragments prophages ou sur des opérons comme le groupe *egc*. Un opéron est une unité d'ADN fonctionnelle regroupant des gènes *es* contrôlés par le même promoteur. Sur un opéron, l'ensemble des gènes *es* est donc transcrit en ARN messager puis traduit en protéine en même temps. Jarraud et al, 2001<sup>13</sup> ont identifié que l'opéron *egc* comporte les gènes *seg* et *sei*. Par la suite les gènes *sem*, *sen*, *seo* et *seu* ont été ajoutés à cet opéron. Les ESs de l'opéron *egc*

sont généralement présentes ensemble. Le Tableau 3 illustre la position des entérotoxines déjà connues.

Tableau 3 Localisation chromosomique des gènes codant pour les entérotoxines staphylococciques

Entérotoxine	Localisation du gène	Références
SEA	Prophage	Betley & Mekalanos (1985) <sup>66</sup> Borst & Betley (1994) <sup>67</sup>
SEB	Chromosome, plasmide, ilot de pathogénicité	Jones & Khan (1986) <sup>68</sup> Shafer & landolo (1978) <sup>69</sup> Shalita et al. (1977) <sup>70</sup> Altboum et al. (1985) <sup>71</sup>
SEC	Chromosome, plasmide, ilot de pathogénicité	Bohach & Schlievert (1987) <sup>72</sup> Hovde et al. (1990) <sup>73</sup> Altboum et al. (1985) <sup>71</sup> Fitzgerald et al. (2001) <sup>74</sup>
SED	Plasmide	Chang & Bergdoll (1979) <sup>75</sup> Bayles & landolo (1989) <sup>76</sup>
SEE	Prophage	Couch et al. (1988) <sup>77</sup>
SEG	Opéron <i>egc</i> , chromosome	Munson et al. (1998) <sup>9</sup> Jarraud et al. (2001) <sup>13</sup>
SEH	Transposon	Su & Wong (1996) <sup>11</sup> Ren et al. (1994) <sup>10</sup> Noto & Archer (2006) <sup>78</sup>
SEI	Opéron <i>egc</i> , chromosome	Munson et al. (1998) <sup>9</sup> Jarraud et al. (2001) <sup>13</sup>
SEIJ	Plasmide	Zhang et al. (1998) <sup>12</sup>
SEK	Ilot de pathogénicité	Orwin et al. (2001) <sup>14</sup>
SEL	Ilot de pathogénicité	Orwin et al. (2003) <sup>55</sup>
SEM	Opéron <i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al. (2001) <sup>13</sup>
SEN	Opéron <i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al. (2001) <sup>13</sup>
SEO	Opéron <i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al. (2001) <sup>13</sup>
SEP	Prophage	Kuroda et al. (2001) <sup>15</sup> Omoe et al. (2005) <sup>79</sup>
SEQ	Ilot de pathogénicité	Jarraud et al. (2002) <sup>16</sup> Diep et al. (2006) <sup>80</sup>
SER	Plasmide	Omoe et al. (2003) <sup>17</sup>
SES	Plasmide	Ono et al. (2008) <sup>18</sup>
SET	Plasmide	Ono et al. (2008) <sup>18</sup>
SEIU	Opéron <i>egc</i> , chromosome	Letertre et al. (2003) <sup>19</sup>
SEIV	Opéron <i>egc</i> , chromosome	Thomas et al. (2006) <sup>20</sup>
SEIW	Opéron <i>egc</i> , chromosome	Thomas et al. (2006) <sup>20</sup>

L'*egc* contient également deux pseudogènes ( $\varphi$ ent1 et  $\varphi$ ent2). Ce locus pourrait jouer le rôle de formation des gènes *es*. En effet, des phénomènes de duplications et de recombinaisons à partir d'un gène ancestral commun pourraient expliquer la formation de nouvelles entérotoxines. Ceci a été démontré, au sein de l'opéron *egc*, par l'identification de gènes codant pour *seu*, *seu2* qui a été renommé *sew* et *sem-sev*<sup>19,20</sup>. La localisation des gènes codant pour des ESs, sur des éléments génétiques mobiles (plasmides) peut entraîner un transfert horizontal de gènes entre les souches de *S. aureus*. Par exemple, le

gène *seb* est situé sur le chromosome dans certains isolats cliniques<sup>69</sup>, alors qu'il a une localisation plasmidique dans d'autres souches de *S. aureus*<sup>70</sup>.

La régulation de la production des ESs est un mécanisme encore peu connu. Le *S. aureus* est capable de s'adapter aux changements environnementaux, en utilisant une combinaison de systèmes d'adaptation<sup>81</sup>. Ces systèmes permettent chez *S. aureus* de s'adapter rapidement au stress environnemental en régulant l'expression des gènes avec des caractéristiques physiologiques importantes, comme la production des ESs. Les systèmes d'adaptation peuvent contrôler directement ou indirectement la transcription d'un ensemble spécifique de gènes (opérons) et/ou un seul gène<sup>82</sup>. Pour l'entérotoxine la plus étudiée, la SEA, il a été démontré que la transcription du gène *sea* est liée au cycle de vie du prophage codant<sup>83</sup> et est inductible par un stress bactérien<sup>84</sup>. Six différents prophages porteurs du gène *sea* (*u252B*, *uMu3*, *uMu50A*, *uNM3*, *uSa3ms* et *uSa3mw*) ont été décrits<sup>85</sup>. Ils régulent les niveaux d'expression de la SEA<sup>67</sup>.

Le système *agr* (Accessory Gene Regulator) est un des principaux systèmes de régulation contrôlant l'expression des facteurs de virulence chez *S. aureus*<sup>86</sup>. Il fonctionne en combinaison avec le système *sar* (Staphylococcal Accessory Regulator) décrit par Cheung et al, 1992<sup>87</sup> et Novick et al, 2001<sup>88</sup>. L'expression des ESs est en grande partie contrôlée par le système *agr*. Par exemple, les expressions des gènes *seb*, *sec* et *sed* sont *agr*-dépendantes, alors que les expressions de *sea* et *see* sont *agr*-indépendantes<sup>12,89</sup>. Vojtov et al, 2002<sup>90</sup> ont démontré que la SEB est un régulateur négatif de l'expression des gènes d'exoprotéines, agissant par l'intermédiaire du système *agr*. Il faut noter que les types SEB, SEC et SED ne sont que partiellement régulés par le système *agr* et peuvent également être produits indépendamment. La production des ES codées dans l'opéron *egc* (SEG, SEI, SEM, SEN, SEO et SEIU) est la plus élevée dans les premiers stades de la phase exponentielle de croissance bactérienne et dépend de  $\sigma B$  (promoteur)<sup>91</sup>. D'autre part, la production du type SEH est prédominante dans la phase exponentielle tardive de la croissance bactérienne et semble être régulée positivement par Rot (régulateur d'expression et *SaeR* (régulateur d'expression))<sup>92</sup>. De plus, *Sae RS* semble également avoir un impact positif sur la production du type SEIX<sup>93,94</sup>. En résumé, les gènes des es ne sont pas tous situés au même endroit dans le génome et peuvent dépendre de différents régulateurs d'expression, cela implique que les ESs ne seront pas toutes produites de la même façon.

Pour mieux comprendre l'expression des gènes *es* pendant les différentes phases de croissance, Derzelle et al. 2009<sup>95</sup> ont réalisé une étude sur 28 souches de *S. aureus* isolées de TIACs ou de souches de référence, en utilisant la PCR quantitative par transcription inverse (rt-PCR). Cette technique de quantification de l'ARNm, produit par le microorganisme, a permis de vérifier la fonctionnalité du gène et d'évaluer son taux d'expression. Ainsi, quatre profils d'expression des gènes ont été mis en évidence :

- Le premier profil concerne les gènes *sea*, *see*, *sej*, *sek*, *sep* et *seq*. La phase de croissance bactérienne n'influence pas la production des ARNm
- Le deuxième profil concerne l'opéron *egc*, les niveaux d'ARNm pour *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* et *seu* semblent légèrement diminués pendant la croissance bactérienne.

- Le troisième profil présente une rapide et importante production d'ARNm pour les gènes de *seb*, *sec* et *seh* à la fin de la phase de croissance exponentielle.
- Enfin, le dernier profil met en évidence une faible augmentation post-exponentielle de l'expression de *sed*, *ser* et *sel*.

L'analyse des ARNm par RT-PCR a permis de mettre en évidence la capacité des souches à produire les ES dans les conditions testées. Cependant, cette expression des ARNm ne signifie pas que les ES ont été produites par la souche de *S. aureus*.

La majorité des études publiées se sont intéressées aux cinétiques de production des entérotoxines classiques SEA-SEE utilisant des méthodes ELISA <sup>96</sup>. Cependant, peu d'études des cinétiques ont été réalisées sur la production d'une large gamme d'entérotoxines incluant celles dites « non classiques ».

### I.A.1.7 Mécanisme de l'activité des entérotoxines staphylococciques

#### I.A.1.7.1 L'activité émétique

Les ES ont une activité émétique provoquant des vomissements. Les études réalisées sur la musaraigne<sup>97</sup> ont confirmé qu'un réseau de connexions ramifiées reliant de multiples organes du corps au cerveau, appelé nerf vague, était un élément essentiel dans le processus de vomissement induit par les ESs. Les ESs utilisent les cellules épithéliales<sup>98</sup> comme porte d'entrée pour traverser l'épithélium intestinal afin d'atteindre d'autres cibles, comme illustré Figure 3. Il est important de noter que le mouvement des ESs à travers les cellules épithéliales est considéré comme un processus de transcytose dépendant des glycolipides<sup>82</sup>. Cela permet aux ESs d'atteindre le nerf vague et de déclencher un vomissement par réflexe émétique.

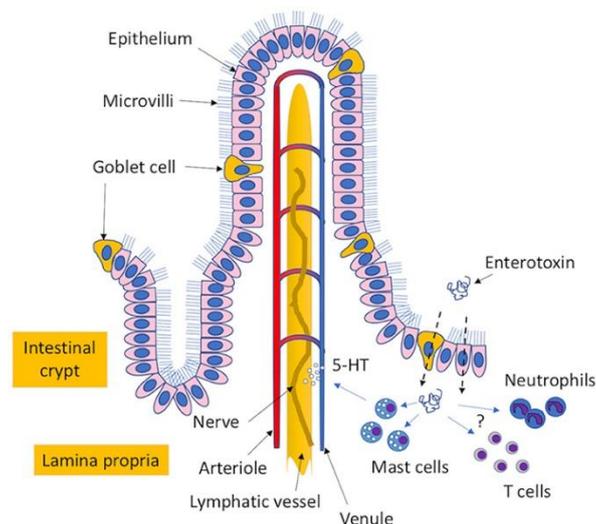


Figure 3 Mécanisme physiologique, proposé par Fisher et al, 2018<sup>82</sup>, à l'origine des vomissements induits par les entérotoxines.

### I.A.1.7.2 L'activité super antigénique

Les ES ont également une activité super antigénique, cette capacité permet de stimuler un grand nombre de lymphocytes T. Dans la réponse immunitaire cellulaire, le principal événement est la reconnaissance de l'antigène par le récepteur d'antigène des cellules T (TCR) lié à la membrane<sup>99-102</sup>. Le TCR est un hétérodimère polymorphe glycosylé, composé soit de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , soit de chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ . L'antigène est présenté au TCR sous la forme de peptides transformés liés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), de classe I et II, qui sont des protéines membranaires présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA)<sup>103</sup>. Les superantigènes peuvent interagir avec de nombreuses cellules T de manière non spécifique, et sont les activateurs les plus puissants des lymphocytes T. Ils ne requièrent que les cellules présentatrices d'antigènes du CMH de classe II, provoquant l'activation. Un résumé du mécanisme de l'activation de la réponse antigénique par les entérotoxines est illustré Figure 4.

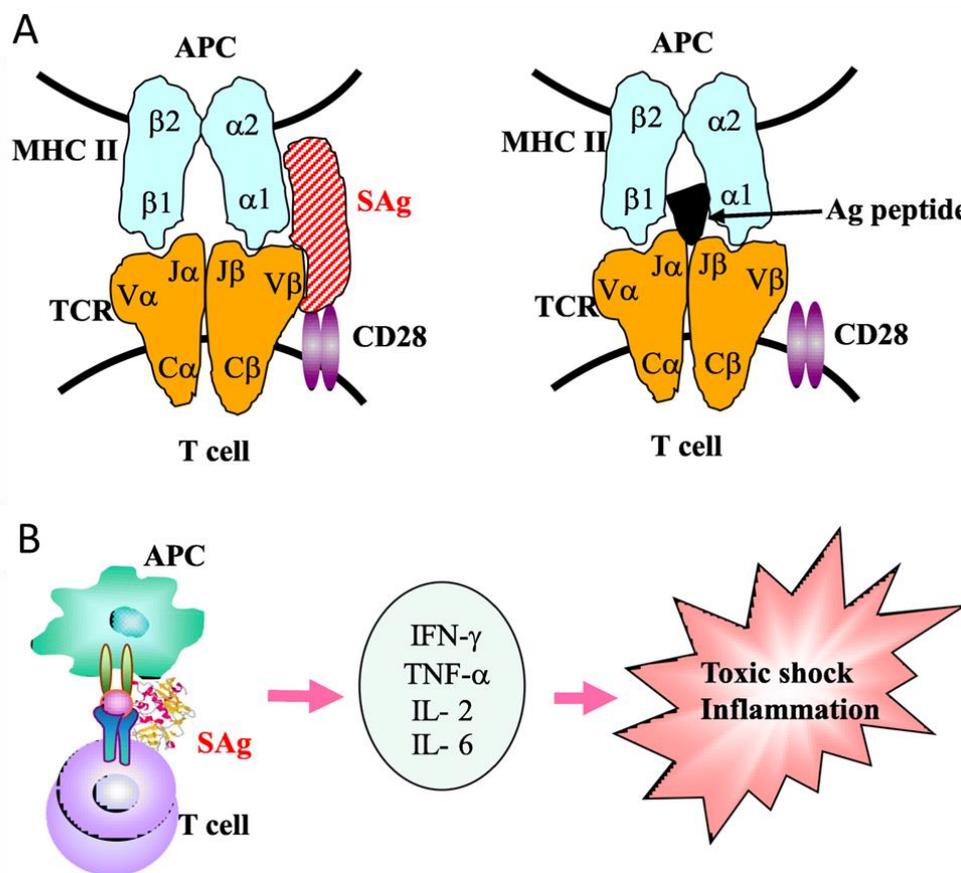


Figure 4 Mécanisme de l'activation de la réponse antigénique par les entérotoxines : A) activation superantigénique (à gauche) et activation antigénique normale (à droite) se liant au CMH de classe II de l'APC et au récepteur des cellules T. B) Activités superantigéniques des entérotoxines (SAG), qui induisent une production massive de cytokines et provoquent ensuite une inflammation et un choc toxique chez les humains et les animaux. APC, cellules présentatrices d'antigènes ; MHC, complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR, récepteur d'antigènes des cellules T. Proposé par Dong-Liang Hu et al, 2021<sup>56</sup>

### I.A.1.8 Production des entérotoxines staphylococciques dans la matrice alimentaire

Plusieurs études ont été réalisées sur les conditions de production des entérotoxines dans l'aliment. Elles ont mis en évidence que de nombreuses conditions physico-chimiques comme la température, le pH, la salinité, l'activité de l'eau et l'atmosphère doivent être réunies pour permettre d'une part la croissance du *S. aureus* et d'autre part la production de ses entérotoxines comme décrit par Tatini et al en 1973<sup>104</sup> et rapporté dans le Tableau 4.

*Tableau 4 Facteurs affectant la croissance et la production d'entérotoxines par Staphylococcus aureus (Tatini, 1973)<sup>104</sup>*

Conditions	Croissance <i>S. aureus</i>		Production des entérotoxines	
	Optimum	Gamme	Optimum	Gamme
Température	37	7–48	37–45	10–45
pH	6–7	4–10	7–8	4–9.6
Activité de l'eau (aW)	0.98	0.83 à 0.99	0.98	0.85 à 0.99
NaCl (%)	0	0–20	0	0–10
Potentiel redox (Eh)	> +200 mV	< -200 mV à > +200 mV	> +200 mV	< -100 mV à > +200 mV
Atmosphère	Aérobic	Anaérobic–aérobic	Aérobic (5–20% dissous O <sub>2</sub> )	Anaerobic–aerobic

En plus de ces conditions physico-chimiques, la nature de l'aliment constitue un facteur clé permettant une croissance optimale du *S. aureus*. En effet, ce pathogène a besoin d'aliments riches en protéines pour pouvoir se développer (Figure 5). Les aliments les plus fréquemment impliqués diffèrent fortement d'une zone géographique à l'autre, cela est probablement dû aux habitudes alimentaires de chaque zone<sup>105</sup>. Par exemple, la viande ou les produits à base de viande sont régulièrement impliqués dans des TIACs recensées au Royaume-Uni ou aux États-Unis<sup>106</sup>. En France, la consommation de fromages est très fréquente (environ 28 kg/an/personne) ce qui explique la forte implication des produits laitiers dans les TIACs en France comparé aux pays anglo-saxons<sup>107</sup>.

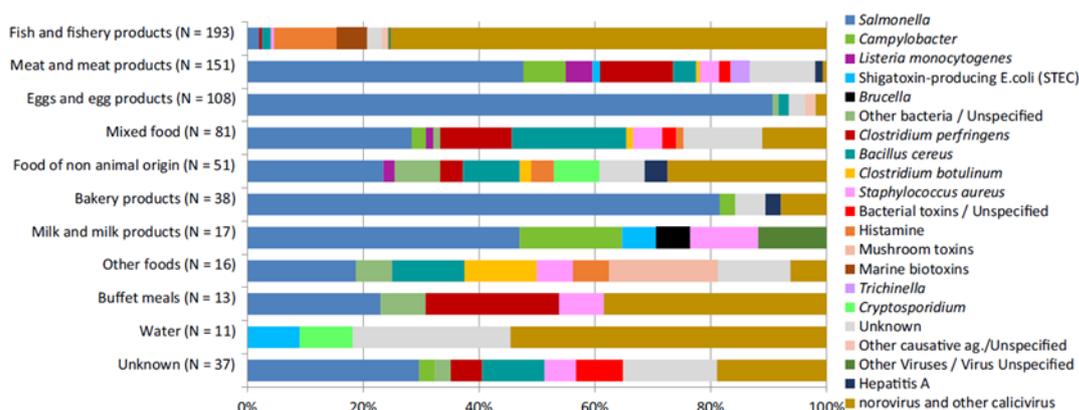


Figure 5 Fréquence des agents associés à des foyers de TIACs confirmés, par type alimentaire, dans les États membres de l'UE déclarants, chiffre sur l'année 2019 (EFSA 2021)<sup>107</sup>

## I.A.2 Toxi-infection alimentaire collective (TIAC)

Les « toxi-infections alimentaires collectives » ou TIAC correspondent à l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. C'est la définition proposée par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Le *Staphylococcus* produit des substances toxiques dont les entérotoxines, agents responsables d'intoxications alimentaires. L'ingestion des ESs par l'Homme peut entraîner des troubles intestinaux, avec vomissements et diarrhées dans les quelques heures qui suivent l'ingestion. La maladie peut être grave, mais elle dure généralement moins de 48 heures et ne laisse aucune séquelle.

A ce jour, de nombreuses TIACs ont déjà été décrites dans la littérature<sup>65</sup>, certaines d'entre elles sont spectaculaires comme en 2000 à Osaka (Japon) où 13 000 cas ont été recensés<sup>33</sup>. Pour cette TIAC, la cause initiale a été attribuée à une panne de courant qui a entraîné l'arrêt de la chaîne de production et des enceintes réfrigérées de l'usine. Ainsi, le *S. aureus* a pu se développer et produire l'entérotoxine. La reprise de la production sans éliminer les produits contaminés a laissé partir dans le marché des produits contaminés en ESs. Après les premiers cas d'intoxication, les annonces de rappel de produits ont tardé, ce qui a prolongé la disponibilité des produits contaminés dans le commerce et donc augmenté les cas de malades chaque jour. Cette TIAC est devenue une épidémie historique d'intoxication alimentaire au Japon. Dans cette TIAC, les aliments incriminés étaient du lait et du lait écrémé en poudre. L'entérotoxine de type SEA a été détectée à des concentrations comprises entre 0.08-0.38 ng/g dans le lait et jusqu'à 3.72 ng/g dans le lait écrémé en poudre. Le nombre important de cas et la diversité des âges et des sexes durant cette TIAC

a permis d'établir une gamme de quantité de SEA provoquant les symptômes, cette gamme est comprise entre 20-100 ng par personne<sup>33</sup> comme l'illustre la Figure 6.

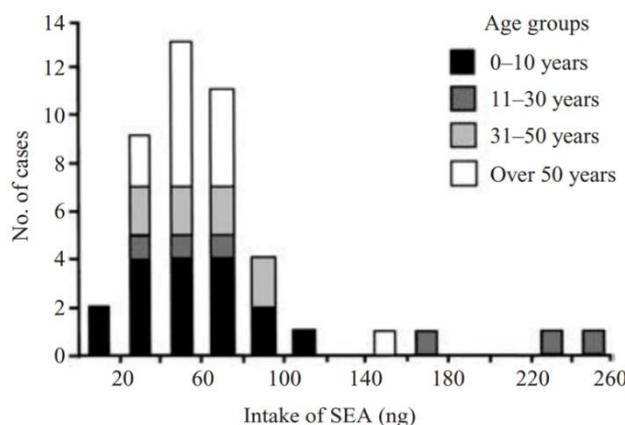


Figure 6 Graphique des quantités de SEA dans le lait, ingérée et provoquant des symptômes pour 44 cas. Asao et al 2003

### I.A.2.1 TIAC a Staphylocoques dans l'Union européenne

Selon l'EFSA (European Food Safety Authority), les TIAC sont classées en deux catégories en fonction du faisceau de preuves disponibles:

- TIAC suspectée (weak evidence) : la TIAC à Staphylocoques est considérée comme suspectée si (i) la symptomatologie provoquée est caractéristique aux ESs et (ii) que l'aliment consommé est favorable pour la production des ESs par le *S. aureus*, mais ni les ESs ni le *S. aureus* n'ont pu être détectés lors de l'analyse des échantillons.
- TIAC confirmée (strong evidence) : la TIAC à Staphylocoques est considérée comme confirmée si en plus des symptômes spécifiques, le *S. aureus* et/ou les ESs sont détectés.

L'EFSA a reporté dans son rapport annuel de 2021<sup>107</sup> les foyers de TIACs. En 2019, dans l'Union Européenne, 997 foyers confirmés ou suspectés de TIACs dues aux toxines bactériennes ont été signalés par 13 états membres (Allemagne, Bulgarie, Croatie, Chypre, Espagne, Finlande, France, Hongrie, Italie, Pologne, Portugal, Roumanie, Suède). Le foyer le plus important a été décrit en Italie où 44 des 70 personnes exposées ont été hospitalisées. Aucun décès n'a été signalé au cours de cette année<sup>107</sup>. Par ailleurs, les TIACs à domicile sont les plus reportées et présentent plus de 40% des TIACs déclarées comme l'illustre la Figure 7. Ce nombre est certainement sous-évalué du fait que très peu d'intoxications à domicile sont déclarées par les familles. Les TIACs liées à la restauration collective sont moins nombreuses car cette dernière doit répondre à des normes d'hygiène strictes. Cependant, elles sont plus souvent répertoriées du fait que les responsables des établissements sont tenus de les déclarer.

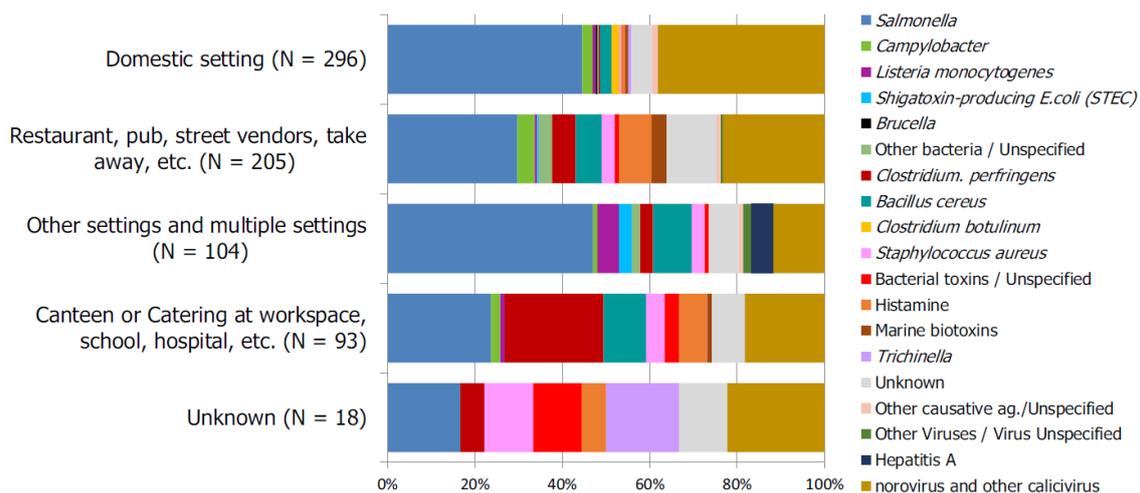


Figure 7 Répartition des foyers de TIACs confirmés, par lieu d'exposition et par agent causal, dans les États membres de l'UE déclarants, 2019 (EFSA 2021)<sup>107</sup>

De nombreux chercheurs considèrent que les TIACs à *S. aureus* font partie des maladies d'origine alimentaire les plus courantes dans le monde. Elles provoquent une symptomatologie de courte durée, qui se solde généralement par une guérison complète et sans séquelles en quelques jours. Ainsi, le corps médical s'intéresse peu à ces intoxications, notamment lorsque qu'elles ne touchent que peu de personnes ce qui engendre une sous-déclaration<sup>108,109</sup>.

### I.A.2.2 TIAC a Staphylocoques en France

Depuis 1987, l'agence Santé Publique France (SPF) compile et publie dans un rapport annuel le nombre de TIACs recensées en France, représenté Figure 8. En 2019, 1783 TIACs ont été déclarées en France, impliquant 15 641 personnes dont 609 hospitalisées et 12 décédées. Le taux de TIACs notifié a augmenté de 9% par rapport à l'année précédente.

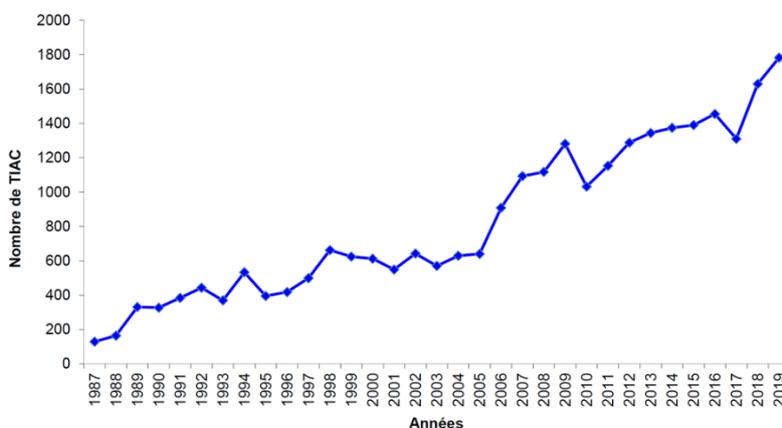


Figure 8 Nombre de TIACs déclarées en France entre 1987 et 2019 (SPF 2021)<sup>110</sup>

Parmi les 1 783 TIACs déclarées durant l'année 2019<sup>110</sup>, 876 (49% de l'ensemble des TIACs déclarées) ont été provoquées par des toxines bactériennes dont 445 (17 confirmées et 428 suspectées, soit 25%) sont dues au *S. aureus*. Au total, 2 476 personnes malades ont été recensées dont 97 hospitalisées. Les TIACs à staphylocoques ont lieu tout au long de l'année, avec une légère augmentation au mois de décembre à cause des fêtes de fin d'année. Les chiffres de SPF, Figure 9, indiquent que le *S. aureus* est le pathogène le plus

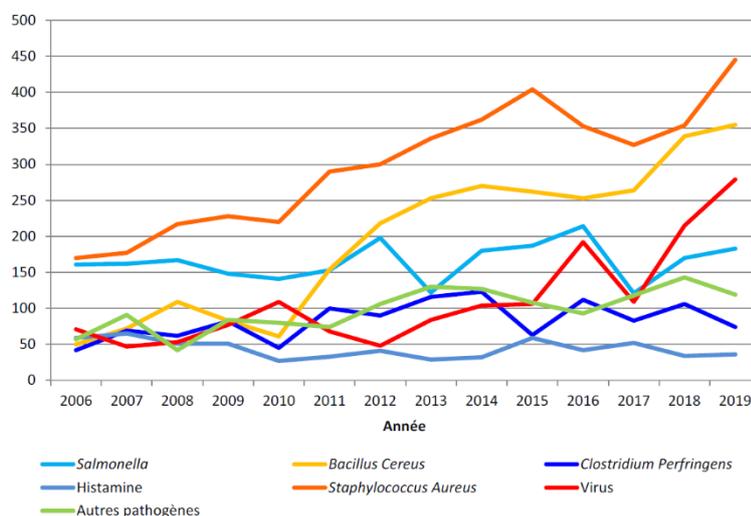


Figure 9 Nombre de TIAC selon l'agent pathogène suspecté ou confirmé en France entre 2006 et 2019 (SPF 2021)

fréquemment impliqué dans les TIACs dues aux toxines bactériennes, et ce depuis 2006. Par ailleurs, 48% des TIACs à staphylocoques ont été associées à un équipement défectueux ou inadapté (réfrigérateur défectueux...), 45% à un non-respect des règles d'hygiène par le préparateur et 4% à des problèmes de fonctionnement (défaut de la chaîne du froid, erreurs de préparation, délais trop long entre la préparation et le service)<sup>110</sup>.

### I.A.2.3 Les conditions de déclenchement d'une TIAC à staphylocoques

Cinq conditions constituent la source responsable de TIACs à staphylocoques, comme le résume la Figure 10 :

- 1) Une souche de staphylocoques producteurs d'entérotoxines avec une activité émétique démontrée.
- 2) Un vecteur de transmission de la contamination de l'aliment tel que le manque d'hygiène du manipulateur ou des outils de préparation. Les matières premières peuvent être également contaminées lors du prélèvement comme par exemple dans le cas des mammites bovines ou caprines.
- 3) Un aliment favorable pour le développement du germe. Comme décrit précédemment, la matrice alimentaire devra être riche en protéines (produit laitier, carné...).

4) Des conditions environnementales favorables pendant une période permettant une multiplication bactérienne importante et une production des ES (conditions optimales de température et de salinité décrites précédemment).

5) Une ingestion des entérotoxines en quantité suffisante pour déclencher la maladie. Certaines ES ont une activité émétique plus intense que d'autres comme décrit dans le Tableau 2. A noter que l'effet combiné de plusieurs ES n'a pour le moment pas ou peu été étudié. Et enfin, chaque individu ne répondra pas de la même façon en fonction de son âge, sexe, poids, etc....

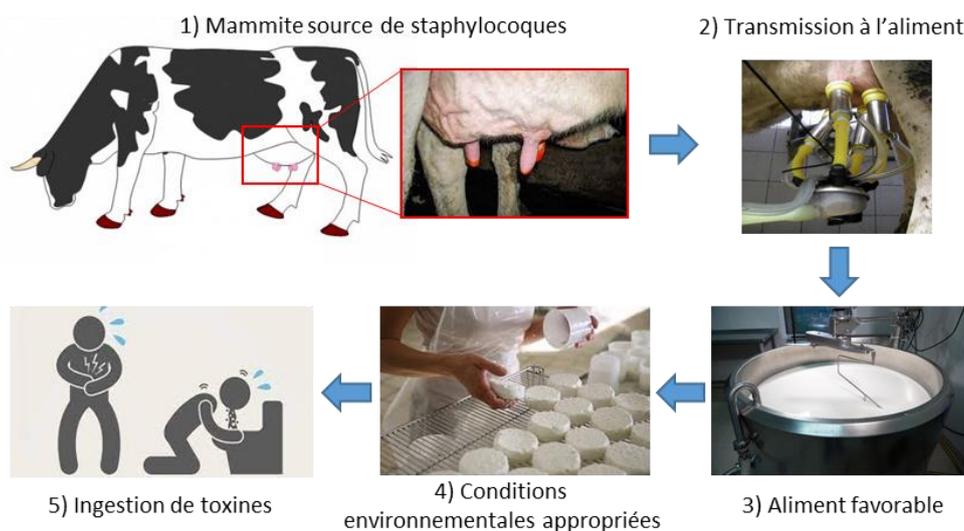


Figure 10 Exemple d'une contamination par le *S. aureus* d'un aliment provoquant une TIAC

Ainsi pour maîtriser le risque d'intoxication et dans le but de protéger le consommateur, les 5 conditions mentionnées ci-dessus doivent être contrôlées lors des processus de fabrication des aliments. Ainsi, des normes HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) d'hygiène industrielle ou de restauration sont mises en place afin de limiter la contamination des aliments à la source de production. Par exemple, les éleveurs doivent faire des vérifications visuelles sur les mamelles des vaches avant les prélèvements afin d'identifier la présence de mammites<sup>111</sup>. De plus, la surveillance des aliments favorables au développement du *S. aureus*, comme le lait et les produits laitiers, est encadrée par la réglementation. En effet, des critères relatifs au dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (SCP) et à la détection des ESs, dans le lait et les produits laitiers, ont été introduits dans le règlement européen (CE) N° 2073/2005 modifié par le règlement (CE) N° 1441/2007 et (UE) 2019/229 :

- Critères d'hygiène : lorsque la valeur de SCP est supérieure à  $10^5$  unités formant colonie par gramme (ufc/g), l'aliment doit faire l'objet d'une analyse d'ES.
- Critères de sécurité : le résultat de la méthode officielle européenne de détection des ESs (NF EN ISO 19020) doit être négatif dans un échantillon de 25 g d'aliment.

Les aliments concernés par ce règlement sont les fromages, le lait, le lait en poudre et le lactosérum.

La détection d'ESs dans tout aliment le rend potentiellement dangereux pour la santé humaine, au titre de l'article 14 du règlement (CE) n°178/2002. Le lot de produits contaminés est donc considéré comme impropre à la consommation car représentant un danger et doit donc être détruit, ce qui peut induire des impacts économiques et médiatiques très importants.

En plus des contrôles imposés par la réglementation pendant le processus de préparation des aliments et afin d'éviter la commercialisation de denrées alimentaires contaminées, des contrôles officiels sont réalisés par la DD(CS)PP (direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations) sur les lieux de commercialisation de produits alimentaires. Dans ce cas, les échantillons sont envoyés vers des laboratoires agréés qui constituent le réseau du Laboratoire National de Référence (environ 70 laboratoires répartis sur le territoire national). Après une première analyse de screening ou « de première intention » (analyses multi-pathogènes) et en cas de suspicion de la présence du *S. aureus* ou d'ESs dans les aliments, des analyses dites « de confirmation » sont réalisées au Laboratoire National de Référence (LNR) des Staphylocoques à Coagulase Positive, qui est l'ANSES. En effet, l'ANSES a été nommée Laboratoire de référence de l'Union européenne (LRUE) en 2006 pour les SCP incluant *S. aureus* puis Laboratoire National de Référence (LNR) en 2009. Ainsi, la confirmation et l'investigation des TIACs représentent une des missions attribuées au LRUE et au LNR.

#### I.A.2.4 Processus de déclaration d'une TIAC

En cas de TIAC, le médecin ou le responsable d'établissement doit enclencher une déclaration en ligne afin d'initier à la fois une enquête épidémiologique gérée par l'ARS sous la direction du ministère de la santé et une enquête alimentaire gérée par la DD(CS)PP sous la direction du ministère de l'agriculture. Les résultats des enquêtes sont transmis aux autorités compétentes représentées par la Direction générale de l'Alimentation (DGAI) afin de statuer sur la décision, qui peut aller jusqu'à la fermeture administrative de l'établissement. Le processus de déclaration d'une TIAC en France est indiqué dans la Figure 11.

Il est à noter que l'enquête épidémiologique (symptômes, délais d'apparition, population exposée, nombre de cas hospitalisés, type d'aliment consommé...), est réalisée par les services de santé publique France (SPF). Les échantillons cliniques (souches bactériennes) sont analysés par des laboratoires de biologie agréés. Concernant l'enquête alimentaire, les échantillons prélevés par la DD(CS)PP sont orientés vers le réseau des laboratoires agréés LNR. En cas de besoin des analyses de confirmation, les échantillons sont orientés vers l'ANSES où une batterie d'outils d'analyse est mise en place afin de caractériser les contaminations du germe à la toxine.

Le chapitre suivant (I.B) décrit les différentes techniques qui peuvent être utilisées lors de la caractérisation d'une TIAC.

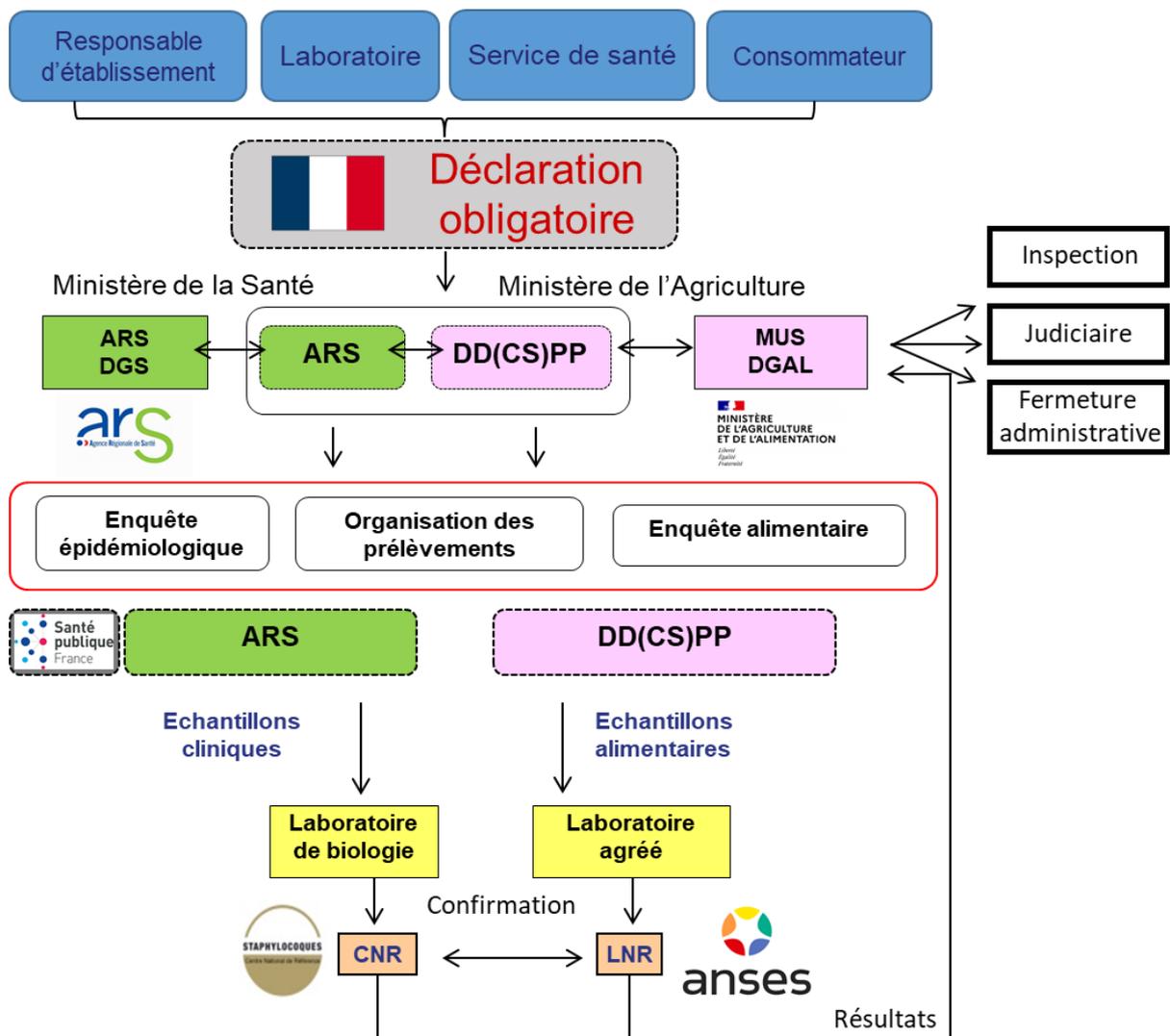


Figure 11 Organigramme du système de déclaration des TIACs à SCP

### I.A.2.5 Impact économique des TIACs à *S. aureus*

Les impacts socio-économiques causés par les TIACs sont difficiles à chiffrer, cela est dû aux nombreuses intoxications alimentaires non répertoriées ou ayant des impacts indirects. Les TIACs à SCP contrairement aux autres pathogènes ont souvent moins d'impact et sont donc peu suivies. Bennett et al en 2013<sup>112</sup> ont analysé les TIACs des Etats Unis d'Amérique (USA) de 1998 à 2008 sur les trois pathogènes producteurs de toxines : *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus*. Ils sont impliqués dans 14% des TIACs aux USA soit 1,3 million de cas par an et auraient coûté en soins près de 523 millions de dollars par an. D'après Scharff et al 2011<sup>113</sup> une hospitalisation aux USA pour une intoxication au *S. aureus* coûterait entre 280 et 2 195\$ par personne avec une moyenne à 695\$, ainsi le coût annuel est estimé à 168 millions \$ pour l'ensemble des TIACs à SCP. En 2015 Mangen et al<sup>114</sup> ont estimé que les coûts dus aux TIACs à *S. aureus* pour la société

néerlandaise pour l'année 2011 représentaient la part la plus importante des coûts attribués aux aliments (47,1 millions d'euros/an).

L'intoxication alimentaire historique qui a eu lieu à Osaka (13 000 personnes malades, cf paragraphe I.A.2) a fait perdre à l'industriel la confiance des consommateurs ce qui a impacté sévèrement les ventes de ce fabricant de produits laitiers. Le déficit total pour la période a atteint 52,9 milliards de yens soit environ 300 millions d'euros et la société a été contrainte de fermer deux sites de production, dont l'usine d'Osaka impliquant la suppression de plus d'un millier d'emplois<sup>115</sup>.

Les exemples cités ci-dessus montrent que même si l'impact sanitaire reste modéré, les retombées économiques peuvent parfois avoir de lourdes conséquences.

## I.B Techniques d'analyse des échantillons impliqués dans une TIAC à SCP

Dans les aliments, Il est possible que le staphylocoque soit détruit ou inactivé par la chaleur lors de la cuisson, alors que les ESs restent présentes (si elles sont produites) de par leur forte résistance à des paramètres difficiles comme le pH et les températures élevées. Lors des contrôles officiels et/ou dans le cadre de prélèvement des échantillons potentiellement impliqués dans une TIAC, deux types d'échantillons sont donc distingués : les souches bactériennes et les aliments. Toutefois, seule la détection des ESs permet de confirmer avec certitude que les SCP sont à l'origine de la TIAC. Néanmoins, la caractérisation des souches peut apporter des informations pertinentes comme l'identification de la source de contamination. Ainsi, la technique mise en place lors de l'analyse des échantillons dépend à la fois de la nature des échantillons et de l'objectif de l'analyse.

Dans cette partie nous présenterons les méthodes déjà existantes pour l'analyse des ESs, des souches SCP et des gènes de pathogénicité codant pour les ESs, dans des matrices alimentaires mais aussi dans des milieux de culture du staphylocoque (BHI : Brain Heart Infusion, LB : lysogeny broth...). Ces outils peuvent être utilisés lors de l'analyse d'échantillons issus de TIACs ou dans le cas d'une contamination pendant la fabrication des aliments (analyses d'auto-contrôle), ou suite à un control officiel effectué par les services d'hygiène.

### I.B.1 Outils de détection du SCP et des gènes de pathogénités

#### I.B.1.1 Détection des staphylocoques à coagulase positive (SCP)

La détection des SCP peut être réalisée directement sur l'aliment selon la norme internationale NF EN ISO 6888 partie 1, partie 2 ou partie 3 (Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (SCP)). Cette méthode permet de vérifier et de quantifier les SCP dans des milieux sélectifs. L'interprétation des résultats obtenus par cette méthode de microbiologie ne permet pas de confirmer que les SCP sont à l'origine de la TIAC. En effet, comme décrit précédemment, le traitement thermique de l'aliment (pasteurisation, cuisson...) élimine les SCP mais pas les entérotoxines. En conséquence, dans le cas de résultats négatifs (non détection de la bactérie), l'implication des ESs dans la TIAC ne peut être confirmée car il est possible qu'elles soient produites avant le traitement thermique qui a probablement éliminé les SCP. L'inverse est aussi vrai, la détection des SCP ne permet pas de confirmer leur expression des ESs, car cela dépend de plusieurs paramètres comme la nature de la matrice, la pathogénicité des SCP et les conditions physico-chimiques décrites plus haut.

L'utilisation du MALDI-TOF permet de discriminer l'espèce bactérienne mais aussi le type (*aureus*, *argenteus*, *pseudintermedius*...) via l'utilisation de banques de données fournies avec l'appareil. Par exemple Böhme et al, en 2012<sup>116</sup> ont pu identifier la présence souches de *Staphylococcus aureus* provenant de matrice laitière par MALDI-TOF avec une sensibilité de 100%. Cependant, cette méthode ne permet pas d'obtenir des informations quant à la virulence des souches et donc leur capacité à produire les ESs.

Les méthodes de détection des SCP permettent donc de réaliser un premier screening permettant de vérifier la présence de l'espèce bactérienne sans pouvoir vérifier leur virulence.

### I.B.1.2 Analyse de l'ADN par PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)

La méthode par PFGE est une technique de séparation de parties d'ADN en fonction de leur taille par un principe d'électrophorèse sur gel à champ pulsé. Pour le cas des SCP, une fois l'ADN extrait de la souche, il est découpé par des enzymes de restriction à faible nombre de sites de coupure spécifiques) avec le même nombre de fragments et à la même taille pour chaque espèce bactérienne<sup>117</sup>. L'utilisation de banques de références permettrait d'identifier la souche, son origine ou comparer plusieurs souches entre elles.

### I.B.1.3 Analyse de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR (polymérisation en chaîne) est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, elle permet de répliquer un grand nombre de fois une séquence d'ADN à partir d'une faible concentration et de manière très spécifique. Cette méthode, illustrée Figure 12 fonctionne grâce à des enzymes (polymérases) et à des cycles de réplication. Des amorces spécifiques sont utilisées pour chaque partie de l'ADN à dupliquer. Les amorces sont constituées d'oligonucléotides de 15 à 30 nucléotides. Une fois la séquence ADN ou ARN amplifiée, elle est détectée pour confirmer ou non la présence d'un gène.

A partir des années 90, la PCR a été appliquée à la recherche des gènes de *S. aureus* dans l'ADN issus de souches provenant d'aliments et de patients. Le gène ciblé a été préférentiellement le gène *nuc* afin de confirmer que la souche analysée est bien du Staphylocoque doré<sup>118</sup>. En effet, le gène *nuc* tout comme l'ARN 16S de *S. aureus* sont spécifiques du genre *S. aureus*.

La méthode d'analyse par PCR possède de nombreux avantages comme la rapidité d'analyse, le coût et la sensibilité, c'est pourquoi elle est répandue dans les laboratoires d'analyse. Cependant, cette technique ne peut pas montrer si le gène recherché est tronqué ou inactivé. De plus, la PCR est susceptible d'être interférée par un ADN proche de celui ciblé générant ainsi des résultats faux positifs. Enfin, les variations de séquences liées aux variants peuvent empêcher l'hybridation de l'amorce si la mutation a lieu sur un site de fixation conduisant à des résultats faux négatifs<sup>119</sup>.

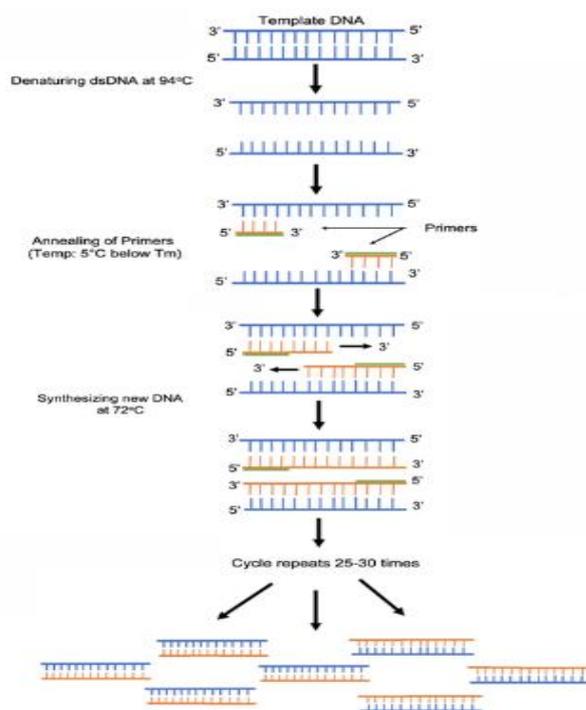


Figure 12 Schéma de fonctionnement de la méthode PCR (origine addgener protocols)

#### I.B.1.4 Analyse de l'ADN par séquençage génomique WGS (Whole Genome Sequencing)

Le principe de base du séquençage, illustré Figure 13 consiste dans une première étape de fragmentation de façon aléatoire soit du génome ou soit de grandes sections d'ADN afin d'obtenir des bouts d'ADN de plusieurs milliers de paires de bases, facilement manipulables. Dans un deuxième temps, les fragments d'ADN sont séquencés afin d'identifier chaque paire de bases issue des fragments. Avec les extrémités des nombreux petits fragments, il est possible de reconstruire la séquence complète du génome par recoupement (chevauchement) des séquences similaires via les parties en commun issues de la cassure aléatoire. En effet, l'ADN n'est pas « cassé » aux mêmes endroits.

Au laboratoire de référence national et européen du Staphylocoque (ANSES), cette méthode a été mise en place pour l'analyse des génomes de *S. aureus* sur plus de 500 souches. Elle a permis de par un outil informatique développé au laboratoire NARA<sup>36</sup>

d'identifier des gènes de pathogénicité codant pour des ESs. D'autres études utilisant le WGS ont été menées pour l'identification du type d'ES comme pour la découverte de SEI26 et SEI27 par Zhang et al, 2018<sup>26</sup> ou SEI28 à SEI33 par Dicks et al, 2021<sup>28</sup>. Le WGS a également permis d'identifier de nombreux variants qui ne sont actuellement identifiables que par cette méthode.<sup>45,93,120</sup>

Le WGS propose de nombreux avantages pour l'analyse des ESs. Il permet avec certitude de détecter la présence des gènes de l'ensemble des ESs connues, identifier le variant, et vérifier si le gène est tronqué, ce que la PCR ne permet pas de faire. Aussi, le WGS peut être adapté instantanément en cas de découverte de nouvelles entérotoxines. Cependant, la confirmation de l'expression de la toxine dans l'aliment ne peut être obtenue avec cet outil. Enfin, l'apport du WGS dans la caractérisation des TIACs à Staphylocoques reste limité si nous prenons en compte l'information obtenue et le coût de l'analyse. Néanmoins, l'association du WGS à d'autres outils de détection des entérotoxines peut s'avérer très pertinent. En effet, le WGS est capable de couvrir la totalité des facteurs de virulence de la souche en prenant en compte les variations génétiques.

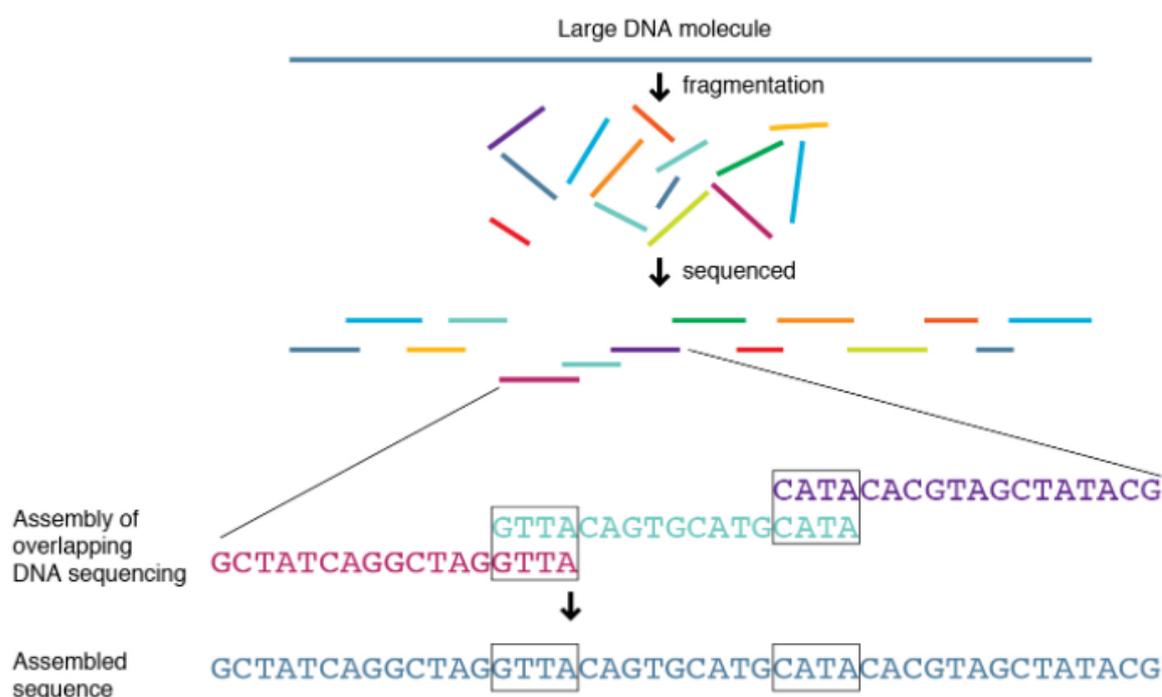


Figure 13 Schéma de fonctionnement de la méthode WGS

### I.B.1.5 Analyse de l'ARNm par qRT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

La RT-PCR est une méthode qui utilise le principe de la PCR (réaction en chaîne par polymérase) pour analyser un échantillon d'ARN. Dans un premier temps, l'ARN est rétrotranscrit par une enzyme (transcriptase inverse) permettant ainsi la synthèse de l'ADN complémentaire qui est utilisé ensuite pour réaliser une PCR classique. La technique de qRT-PCR permet aussi de quantifier l'ARN initialement présent dans l'échantillon afin de

connaitre le niveau d'expression des gènes. En effet, plus le gène est exprimé plus la quantité d'ARN synthétisé est grande. A titre d'exemple, cette technique a été utilisée par Derzelle et al, en 2009<sup>95</sup> dans l'analyse de 28 souches, provenant en grande partie de TIACs à SCP, en ciblant 17 ARNm codant pour des ESs. Cette méthode a permis d'identifier 4 profils d'expression des ESs décrits précédemment. De même, Even et al 2009<sup>121</sup> et Cretenet et al 2011<sup>122</sup> ont également étudié des cinétiques d'expression des gènes *sea*, *sec*, *seg*, *seh*, *sek* et *sel* par qRT-PCR.

Ainsi, les informations obtenues sur la production des ARNm issus des gènes codant pour les ESs indiquent que le gène est viable et que l'ARNm est produit. Cependant, la production de la toxine dans l'aliment ne peut être confirmée, mais permet d'ajouter un faisceau de preuves sur le pathogène incriminé lors de la TIAC.

L'ensemble des techniques pour l'analyse du *S. aureus* et de son génome apporte de nombreuses réponses lors d'une investigation de TIAC tant par la détection du *S. aureus* que par la présence des gènes codant pour les toxines. Cependant, ce type d'information ne permet pas de confirmer avec certitude que les SCP ont exprimé les ESs, et donc pouvoir les identifier comme responsables de la TIAC.

## I.B.2 Outils de détection des entérotoxines staphylococciques

Actuellement il n'existe pas de méthode pour l'analyse de l'ensemble des 35 ESs dans les aliments. Deux grandes familles de méthode ont été reportées dans la littérature, les méthodes basées sur le principe immuno-enzymatique et celles basées sur le principe physico-chimique. Dans cette partie, les différentes méthodes permettant la détection des ESs sont présentées.

### I.B.2.1 Analyse des entérotoxines staphylococciques par la norme NF EN ISO 19020

La norme NF EN ISO 19020 « Méthode horizontale de détection des entérotoxines staphylococciques par test immuno-enzymatique dans les aliments » a été récemment publiée (2019) et s'applique à la recherche des 5 ESs de SEA à SEE dans les produits destinés à la consommation humaine. La norme comporte deux étapes principales :

- La première étape consiste à l'extraction de 25 g d'ESs par des modifications de pH suivie d'une concentration par dialyse dans une solution concentrée de PEG (polyéthylène glycol). Après une nuit de dialyse, l'eau et les petites molécules (<6 à 8 KDa) sont éliminées de la membrane de dialyse. Les entérotoxines concentrées dans cette membrane de dialyse sont récupérées dans 5 mL d'une solution de tampon PBS (Tampon phosphate salin)
- La deuxième étape consiste à analyser l'extrait des ESs en utilisant les deux trousseaux de détection validés et disponibles dans le commerce, basées sur le

principe immuno-enzymatique : (i) le kit VIDAS® STAPH ENTEROTOXIN II (SET2)<sup>123</sup> et (ii) le kit RIDASCREEN® SET Total<sup>124,125</sup>. Ces deux trousse permettent la détection qualitative des cinq entérotoxines SEA à SEE sans pouvoir les distinguer car elles sont composées d'un mélange d'anticorps contre les 5 ESs, cela permet une analyse multiplexe mais avec une perte de l'information du type d'ES détectée.

Actuellement, cette norme ne couvre que les deux kits mentionnés ci-dessus. Cependant, la mise en place de nouveaux kits nécessite leur validation selon les performances décrites dans cette norme pour qu'ils puissent être inclus.

### I.B.2.2 Analyse des entérotoxines staphylococciques par les méthodes ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

La méthode ELISA, illustrée Figure 14, est un dosage immuno-enzymatique sur support solide. Cette technique biochimique utilise deux anticorps dans le format dit « sandwich ». L'un des deux anticorps, qui est spécifique de l'antigène que l'on souhaite doser, est fixé sur un support, tandis que le deuxième anticorps se lie au composé dosé par un autre épitope, tout en étant couplé à une enzyme (peroxydase). L'anticorps secondaire couplé à une enzyme permet, via l'utilisation d'un substrat, de libérer un produit chromogène ou fluorogène utilisé pour la détection. La mesure de la fluorescence par des appareils de spectrophotométrie permet de détecter mais aussi de quantifier la présence du composé dosé. Cette méthode est réputée comme la plus sensible. Elle peut atteindre des LLOD (lower limit of detection) de l'ordre de la dizaine de picogramme par gramme dans l'aliment. Ce test est rapide, simple d'emploi et relativement peu coûteux. Cependant comme toutes les techniques basées sur l'utilisation des anticorps, la méthode ELISA est limitée par la disponibilité des anticorps spécifiques et peut souffrir des effets de matrice.

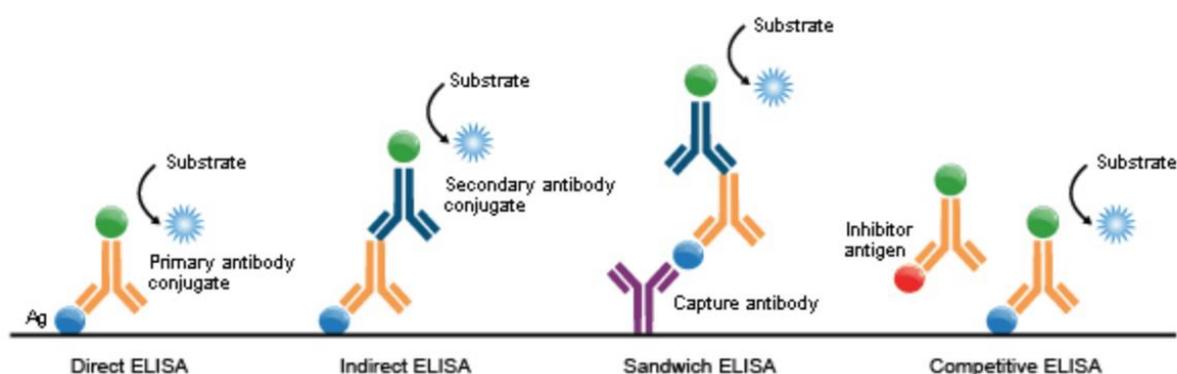


Figure 14 Schéma des 4 modes les plus classiques de fonctionnement de la méthode ELISA

Dans la Figure 14, les différents modes ELISA sont exposés, le direct ELISA est le plus simple car il n'utilise qu'un anticorps de capture, induisant une moindre spécificité et un risque plus élevé de réactions croisées. L'ELISA indirecte utilise un second anticorps de révélation

et permet de réduire sensiblement les réactions croisées par rapport au mode direct ELISA<sup>126</sup>. Le mode le plus spécifique est l'ELISA sandwich car il utilise deux anticorps spécifiques dirigés contre l'entérotoxine ciblée. Enfin le mode ELISA compétitif permet via une compétition entre un antigène marqué et celui à doser de quantifier l'analyte.

Deux types d'anticorps sont à distinguer :

- Anticorps polyclonaux : ils sont rapides à obtenir et possèdent de nombreux sites de fixation de la protéine cible. Cependant, ils sont moins spécifiques et sont souvent mélangés à d'autres anticorps (sauf après purification spécifique). Enfin, il existe une faible reproductibilité d'une production à l'autre de par l'utilisation d'animaux différents pour la production.
- Anticorps monoclonaux : après immunisation de l'animal, les cellules productrices d'anticorps (Splénocytes) sont récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome afin de créer des cellules immortelles productrices d'anticorps. Cela est suivi d'une longue étape de screening permettant d'identifier les anticorps les plus spécifiques, pour finalement obtenir des hybridomes permettant de produire des quantités définies d'anticorps. Les anticorps monoclonaux sont très spécifiques car ils sont orientés contre un seul épitope. De plus, la reproductibilité entre les différents lots est conservée car ils proviennent toujours de la même souche cellulaire. Cependant, leur conception est longue et coûteuse. Enfin, la forte spécificité peut induire un manque d'affinité en cas de modification de l'épitope suite à une variation de séquence ou la présence d'une modification post-traductionnelle<sup>127</sup>.

Dans la littérature, il existe de nombreuses méthodes ELISA pour l'analyse des ESs, ici seules celles développées pour l'étude de nouvelles ESs sont présentées :

-SEIJ Ono et al 2018<sup>128</sup>, dans cette étude les auteurs ont étudié la production de la SEIJ par le *S. aureus*. Une méthode ELISA a été mise en place en utilisant des anticorps polyclonaux produits à partir d'une entérotoxine SEIJ recombinante. Les SEIJ ont été analysées dans des surnageants de culture BHI (brain heart infusion) de *S. aureus* après une incubation pendant 16h à 37°C. Dans les deux souches *sej+* testées (validées en PCR), les auteurs ont détecté SEIJ à des concentrations relativement importantes. Actuellement aucun ELISA de SEIJ n'a été testé dans le cadre d'une TIAC ou sur aliments.

-SEK Aguilar et al 2017<sup>129</sup>, dans cette étude les auteurs ont mis au point un ELISA pour la détection de type SEK avec des anticorps monoclonaux. L'objectif étant de détecter la présence de SEK dans du plasma humain afin d'identifier des chocs toxiques induits par cette toxine.

-SEM Zhao et al, 2017<sup>130</sup>, les auteurs ont réalisé un ELISA avec des anticorps contre la SEM afin de la détecter dans des matrices alimentaires. Trois matrices ont été utilisées : du lait, de la viande et du riz et des gammes d'étalonnage de 0,5 à 20 ng/ml ont été réalisées avec un standard de SEM recombinante.

-SEP Omoe et al 2005<sup>79</sup>, cette étude est la première à décrire l'existence du type P, l'homologie de séquence étant très proche de SEA (80%). Cet article est controversé concernant l'existence d'un nouveau type ou juste d'un variant éloigné de la SEA. Les

auteurs ont réalisé un ELISA spécifique en utilisant des anticorps monoclonaux pour ne fixer que la SEP et non la SEA, la SEE et la SED qui sont les ESs les plus proches en termes d'homologie de séquences. Cependant, certaines publications<sup>128</sup> utilisant des anticorps polyclonaux observent des réactions croisées en ELISA. En effet, des anticorps polyclonaux anti-SEA peuvent fixer les 3 ESs (A, E, P) de même que pour les anti-SEE, probablement en lien avec leur faible spécificité.

-SEQ Hu et al, 2017<sup>131</sup>, cet article décrit la résistance de la SEQ à différentes conditions retrouvées lors d'une intoxication alimentaire comme le chauffage, la digestion (trypsine / pepsine). Les auteurs ont produit des anticorps anti-SEQ pour analyser via la méthode ELISA la dégradation de la toxine en matrice alimentaire. Ils ont constaté que la SEA comme la SEQ peuvent résister pendant plusieurs heures à des conditions difficiles (100°C/trypsine/pepsine).

-SER Schubert et al, 2017<sup>132</sup>, les auteurs ont quantifié, par la méthode ELISA, la production de SED et de SER produites par différentes souches de *S. aureus*, dans du jus de viande et dans du lait. Ils ont constaté que la production des toxines SED et SER varie fortement en fonction des conditions de température et de matrice pouvant aller de 13 ng/ml à 25000 ng/ml pour une incubation de 48 h.

-SEY Aziz et al, 2020<sup>133</sup>, dans cet article les auteurs ont identifié 3 sous-groupes de SEY pour lesquels ils ont produit des anticorps et effectué des ELISA afin d'analyser plus de 270 souches dont 42 productrices de SEY.

-SE02 Suzuki et al, 2020<sup>27</sup>, seul cet article mentionne l'existence de la toxine SE02. Les auteurs ont utilisé la méthode ELISA afin d'analyser des souches issues de la TIAC de Osaka en 2000 (cf paragraphe I.A.2). Cela leur a permis de détecter la SE02 dans ces souches et donc d'émettre l'hypothèse que cette toxine a pu également jouer un rôle lors de la TIAC sans pouvoir le confirmer car l'aliment n'a pas pu être testé directement.

Il n'existe pas d'ELISA pour 19 types d'ES (SEL, SEN, SEO, SES, SET, SEIU, SEIV, SEIW, SEIX, SEIZ, SEI26, SEI27, SEI01, SEI28, SEI29, SEI30, SEI31, SEI32 et SEI33). Dans cette liste, 5 ESs possèdent une activité émétique démontrée (SEL, SEN, SEO, SES, SET).

L'ELISA est actuellement la méthode la plus utilisée pour la détection des ESs. En effet, elle offre de nombreux avantages, comme une limite de détection très basse de l'ordre de la dizaine de picogrammes par mL<sup>27,133,134</sup>. Cette méthode propose également une facilité d'utilisation et d'apprentissage pour le manipulateur avec un coût relativement bas. Cependant, l'utilisation d'anticorps peut induire des déviations positives par réactions croisées. Par exemple, la phosphatase alcaline et la forte homologie de séquence entre certaines ESs comme la SEA, la SEE et la SEP (80%) peuvent générer un résultat faux positif pour le kit vidas SET 2<sup>123,128</sup>. La présence de faux négatifs peut également être observée si l'antigène est dégradé ou si la matrice empêche la fixation de l'anticorps à son épitope (effet de matrice). De plus, il est possible d'avoir un variant de toxine possédant une mutation sur l'épitope de l'anticorps, dans ce cas la fixation sera impactée ou ne pourra avoir lieu.

Il existe dans la littérature d'autres tests basés sur l'utilisation d'anticorps, qui seront décrits dans la partie suivante.

### I.B.2.3 Analyse des entérotoxines staphylococciques par les tests de flux latéral LFA (Lateral flow assay)

Appelé aussi dosage immuno-chromatographique à flux latéral, le test de flux latéral LFA (Lateral flow assay) est basé sur le même principe que l'ELISA avec l'utilisation d'un anticorps de capture et d'un anticorps secondaire. Cette méthode permet de doser un échantillon liquide. L'analyte va migrer sur une bandelette et la molécule recherchée se fixe au premier anticorps, puis le flux va l'emporter vers le deuxième anticorps, comme le montre la Figure 15. Une fois le complexe anticorps / antigène constitué, une révélation est réalisée via des fluorophores fixés au premier anticorps ou à des particules d'or, ou de latex pour l'agglutination. Ainsi, si une bande apparaît sur la ligne de révélation située au niveau du deuxième anticorps, c'est qu'il y a présence de la molécule recherchée. L'avantage de cette méthode est sa facilité d'utilisation, en effet il suffit de mettre une goutte de l'échantillon sur la bandelette et le résultat est obtenu après 10 à 30 min. De par sa facilité d'utilisation, cette méthode est utilisée dans les tests de grossesse. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle est difficilement applicable aux matrices complexes comme les matrices alimentaires.

L'utilisation des tests LFA pour l'analyse des ESs existe depuis les années 2000. Alefantis et al,<sup>135</sup> en 2004 ont mis au point un test LFA par révélation par billes magnétiques. Ils ont détecté jusqu'à 0,1 ng/mL de la SEB dans du tampon. Rong-Hwa et al,<sup>136</sup> en 2010 ont utilisé des micros particules d'or pour la révélation de leur test LFA ciblant la SEB dans de la tomate, des champignons et de la nourriture pour bébé à base de viande. Ils ont obtenu une LOD proche de 10 ng/mL. Seul un article utilise les tests LFA pour d'autres ESs que la SEB Féraudet-Tarisse et al,<sup>134</sup> 2021. Les auteurs ont réalisé un test de détection multiplexe de 5 ESs : SEA, SEB, SEG, SEH et SEI, les sensibilités obtenues sont comprises entre 0,1 - 0,3 ng/ml dans du tampon avec une révélation par chromophore en moins de 30 min. Les tests LFA ont comme avantages, par rapport aux tests ELISA, leur rapidité et la facilité d'utilisation. En effet, ces tests sont conçus pour être utilisés sur le terrain sans formation préalable. Cependant, leur sensibilité dans les matrices alimentaires est 10 à 100 fois plus faible que celle des tests ELISA.

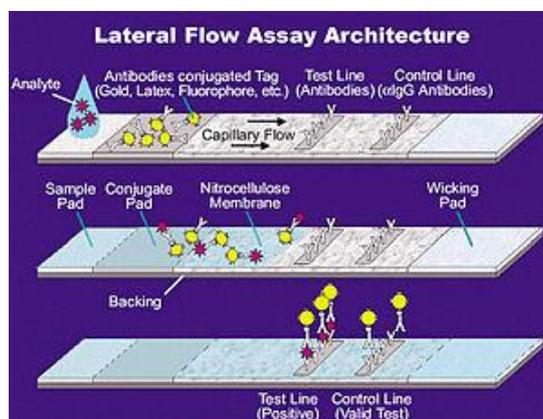


Figure 15 Schéma de fonctionnement de la méthode LFA proposée par la NASA

#### I.B.2.4 Analyse des entérotoxines staphylococciques par la méthode agglutination passive inversée au latex : RPLA (reversed passive latex agglutination)

La trousse SET-RPLA vendue par Denka Seiken permet la détection de la SEA, la SEB, la SEC et la SED sur le principe RPLA. La technique consiste à coupler les anticorps à du latex. Ainsi, les particules de latex s'agglutinent en présence de l'entérotoxine correspondante. Lors de la décantation, celle-ci forme une couche diffuse à la base du puits. Si les entérotoxines staphylococciques sont absentes ou à une concentration inférieure au seuil de détection du test, une telle structure en réseau ne peut pas être formée et, par conséquent, un bouton serré sera observé. En 1986, Park et al<sup>137</sup> ont démontré que cette méthode pouvait fonctionner dans différentes matrices alimentaires (boeuf, nouilles, salami, jambon et fromage). Ils ont obtenu la LOD pour les 4 ESs à 0.75 ng/g de nourriture. Cette méthode est de moins en moins utilisée de nos jours car les tests ELISAs sont plus sensibles.

#### I.B.2.5 Analyse des entérotoxines staphylococciques par la méthode de résonance plasmonique de surface ou SPR (Surface plasmon resonance)

La SPR est une technique exploitant le phénomène d'interactions entre d'une part la lumière et d'autre part la matière. Cette méthode est couramment utilisée dans la mesure des liaisons entre un ligand et son récepteur fixé sur une surface métallique. Ainsi les anticorps fixés sur la couche métallique modifient l'angle de la lumière en fonction de la présence ou non de son antigène. Haddada et al,<sup>138</sup> en 2017 ont utilisé cette méthode pour la détection de la SEA dans du lait, ils ont obtenu une LOD de 5 ng/mL. Cette méthode permet facilement et rapidement un large screening des anticorps fonctionnels, cette technique peut donc être utilisée lors de la sélection des anticorps pour la mise en place d'un test ELISA. Cependant l'ELISA reste plus sensible et moins contraignant à utiliser en routine que cette méthode.

#### I.B.2.6 Analyse des entérotoxines staphylococciques par les techniques des immuno-empreintes (Western Blot : WB)

Couramment appelé Western blot, cette méthode permet l'analyse de protéines présentes dans un gel natif (non dénaturant) en réalisant un transfert des protéines du gel (sur lequel les protéines ont au préalable été séparées selon leur masse moléculaire) à une membrane puis une révélation d'une protéine via des anticorps spécifiques à celle-ci. Ces anticorps sont couplés à un révélateur (radioactivité, fluorochrome...). Cette méthode est longue et difficile à mettre en place pour l'analyse de matrices alimentaires. Régulièrement, cette méthode est utilisée pour confirmer la présence de ESs dans du tampon. Ono et al,<sup>128</sup> en 2018 ont démontré la spécificité des anticorps anti-SEIJ via l'utilisation d'un Western Blot. Rasooly et Rasooly,<sup>139</sup> en 1998 ont analysé la SEA par WB dans du lait, de la viande et de la salade de pomme de terre. La sensibilité est proche du 1 ng/mL. Les avantages de cette

méthode par rapport à l'ELISA sont l'information sur la masse moléculaire de la protéine et la séparation au préalable des protéines entre elles, donc la limitation des réactions croisées.

### I.B.2.7 Analyse des entérotoxines staphylococciques par la méthode de cytométrie en flux

La dernière technique utilisant des anticorps pour la détection des ES a été développée par Shepelyakovskaya et al,<sup>140</sup> en 2020. Cette méthode est basée sur une détection en flux par un cytomètre de flux, un appareil utilisé généralement pour la détection de cellules marquées via des anticorps couplés à de la fluorescence. Dans cette étude, des anticorps anti-SEA, SEB et SEH ont été fixés sur des billes. Ce complexe a été mis en présence d'abord des ESs puis d'un deuxième anticorps couplé à un fluorochrome différent pour chaque ESs, comme illustré Figure 16. Ainsi, l'analyse peut être multiplexée, et permet d'obtenir des groupes quantifiables par cytométrie en flux comme décrit Figure 17. Des tests sur différentes matrices alimentaires à la concentration de 2 ng/g ont été fructueux. Cette méthode comparée à l'ELISA permet une analyse multiplexe, cependant l'ELISA est plus simple d'utilisation et également plus sensible sur les matrices alimentaires.

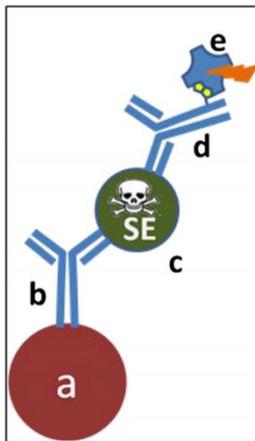


Figure 16 (a) Bille (b) AC de capture anti-entérotoxine (c) entérotoxine (d) AC de détection anti-entérotoxine biotinylée. (e) SA-PE. Provenant de Shepelyakovskaya et al en 2020

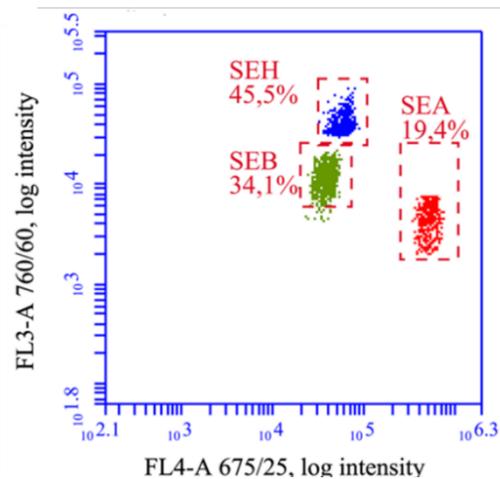


Figure 17 Mesure des concentrations de SEA, SEB, et SEH dans un mélange incubé avec des AC de détection biotinylés et révélés avec SA-PE. Provenant de Shepelyakovskaya et al en 2020

### I.B.2.8 Analyse des entérotoxines staphylococciques via l'utilisation d'Aptamères (Aptamer)

Le terme "Aptamère" provient des termes latins "aptus", qui signifie "s'adapter", et "meros", qui signifie "partie". Les aptamères sont de courtes molécules d'ADN ou d'ARN simple brin, qui peuvent se lier sélectivement à une cible spécifique comme les protéines, les peptides, les glucides, les petites molécules, les toxines et même les cellules vivantes. Les aptamères prennent des formes variées en raison de leur tendance à former des

boucles à un seul brin. Ils sont extrêmement polyvalents et se lient à des cibles avec une grande spécificité<sup>141</sup>. La liaison des aptamères provient de leur structure tertiaire, en effet la reconnaissance et la liaison des cibles impliquent des interactions tridimensionnelles, dépendantes de la forme, ainsi que des interactions hydrophobes. Les aptamères se lient parce qu'ils "s'adaptent" à leurs cibles<sup>142</sup>. Les aptamères peuvent donc fonctionner comme les anticorps. Purschke et al,<sup>143</sup> en 2003 ont été les premiers à créer un aptamère anti-SEB afin de proposer des méthodes alternatives aux anticorps. Mudili et al,<sup>144</sup> en 2015 ont créé un ELISA anti-SEB entre un anticorps de capture et un aptamère, ils ont pu obtenir une LOD de 50 ng/mL dans du lait. Kumari et al,<sup>145</sup> en 2019 ont utilisé la technique du FRET (Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) pour la détection de la SEB. Quand l'aptamère fixe la SEB, il change de conformation ce qui permet à un deuxième brin d'ADN complémentaire de venir se fixer à l'aptamère, et donc par excitation de créer de la fluorescence. La LOD a été estimée à 5 ng/g dans une soupe de lentille. L'utilisation des aptamères semble très prometteuse pour l'analyse des ESs. D'une part, leur production n'implique pas l'utilisation d'animaux à l'inverse des anticorps et d'autre part, une fois la séquence établie, ils sont simples à produire et peu coûteux. Enfin, l'homologie de séquence entre les ESs pourrait faciliter l'optimisation des aptamères permettant d'englober des groupes d'ESs. Cependant, la sensibilité est largement inférieure à celle des ELISA classiques utilisant des anticorps, voir inapplicable pour l'analyse des ESs dans les aliments naturellement contaminés.

#### I.B.2.9 Analyse des entérotoxines staphylococciques par les tests sur animaux

Les animaux sont utilisés comme modèle pour tenter de comprendre ce qui se passe chez l'Homme et afin d'observer les réponses à divers facteurs d'exposition (substances) mais également pour évaluer l'efficacité et/ou la toxicité de ces substances.

Les tests sur animaux réalisés avec les ESs ont principalement servi à démontrer l'activité émétique de celle-ci. Plusieurs espèces ont été utilisées car chacune a une tolérance différente aux ESs (cf paragraphe I.A.1.7.1).

Le premier test sur animaux (publié) remonte à l'année 1943. Fulton et al,<sup>146</sup> ont démontré l'activité émétique d'une ou plusieurs ESs (la nomenclature des ESs n'est pas encore identifiée à cette époque) produites en milieu de culture, sur des chatons.

Enfin une étude par Scheuber et al,<sup>147</sup> en 1983 a été réalisée avec un test appelé « direct skin » consistant à déposer de la SEB sur la peau d'un cobaye sensibilisé à la SEB et donc possédant les anticorps anti-SEB. Ainsi une réaction cutanée apparaît 20 min après exposition par réponse antigénique a permis aux auteurs obtenir une LOD entre 10-100 pg/g en fonction de l'aliment analysé. Cependant les problèmes éthiques liés à l'utilisation d'animaux pour la détection des ESs limitent leur utilisation.

### I.B.2.10 Détection des entérotoxines staphylococciques par LC-MS

En conclusion, il existe de nombreuses méthodes qui peuvent être mises en place lors de l'analyse des échantillons issus d'une TIAC, dont les souches bactériennes. Pour le cas des staphylocoques, trois types de méthodes peuvent être distinguées : les méthodes dédiées à la détection du staphylocoque, les méthodes de biologie moléculaire permettant la détection des facteurs de virulence (les gènes codant les ES, les ADN, les ARN...) et enfin les méthodes permettant la détection de l'ES directement dans l'aliment. Les informations fournies par chaque type de méthode peuvent être utilisées de manière complémentaire afin de rassembler un faisceau de preuves pour confirmer les TIACs à SCP.

En effet, la détection des gènes codant les ES permettrait d'orienter l'analyse vers le type d'ESs probablement exprimé dans l'aliment. La comparaison des ADN permettrait de comparer les origines des souches isolées de l'aliment ou de l'hôte. Cependant, la détection de l'ES dans l'aliment prélevé lors de l'épisode toxique est la preuve tangible de l'implication du Staphylocoque dans la TIAC. Les méthodes ELISA sont majoritairement utilisées pour la détection des ESs dans les aliments car ces méthodes sont les plus sensibles. Cependant, leur principe fondé sur l'utilisation des anticorps constitue à la fois un atout et un inconvénient. En effet, il est le responsable des réactions croisées et du manque de spécificité observé pour les méthodes ELISA. La mise en place des méthodes ELISA pour tous les ESs nécessite la préparation des anticorps couvrant les 35 ESs décrites, ce qui constitue un obstacle majeur pour ce type de méthode. L'utilisation d'aptamères pourrait être une alternative aux anticorps de par leur production rapide et peu coûteuse. Cependant, leur mauvaise sensibilité ne permet pas de les utiliser pour l'analyse d'un échantillon réel.

La LC-MS constitue une alternative pertinente pour les méthodes ELISA, elle permet une analyse multiplexe des ESs dans les aliments et peut atteindre des niveaux de sensibilité permettant l'analyse des échantillons naturels. Enfin, la spécificité est un atout majeur de la LC-MS. Cette technique qui fait l'objet de cette thèse est détaillée dans la partie suivante.

## I.C Analyses protéomiques par spectrométrie de masse, applications aux ESs

Les analyses protéomiques par spectrométrie de masse sont réalisées en trois étapes majeures. Une première étape de préparation d'échantillons permet de simplifier la matrice et de concentrer la ou les protéines d'intérêt, afin de favoriser la sensibilité et la spécificité de l'analyse par spectrométrie de masse. Dans une seconde étape, l'échantillon est analysé par un appareil de spectrométrie de masse à basse ou haute résolution (la résolution est la capacité d'un instrument à distinguer deux pics adjacents dans un spectre de masse). Enfin dans une dernière étape, le signal issu de l'analyse est traité informatiquement pour l'identification et/ou la quantification des protéines.

Le principe général de la spectrométrie de masse sera d'abord présenté, avant de détailler son application à l'analyse protéomique : les stratégies d'analyse protéomique bottom-up et top-down, la préparation d'échantillons pour l'analyse des protéines en matrices complexes ainsi que les méthodes de quantification absolue et relative des protéines seront présentées. Nous focaliserons cet exposé sur l'analyse par spectrométrie de masse en mode ciblé, même si les méthodes non ciblées seront évoquées. Finalement, nous terminerons ce chapitre par une revue de la littérature sur l'application de l'analyse protéomique aux entérotoxines.

### I.C.1 Principe de la spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse pour l'identification et/ou la détection de molécules ionisées en mesurant leur rapport masse sur charge ( $m/z$  où  $m$  est la masse moléculaire et  $z$  la charge de l'ion, positive ou négative). La technique MS comporte 4 éléments comme illustré Figure 18, le premier élément est une source d'ionisation qui permet un transfert en phase gazeuse des molécules et leur ionisation. Le second élément est composé d'un ou plusieurs analyseurs qui permettent de séparer les ions selon leurs rapports  $m/z$ . Ensuite le troisième élément est un détecteur capable d'analyser et d'amplifier le signal produit par les ions. Enfin le dernier élément, le traitement du signal, permet une représentation des données sous forme d'un spectre de masse (intensité en fonction du rapport  $m/z$ ).

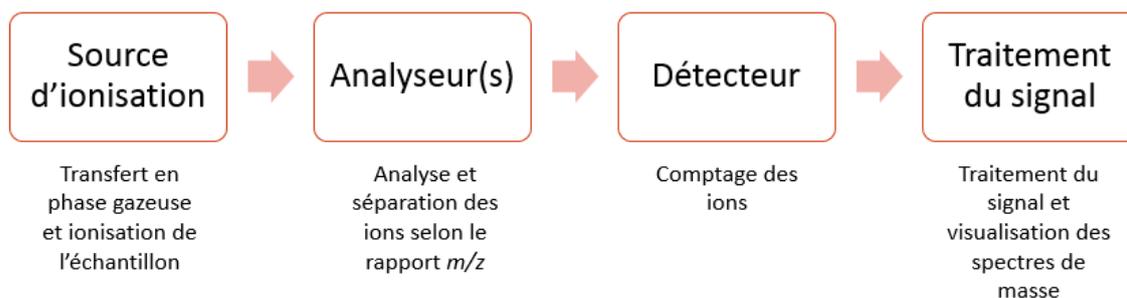


Figure 18 Description d'un spectromètre de masse

### I.C.1.1 Instrumentation

#### I.C.1.1.1 Source d'ionisation

Il existe de nombreuses sources d'ionisation, ici les 2 principes d'ionisation les plus utilisés pour l'analyse protéique seront décrits.

La Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) est une méthode où les protéines sont ionisées par transfert de charge à partir d'une matrice, elle-même ionisée en utilisant l'énergie du laser. Cette méthode produit majoritairement des ions mono-chargés et est considérée comme une ionisation douce.<sup>148</sup>

L'ionisation par électronébulisation (ElectroSpray Ionisation) (ESI), illustrée Figure 19, correspond à la technique d'ionisation utilisée lors de ce travail de thèse. Cette source ionise les composés en solution à pression atmosphérique, le plus souvent après une étape de séparation en ligne par chromatographie liquide. Le flux liquide forme un nuage de fines gouttelettes chargées (spray) après la traversée de l'aiguille d'ionisation. La densité de charge devenant trop importante au fur et à mesure de la désolvatation (par chauffage), les gouttelettes explosent en libérant des microgouttelettes de solvant et de molécules chargées. Cette méthode génère un nombre de charges variables et est considérée comme une ionisation douce<sup>149</sup>.

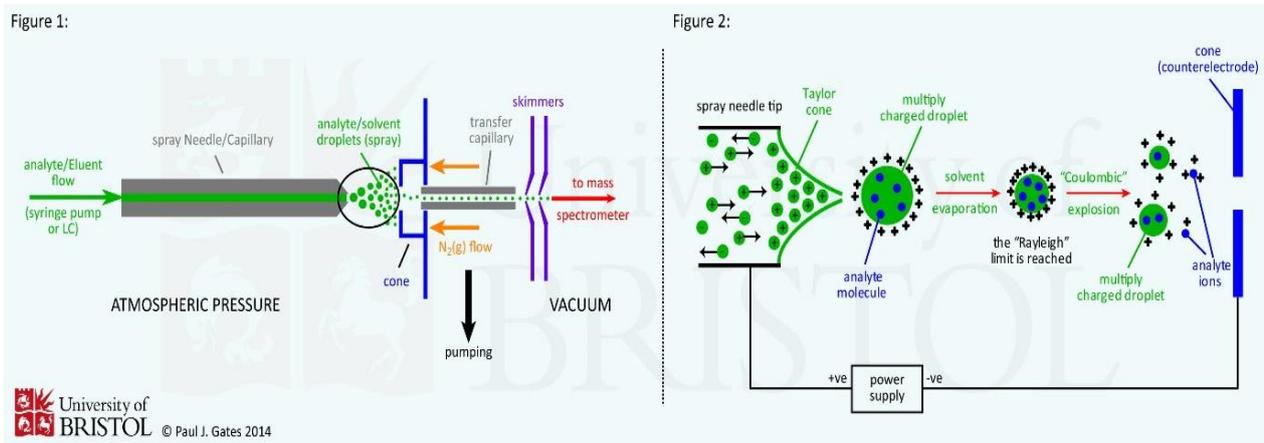


Figure 19 Description par Gates et al 2014 d'une source d'ionisation ESI

### I.C.1.1.2 Analyseur

Les analyseurs différencient les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ . Il existe de nombreux modèles composés de différentes technologies (quadripôle, piège à ions, temps de vol (TOF), résonance cyclonique ionique (FT-ICR) et Orbitrap. Chaque analyseur possède des spécificités en termes de vitesse d'analyse, de résolution et gamme dynamique (indique la différence d'intensité pouvant être analysé par l'appareil), comme rapporté dans le Tableau 5 proposé par Junot et al,<sup>150</sup> en 2014

Tableau 5 Aperçu des spectromètres de masse les plus couramment utilisés (Junot et al 2014)

Mass analyzer type		Resolving power (FWHM)	Mass accuracy (ppm)	Scan rate	Mass range	Dynamic range
<b>Low resolution instruments</b>						
QqQ		Up to 7500 (at $m/z$ 508)	5-500 ppm	Up to ~5,000 Da/s (i.e. ~5 Hz when considering a 1000 $m/z$ window)	Up to 3,000 $m/z$	$10^5$ - $10^6$
IT/LIT		Up to ~10,000	50-500 ppm	Up to ~33,000 Da/s	Up to 4,000 $m/z$	$10^4$
Qq-LIT		Up to 9200 (at $m/z$ 922)	50-500 ppm	Up to 20,000 Da/s	Up to 2,000 $m/z$	$10^5$ - $10^6$
<b>High resolution instruments</b>						
TOF	TOF only	Up to ~20,000 (at ~ $m/z$ 1000)	< 1-2 ppm (internal calibration)	Up to 40 Hz	Up to 20,000 $m/z$	$10^4$ - $10^5$
	Qq-TOF	Up to 60,000 (at $m/z$ 1222)	< 1-2 ppm (internal calibration)	Up to 100 Hz	Up to 40,000 $m/z$	$10^4$ - $10^5$
	IT-TOF	10,000 at $m/z$ 1000	< 2 ppm (internal calibration)	10 Hz	Up to 5,000 $m/z$	$10^3$
Orbitrap	Orbitrap-Exactive	Up to 140,000 (at $m/z$ 200)	< 1 ppm (internal calibration) < 3 ppm (external calibration)	Up to 12 Hz with a mass resolution of 17,500 (at $m/z$ 200)	Up to 6,000 $m/z$	$10^5$ - $10^4$
	LIT-Orbitrap	Up to 240,000 (at $m/z$ 400)	< 1 ppm (internal calibration) < 3 ppm (external calibration)	Up to ~8 Hz with a mass resolution of 15,000 (at $m/z$ 400)	Up to 4,000 $m/z$	$10^3$ - $10^4$
	Q-Orbitrap	Up to 140,000 (at $m/z$ 200)	< 1 ppm (internal calibration) < 5 ppm (external calibration)	Up to 12 Hz with a mass resolution of 17,500 (at $m/z$ 200)	Up to 4,000 $m/z$	$10^3$ - $10^4$
FT-ICR	LIT-FT 7T	>750,000 (at $m/z$ 400)	< 1 ppm (internal calibration) < 1.2 ppm (external calibration)	1 Hz with a mass resolution of 100,000 (at $m/z$ 400)	Up to 4,000 $m/z$	$10^3$ - $10^4$
	Qq-FT 7T	> 1,000,000 (at $m/z$ 400)	< 1 ppm (internal calibration) < 1.5 ppm (external calibration)	1 Hz with a mass resolution of 250,000 (at $m/z$ 400)	Up to 10,000 $m/z$	$10^3$ - $10^4$

Dans ce travail de thèse, un analyseur Orbitrap a été utilisé. Il se compose de deux électrodes comme illustré Figure 20 : une première électrode en forme de fuseau placée à l'intérieur d'une deuxième électrode creuse.<sup>151</sup> Ces deux électrodes via leur structure induisent un champ électrostatique, ainsi les ions orbitent autour de l'électrode centrale et oscillent d'avant en arrière le long de l'axe Z. Cette oscillation génère un courant électrique dans les plaques du détecteur qui est enregistré par l'instrument. Les fréquences de ces courants électriques dépendent des rapports masse/charge des ions. Les spectres de masse sont obtenus par transformée de Fourier<sup>152</sup>. Ce type d'analyseur est de type haute résolution et peut atteindre pour les appareils les plus récents, comme l'Orbitrap Eclipse,

1.000.000 de résolution pour 200 m/z avec une gamme de masse comprise entre 50 et 8000 m/z.<sup>153</sup>

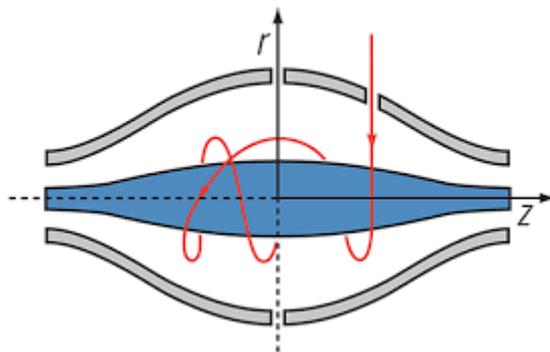


Figure 20 Schéma descriptif d'un analyseur Orbitrap Thermo Fisher Scientific

#### I.C.1.1.3 Détecteur

Le dernier élément du spectromètre de masse est le détecteur. Le détecteur enregistre le courant produit lorsqu'un ion passe ou frappe une surface pour le transformer en signal qui est ensuite converti et représenté par son intensité en fonction du rapport m/z.<sup>154</sup>

#### I.C.1.1.4 Fragmentation

La fragmentation permet d'analyser la structure de l'ion précurseur. Il existe différents modes de fragmentation, mais seule la fragmentation HCD pour Higher-energy Collisional Dissociation a été utilisée dans ce projet de thèse. Le principe consiste à accélérer les ions précurseurs par l'application d'un potentiel électrique afin d'augmenter leur énergie cinétique, puis les ions précurseurs entrent en collision avec des molécules de gaz neutres (souvent de l'hélium, de l'azote ou de l'argon). Lors de la collision, une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne. Cela entraîne la rupture des liaisons et la fragmentation de l'ion moléculaire en fragments plus petits (Figure 22). Ce mode est utilisé pour la quantification des protéines. La fragmentation de protéines ou de peptides se réalise la plupart du temps au niveau de la liaison peptidique et produit différents types d'ions en fonction du lieu de rupture et de la répartition de la charge, comme décrit Figure 21. Il est ainsi possible d'obtenir les ions a, b, c en partie Nter ou x, y, z en partie Cter décrits pour la première fois par Roepstorff et Fohlman en 1984<sup>155</sup>.

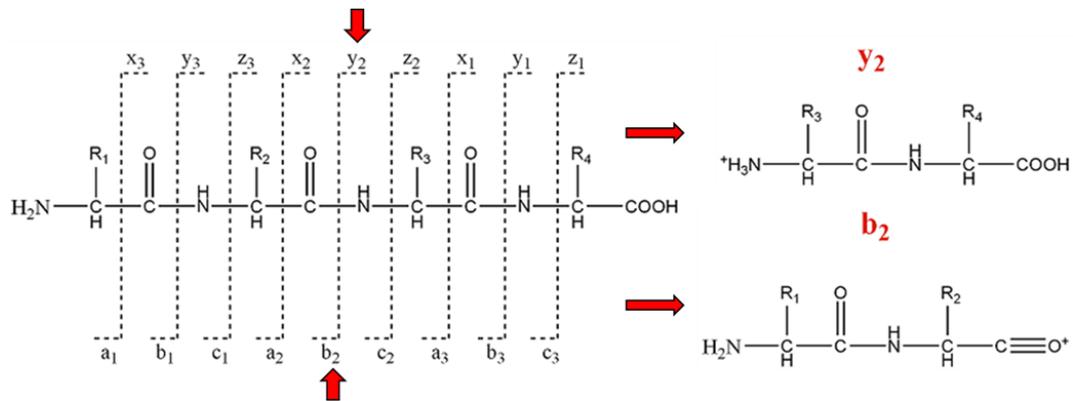


Figure 21 Fragmentation sur les liaisons peptidiques induisant des ions fragments Roepstorff et Fohlman en 1984

Le mode HCD, illustré Figure 22 , génère en majorité des ions de type  $y^{156}$ . Il existe d'autres modes de fragmentation pour la quantification, comme le mode CID ou Collision-induced dissociation, sur un principe proche du mode HCD. De même, il existe des modes plus spécifiques à la caractérisation des protéines comme la dissociation par capture d'électrons (ECD), la dissociation par transfert d'électrons (ETD) ou la dissociation multiphotonique infrarouge (IRMPD) permettant une couverture plus complète des séquences peptidiques par rapport à la méthode classique CID ou HCD. De plus, ces approches ont l'avantage de préserver les modifications post-traductionnelles pendant la fragmentation<sup>157,158</sup>.

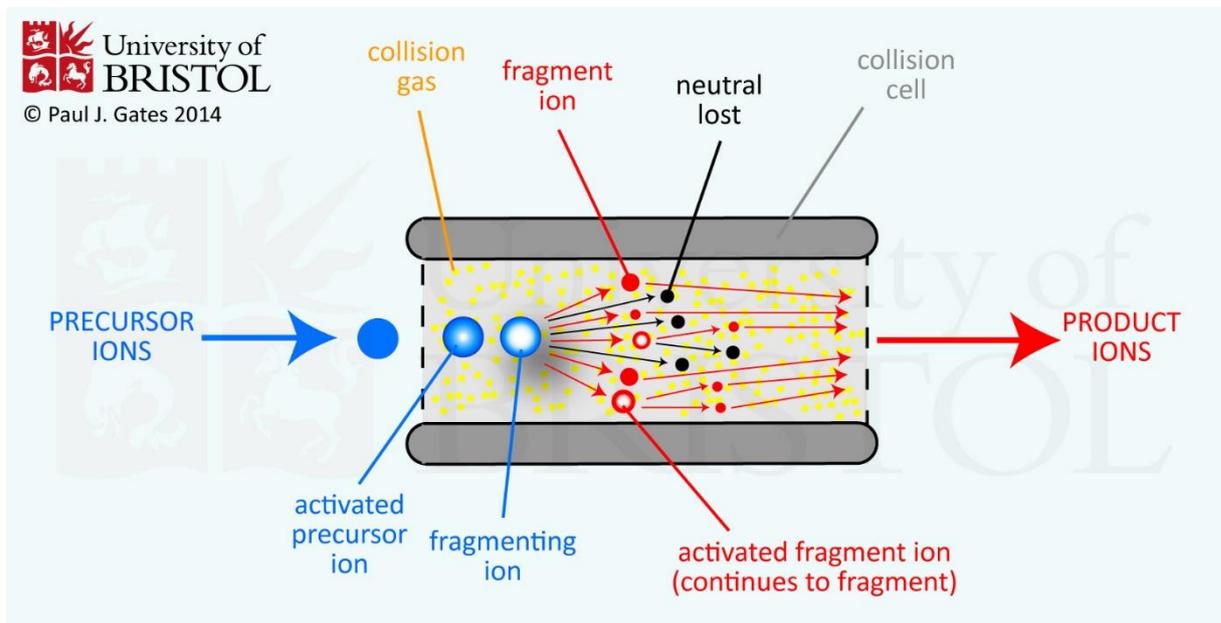


Figure 22 Description par Gates et al 2014 d'une cellule de collision de type HCD

#### I.C.1.1.5 Instrument utilisé durant les travaux de thèse

L'appareil utilisé lors de ce travail est de type Q Exactive de la marque Thermo Fisher Scientific, illustré Figure 23. C'est un appareil hybride quadripôle-Orbitrap avec une ionisation par ESI et une fragmentation par une cellule HCD. Cet appareil permet de sélectionner des ions précurseurs via le quadripôle, de les accumuler à l'aide d'une C-Trap

puis, soit de mesurer leur rapport  $m/z$  directement par l'Orbitrap, soit de passer par une étape de fragmentation dans la cellule HCD puis de mesurer le rapport  $m/z$  des ions fragments obtenus. La résolution d'un Q Exactive de première génération est comprise entre 17 500 et 140 000 à 200  $m/z$  pour une fréquence de 16 à 2 Hz (la fréquence indique le nombre possible d'analyse en 1 seconde par l'analyseur) et possède une gamme de masse entre 50 et 4000  $m/z$ <sup>159</sup>.

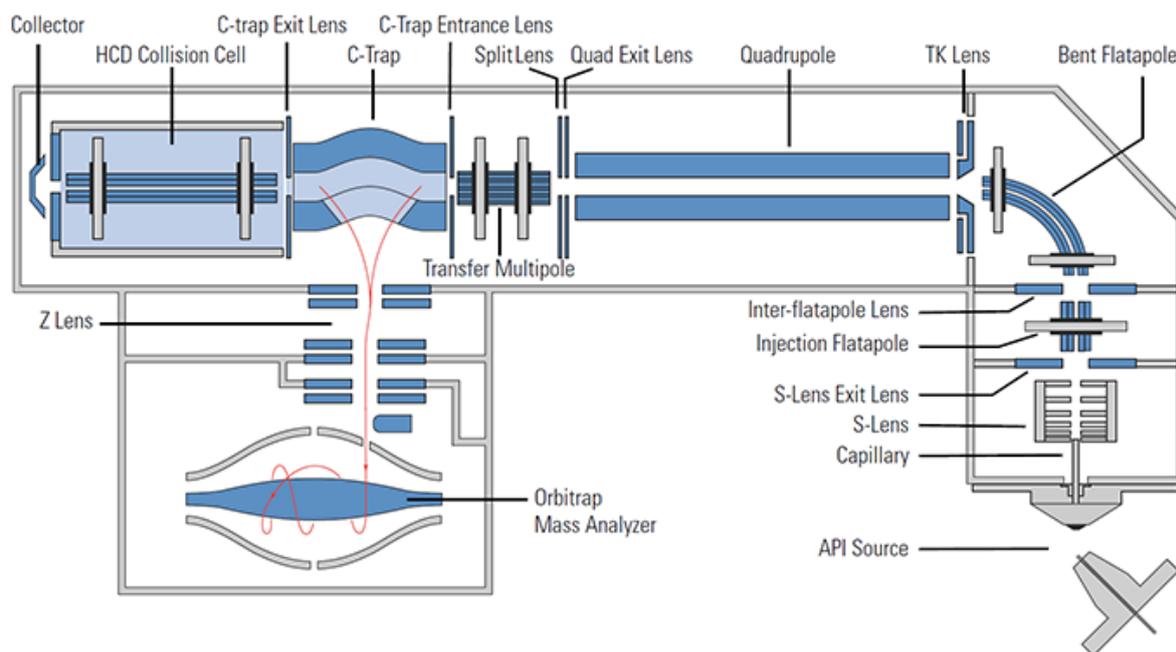


Figure 23 Représentation schématique d'un Q Exactive par Michalski et al 2011

## I.C.2 Apport de la spectrométrie de masse pour l'analyse des protéines et stratégies analytiques

L'analyse par spectrométrie de masse des protéines est exploitée pour la découverte et la validation de biomarqueurs comme pour la maladie d'Alzheimer<sup>160</sup> ou Parkinson<sup>161</sup>, la découverte et le développement de médicaments<sup>162</sup> ou enfin, à l'identification de toxines protéiques comme la ricine<sup>163</sup>, la toxine botulique<sup>164</sup> ou les entérotoxines<sup>165</sup>. La protéomique peut être appliquée à l'analyse d'une seule protéine ou utilisée pour l'analyse à grande échelle d'un protéome spécifique, y compris pour étudier l'abondance des protéines comme décrit par Abdelmegid et al,<sup>166</sup> en 2018. Les auteurs ont étudié en mode non ciblé le protéome du *S. aureus* dans du lait issu de vaches infectées par des mammites, leurs travaux ont permis de mettre en évidence une abondance significativement différente pour 25 protéines de lait, permettant ainsi d'identifier des laits sains ou contaminés. Il est également possible d'étudier les modifications des protéines, et ainsi d'identifier de nouveaux variants ou sous type de protéines. En effet Wang et al,<sup>167</sup> en 2012 ont mis en place une méthode permettant d'identifier les sous types de la toxine botulique sans l'utilisation d'outils génomiques. D'autres travaux concernent l'étude des interactions

protéine-protéine et des interactions protéine-composé. Ces approches peuvent permettre de comprendre comment une toxine se fixe à son récepteur protéique, comme dans l'étude proposée par Bastos et al,<sup>168</sup> en 2020 sur une toxine du venin de serpent *Bothrops jararaca*. Ainsi, la spectrométrie de masse est un outil analytique de choix pour l'analyse des protéines et des toxines.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes focalisé sur l'analyse quantitative de toxines protéiques en faible abondance dans des matrices complexes, notamment via la spectrométrie de masse en mode ciblé. Dans un premier temps nous développerons les stratégies bottom-up et top-down, en décrivant également leurs avantages concernant la sensibilité et la spécificité. Suite à cela nous décrirons les quatre principaux modes d'acquisitions pour les analyses protéomiques, deux d'entre eux sont des modes ciblés (PRM et SRM). Cela consiste à rechercher spécifiquement une ou des protéines ou des peptides avec une séquence et donc un rapport m/z déjà connu. Les deux autres modes sont dits non ciblés (DDA et DIA) pour une analyse plus empirique de l'échantillon.

La préparation des échantillons pour l'analyse par spectrométrie de masse est une étape cruciale. En effet, l'effet de matrice dépend de la pureté de l'échantillon, et l'étape de préparation d'échantillons permet aussi de reconcentrer l'analyte pour des analyses sensibles et quantitatives. Ainsi, les différentes stratégies les plus courantes seront présentées. Finalement, nous développerons les stratégies de quantification protéique en décrivant un large panel de méthodes pour les quantifications relatives ou absolues.

## I.C.2.1 Stratégie analytique et mode d'acquisition des données

### I.C.2.1.1 Stratégie bottom-up

L'approche bottom-up est la méthode la plus courante pour l'analyse des protéines. Elle consiste à utiliser une enzyme protéolytique pour digérer les protéines. Cette digestion produit des peptides spécifiques dit protéotypiques de la protéine, plus simples à analyser que la protéine entière, par une masse de l'ordre de 1500-2000 Da et un nombre réduit d'états de charge<sup>169,170</sup>. Comparer les rapports m/z des peptides protéolytiques et leurs spectres de masse en tandem avec ceux prédits dans une base de données de séquences ou à un spectre de peptide annoté dans une bibliothèque spectrale permet d'identifier les peptides de la protéine. Plus le nombre de peptides identifiés est grand, et donc le recouvrement de séquence, plus l'identification de la protéine est fiable<sup>171</sup>. La protéomique bottom-up est un moyen relativement simple et fiable de déterminer la composition protéique d'un échantillon donné. La digestion en peptides peut être facilitée en utilisant des agents dénaturants, comme le Rapigest, l'urée, des agents organiques et inorganiques (tel que des sels), des détergents<sup>172</sup>. Cela dénature la protéine afin de rendre accessible les sites de coupure par l'enzyme. Cependant, la présence de ponts disulfures au niveau des cystéines empêche le dépliement total de la protéine. Ainsi, comme illustré Figure 24, le dithiothréitol (DTT) est un réducteur fort qui réduit les ponts disulfures et l'ajout de

l'iodoacétamide (IAA) empêche la reformation des ponts en se fixant aux groupements thiols des cystéines.<sup>173</sup> comme décrit par Fremout et al, en 2014<sup>174</sup>

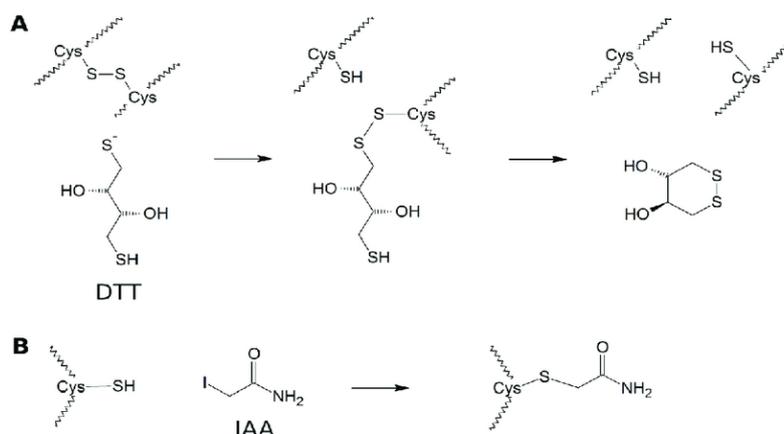


Figure 24 Réaction chimique du DTT et l'IAA sur les ponts disulfures Fremout et al, 2014

La trypsine est la protéase la plus couramment utilisée pour la digestion des protéines. Elle coupe au niveau C-terminal des résidus basiques de lysine et d'arginine (si non suivis d'une proline). Au vu de l'abondance des deux acides aminés basiques, les peptides produits par la trypsine sont généralement compris entre 8 et 25 acides aminés, soit des masses de peptides comprises entre 500 et 2000 Da. Il s'agit de la taille optimale pour une analyse en LC-MS<sup>175,176</sup>. Du fait de la coupure par la trypsine au niveau des résidus basiques, les peptides présentent deux groupements aminés (en Cter et Nter), ce qui conduit majoritairement à des peptides di-chargés et un rapport m/z compris entre 300 et 1000. Il est possible d'obtenir des peptides chargés au-delà de 2 charges via la présence dans la séquence d'acides aminés comme l'histidine, l'arginine et la lysine (en cas de non-coupure). Cette gamme de masse est tout à fait adaptée aux analyseurs conventionnels comme les quadripôles (10-4000 m/z) ou l'Orbitrap (50-4000 m/z). La trypsine possède une grande spécificité, cependant le rendement du clivage dépend de l'acide aminé à la suite de la lysine ou de l'arginine comme décrit Figure 25 par Rodriguez et al,<sup>177</sup> en 2008. Le nombre de non-clivage est plus important si la fréquence de digestion est plus faible comme par exemple en présence d'une proline ou d'une cystéine à la suite des sites de coupure.

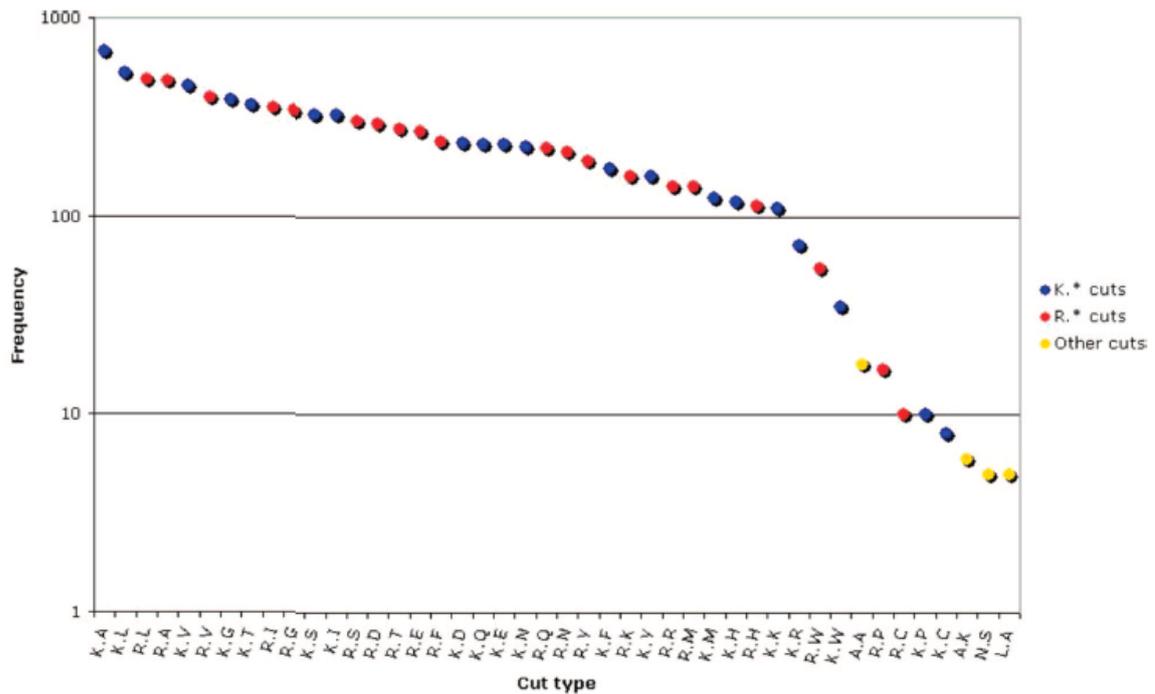


Figure 25 Fréquence des sites de coupure de la trypsine pour les 45 paires d'acides aminés d'après Rodriguez et al, 2008

Il existe également une grande diversité des enzymes pour la digestion protéique. La trypsine présente des peptides très adaptés à l'analyse par MS tant par la taille des peptides délivrés que par leurs charges comme vu précédemment, et permet le plus souvent d'atteindre la plus grande couverture de séquence. Cependant d'autres enzymes protéolytiques peuvent être utilisées en complément. C'est le cas pour l'analyse des protéines qui possèdent des séquences particulières avec une distribution des sites de coupure ne permettant pas l'obtention de peptides analysables par MS (taille, doubles arginine ou lysine...). Des séquences particulières peuvent contenir des informations importantes telles que des modifications post-traductionnelles (PTM) ou des mutations qu'il peut être intéressant d'identifier. Ainsi, d'autres enzymes ont été décrites, Tableau 6, avec des sites de clivage différents et plus ou moins spécifiques. Elles sont régulièrement utilisées comme complément de la trypsine en fonction de la nature de la séquence analysée.

Tableau 6 Site de coupure des principales enzymes utilisées pour l'analyse des protéines par spectrométrie de masse.

Enzyme	Acide aminé	Hydrolyse
Trypsine	K, R	Cter
Chymotrypsine	F, Y, L, W, M	Cter
Pepsine	F, Y, L, W	Nter
Thermolysine	F, Y, I, W, M, V	Nter
Glu-C	D, E	Cter
Lys-C	K	Cter
Lys-N	K	Nter
Arg-C	R	Cter
Asp-N	D	Nter

#### I.C.2.1.2 Stratégie top-down

La seconde stratégie, top-down, consiste à analyser la protéine intacte sans digestion, soit en mode « full scan MS » conduisant à l'obtention d'un profil d'états de charge qui peut être déconvolué pour déterminer la masse exacte de la protéine analysée, comme illustré Figure 26. Soit après fragmentation ( $MS^2$ ) pour séquencer la protéine via les ions fragments obtenus Figure 27 (issus de Kafader et al, 2020<sup>182</sup>)

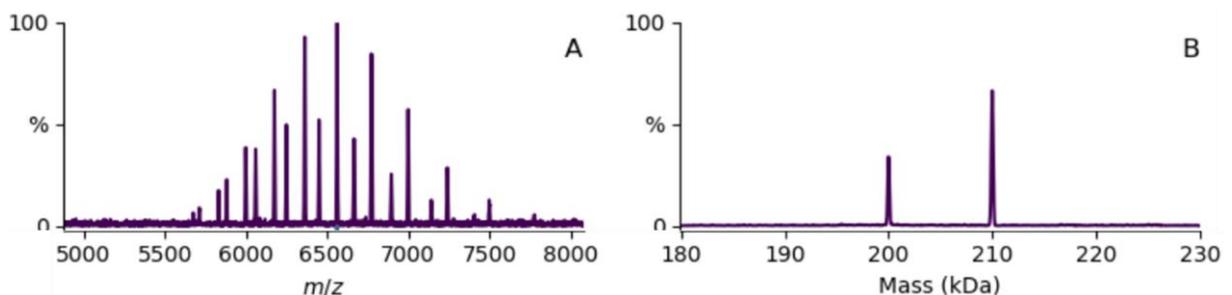


Figure 26 (A) Spectre full MS de deux protéines avec le profil d'état de charge. (B) Déconvolution du spectre full MS indiquant la masse exacte des deux protéines. Figure proposée par Marty et al, 2020<sup>178</sup>

Les avantages de la méthode top-down sont liés à l'analyse des protéines dans leur intégralité et à la capacité de conserver le lien entre les modifications post-traductionnelles (PTM) sur une même protéine<sup>179</sup>. Cela permet d'identifier des modifications post-traductionnelles difficilement visibles en bottom-up (Figure 28) comme la présence d'un pont disulfure<sup>180</sup>. De nombreuses PTM peuvent être présentes sur une même protéine complexifiant fortement les spectres de masse comme lors de l'étude de Manconi et al,<sup>181</sup> en 2017 où les auteurs ont pu identifier plus de 30 PTM sur une même protéine, la

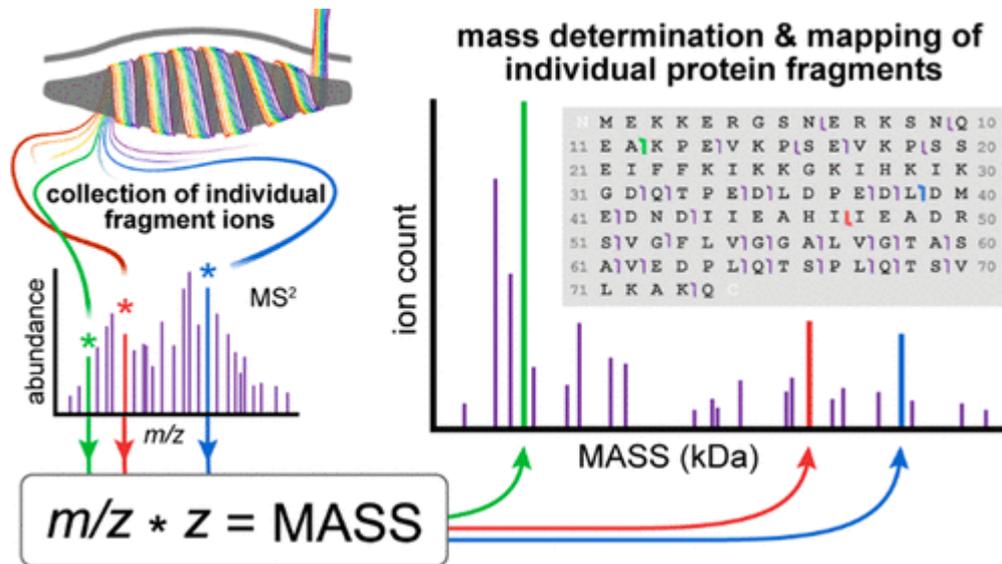


Figure 27 (À gauche) spectre full  $MS^2$  d'une protéine avec les rapports  $m/z$  des fragments observés. (À droite) identification des fragments permettant le séquençage protéique. Figure proposé par Kafader et al, 2020

cystatine, à la recherche de nouveaux biomarqueurs salivaires de maladies cardiovasculaires. Les mutations d'acides aminés provenant de variants peuvent également être identifiées au même titre que les PTM. Ainsi les cancers sont issus de cellules mutées qui généralement favorisent leur survie au lieu de provoquer leur apoptose. C'est le cas de la protéine provenant du gène KRAS qui, si elle est mutée sur la glycine en position 13 par un acide aspartique (Gly13Asp), provoque cette survie cellulaire. Ntai et al,<sup>182</sup> en 2018 ont mis en place une méthode utilisant une préparation d'échantillons basée sur l'immunocapture suivie d'une analyse top-down pour identifier cette mutation au niveau protéique afin de proposer un diagnostic rapide sur la potentielle apparition de cancers.

La protéomique top-down est moins sensible que la protéomique bottom-up dû au nombreux états de charges après ionisation electrospray de la protéine (voir Figure 26) qui provoquent une dispersion du signal<sup>183</sup>. C'est également cet effet de dispersion du signal qui limite l'analyse des protéines supérieures à 30-40 kDa pour les appareils de type Orbitrap<sup>184</sup> ou TOF<sup>185</sup>. Une exception est à noter pour les anticorps où la limite peut monter à 150 kDa<sup>186</sup>. Récemment, Vanaernum et al,<sup>187</sup> ont analysé des complexes protéiques atteignant 336 kDa en utilisant des analyseurs Orbitrap. De nouvelles méthodes permettant de limiter le nombre d'états de charge ont été développées comme décrit dans l'étude de Huguet et al,<sup>188</sup> 2019 où les auteurs ont proposé la méthode PTCR (proton transfer charge reduction) qui a pour objectif de limiter le nombre de protons liés à la protéine et donc le nombre d'états de charge. Pour cela, les auteurs ont réalisé un transfert ion-ion proton vers un autre ion receveur. Les analyseurs de type Orbitrap les plus récents (EMR ou Extended Mass Range) ont également la possibilité d'analyser des protéines intactes avec une gamme de rapport  $m/z$  étendue<sup>187,189,190</sup>.

La quantification absolue par top-down est peu développée dans la littérature et manque de sensibilité comme décrit précédemment. La difficulté d'obtenir des étalons internes comme des protéines SILAC ou PSAQ (décrit ultérieurement), marquées aux isotopes stables, limite aussi la quantification absolue par top-down. La quantification est le plus souvent dite « relative » et consiste à comparer l'abondance de protéoformes entre différentes conditions comme décrit par Santos Seckler et al,<sup>191</sup> en 2021. Les auteurs ont étudié l'abondance des protéoformes des apolipoprotéines A-I (ApoA-I) et C-III (ApoC-III) pour le diagnostic de maladies liées au cholestérol.

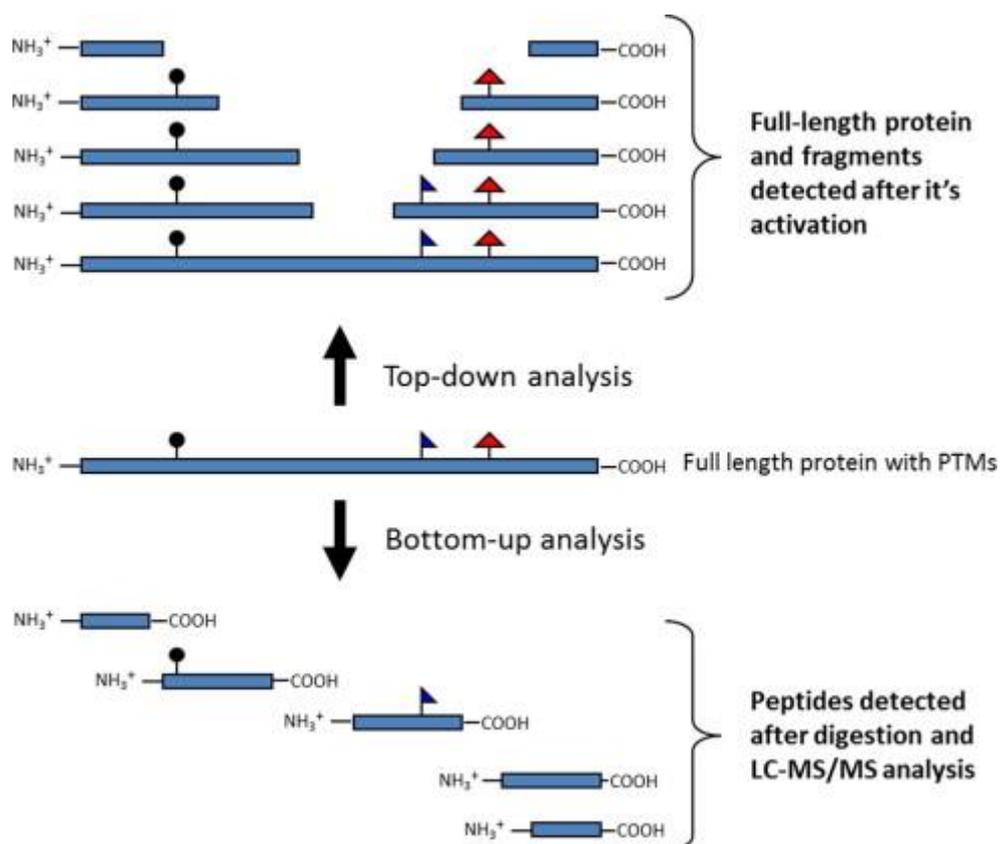


Figure 28 Description schématique de l'approche bottom-up et top-down. Adapté de scherl et al, 2015

### I.C.2.2 Les modes d'acquisition des données pour la protéomique (LC-MS)

Il existe 4 principaux modes d'acquisition pour l'analyse protéomique : 2 modes ciblés et 2 modes non ciblés. Les modes ciblés, avec la méthode SRM (Selected Reaction Monitoring) ou MRM (Multiple Reaction Monitoring) et la méthode PRM (Parallel Reaction Monitoring), consistent à rechercher des peptides (ou protéines) déjà identifiés. Il s'agit des modes d'acquisition les plus couramment utilisés pour la quantification absolue. Les 2 autres modes d'acquisition, sont non ciblés, donc sans a priori lors de l'acquisition : le mode DIA (Data Independent Acquisition) et le mode DDA (Data Dependent Acquisition). Les différentes méthodes d'acquisition listées seront développées dans les paragraphes suivants. Dans cette partie nous décrivons en premier la SRM qui est la méthode la plus

utilisée en protéomique ciblée, puis la PRM, plus récente, suivie par la DDA ou mode non ciblé le plus utilisé pour l'identification de protéine, et enfin la DIA plus récemment proposée.

#### I.C.2.2.1 Mode Selected Reaction Monitoring (SRM et MRM)

Le mode d'acquisition SRM appelé aussi MRM, illustré Figure 29, est la méthode classique pour l'analyse ciblée des protéines. Ce mode ciblé permet de mesurer la concentration d'un nombre restreint de protéines d'intérêt avec une forte sensibilité, de manière reproductible et précise<sup>192</sup>. Avant analyse, les peptides provenant de la digestion enzymatique (protéomique bottom-up) sont séparés par une colonne de chromatographie liquide puis analysés par un spectromètre de masse de type triple quadripôle (QQQ). L'appareil mesure et transmet le rapport  $m/z$  (ions précurseurs et fragments) des ions peptidiques spécifiques des protéines d'intérêt<sup>193</sup>. Le quadripôle est un analyseur constitué de quatre électrodes soumises à une différence de potentiel entre chaque paire d'électrodes, cela créé un champ électrique de type quadripolaire. Les ions précurseurs sont sélectionnés dans le premier quadripôle (Q1) en fonction de leur rapport  $m/z$  spécifique avec une tolérance de 0.7-2 Da, le quadripôle (Q2) est une cellule de collision CID (collision-induced dissociation) qui permet la fragmentation des ions précurseurs, puis les ions fragments obtenus sont orientés vers le troisième quadripôle (Q3) qui applique une nouvelle sélection d'ions avec les rapport  $m/z$  spécifiques des ions fragments afin de les sélectionner pour être guidés vers un détecteur (voir Figure 29). La double sélection ions précurseurs / ions fragments, nommée transition, permet une analyse très spécifique et de réduire considérablement le bruit de fond, ce qui améliore le rapport signal/bruit<sup>194</sup>.

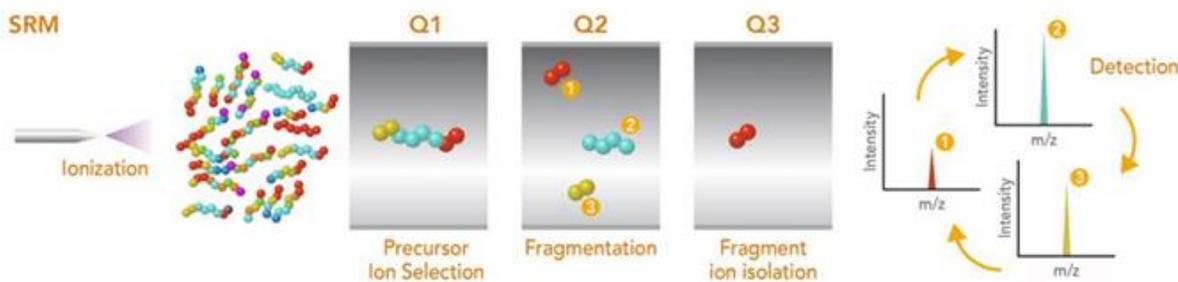


Figure 29 Vue d'ensemble de la méthode LC-SRM-MS. Adapté de Burnum-Johnson et al 2016<sup>195</sup>

On retrouve ce mode dans la quantification de la ricine qui est une protéine toxique issue de la graine de ricin. Dans l'étude de Schieltz et al,<sup>196</sup> en 2015 les auteurs ont pu différencier plus spécifiquement la ricine d'une autre protéine avec une forte homologie, l'agglutinine de *R. communis* (RCA), difficile à discriminer par les méthodes classiques d'ELISA. Malgré les nombreux avantages proposés par la méthode SRM, comme la spécificité, la sensibilité et la reproductibilité, cette méthode peut souffrir d'interférences dues à des co-élutions avec des peptides isobares, lors de l'analyse de matrices biologiques riches en protéines. Ce phénomène est amplifié par l'utilisation de la trypsine libérant ainsi de nombreux autres peptides pouvant avoir des rapports  $m/z$  proches de ceux analysés<sup>197</sup>. Afin d'identifier ces

interférences, des critères sont appliqués lors du traitement du signal. Notamment, au moins trois transitions par peptide doivent être suivies avec un ratio entre ces transitions stable et conservé<sup>198</sup>. Il est également important d'avoir un étalon interne sous forme d'un peptide marqué aux isotopes stables pour identifier les bons temps de rétention et une forme de pic cohérente<sup>199</sup>. De plus, les analyses SRM nécessitent l'identification d'un ensemble prédéfini et validé de peptides cibles et de fragments attirés. Il faut donc choisir au préalable, lors de l'optimisation analytique, les peptides et les fragments à analyser pour définir les transitions optimales. L'aide de logiciels dédiés tel que Skyline<sup>200</sup> est essentielle.

Le mode SRM permet de multiplexer les analyses. Cela consiste en l'analyse de plusieurs protéines en une seule analyse et dépend de la rapidité d'acquisition de l'appareil utilisé. Il est possible d'optimiser ce multiplexage comme par Burgess et al,<sup>201</sup> en 2014. Les auteurs ont développé une méthode SRM pour la quantification de 400 peptides et de leurs isotopes stables utilisés comme étalons internes, pour un total de 800 peptides ciblés avec 3 transitions par peptide, soit 2400 transitions suivies. De même, pour favoriser le multiplexage, Rougemont et al,<sup>202</sup>, ont développé en 2017 une méthode appelée SCOUT-SRM afin de compenser la variation des temps de rétention d'une injection à l'autre et basée sur 19 peptides (les SCOUT) élués le long de la séparation chromatographique.

#### I.C.2.2.2 Mode parallel reaction monitoring (PRM)

Depuis 2012, les spectromètres de masse haute résolution de type Q Exactive (Figure 23)<sup>159</sup> se sont imposés comme une alternative crédible aux triple quadripôles. Brièvement, le Q Exactive est un spectromètre de masse hybride combinant un quadripôle et un Orbitrap comme décrit précédemment. Le Q Exactive est le plus souvent utilisé en mode d'acquisition PRM pour les analyses quantitatives dans les matrices complexes. Une étape de fragmentation dans une cellule HCD est réalisée après le stockage des ions précurseurs dans la C-trap et les ions fragments sont analysés dans l'Orbitrap comme illustré Figure 30 ; le choix des transitions se fait donc post-acquisition offrant un avantage sur le SRM pour la rapidité de mise au point de la méthode. L'Orbitrap est un analyseur de masse à haute résolution et permet d'atteindre une précision de masse de l'ordre de 5 ppm, ce qui a pour intérêt, comparé au SRM, d'identifier de potentielles co-élutions d'ions interférant avec des rapports m/z des ions fragments proches de ceux de l'analyte. Le mode PRM permet ainsi, en présence de matrices complexes, de quantifier sur une gamme dynamique plus large qu'avec le mode SRM<sup>203</sup>.

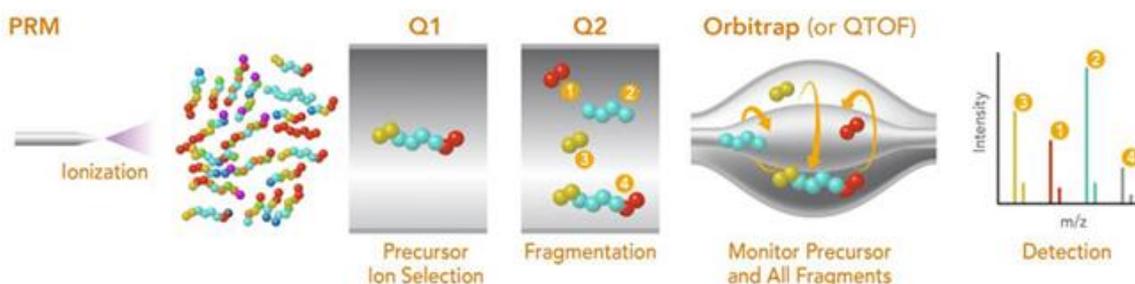


Figure 30 Vue d'ensemble de la méthode LC-PRM-MS. Adapté de Burnum-Johnson et al,<sup>195</sup>

Le mode PRM offre de nouvelles alternatives pour les analyses multiplexées<sup>204</sup>. Il permet ainsi d'accumuler dans la C-trap individuellement chaque ion précurseur et, après fragmentation, de les analyser simultanément (MSX (multiplex) entre 2 et 10 sur l'appareil utilisé au laboratoire) dans l'Orbitrap, comme représenté Figure 31. Le multiplexage du mode PRM a été utilisé par Zhang et al,<sup>205</sup> en 2021 avec l'objectif de supprimer la chromatographie liquide en amont de la MS pour réduire le temps d'analyse d'anticorps thérapeutiques. Ainsi l'injection a été réalisée en direct (infusion) conduisant à analyser de nombreux peptides simultanément. Les auteurs ont utilisé un MSX n=2 pour incorporer le peptide cible et son étalon interne marqué aux isotopes stables. Lors d'une méthode quantitative il est important d'avoir un certain nombre de points par pic afin d'obtenir une aire représentative de la quantité d'analyte. L'utilisation du PRM MSX permet d'augmenter la résolution pour un même nombre de point par pic ou de réduire le temps d'analyse en maintenant le nombre de points par pic chromatographique.

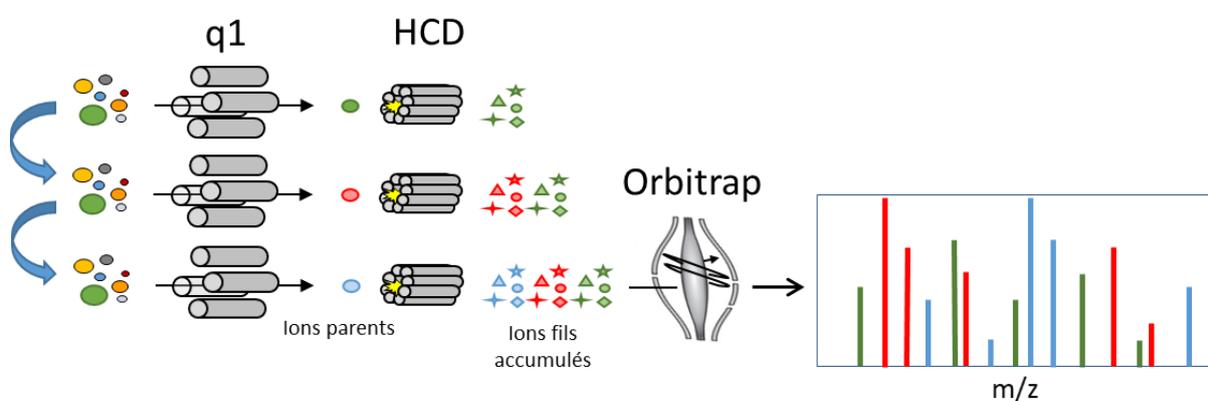


Figure 31 Vue d'ensemble de la méthode LC-PRM-MS en mode MSX (n=3).

Une alternative au mode multiplexe décrit précédemment consiste à élargir la plage de sélection des ions précurseurs par le quadripôle et ainsi de sélectionner plusieurs ions précurseurs dans le quadripôle en même temps. C'est le mode broad-band décrit par Gallien et al<sup>206</sup> en 2014 et illustré Figure 32, cela consiste par exemple à augmenter la plage de sélection pour laisser passer deux ions précurseurs avec un rapport m/z proche comme pour les peptides non marqués et leurs homologues marqués sur les lysine (K) et arginine (R).

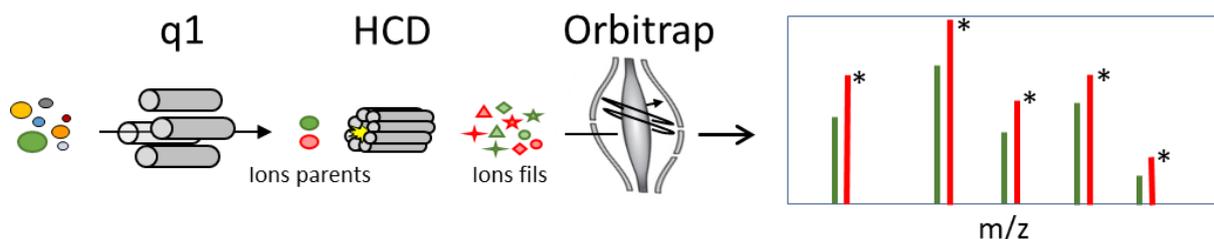


Figure 32 Vue d'ensemble de la méthode LC-PRM-MS en mode broad-band.

Bien que les exemples précédents concernent la quantification de biomarqueurs, le multiplexage présente un intérêt également pour les toxines. Le PRM, le PRM MSX et le PRM broad-band ont été utilisés dans ce travail de thèse pour répondre à des problématiques de spécificité de l'analyse en matrices complexes et permettre le suivi d'un grand nombre de peptides protéotypiques représentatifs de différents types d'entérotoxines.

### I.C.2.2.3 Mode Data Dependent Acquisition (DDA)

Cette méthode, représentée Figure 33, est en deux étapes cycliques. Dans un premier temps une analyse en « full scan MS » est réalisée, c'est un balayage sans filtre et sans fragmentation des ions transmis à l'analyseur pour mesure du rapport  $m/z$ . Les  $N$  ions les plus intenses lors du « full scan MS » ( $N$  généralement entre 5 et 10) sont, dans un second temps, ciblés, accumulés, fragmentés et les ions fragments analysés par l'Orbitrap. Ces étapes sont répétées en cycle tout au long de l'analyse de l'échantillon. Afin de ne pas refragmenter un peptide déjà analysé, il est possible de l'éliminer temporairement et ainsi de favoriser d'autres peptides moins abondants. La limite de cette méthode est la rapidité du spectromètre de masse à enchaîner ces étapes. Les rapports  $m/z$  et les spectres MS et MS/MS ainsi obtenus sont comparés aux bases de données protéomiques, pour identifier chaque peptide<sup>207</sup>. Les appareils les plus utilisés pour le mode DDA sont le plus souvent de type hybride avec un quadripôle ou un piège à ions, et un analyseur à haute résolution Orbitrap ou TOF.

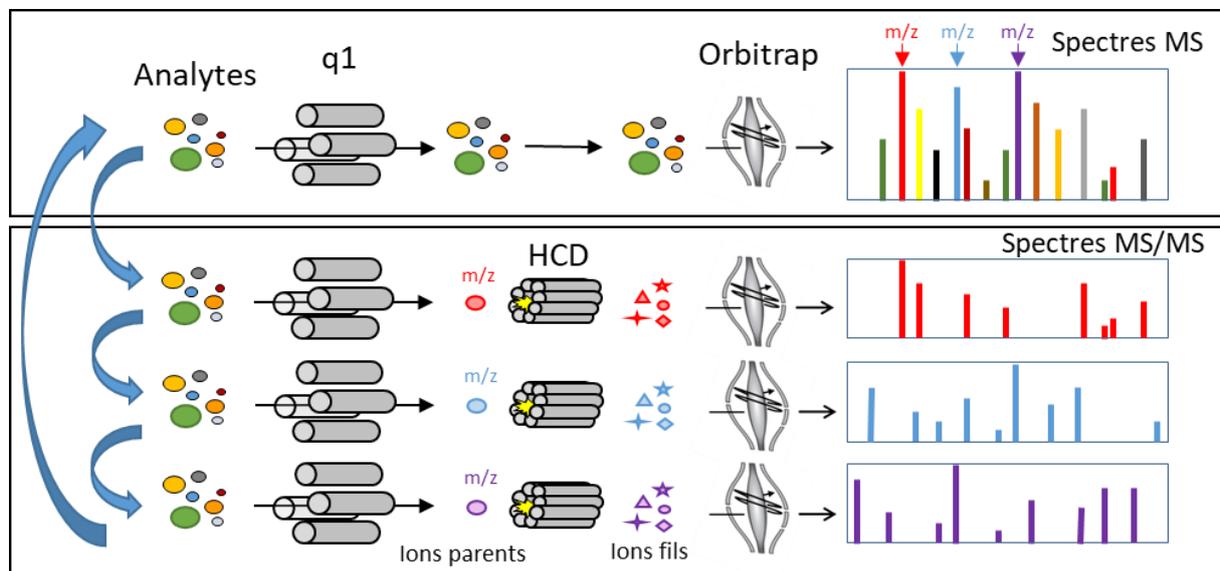


Figure 33 Vue d'ensemble d'un cycle de la méthode LC-DDA-MS ( $N=3$ ).

Il existe plusieurs logiciels de retraitement de données DDA comme Proteome Discoverer, X!TandemPipeline, MaxQuant...<sup>208,209</sup>. Ces logiciels utilisent différents algorithmes comme Mascot<sup>171</sup>, Sequest<sup>210</sup>, Andromeda<sup>211</sup>, XTandem<sup>209</sup>. Ces algorithmes réalisent une digestion *in Silico* des protéines recherchées à partir de fichier FASTA contenant les séquences en

acides aminés, ainsi que les rapports  $m/z$  théoriques des peptides, sont confrontés aux données LC-MS obtenues.

#### I.C.2.2.4 Mode Data-independent acquisition (DIA)

L'un des plus grands défis de la protéomique de découverte est l'identification et la quantification précise de l'abondance du grand nombre de protéines contenues dans des échantillons complexes. Le nombre de peptides libérés par ces protéines pendant la préparation de l'échantillon est encore plus élevé (> 100 000) et peut dépasser le nombre maximal de spectres pouvant être acquis dans les flux de travail traditionnel DDA. Ce problème connu de sous-échantillonnage peut être contourné en utilisant une méthode d'acquisition alternative.

L'analyse en mode DIA (appelé aussi SWATH pour *Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragment Ion Mass Spectra*) est le terme générique introduit en 2003 par Purvine et al,<sup>212</sup> et a pour principe que tous les ions précurseurs de l'ensemble de la gamme de masse sont isolés séquentiellement dans des fenêtres de rapport  $m/z$  (entre 25-50  $m/z$ ) et fragmentés ensemble. La Figure 34 représente la succession de fenêtres en rouge, bleu, violet issues du spectre « full scan » MS, ces fenêtres d'ions précurseurs sont ensuite transmises à la cellule de collision MS/MS. Les spectres obtenus sont très complexes car les ions fragments qui en résultent proviennent de multiples ions précurseurs, ce qui complique l'analyse des données. Afin de mettre en corrélation des ions précurseurs et les ions fragments, une analyse en spectre « full scan MS » peut être réalisée (voir Figure 34). L'une des stratégies permettant d'identifier les peptides avec un haut degré de confiance repose sur les bibliothèques spectrales de peptides issus d'analyse DDA<sup>213</sup> ou plus récemment sur la réalisation de bibliothèques spectrales de peptides *in silico*. Ainsi, Yang et al,<sup>214</sup> en 2020 ont décrit une méthode de deep learning appelé DeepDIA, pour obtenir des bibliothèques spectrales de peptides *in silico*, qu'ils ont confronté à des bibliothèques spectrales de peptides classique issus de DIA.

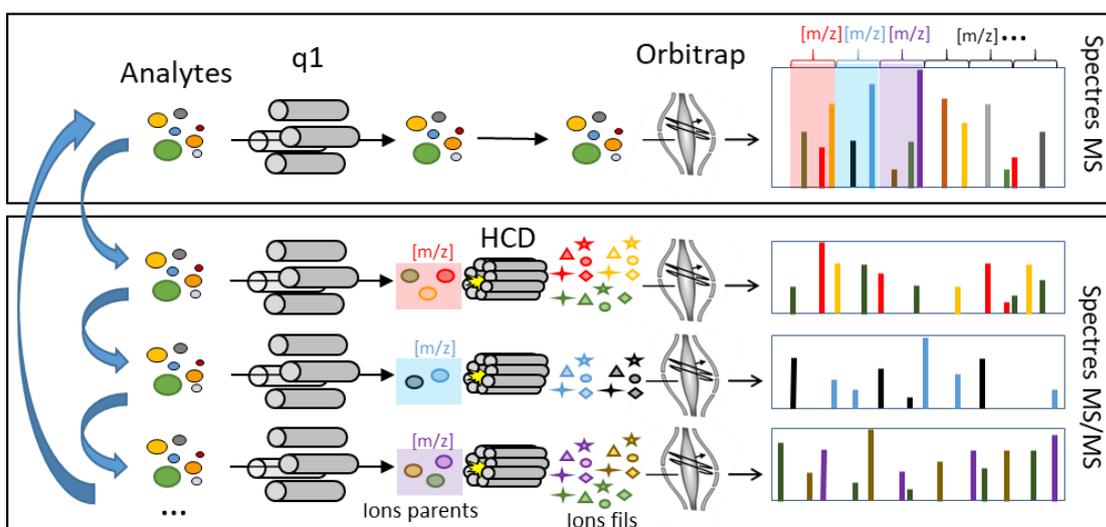


Figure 34 Vue d'ensemble d'un cycle de la méthode LC-DIA-MS

Les données générées par l'analyse DIA sont très complètes et informatives et peuvent être utilisées pour des analyses « ciblées » post-acquisition<sup>215</sup>. La quantité de données générées par DIA nécessite la création de banques de données et de logiciels dédiés. Il existe différents logiciels, comme ABSciex PeakView, Biognosys Spectronaut, OpenSWATH, Thermo Pinpoint et Waters Protein Lynx Global Server, qui prennent en charge l'interprétation des données DIA. Il est également possible d'utiliser la plateforme logicielle Skyline, plus accessible<sup>216</sup>. Au niveau bactérien Midha et al,<sup>217</sup> ont proposé en 2020 une bibliothèque spectrale de peptides pour la bactérie *Escherichia coli* en incorporant entre 4 014 des 4 389 protéines annotées pour un total de 56182 peptides protéotypiques.

### I.C.3 Analyses protéomiques en matrices complexes

Nous verrons au sein de cette partie comment l'analyse des protéines s'applique à des échantillons complexes, et notamment les effets de matrices et la préparation de l'échantillon.

#### I.C.3.1 Effets de matrice et normalisation du signal

Comme décrit précédemment, la LC-MS permet une quantification précise et sensible via les acquisitions en mode ciblé. Cependant la sensibilité peut être altérée par le phénomène d'effet de matrice dans les échantillons complexes. La quantification en mode ciblé est limitée par les effets de matrice, en particulier lorsqu'elle utilise une source du type ESI pour analyser des extraits de matrices complexes<sup>218</sup>. Les effets de matrice sont souvent causés par une variation de l'ionisation des analytes cibles en présence de composés co-élus issus de la matrice. Les effets de matrice peuvent se manifester par une perte ou un gain du signal observé. Les variations du signal des ions affectent considérablement la performance analytique d'une méthode. Par conséquent, les effets de matrice doivent être évalués lors de la validation d'une méthode LC-MS. Afin de corriger ou de compenser ces effets de matrice, un étalon ou standard interne (IS) est ajouté afin de normaliser le signal par un ratio analyte / IS.<sup>219</sup>

De plus, les effets de matrice sont variables selon les échantillons et cela pose un vrai challenge dans le domaine alimentaire où les matrices sont à la fois complexes et variées de par la diversité des aliments et de par leur composition. En effet, une préparation d'échantillons est en général orientée pour un type de matrice et d'analyte spécifiques, or la diversité des aliments oblige à obtenir des préparations d'échantillons plus générales. Ainsi, il existe la norme NF EN ISO 19020 adaptée aux ESs pour une analyse par test immunologique<sup>125</sup> à partir des matrices alimentaires, mais jamais évaluée pour l'analyse protéomique par spectrométrie de masse.

A noter que seules les matrices riches en protéines permettent la production d'ESs par *S. aureus*<sup>65</sup>. Ainsi les aliments concernés par l'identification d'ESs sont des matrices complexes de par la forte concentration en protéines. De plus, une analyse par protéomique bottom-up utilisant la trypsine comme enzyme de digestion va produire une très grande quantité

de peptides, ce qui va augmenter la complexité de la matrice. Ainsi, une préparation de l'échantillon efficace est essentielle pour réduire les effets de matrice, notamment dans le domaine alimentaire et pour la détection à l'état de trace<sup>220</sup>.

### I.C.3.2 Préparation d'échantillons

Comme vu précédemment, la préparation d'échantillons pour une analyse de protéines en LC-MS est obligatoire. Dans cette partie, nous listerons les méthodes les plus couramment utilisées pour la préparation d'échantillons protéiques. Nous verrons les méthodes de séparation des protéines et peptides basées sur leur masse moléculaire, les méthodes de séparation par précipitation protéique, les méthodes de dessalage et d'élimination des détergents, les méthodes de fractionnement par chromatographie liquide et enfin les méthodes d'extraction protéiques par immuno-affinité utilisant des anticorps (ou des aptamers).

#### I.C.3.2.1 Gel SDS-PAGE

Décrit pour la première fois par Laemmli en 1970<sup>221</sup>, le gel SDS-PAGE permet la séparation des protéines par électrophorèse à travers une matrice de gel en fonction de leurs masses moléculaires, les petites protéines migrant plus rapidement en raison de leur moindre résistance à la matrice de gel.

Le dodécylsulfate de sodium ou SDS est un détergent qui a un fort effet dénaturant sur les protéines et qui se lie au squelette de la protéine à un rapport molaire constant<sup>222</sup>. De plus, le SDS apporte une charge négative aux protéines les faisant ainsi toutes migrer dans le même sens. En présence de SDS et d'un agent réducteur qui coupe les liaisons disulfures essentielles au bon repliement des protéines, celles-ci se déploient en chaînes linéaires dont la charge négative est proportionnelle à la longueur de la chaîne polypeptidique. Ainsi le SDS élimine en grande partie l'influence de la structure et de la charge. Les protéines sont donc séparées uniquement sur la base de la longueur de la chaîne polypeptidique.

Les méthodes de révélation des protéines dans les gels sont principalement basées sur l'utilisation du bleu de Coomassie. Ce colorant bleu va se fixer sur les protéines pour révéler leur position dans le gel. Il est possible par la suite de réaliser des Western blots par un transfert des protéines présentes dans le gel SDS-PAGE sur une membrane de nitrocellulose, cette membrane sera ensuite mise en présence d'anticorps de la protéine recherchée. En parallèle du Western Blot, la spectrométrie de masse permet d'identifier la ou les protéines présentes. Pour ce faire, la partie du gel où se situe la protéine est découpée, puis une digestion enzymatique et une extraction peptidique sont réalisées. C'est la méthode historique pour l'identification des protéines en LC-MS utilisée en 1981 par Stadler et al,<sup>223</sup> et encore largement utilisée de nos jours pour les analyses de routine ou pour les analyses du protéome comme pour Busche et al,<sup>224</sup> en 2018. Les auteurs ont analysé le secretome de trois souches de *S. aureus* d'origine humaine avec une méthode DDA. Ils ont pu identifier 869 protéines sécrétées dont une quarantaine de facteurs de virulence ou toxines comprenant des ESs.

#### I.C.3.2.2 Précipitation protéique (séparation en fonction du point isoélectrique)

La précipitation est la méthode la plus simple pour concentrer une protéine, éliminer les sels et détergents. Afin de la rendre éventuellement sélective de la protéine d'intérêt, il faut que la protéine d'intérêt précipite dans des conditions particulières par rapport aux autres protéines<sup>225</sup>. Trois paramètres jouent sur la solubilité des protéines : leur hydratation, leur charge électrostatique et leur conformation. Plusieurs méthodes permettent la précipitation protéique, par l'exemple via l'utilisation de solvants dénaturants comme l'éthanol, l'acétone ou le phénol<sup>226</sup>. La modification du pH peut également être utilisée, elle est obtenue par des acides tel que le TCA (acide trichloroacétique), acide le plus utilisé pour la précipitation des protéines<sup>227</sup>. La précipitation ionique est également régulièrement utilisée car elle dénature peu la protéine et permet donc de conserver son activité ou sa conformation après précipitation, l'urée ou le sulfate d'ammonium sont d'ailleurs très utilisés pour ce type de précipitation protéique<sup>228</sup>. Enfin il est également possible de précipiter des protéines par la chaleur mais ce processus endommage fortement leur conformation. Koike et al,<sup>229</sup> en 2019 ont développé une méthode d'analyse de la toxine SEA dans du lait par double précipitation : une première précipitation acide « douce » pour l'élimination de la caséine (protéine majoritaire du lait) suivie d'une deuxième précipitation au TCA de la toxine SEA. La LOD est estimée à 10 ng/g dans le lait avec une analyse par LC-MS utilisant un appareil QTRAP en mode MRM. La précipitation permet aussi de concentrer les protéines avant analyse du protéome de souches de *S. aureus*<sup>224,230,231</sup>.

#### I.C.3.2.3 Filtration / dialyse

Afin de concentrer ou de purifier des protéines, des méthodes par filtration/dialyse peuvent être utilisées en exploitant la masse moléculaire des protéines d'intérêt. La dialyse est une méthode souvent utilisée pour modifier le tampon dans lequel la protéine est solubilisée. Cependant cette méthode permet aussi de concentrer les protéines. Si le boudin de dialyse est plongé dans du PEG, le polymère va, par effet osmotique, faire diffuser l'eau hors du boudin de dialyse, afin d'obtenir un échantillon déshydraté. Cette méthode est utilisée dans la norme NF EN ISO 19020<sup>125</sup> pour la concentration des ESs issues de matrices alimentaires.

Plus récemment, des digestions sur filtre ont été proposées pour faciliter l'analyse de protéines hydrophobes, comme la méthode FASP (filter-aided sample preparation), décrite pour la première fois par Wiśniewski et al en 2009<sup>232</sup>, pour éliminer les sels et détergent. L'utilisation du SDS permet une bonne extraction des protéines hydrophobes mais n'est

pas compatible avec des analyses en LC-MS, il est donc obligatoire de l'éliminer de l'échantillon protéique. Le protocole proposé par Erde et al, 2014<sup>233</sup> est présenté Figure 35.

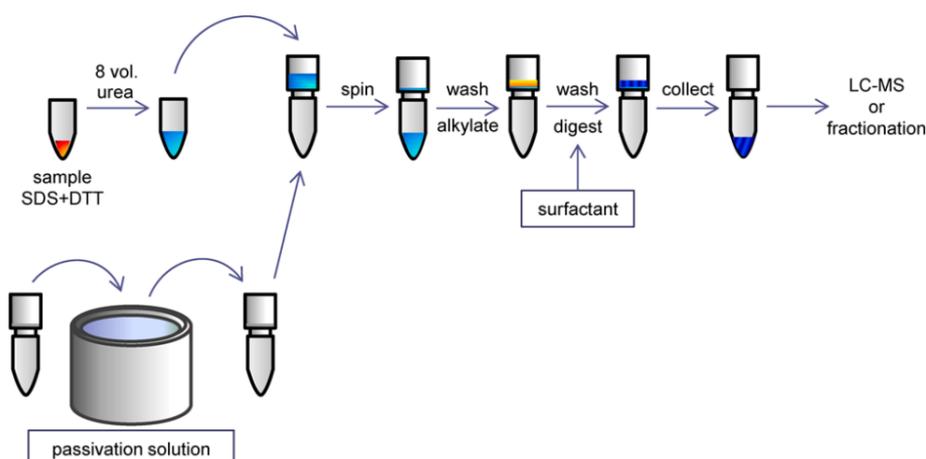


Figure 35 Protocole FASPe proposé par Erde et al 2014

#### I.C.3.2.4 Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation (SP3)

En 2014, Hughes et al,<sup>234</sup> propose une méthode Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation (SP3). SP3 fournit un moyen rapide de préparation d'échantillons protéomiques dans un seul tube ce qui facilite l'analyse à haut débit du protéome. En effet, elle a pour principe de fixer l'ensemble des protéines de l'échantillon sur des billes magnétiques qui seront extraites de la matrice via un aimant. Cette méthode d'extraction n'est pas ciblée, elle permet d'extraire l'ensemble du protéome d'une matrice et donc de changer de tampon ou de milieu afin d'éliminer les sels et détergent. Hughes et al,<sup>235</sup> en 2019 ont proposé un protocole standardisé et reproductible pour la quantification du protéome de cellules humaines en utilisant la méthodes SP3 pour éliminer les détergents de lyse cellulaire.

#### I.C.3.2.5 Chromatographie liquide et SPE pour le fractionnement

Il existe plusieurs types de fractionnement, réalisés par chromatographie liquide ou par SPE (Extraction en Phase Solide). La SPE consiste à fractionner l'échantillon en fonction de la polarité ou de la charge des analytes, le plus souvent au niveau peptidique après digestion à la trypsine, sur de petites cartouches chromatographiques. Cette méthode a déjà été utilisée pour l'analyse des ESs par Andjelkovic et al 2016<sup>236</sup>, l'objectif étant d'obtenir une méthode de détection de la SEA et SEB dans le lait sans utilisation d'anticorps. Avec une cartouche de type SPE C18, ils ont obtenu une LOD de 4 à 8 ng/mL. La chromatographie liquide en colonne peut également être utilisée pour le fractionnement d'échantillon. Shi et al,<sup>237</sup> en 2012 ont proposé un protocole, illustré Figure 36, de fractionnement du plasma humain sur colonne C18 en phase basique. Ils ont obtenu 96 fractions qui ont été regroupées en 12 groupes pour être analysées ensemble en nano-LC-MS sur une colonne C18 en phase acide. Ce protocole a permis aux auteurs d'obtenir des LOD comprises entre 50-100 pg/mL pour la protéine PSA.

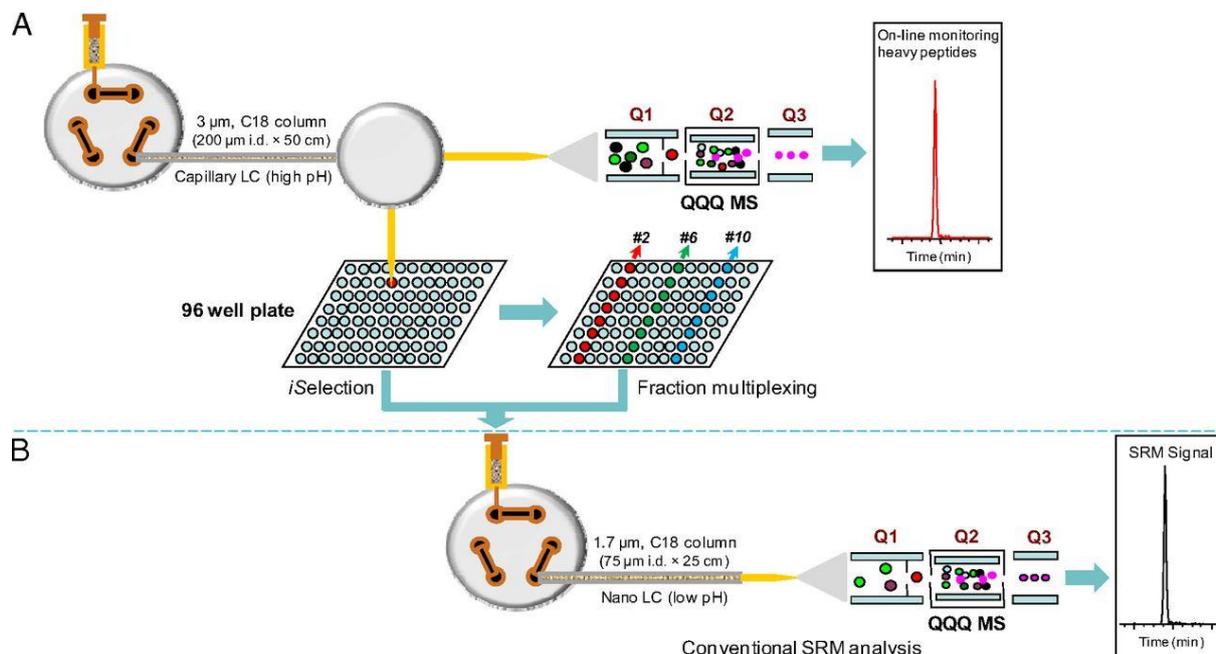


Figure 36 Schéma du plan expérimental de Shi et al 2012<sup>237</sup> pour le fractionnement du plasma humain par colonne C18.

#### I.C.3.2.6 L'immuno-enrichissement ou immunocapture

L'immunocapture, illustrée Figure 37, permet l'enrichissement d'une protéine par des anticorps immobilisés. Il s'agit d'une des méthodes les plus sensibles pour la purification des protéines. Cette méthode a pour principe d'immobiliser des anticorps spécifiques de la protéine recherchée, par exemple à des billes magnétiques comme Dupré et al, 2015<sup>165</sup>. Les auteurs ont ainsi atteint une LOD de 0.25 ng/mL pour la SEB avec une détection en mode PRM sur un Q Exactive. L'utilisation de billes magnétiques permet d'extraire le complexe protéique via l'utilisation d'aimants. Une alternative est le multiplexe « Bundles » qui utilise des cônes avec des anticorps fixés à l'intérieur (de type zip-tip)<sup>238</sup>. Plus récemment, des colonnes d'immunoaffinité multiples (mIACs) ont été utilisées par Li et al,<sup>239</sup> 2021 afin de fixer un grand nombre d'anticorps sur une colonne de type SPE pouvant être adaptée au format 96 puits. Une étape d'éluion est généralement réalisée afin de libérer la protéine du complexe. Il est cependant possible de réaliser une digestion trypsique directement sur les billes magnétiques couplées au complexe anticorps-protéine pour réduire le temps de préparation de l'échantillon et augmenter le rendement global de l'étape d'immunocapture<sup>240</sup>. L'immuno-enrichissement permet d'atteindre des limites de détection proches de la centaine de pg/mL, en effet Adrait et al,<sup>241</sup> en 2012 ont atteint une LOD de 352 pg/mL de la toxine SEA dans du sérum, matrice complexe et riche en protéines. Dupuis et al,<sup>242</sup> 2008 et Hennekinne et al,<sup>243</sup> 2009 ont été les premiers à étudier la toxine SEA issue d'une intoxication alimentaire par spectrométrie de masse. Afin d'extraire la toxine, les auteurs ont utilisé l'immunocapture et ont pu identifier la SEA dans des perles de coco à 1.5 ng/g. L'immunocapture est multiplexable en ajoutant différents anticorps ciblant différentes protéines comme Picard et al,<sup>244</sup> en 2012 qui ont multiplexé 7 entérotoxines SEA-SEH afin d'obtenir une preuve de concept d'analyse dans du suc gastrique à 10 ng/mL. Dans cette étude, le rendement de capture a été pris en compte via

l'utilisation de protéines marquées aux isotopes stables comme étalons internes (Figure 37 Dupré et al,<sup>165</sup> 2015). En effet, même si l'immunoprécipitation propose une purification efficace des protéines recherchées, une variation des rendements peut être observée en fonction des matrices analysées et doit être prise en compte lors de la quantification. Il est également important de sélectionner le ou les anticorps utilisés. Les anticorps jouent un rôle essentiel dans cette méthode, l'utilisation d'anticorps monoclonaux permet d'être plus spécifique sur la protéine ciblée ou le sous-type d'une protéine, et des anticorps polyclonaux ont un spectre plus large de capture. Les aptamères permettent également de capter les protéines de manière spécifique. Il s'agit d'ADN ou ARN synthétiques qui de par leur conformation ont la possibilité de capter un ligand. Ray et al,<sup>245</sup> ont proposé en 2020 un aptamère de capture (AptA-MS) pour l'analyse de complexes protéiques afin d'éviter de contaminer leur analyse par des peptides parasites issus des anticorps. La production des aptamères reste relativement simple en comparaison avec les anticorps, dont le coût de production est élevé. Récemment des aptamères ont été développés pour certaines ESs comme la SEA Zhang et al,<sup>246</sup> 2020 ou SEB Chen et al,<sup>247</sup> 2019, cependant aucune étude n'a utilisé les aptamères comme méthode de capture couplée à la LC-MS pour les ESs. Une autre alternative de ligand consiste en des peptides d'affinité, couplés à des billes magnétiques, qui vont venir se lier à la protéine d'intérêt<sup>248</sup>. Enfin, l'immunocapture peut être réalisée après digestion enzymatique afin de capter les peptides libérés. Anderson et al,<sup>249</sup> en 2004 ont proposé la méthode SISCAPA (Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies). L'intérêt est de pouvoir ajouter des étalons internes de type peptides marqués aux isotopes stables qui seront également captés par les anticorps anti-peptides, et donc de prendre en compte le rendement d'immunocapture. Ippoliti et al,<sup>238</sup> en 2016 ont utilisé la méthode SICAPA avec un haut multiplexage (150) et ont obtenu une LOD moyenne pour leurs 110 peptides de 0,072 fmol/mL dans du plasma, en utilisant la plateforme de microchromatographie Agilent AssayMAP Bravo. Liu et al,<sup>250</sup> ont développé en 2018 un SISCAPA-MRM pour l'analyse de toxines de cobra obtenant des LOD comprises entre 3,2 et 9,6 attomoles.

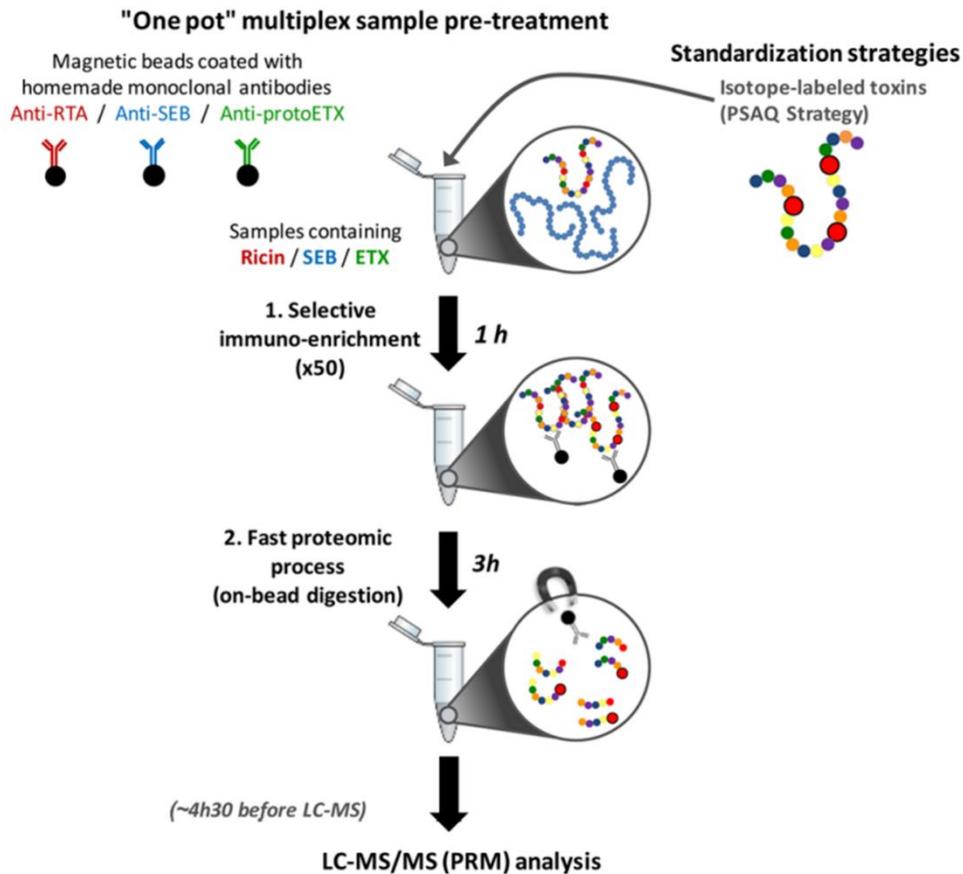


Figure 37 Protocole de préparation des échantillons basé sur l'immuno-enrichissement multiplexé proposé par Dupré et al, 2015

## I.C.4 Les approches de quantification par spectrométrie de masse

Il existe deux types de quantification par spectrométrie de masse. La quantification relative qui ne permet pas de donner une valeur de concentration chiffrée mais permet une comparaison entre différents échantillons. Elle est le plus souvent utilisée lors de l'analyse d'un grand nombre de protéines comme l'analyse d'un protéome. La quantification absolue permet de chiffrer une valeur de concentration. Pour cela il est indispensable de disposer d'une référence, c'est-à-dire un étalon de concentration connue et de pureté élevée. Ce type de quantification est régulièrement utilisée dans les analyses ciblées, concernant un nombre limité de protéines dont la concentration est ainsi mesurée précisément<sup>251</sup>.

### I.C.4.1 Quantification relative par spectrométrie de masse

La quantification relative des protéines est le plus souvent réalisée à l'aide d'un marquage isotopique des protéines. Nous citons juste une approche historique sans marquage.

#### I.C.4.1.1 Quantification relative par comptage spectral (sans marquage).

Dans l'approche de comptage spectral, la quantification relative des protéines est réalisée en comparant le nombre de spectres MS/MS réalisés de la même protéine dans chacune des conditions étudiées. Une augmentation de l'abondance d'une protéine entraîne généralement une augmentation du nombre de ses peptides protéolytiques, et inversement. Cette augmentation entraîne alors généralement une augmentation de la couverture de la séquence protéique, du nombre de peptides uniques identifiés et du nombre de spectres MS/MS totaux observés (nombre de spectres) pour chaque protéine<sup>252</sup>. Par conséquent, le comptage spectral peut être utilisé comme un indice simple mais fiable pour la quantification relative des protéines. Cozzolino et al,<sup>253</sup> en 2020 ont proposé d'améliorer cette méthode de quantification par une normalisation du signal basée sur la complexité de la matrice (CBN) afin d'introduire un facteur d'ajustement des variables.

#### I.C.4.1.2 Quantification relative par marquage isotopique de l'échantillon

Un certain nombre d'approches de marquage par isotopes stables ont été développées pour l'analyse protéomique quantitative relative. Il s'agit notamment de l'Isotope-Coded Affinity Tag (ICAT), du Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC), du marquage métabolique, du marquage enzymatique ( $H_2^{18}O$ ), des Tandem Mass Tags (TMT), des Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ) et d'autres marquages chimiques<sup>254,255</sup>. Ces méthodes de marquage par isotopes stables ont apporté une flexibilité et une précision précieuse en protéomique quantitative pour identifier des protéines impactées (en termes d'abondance) dans des échantillons complexes. Cependant, la plupart des approches de quantification basées sur le marquage présentent des limites potentielles. Celles-ci comprennent le temps et la complexité de la préparation de l'échantillon, le coût élevé des réactifs, le marquage incomplet et la nécessité d'un logiciel de quantification relative spécifique.

Les 3 méthodes SILAC, ICAT,  $H_2^{18}O$ , représentées Figure 38, permettent d'alourdir un échantillon protéique dans le but d'une analyse de quantification relative du protéome. La méthode SILAC consiste à faire croître un organisme (cellulaire, bactérien, ...) en présence d'une alimentation alourdie ( $^{13}C$  et  $^{15}N$ ). La méthode ICAT consiste à alourdir toutes les protéines de l'échantillon avec un tag chimique. Enfin la méthode  $H_2^{18}O$  utilise une digestion par hydrolyse dans de l'eau alourdie ( $H_2^{18}O$ ) afin d'alourdir les peptides produits par un  $^{18}O$  en Cter. Une fois que l'échantillon de standard est alourdi, il est mélangé à d'autres échantillons pour les comparer entre eux, en termes d'abondance.

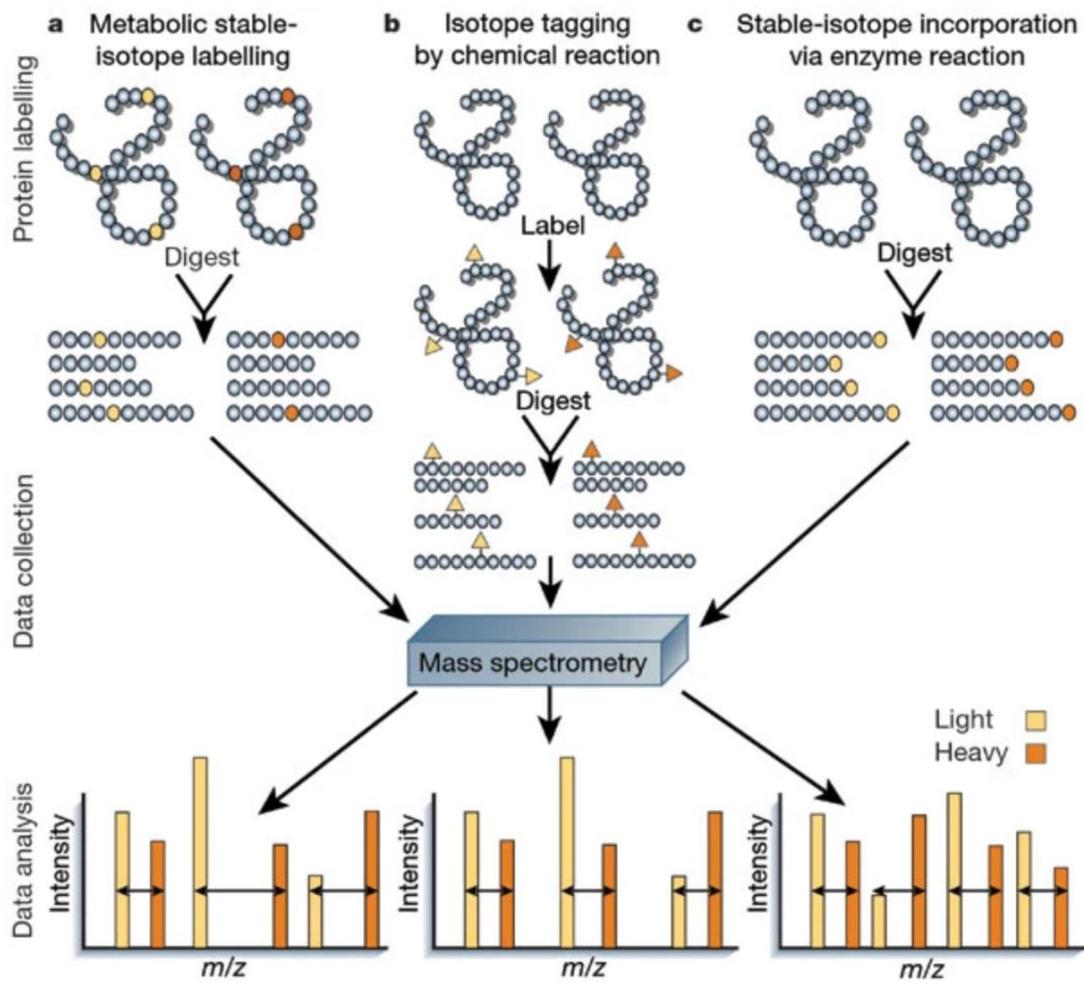


Figure 38 Les 3 méthodes de quantification relative avec marquage isotopique : SILAC, ICAT,  $H_2^{18}O$  proposé par Aebersold et al, 2003<sup>207</sup>

Les deux méthodes iTRAQ de chez Sciex et TMT de chez Thermo, représentées Figure 39, sont également des méthodes de quantification relative avec marquage isotopique. Chaque échantillon est marqué par un tag isobarique attitré qui se fixe sur l'ensemble des protéines ou peptides puis les échantillons sont mélangés et analysés en mode MS/MS. Les ions précurseurs issus des différentes conditions ont la même masse et sont isolés en même temps dans le premier quadripôle. Lors de la fragmentation, une partie du tag va former un fragment de masse spécifique de chaque condition et ainsi permettre de comparer l'abondance de chaque peptide entre les différentes conditions. Avec cette méthode il y a cependant un nombre limité d'échantillons à comparer en même temps en fonction du nombre de tag isobares disponibles. La méthode iTRAQ est limitée à 8-plex<sup>256</sup>. Le nouveau TMTpro 16-plex propose la possibilité de faire des comparaisons jusque 16 conditions en même temps<sup>257</sup>. Li et al,<sup>258</sup> ont proposé en 2021 une amélioration du TMTpro en utilisant des prolines alourdis avec des  $^{15}N$ , cela a permis d'obtenir un 18-plex.

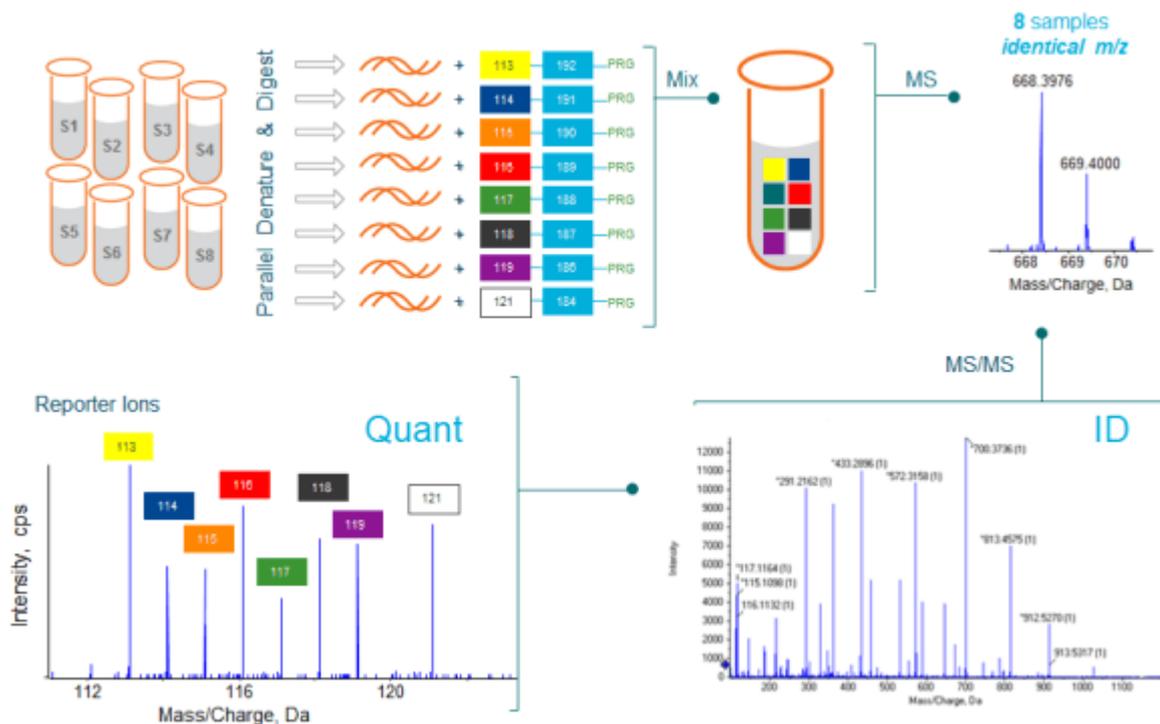


Figure 39 Méthode de quantification relative avec marquage : iTRAQ proposé par Sciex

#### I.C.4.2 Quantification absolue des protéines

Pour la quantification absolue, l'utilisation d'étalons internes et d'étalons de quantification (standard en anglais) est indispensable. Ces étalons doivent avoir une concentration connue et une pureté élevée, cela permettant de rendre la méthode juste et fidèle comme illustré Figure 40, alors que les méthodes de quantification relative doivent avoir uniquement une bonne fidélité. La justesse est la concordance ou l'accord entre la valeur

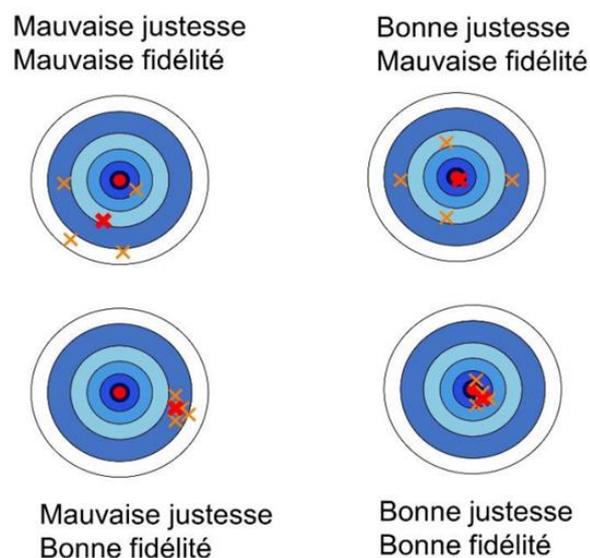


Figure 40 Représentation de la justesse et de la fidélité en schéma

mesurée et la vraie valeur. La fidélité correspond au regroupement autour d'une même valeur des valeurs mesurées.

Les méthodes de quantification absolue nécessitent l'ajout d'un étalon interne en quantité connue, le plus souvent marqué aux isotopes stables. La quantification est alors réalisée soit par comparaison directe du signal du peptide endogène à celui de l'étalon interne (par exemple, méthode de quantification par dilution isotopique), soit via une gamme d'étalonnage externe préparée en parallèle de l'échantillon à doser, à l'aide d'un étalon non marqué aux isotopes stables. Nous décrivons également le cas de la quantification par ajout dosé. Dans tous les cas, l'étalon utilisé pour la quantification absolue doit être parfaitement caractérisé (pureté, concentration etc).

### I.C.4.3 Quantification par un étalon non marqué aux isotopes stables

Les étalons non marqués aux isotopes stables permettent de mettre en place une méthode quantitative et ils sont moins coûteux que leurs homologues marqués. La production de protéines recombinantes par *E. coli* est la plus couramment utilisée. Cela consiste à incorporer le gène codant pour la protéine d'intérêt dans un plasmide (ADN circulaire) qui lui-même est inséré dans la bactérie productrice. Cette dernière produira la protéine d'intérêt qui sera par la suite purifiée. Après purification, une analyse en AAA (amino acid analysis)<sup>259</sup> permet de quantifier la protéine avec une grande précision afin de l'utiliser comme étalon de référence.

#### I.C.4.3.1 Gamme d'étalonnage externe

Les étalons de référence sont le plus souvent utilisés pour réaliser une quantification par étalonnage externe, illustrée Figure 41. Une gamme est préparée dans la même matrice (ne contenant pas l'analyte) que celle de l'échantillon pour prendre en compte les effets de matrices. Dans la gamme comme dans l'échantillon un étalon interne est ajouté afin de normaliser le signal (et non pour réaliser directement la quantification). L'avantage de cette méthode est de prendre en compte, au même titre que la méthode PSAQ (décrite dans le paragraphe « étalon interne »), les rendements de préparation d'échantillons et de digestion. Cependant, l'utilisation d'une calibration externe ne mime pas forcément à l'identique les effets de matrice au sein de l'échantillon. D'autre part, la matrice exacte n'est pas toujours connue (par exemple pour les matrices alimentaires lors d'une TIAC) et cela peut donc induire des biais de quantification, liés aux rendements de précipitation et d'immuno-enrichissements<sup>260,261</sup>.

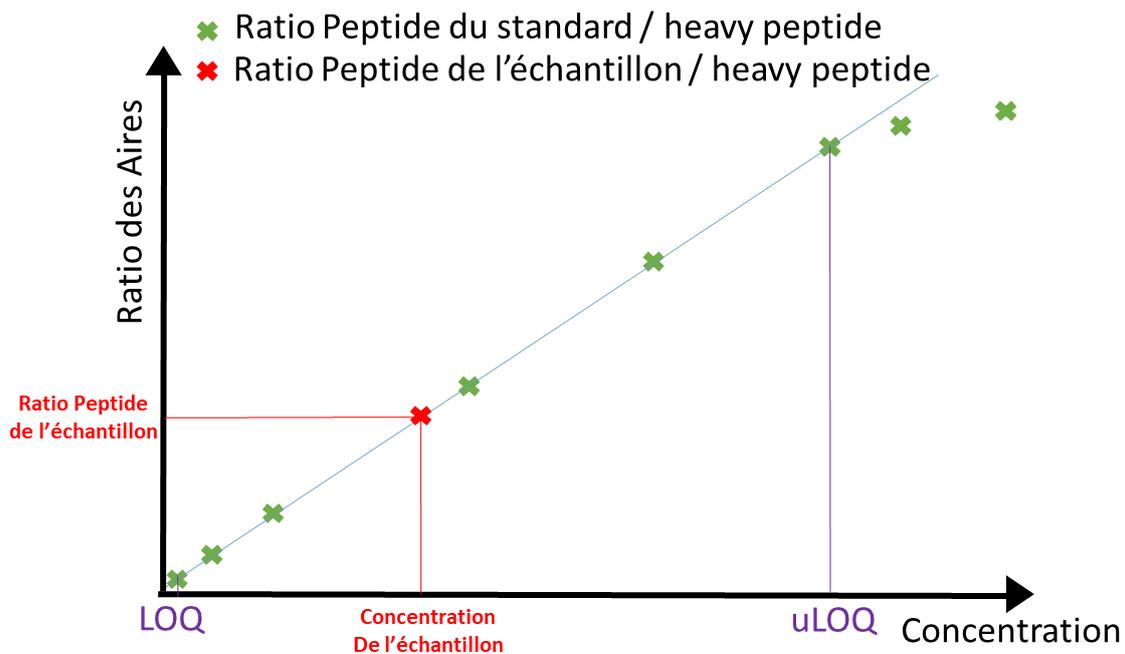


Figure 41 Méthode de quantification par étalonnage externe

#### I.C.4.3.2 Gamme d'étalonnage par ajout dosé

Il est aussi possible réaliser une quantification absolue avec un étalon de référence non marqué via la méthode des ajouts dosés, illustrée Figure 42. Cela consiste à analyser l'échantillon surchargé avec des quantités définies et différentes de l'étalon. Un ratio permet par la suite de déterminer la concentration de l'analyte. Cette méthode prend en compte plus efficacement que la précédente les effets de matrices.

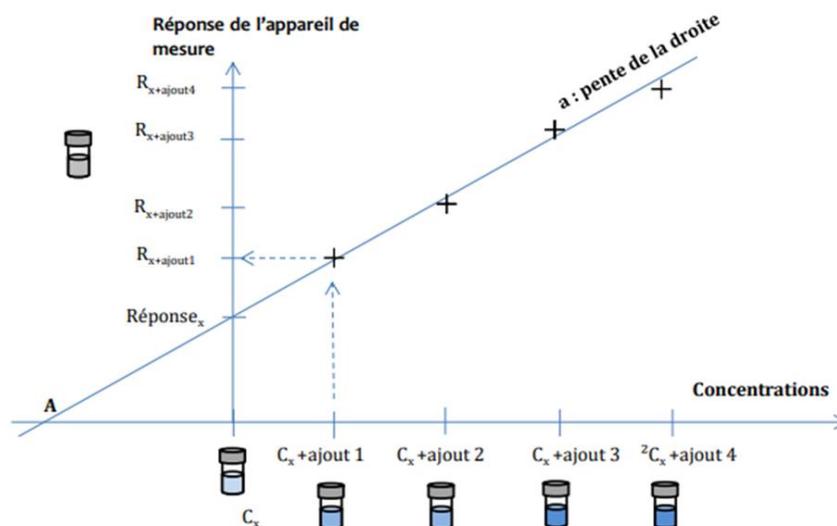


Figure 42 Méthode des ajouts dosés proposé par INRS MétroPol

#### I.C.4.4 Quantification par un étalon marqué aux isotopes stables

Un étalonnage interne consiste à introduire dans l'échantillon à analyser un étalon en quantité connue. Dans cette section, nous présentons des exemples où le signal de l'étalon est utilisé pour réaliser directement la quantification absolue, sans étalonnage externe. L'étalon doit avoir des caractéristiques physico-chimiques similaires à l'analyte d'intérêt. Il est possible de l'introduire à différents stades de l'analyse. (1) L'étalon PSAQ ("Protein Standard Absolute Quantification")<sup>262</sup> ou Absolute SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture)<sup>263</sup> est une version marquée aux isotopes stables de la protéine cible, qui est directement ajoutée à l'échantillon ; (2) L'étalon QconCAT ("Quantification concatamer")<sup>264</sup> est une protéine chimérique contenant un ou plusieurs peptides protéotypiques marqués aux isotopes stables de ou des protéines cibles. Le QconCAT est ajouté avant l'étape de digestion afin que le ou les peptides étalons soient libérés ; (3) Les peptides AQUA ("Quantification absolue")<sup>265</sup> sont des copies synthétiques marquées aux isotopes stables des peptides protéotypiques cibles. Ils sont généralement ajoutés à l'échantillon juste avant l'analyse LC-MS. Ces trois stratégies sont illustrées dans la Figure 43 proposée par Brun et al 2009<sup>262</sup>, et présentées en détail à la suite.

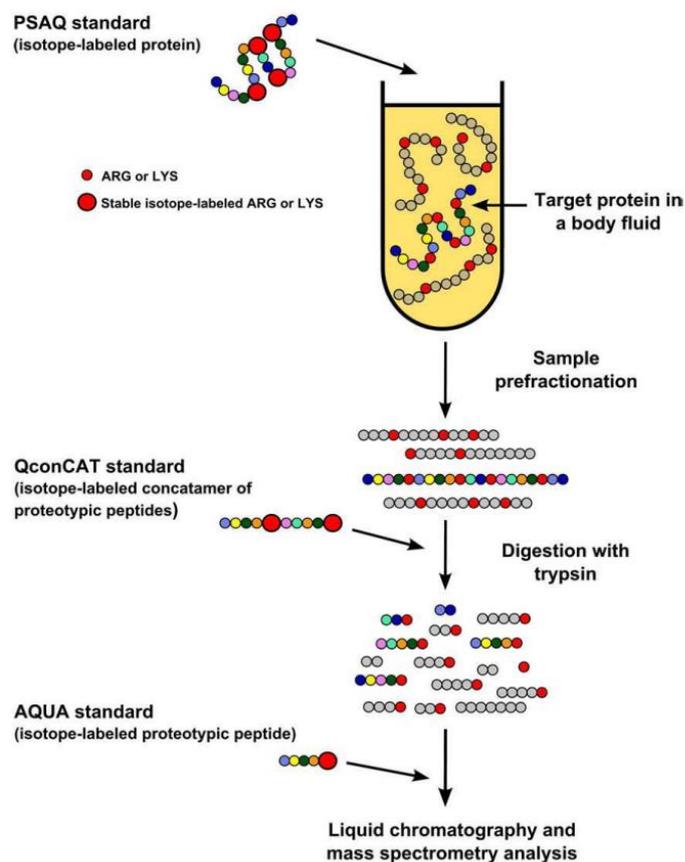


Figure 43 Trois stratégies de quantification absolue PQSA, QconCAT, AQUA peptide proposé par Brun et al, 2009

#### I.C.4.4.1 Peptides alourdis « AQUA »

La méthode AQUA ou peptides marqués (SIL) a été proposée pour la première fois par Barr et al,<sup>266</sup> en 1996 suivie en 2003 par Gerber et al<sup>265</sup>. Cette méthode a pour principe d'incorporer à l'échantillon des peptides protéotypiques (spécifiques de la protéine étudiée) marqués aux isotopes stables <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N au niveau soit de la lysine soit de l'arginine en C-terminale. Ainsi chaque peptide marqué a une différence de masse avec le peptide homologue non marqué respectivement de 8 Da et de 10 Da pour la lysine et l'arginine. Les peptides AQUA ont pour avantage d'avoir les mêmes temps de rétention que leurs homologues non marqués et les mêmes propriétés d'ionisation, ce qui permet de limiter l'impact des effets de matrice sur la quantification sans pour autant les supprimer. Egalement, le coût et la rapidité de synthèse en font la méthode la plus couramment utilisée en quantification absolue. L'inconvénient des peptides AQUA réside dans le fait qu'ils sont introduits à la fin de la préparation d'échantillons, aussi ils ne prennent pas en compte les rendements de purification et de digestion. Une autre approche consiste à utiliser des peptides SIL ailés (WiSIL) (également appelés peptides SIL étendus, flanqués ou clivables)<sup>267</sup> consistant en une séquence peptidique tryptique prolongée aux deux extrémités par plusieurs acides aminés par rapport à la séquence du peptide protéotypique. Introduire dans la séquence le site de clivage par la trypsine permettrait de mieux refléter les conditions de digestion de l'échantillon, augmentant dans certains cas et selon le type d'extension l'exactitude et la précision.<sup>268</sup>

En protéomique bottom-up, la réussite de la quantification repose sur le choix des peptides. En effet les peptides sélectionnés devront être quantotypiques<sup>269</sup> cela indique qu'ils doivent répondre à plusieurs critères pour leur utilisation en quantification :

- peptides protéotypiques (spécifique à la protéine).<sup>269</sup>
- peptides contenant entre 6-25 acides aminés.<sup>269</sup>
- peptides ne contenant pas de méthionine, cystéine, tryptophane pour éviter des oxydations partielles.<sup>269</sup>
- peptides ne contenant pas de glutamine en N-terminale pour éviter la formation d'un pyro-glu.
- peptides bien ionisés par la technique electrospray, ni trop hydrophobes ou hydrophiles.
- peptides ne contenant pas de modifications post-traductionnelles (PTM) de manière à refléter la quantité totale de la protéine<sup>199,270,271</sup>.

Cependant, il est parfois impossible d'obtenir des peptides répondant à l'ensemble des critères décrits ci-dessus. Dans ce cas, il faudra passer par une étape d'optimisation analytique, par exemple un traitement chimique d'oxydation des méthionines<sup>272</sup>.

#### I.C.4.4.2 Quantification concatamer « QconCAT »

Beynon et al,<sup>264</sup> ont proposé la méthode QconCAT (ou QCAT), illustrée Figure 44, en 2005. Cette méthode consiste à former une protéine recombinante chimérique à partir de plusieurs peptides d'intérêt issus de différentes protéines. De même que pour la méthode AQUA, les peptides possèdent des acides aminés lysine et arginine alourdis par des isotopes stables. Cet hybride de protéine est alors ajouté en amont de la digestion pour au final libérer les peptides alourdis. Cette méthode a pour avantage, par rapport aux peptides AQUA, de prendre en compte le rendement de digestion. Cependant, cette protéine étant complètement différente des protéines d'intérêt, il peut y avoir des différences d'efficacité de la digestion.

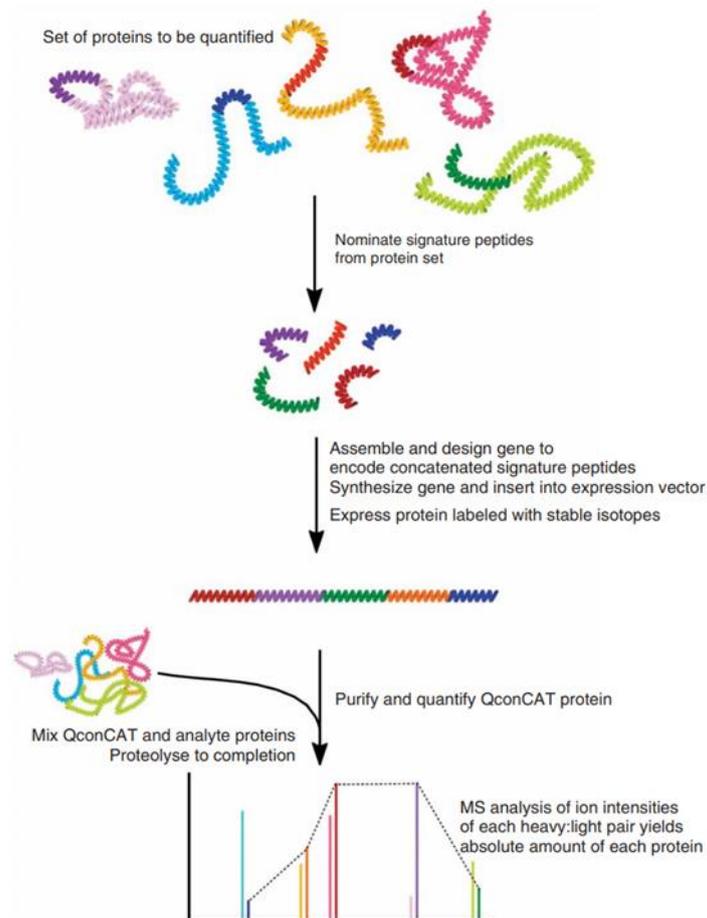


Figure 44 Principe général de la quantification par méthode QconCAT, proposé par Pratt et al 2006

#### I.C.4.4.3 Protein Standard Absolute Quantification « PSAQ »

La méthode PSAQ a été proposée pour la première fois en 2007 par Brun et al<sup>273</sup>. et en 2008 par Hanke et al,<sup>274</sup> sous le nom de Absolute SILAC. Il s'agit d'une protéine recombinante marquée sur l'ensemble des acides aminés lysine et arginine, et qui est identique en termes de séquence à la protéine d'intérêt. Cette méthode permet donc d'incorporer l'étalon directement dans les échantillons avant toutes les étapes de

préparation, prenant en compte l'ensemble des rendements : purification, pré-concentration et digestion. Il s'agit donc du meilleur étalon possible pour la quantification protéique. Cependant son coût et son temps de production sont très élevés, cette méthode est donc peu utilisée en comparaison des autres méthodes.

A noter que cette méthode PSAQ est l'une des rares applicable à la quantification absolue en protéomique top-down. Lanshoeft et al, 2017<sup>275</sup> ont ainsi utilisé une protéine marquée <sup>13</sup>C pour la quantification d'une immunoglobuline en top-down. La quantification absolue en top-down est particulièrement difficile étant donné la complexité d'obtenir des étalons internes de quantification.

L'utilisation d'épitopes de protéines (PrESTs) a été introduite pour la quantification absolue des protéines dans des échantillons complexes. Les PrEST ont été conçus à l'origine pour le projet Human Protein Atlas et sont des fragments de protéines humaines d'une longueur de 50 à 150 acides aminés<sup>263</sup>. Ils sont maintenant disponibles dans une version SIL combinée à une étiquette de quantification (QTag), appelée quantitative PrESTs (QPrESTs), pour plus de 13 000 protéines humaines (Atlas Antibodies AB, Suède). La couverture de séquence protéique offerte par les QPrESTs pourrait mieux imiter les effets de la préparation de l'échantillon sur la protéine native par rapport à l'approche peptide SIL<sup>268</sup>.

#### I.C.4.5 Quantification absolue sans étalon dédié.

La production d'étalon et le marquage isotopique ont un coût souvent très élevé ainsi d'autres alternatives pour la quantification absolue ont été proposées dans la littérature. Ainsi Calderón-Celis et al,<sup>276</sup> ont proposé en 2019 une méthode quantitative par couplage avec l'ICP-MS (Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif). L'objectif étant d'analyser en parallèle l'échantillon protéique avec l'ICP-MS et la LC-MS. L'ICP-MS permet de déterminer la quantité de protéines directement via la mesure de l'abondance des atomes de soufre et de phosphate. Le rôle de la LC-MS est quant à elle de caractériser la complexité protéique de l'échantillon. L'ICP-MS ne nécessite pas un étalon protéique ou peptidique dédié pour atteindre la quantification absolue, c'est donc une quantification universelle. Cependant cette méthode n'est pas encore applicable à des matrices trop complexes. En effet l'ICP-MS ne permet pas de discriminer la séquence des diverses protéines ou peptides en cas de co-élutions.

##### I.C.4.5.1 Quantification par l'intensité du pic chromatographique

L'intensité du signal provenant de l'ionisation électrospray (ESI) est en corrélation avec la concentration d'un peptide, cependant le rendement d'ionisation du peptide, la diversité des matrices, leur composition et les effets de matrice peuvent modifier cette corrélation<sup>277</sup>. La quantification des peptides/protéines, par la seule intensité des pics LC-MS a été exploitée par Chelius et al,<sup>278</sup> en 2002 en chargeant 10 fmol à 100 pmol de digestats de myoglobine dans la nano-LC et en analysant par LC-MS/MS. Après avoir

combiné les aires de pics de tous les peptides de myoglobine identifiés et les avoir tracés en fonction de la quantité de protéines, il a pu être observé que l'aire du pic était en corrélation linéaire avec la concentration de protéines. La forte corrélation entre les aires des pics chromatographiques et la concentration en peptides/protéines a été apparemment maintenue lorsque la myoglobine a été ajoutée à un mélange complexe (sérum humain)<sup>278,279</sup>.

#### I.C.4.5.2 Méthode Hi3

Silva et al,<sup>280</sup> ont développé en 2006 une méthode "Hi3" pour quantifier les protéines dans un mélange en utilisant une technique éprouvée de quantification sans marquage « label free ». Il a été décrit que la concentration d'une protéine dans un mélange complexe peut être estimée en utilisant le signal des trois « best peptides » les plus intenses. L'hypothèse proposée repose sur une réponse LC-MS similaire, réponse basée sur la moyenne des signaux des trois « best » peptides, entre les protéines à quantifier et une autre protéine de référence. La formule Figure 45 permet ainsi de quantifier la ou les protéines. Cette approche a été utilisée par Kriegeskorte et al,<sup>281</sup> 2011 pour l'analyse du cytoplasme de différents mutants de *Staphylococcus aureus* et cette étude a permis une quantification absolue de 154 protéines du protéome cytosolique. De même, une étude sur le protéome cytosolique de *Bacillus subtilis* a été réalisée avec la même méthode de quantification sans marquage<sup>282</sup>. Cette méthode est habituellement utilisée dans un mode non ciblé (DDA), et a été validée pour différentes protéines avec un biais généralement inférieur à 20%.

$$\left[ \begin{array}{c} \text{Concentration} \\ \text{de l'analyte} \end{array} \right] = \frac{\text{Moyenne de l'intensité des 3 meilleurs peptides de l'analyte}}{\text{Moyenne de l'intensité des 3 meilleurs peptides du standard}} \times \left[ \begin{array}{c} \text{Concentration} \\ \text{du standard} \end{array} \right]$$

Figure 45 Formule de quantification de l'analyte par la méthode Hi3

#### I.C.4.5.3 L'indice d'abondance des protéines (PAI)

Une autre approche de quantification utilise l'indice d'abondance des protéines (PAI). PAI est défini comme le nombre de peptides identifiés divisé par le nombre de peptides tryptiques théoriquement observables pour chaque protéine<sup>283</sup>. Cet indice a ensuite été converti en PAI exponentiellement modifié (emPAI, la forme exponentielle du PAI moins un)<sup>284</sup>. L'emPAI a démontré son succès en déterminant l'abondance absolue de 46 protéines dans un lysat de cellules entières de souris, qui avait été mesurées en parallèle à l'aide de peptides synthétiques. Les valeurs de l'emPAI peuvent être calculées facilement à l'aide d'un script simple et ne nécessitent pas d'expérimentations supplémentaires. Elles peuvent être utilisées en routine pour rapporter l'abondance approximative des protéines dans une analyse à grande échelle.

#### I.C.4.6 Validation des méthodes de quantification absolue

Afin de considérer un protocole d'analyse des protéines par spectrométrie de masse comme quantitatif, il est obligatoire de caractériser et de valider le protocole. Grant et al,<sup>285</sup> ont proposé en 2014 une méthode comprenant une liste d'expériences pour valider un protocole quantitatif. Plusieurs paramètres sont à respecter : la répétabilité permet d'estimer la fidélité par des mesures répétées effectuées dans les mêmes conditions, la reproductibilité consiste à faire des mesures avec la même méthode mais dans des conditions de temps et de matériels différentes. Pour la répétabilité et la reproductibilité, les recommandations indiquent un CV<20% pour une méthode quantitative<sup>225</sup>. La linéarité, établie par une gamme d'étalonnage doit être démontrée, ainsi que la limite de quantification (LOQ)<sup>286</sup>. La stabilité de l'échantillon doit être montrée aussi bien lors des cycles de congélation/décongélation, lors de la préparation de l'échantillon, après l'extraction et la digestion.

#### I.C.5 Détection des entérotoxines par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est de plus en plus employée pour la détection, la quantification et la caractérisation des ESs. D'une part, cette technique apporte une grande spécificité d'analyse permettant de distinguer des séquences homologues au sein de milieux complexes. De plus, elle possède une capacité élevée de multiplexage. Également, elle ne nécessite pas la production d'anticorps spécifiques de chaque toxine (sauf formats particuliers, type immunocapture). Ainsi, la MS apparaît comme une alternative pertinente pour la quantification des entérotoxines connues ou récemment décrites pour lesquelles il n'existe pas d'anticorps spécifiques. Cependant, si la spécificité des méthodes basées sur la MS pour l'analyse de protéines en mode ciblé est reconnue, les travaux publiés montrent que ces méthodes restent moins sensibles que les méthodes ELISA, (capable d'atteindre des concentrations de l'ordre du pg/mL). Cette différence est liée en partie à la meilleure tolérance des méthodes immuno-chimiques à la complexité de l'échantillon par rapport à la spectrométrie de masse (en lien avec les phénomènes de suppression de l'ionisation et d'effets de matrice), et également à l'amplification du signal réalisée après fixation de l'anticorps traceur sur la cible (ELISA). Les principales méthodes de spectrométrie de masse publiées à ce jour pour l'analyse des ESs sont listées ci-dessous, selon le type d'échantillon contenant la toxine.

##### I.C.5.1 Les premières analyses en LC-MS des entérotoxines

En 1997 Kientz et al,<sup>287</sup> ont identifié pour la première fois une entérotoxine (SEB) dans du tampon en protéomique bottom-up et en protéomique intacte via l'utilisation d'un appareil de type triple quadripolaire, cela a permis d'obtenir une sensibilité de 3 pmol/mL soit environ 100 ng/mL. Cette première étude a permis d'identifier des peptides tryptiques encore utilisés de nos jours.

### I.C.5.2 Analyse des ESs par LC-MS après culture de *S. aureus*

Kawano et al,<sup>288</sup> ont cultivé en 2000 une souche de *S. aureus* dans le milieu de culture LB (Lysogeny Broth), suivi d'une précipitation et d'une analyse par gel à 2D (2 Dimensions) avec une première dimension permettant de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique, l'autre dimension étant un gel SDS-PAGE comme décrit précédemment. Cette préparation d'échantillons est longue mais a permis d'identifier et de quantifier la présence de l'entérotoxine SEC à 5.33 µg/mL.

D'autres études, listées Tableau 7, portant sur la production du *S. aureus* en milieu de culture ont permis d'étudier les exo-protéomes par spectrométrie de masse, les chercheurs ont par la même occasion identifiés pour la première fois des nouvelles toxines via des modes non ciblés de type DDA. Ainsi les entérotoxines SEA, SEB, SEC, SED, SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEP, SEQ et SEIU ont été identifiées sans être quantifiées. Les milieux de culture utilisés sont le BHI (Brain Heart Infusion), le LB (lysogeny broth) et le TSB (Tryptic Soy Broth). La préparation d'échantillons suit relativement le même schéma. L'ensemble des études incluses une première centrifugation à 3000-5000 g pour éliminer les bactéries. Le surnageant est parfois filtré. Ensuite, une précipitation suivie d'une analyse en gel 2D permet l'analyse du protéome. L'agent précipitant varie d'une étude à l'autre entre l'urée, le TCA (acide trichloracétique), le TFA (Acide trifluoroacétique), et l'éthanol.

Tableau 7 Entérotoxines étudiées par MS issues d'une production par le *S. aureus* dans un milieu de culture.

Entérotoxines	Date	Auteur	Milieu de culture	Appareil MS
SEC	2000	Kawano et al, <sup>288</sup>	LB	Triple quad
SEA SEB	2002	Bernardo et al, <sup>289</sup>	BHI	MALDI-TOF
SEA SEB SEC SEH	2002	Nakano et al, <sup>290</sup>	LB	???
SEC SEH SEK SEL SEQ	2007	Burlak et al, <sup>291</sup>	TSB	Q-TOF
SEB SEC SEK SEQ SEL SEP	2008	Pocsfalvi et al, <sup>292</sup>	LB	Q-TOF
SEB SEK SEI	2010	Ravipaty et al, <sup>293</sup>	BHI	LTQ
SEC SEL	2011	Wolf et al, <sup>294</sup>	TSB	MALDI-TOF
SEB SEU	2012	Enany et al, <sup>231</sup>	TSB	Iontrap-TOF
SEB	2013	Enany et al, <sup>295</sup>	TSB	linear iontrap
SEA SEC SED SEG SEI SEM SEN SEP	2018	Busche et al, <sup>224</sup>	TSB	Orbitrap Fusion
SEA SEB SEC1	2019	Tonacini et al, <sup>230</sup>	TSB	MALDI-TOF

### I.C.5.3 Analyse des ESs par LC-MS dans les matrices biologiques

Les entérotoxines sont également recherchées dans des matrices biologiques comme facteur de virulence et ainsi pour être utilisées comme biomarqueur de la présence d'une souche de *S. aureus* virulente (Tableau 8). Ainsi, lors d'une intoxication alimentaire, l'analyse des sucs gastriques issus de vomit de patients peut permettre la caractérisation d'une TIAC. La spectrométrie de masse en mode ciblé a été utilisée, comme reporté Tableau 8, après immunocapture, permettant d'identifier les entérotoxines SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH dans des matrices telles que l'urine, le sérum ou le suc gastrique. Des étalons internes de type PSAQ, QconCAT et AQUA ont été utilisés pour normaliser le signal et réaliser la quantification. Cependant, aucune étude n'a été publiée sur de réels échantillons issus de patients, et l'ensemble des tests ont été réalisé en surchargeant les toxines dans les matrices biologiques.

Tableau 8 Entérotoxines étudiées par MS dans des matrices biologiques.

ESs	Auteur	Matrice	Appareil MS	Standard	LOD/LOQ ng/ml
SEA SEB	Brun et al, <sup>273</sup> 2007	Urine	nano-LC-QTOF	PSAQ, QconCAT, AQUA	
SEA	Adrait et al, <sup>241</sup> 2012	Serum	QTrap 5500	PSAQ	LOQ: 1.057 LOD: 0.352
SEA SEB SEC SED SEE SEG SEH	Picard et al, <sup>244</sup> 2012	Suc gastrique	QTrap 5500	PSAQ	
SEB	Dupré et al, <sup>165</sup> 2015	Serum	Q Exactive	PSAQ, AQUA	LOQ: 1 LOD: 0,5

### I.C.5.4 Analyse des ESs par LC-MS dans les matrices alimentaires

La spectrométrie de masse a pour la première fois été utilisée sur des matrices alimentaires en 2000 par Nedelkov et al,<sup>296</sup> Leur étude a utilisé une préparation d'échantillons par la méthode BIA (Biomolecular interaction analysis). Cette méthode permet de fixer la toxine sur une plaque via un anticorps et utilise le principe SPR décrit précédemment pour l'analyse. A suite, les auteurs ont analysé directement par MALDI-TOF la toxine SEB intacte fixée sur une plaque et issue d'extraits alimentaires (lait et champignons). Ils ont obtenu une sensibilité de 1 ng/mL de SEB dans les deux matrices. Ce résultat doit être pris avec précaution car une telle sensibilité n'a été ré-obtenue que 15 ans plus tard en 2015 par Dupré et al,<sup>165</sup> dans le lait, en utilisant l'immunocapture, méthode la plus sensible pour l'analyse des ESs par spectrométrie de masse. De plus Nedelkov et al en 2000<sup>296</sup> ont réalisé une analyse intacte qui est nettement moins sensible que la protéomique bottom-up.

Dupuis et al 2008 et Hennekinne et al 2009<sup>242,243</sup> ont pour la première fois analysé une matrice alimentaire provenant d'une TIAC à SCP, issue de perles de coco. L'immunocapture suivie d'une concentration par gel SDS-PAGE a permis d'identifier la SEA. La quantification PSAQ a permis de mesurer la concentration de SEA dans l'aliment incriminé à  $1.5 \pm 0.1$  ng/g. Cette étude est la seule, à ma connaissance, à analyser des matrices alimentaires provenant de TIAC à SCP par LC-MS.

Dupré et al,<sup>165</sup> ont optimisé en 2015 une méthode de préparation d'échantillons par immunocapture afin d'atteindre pour la première fois une sensibilité inférieure au ng/mL (LOD : 0.25 ng/mL) pour la SEB. L'immunocapture semble être la meilleure alternative pour la préparation d'échantillons provenant de matrices alimentaires, cependant des anticorps ne sont pas disponibles pour l'ensemble des ESs. C'est pourquoi d'autres approches sont proposées dans la littérature comme l'utilisation d'une étape de filtration des ESs exploitée par Gilquin et al,<sup>297</sup> en 2017 avec un seuil à 3 kDa, d'une étape de précipitation par l'acide comme utilisé par Koike et al,<sup>229</sup> en 2019 avec du TCA ou d'une étape d'extraction par SPE sur phase C18 avec Muratovic et al<sup>298</sup>, en 2015 et Andjelkovic et al<sup>236</sup>, en 2016. Ces approches sans anticorps donnent des sensibilités comprises entre 2.5 et 141 ng/mL. L'ensemble des études publiées sur l'analyse des ESs par spectrométrie de masse dans des matrices alimentaires est rapporté dans le Tableau 9.

La littérature sur l'analyse des ESs par LC-MS montre que les approches de préparation d'échantillons basées sur l'immunocapture présentent la sensibilité la plus importante. Cependant, les méthodes de quantification en matrices alimentaires basées sur cette préparation d'échantillons sont orientées uniquement sur l'analyse des ESs SEA et SEB. Cela doit être relié à l'absence d'anticorps et d'étalon pour l'ensemble des autres ESs décrites.

Tableau 9 Entérotoxines étudiées par MS dans des matrices alimentaires

Entérotoxines	Date	Auteur	Matrices	préparation d'échantillon	Approche protéomique	Appareil MS	Etalon	LOD/LOQ
SEB	2000	Nedelkov et al. <sup>296</sup>	Lait, champignon	BIA	intact	MALDI-TOF		1 ng/mL
SEB	2003	Nedelkov et al. <sup>299</sup>	Champignon	BIA	intact	MALDI-TOF		1 ng/mL
SEB	2006	Callahan et al. <sup>300</sup>	Jus de pomme	filtration	bottom-up	QTOF et QqQ	AQUA	5 ng/mL
SEA	2008	Dupuis et al. <sup>242</sup>	Perle de coco	Immuno-capture SDSpage	bottom-up	Q-TOF	PSAQ	1,5 ng/mL
SEA	2009	Hennekinne et al. <sup>243</sup>	Perle de coco	Immuno-capture SDS- PAGE	bottom-up	Q-TOF	PSAQ	1,5 ng/mL
SEB	2010	Kull et al. <sup>301</sup>	Lait, jus de pomme et orange	Immuno-capture SDS- PAGE	bottom-up	MALDI-TOF		70 ng/mL
SEA	2011	Sospedra et al. <sup>302</sup>	Lait	précipitation SDS- PAGE	bottom-up	MALDI-TOF	AQUA	150-750 ng/mL
SEB	2012	Bao et al. <sup>303</sup>	viande de poulet	précipitation, filtration	bottom-up	Q ion trap	peptide 2H6-Ac2O	LOQ: 5,5 ng/g
SEA SEB	2012	Sospedra et al. <sup>304</sup>	Lait, jus de pomme et orange	précipitation filtration	top-down	QqQ		50 ng/g
SEB	2015	Dupré et al. <sup>165</sup>	Lait	immuno-capture	bottom-up	Q Exactive	PSAQ, AQUA	LOQ 0,5ng/mL LOD 0,25ng/mL
SEA SEB	2015	Muratovic et al. <sup>298</sup>	Lait, crevette	précipitation filtration	bottom-up	Xevo TQ-S	IS.A B13C6	LOD 2,5 ng/g LOQ 5 ng/g
SEA SEB	2016	Andjelkovic et al. <sup>236</sup>	Lait	SPE	bottom-up	Xevo TQ-S	AQUA	LOD SEA 8ng/mL LOD SEB 4ng/mL
SEA SEB SED	2017	Gilquin et al. <sup>297</sup>	Soupe	précipitation SPE	bottom-up	6500 QTrap	PSAQ	LOD SEA 78ng/mL LOD SEB 141ng/ml LOD SED 48ng/ml
SEA	2019	Koike et al. <sup>229</sup>	Lait	double précipitation	bottom-up	5500 Qtrap	AQUA	LOQ 10ng/g

## I.D Conclusion de l'étude bibliographique et objectifs de la thèse

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à staphylocoques sont causées par l'ingestion d'aliments contaminés par des entérotoxines staphylococciques (ES), produites par certaines souches de staphylocoques à coagulase positive. La réglementation européenne (CE n° 2073/2005 modifié) a défini les critères microbiologiques d'hygiène des procédés et de sécurité. En cas de détection d'ES, le lot d'aliments contaminés est considéré comme impropre à la consommation et doit être détruit, ce qui peut induire des impacts économiques et médiatiques très importants.

A ce jour 35 types d'ESs sont décrits dont 20 possèdent une action émétique démontrée chez l'animal, donc présentent un impact en termes de sécurité sanitaire des aliments. Au même titre que d'autres toxines bactériennes comme la toxine botulique, chaque type d'ES possède de nombreux variants protéiques.

L'étude bibliographique a montré qu'à ce jour, seuls cinq types, SEA à SEE, sont détectables en routine via la norme EN ISO 19020. Cette méthode, basée sur le principe ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) peut détecter qualitativement ces cinq ESs sans les distinguer. Lors de l'investigation de nombreux foyers humains, il arrive régulièrement qu'aucune ES classique de type SEA-SEE ne soit détectée alors qu'une symptomatologie typique d'intoxication à staphylocoques a été identifiée, et que des souches possédant d'autres gènes codant des ES tels que *seg*, *seh*, *sei*, *sem*, *sen*... ont été isolées des produits suspectés être à l'origine de TIACs. Il est donc impératif de disposer d'outils d'analyse et de confirmation capables de viser une plus large gamme de toxines.

Par ailleurs, l'examen des rapports de l'EFSA et de SPF (depuis plus de 10 ans) montre que ce manque d'outils de détection des ESs, dont celles récemment décrites, se traduit chaque année par le faible pourcentage (10%) de TIACs à staphylocoques considérées comme confirmées « strong évidence ». Au niveau des laboratoires nationaux de référence et plus spécifiquement l'ANSES, l'absence de méthode de détection d'un large nombre des ESs est compensée par la mise en place d'une batterie d'outils permettant la détection et la caractérisation génétique des souches de staphylocoques à coagulase positive. En effet, en plus de la symptomatologie observée chez les patients ayant consommé l'aliment, la détection du *S. aureus* isolé de cet aliment ou des patients peut être mise en place moyennant des méthodes de microbiologie telles que la norme EN ISO6888-1 et -2 (dénombrement bactérien). La mise en place des méthodes de biologie moléculaire ou génomiques, permet de vérifier la présence des gènes codant les ESs, donc de confirmer la virulence des souches isolées. L'avantage de ces techniques réside dans leur capacité à couvrir la totalité des gènes *es* connus permettant ainsi d'avoir des informations sur une potentielle présence des ESs autres que les 5 détectables en routine. Ces données sont systématiquement transmises aux autorités compétentes afin de statuer sur l'innocuité de l'aliment, et donc de mettre en place les actions adéquates pour protéger la population. Cependant, cette démarche devient inapplicable dans le cas où les souches de staphylocoques sont éliminées, lors de la cuisson par exemple.

Dans la littérature, la majorité des méthodes utilisées pour l'étude des ESs, sont basées sur le principe ELISA qui utilise des anticorps spécifiques (AC). Les différentes études disponibles dans la littérature ont démontré que les méthodes ELISA sont les plus sensibles pour la détection des ESs notamment dans des matrices complexes comme les aliments. De plus, ces méthodes sont rapides, simples et faciles à mettre en place en laboratoire. Les auteurs ont donc mis en place des ELISA qui ont permis de réaliser des avancées importantes dans l'étude des ESs, de leur toxicité et de leur implication dans des épisodes de TIACs. Cependant, chaque travail publié se limite à l'étude d'un nombre restreint d'ESs sans proposer d'analyses multiplexes. Aussi, la méthode ELISA est susceptible d'être impactée par des réactions croisées des anticorps entre les différents types d'ESs. A l'opposé, les ES possèdent de nombreux variants qui ne sont souvent pas pris en compte lors du développement des méthodes ELISA, alors qu'ils pourraient induire des résultats faux négatifs. Enfin, il est à noter que les réactifs spécifiques à ces méthodes ELISA, y compris les AC n'ont jamais été commercialisés ou rendus disponibles pour la communauté scientifique.

Avec l'augmentation du nombre des ESs décrites chaque année (ainsi 10 nouveaux types d'ESs ont été décrites lors des cinq dernières années) et le manque de réactifs spécifiques disponibles permettant la mise en place de méthodes sensibles type ELISA, la spectrométrie de masse représente une alternative pertinente. Cette technique est utilisée en couplage en ligne avec une chaîne de chromatographie en phase liquide (CL-MS). La LC-MS est de plus en plus employée pour la détection, la quantification et la caractérisation des ESs. Elle apporte une grande spécificité d'analyse pour distinguer des séquences homologues au sein de milieux complexes, et une capacité élevée de multiplexage des analyses. Un des avantages majeurs de la LC-MS concerne la possibilité de la prise en compte des nombreux variants de séquence au sein de chaque type d'ES lors de la mise en place de la méthode. Cet aspect semble être négligé dans les études publiées.

Malgré les nombreux avantages que la MS propose, cet outil n'a été pour le moment appliqué que principalement aux types SEA et SEB dans des matrices alimentaires. Par ailleurs, si la spécificité des méthodes basées sur la MS pour l'analyse de protéines en mode ciblé est reconnue, les travaux publiés montrent que ces méthodes restent moins sensibles que les méthodes ELISA (qui peuvent atteindre des concentrations de l'ordre du pg/ml). Cette différence est liée en partie à l'étape d'extraction des toxines avant analyse, les méthodes immunochimiques étant beaucoup moins exigeantes en termes de pureté de l'extrait que la spectrométrie de masse (en lien avec les phénomènes de suppression de l'ionisation et d'effets matrices). Le principal défi est donc de disposer de protocoles d'extractions et de purifications performants permettant d'améliorer la sensibilité de cette technique de MS. Un autre aspect concerne les nombreux variants de séquence au sein de chaque type de SE, dont l'impact sur les méthodes de détection par anticorps ou spectrométrie de masse semble insuffisamment pris en considération dans la littérature. Au niveau de la spectrométrie de masse ciblée, le choix des peptides protéotypiques et leur spécificité vis-à-vis des variants de séquence apparaît critique pour assurer une détection robuste. Par exemple, il faut prendre en compte le risque de résultats faux négatifs si la séquence du ou des peptides suivis est modifiée. L'analyse en protéomique top-down a

émergé ces dernières années et apporte une vision globale des protéines analysées. Cette vue d'ensemble pourrait aider à détecter et identifier la présence de nouveaux variants. Toutefois, cette approche reste moins sensible que le bottom-up pour des protéines de la masse moléculaire des ESs (dispersion du signal sous de multiples états de charge, chromatographie) et est encore peu appliquée à la quantification absolue.

Afin de confirmer un épisode de TIAC à SCP et de répondre aux problématiques liées à la complexité des matrices alimentaires, aux risques de faux positifs ou négatifs des méthodes actuelles, à la disponibilité des anticorps pour les nouvelles ESs, aux nombreux variants de séquence et enfin à la disponibilité des anticorps, il est nécessaire de développer de nouvelles approches analytiques. Nous avons tenté de répondre à ces questions au cours de cette thèse par l'utilisation de la spectrométrie de masse combinée ou non à l'immunocapture, et par le développement d'approches bottom-up et top-down. Nous distinguerons trois objectifs :

- 1- **Mise en place d'une méthode LC-MS sensible pour la détection et la quantification de 8 ESs** : dans un premier temps, mon travail a porté sur la mise au point d'une méthode d'analyse quantitative des 8 premières ESs (SEA-SEE, SEG-SEI) dans des matrices alimentaires. Dans cette partie, nous avons exploité l'affinité des anticorps disponibles pour extraire, de la manière la plus sélective possible, les ES des matrices alimentaires complexes. Ainsi, ce protocole nous a permis de disposer rapidement d'une première méthode multiplexe pour SEA à SEI et d'atteindre une sensibilité la plus proche possible de celle des méthodes type ELISA. Lors de cette étude les séquences des variants ont été prises en considération aussi bien lors de l'optimisation du protocole de l'immunocapture que lors du choix des peptides prototypiques. Cette méthode LC-MS a été testée sur des matrices alimentaires naturellement contaminés par des ESs. Ce travail est décrit dans le Chapitre 2A de la thèse, et a donné lieu à la publication d'un article dans Journal of Agricultural and Food Chemistry Lefebvre et al 2021<sup>305</sup>.
- 2- **Analyse des variants par une approche top-down**: la seconde partie de ce travail de thèse a été dédiée à l'identification et à la quantification des variants de séquences protéiques, de manière à compléter les données génomiques issues du WGS. Nous avons mis au point une méthode de quantification absolue des 4 variants de SEA par une approche top-down. Nous avons ainsi réussi à quantifier des variants issus de 13 souches de *S. aureus*, et à comparer nos résultats avec la méthode décrite au chapitre 2A, avec l'ELISA et le séquençage génomique WGS. Ce travail est décrit dans le Chapitre 2B de la thèse et a également donné lieu à la rédaction d'un article, soumis à Journal of Proteome Research.

**3- Mise en place d'une méthode LC-MS permettant une détection et quantification large spectre des ES produites par les souches *S. aureus* :** finalement, mon travail s'est orienté vers la détection d'un panel de 24 ESs, c'est-à-dire celles pour lesquelles il n'existe pas encore d'anticorps spécifiques. Nous avons donc développé une méthode LC-MS pour l'analyse d'une large gamme de toxines en utilisant une préparation d'échantillons basée sur la précipitation acide des protéines. Cette méthode a été optimisée pour l'analyse des surnageants de culture dans un premier temps et a permis de détecter les 24 ESs puis de les quantifier via la méthode Hi3 « label free ». Dans cette étude, les peptides protéotypiques des 24 ESs et des 162 variants ont été identifiés en mode non ciblé (DDA) puis confirmés en mode ciblé (PRM). Cette approche a permis de quantifier 24 types d'ESs dans des surnageant de culture de 49 souches de *S. aureus*. Ce travail est décrit dans le Chapitre 2C de la thèse, et a également donné lieu à la rédaction d'un manuscrit, en cours de soumission au journal *Toxins*. Enfin à l'aide de cette méthode, nous avons étudié les cinétiques de production des ESs par le *S. aureus* en milieu BHI afin de mieux comprendre la capacité des souches à produire simultanément les ESs et de pouvoir comparer les niveaux de concentrations entre les différentes ESs produites.

# II Résultats & Discussion

## II.A Résultats partie A: Détection et quantification des ESs dans les matrices alimentaires par immunocapture par protéomique bottom-up multiplexe

### II.A.1 Introduction partie A

Nous avons vu lors de l'introduction de cette thèse l'importance des toxines protéiques bactériennes, telles que les entérotoxines de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dans le domaine de la sécurité alimentaire<sup>107</sup>. Les effets sur la santé causés par les entérotoxines peuvent être observés à de très faibles doses (20-100 ng/g)<sup>33</sup> provoquant : nausées, vomissements et diarrhées. Ces symptômes sont généralement assez légers chez les adultes en bonne santé alors que pour les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées, ils peuvent être dans certains cas mortels<sup>306</sup>. Le développement de méthodes pour l'analyse des ESs (35 répertoriées à ce jour) afin d'identifier la source de la contamination est donc une question importante. Il existe des approches immunologiques, parmi elles les méthodes immunoenzymatiques comprenant le dosage ELISA et le dosage fluorescent enzymatique (ELFA)<sup>134</sup>. Pour ces méthodes, des kits commerciaux sont disponibles, ils permettent la détection et la confirmation de la présence des 5 premières ESs à des niveaux faibles et inférieurs au ng/g via la norme NF EN ISO 19020 (Vidas / SET Ridascreen)<sup>123,124</sup>. Cette norme NF EN ISO 19020 utilise une préparation d'échantillons basée sur une première étape d'acidification. L'acidification permet la précipitation sélective des protéines : les ESs vont rester en solution car elles sont particulièrement résistantes à de faibles niveaux de pH à la différence d'autres protéines de l'échantillon<sup>104</sup>. Elle est suivie d'une étape de dialyse - concentration utilisant du Polyéthylène glycol (PEG), étape que nous avons adaptée à notre protocole de spectrométrie de masse. Outre les problématiques de disponibilité des anticorps, les méthodes basées sur la réaction anticorps-antigène peuvent souffrir d'interférences avec des molécules ayant des propriétés similaires à celles de l'analyte cible, ce qui entraîne un manque potentiel de spécificité. Ce problème est accentué par la complexité des échantillons et la grande diversité des matrices alimentaires<sup>107</sup>, aussi la nécessité de développer de nouvelles méthodes basées sur des principes d'analyse différents se justifie. À cette fin, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem apparaît comme une bonne alternative, avec plusieurs développements réussis dans les matrices alimentaires rapportés (cf paragraphe I.C.5). A noter cependant que les méthodes de spectrométrie de masse dans les aliments ne se focalisent le plus souvent que sur les toxines SEA, SEB et SED. Différentes stratégies de préparation d'échantillons ont été appliquées dans ces études en utilisant des matrices alimentaires de complexités variables. Il apparaît que l'immunocapture<sup>165,243</sup> apporte une sensibilité améliorée avec un seuil de détection inférieur au ng/g de matrice, comparé aux analyses utilisant des précipitations ou des filtrations. De même, la détection par spectrométrie de masse ciblée des peptides

protéotypiques après une étape de digestion par la trypsine (bottom-up) est la plus courante et la plus sensible.

L'immunocapture a montré une sensibilité nettement supérieure aux autres méthodes et apparaît comme la seule méthode de la littérature capable d'atteindre des niveaux de sensibilité inférieurs au ng/g, concentrations des ESs retrouvées dans les échantillons issus de TIACs. Les matrices alimentaires impliquées dans des TIACs à SCP sont riches en protéines, élément essentiel pour le développement du *S. aureus*. Il est donc compliqué d'isoler une protéine minoritaire de l'ordre du ng dans un milieu riche en protéines de l'ordre du gramme. Des méthodes de filtration, précipitation ou même d'électrophorèse de protéines, peuvent être optimisées pour analyser les ESs dans certaines matrices alimentaires « moins complexes » comme les jus de pomme et d'orange<sup>304</sup>. Mais ces méthodes seront d'utilité limitée pour une autre matrice plus complexe. A l'inverse, les méthodes basées sur l'immunocapture semblent moins impactées par les modifications de matrice<sup>165,243,301</sup>. Les problèmes de spécificité liés aux anticorps éventuellement rencontrés avec l'ELISA ne sont pas présents ici car la spécificité repose sur la combinaison de la reconnaissance par l'anticorps et de l'identification protéomique par spectrométrie de masse. Seule la présence de variants de séquence pourrait altérer le fonctionnement de l'approche via la mutation de l'épitope ou du/des peptides protéotypiques, ce qui conduirait à un faux négatif.

Dans ce travail, les 5 premières toxines de SEA-SEE ont pu être analysées via une méthode de préparation d'échantillons utilisant l'immunocapture, étant donné la disponibilité des anticorps dans le commerce, disponibilité qui apparaît comme le principal frein à l'extension de la méthode. Afin d'élargir le nombre de toxines étudiées, trois autres ESs (SEG, SEH, SEI) ont été incluses suite au développement d'anticorps par le Laboratoire d'Études et Recherches en Immunoanalyse (CEA/LERI). Durant cette collaboration, des anticorps ont été produits pour 5 ESs (SEA, SEB, SEG, SEH, SEI)<sup>134</sup>. Dans un premier temps, des versions recombinantes de chaque ESs ont été produites par la bactérie *E. coli*. Ensuite ces protéines ont été injectées à des souris lors de l'étape d'immunisation, ces souris sont sacrifiées et les splénocytes (cellules productrices d'anticorps) sont isolées pour être hybridées avec des cellules de myélome appelées cellules immortelles. Ensuite, une longue étape de criblage a permis d'isoler les hybridomes spécifiques à l'ES injectée. Enfin des tests de sélection des clones permettent d'identifier les « meilleurs » anticorps ou couple d'anticorps dans le cas des ELISA. C'est ce couple d'anticorps qui a également été sélectionné pour l'étape d'immunocapture. Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, une étape préalable de purification et de concentration a été réalisée suivant le protocole de préparation d'échantillons de la norme NF EN ISO 19020 qui permet de concentrer les toxines à partir de 25 g de matrice.<sup>123</sup>

L'objectif de ce premier article<sup>305</sup>, publié dans Journal of Agricultural and Food Chemistry, a été d'évaluer la capacité de la spectrométrie de masse pour la détection et la quantification de 8 ESs simultanément dans des échantillons issus de TIAC, en exploitant la configuration analytique la plus sensible et la plus spécifique d'après la littérature : une immunocapture suivi d'une analyse bottom-up en mode ciblé sur un appareil à haute résolution (mode PRM). Dans cet article, nous avons exposé nos travaux sur l'optimisation analytique : le choix des peptides, le mode d'acquisition et les conditions de l'immunocapture, notamment dans le cas

de la présence de variants de séquence. Un autre intérêt de la spectrométrie est la possibilité de multiplexer les analyses, même en utilisant l'immunocapture. En effet, il est possible de mixer les billes magnétiques couplées à des anticorps pour cibler des types d'ESs différents simultanément. La rapidité de l'analyse LC-MS nous a permis après optimisation de quantifier 36 peptides au total avec leur version marquée, pour les 8 toxines. Nous avons ensuite caractérisé les performances de la méthode quantitative. La quantification repose à la fois sur l'ajout des peptides alourdis aux échantillons (étalons internes) pour compenser les fluctuations d'ionisation et sur une gamme d'étalonnage externe réalisée à l'aide de 8 étalons protéiques. La gamme d'étalonnage prend en compte toutes les étapes de préparation d'échantillons y compris le rendement de digestion à l'inverse d'un étalonnage purement peptidique. Cependant les effets matrices ne peuvent pas être pris totalement en compte car même si la gamme est réalisée dans une matrice très proche, les matrices alimentaires présentes des variations parfois importantes (en termes de composés et de concentration). Seules les protéines marquées PSAQ auraient permis de prendre en compte l'ensemble du processus de préparation d'échantillons, mais les PSAQ ont un coût de développement élevé et sont donc peu utilisés pour les ESs. La méthode a finalement été confrontée à de réels échantillons issus d'autocontrôle déjà caractérisés par les méthodes d'ELISA et de PCR.

## II.A.2 Article 1: Quantitative Determination of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins Types A to I and Variants in Dairy Food Products by Multiplex Immuno-LC-MS/MS.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07545>

# Quantitative Determination of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins Types A to I and Variants in Dairy Food Products by Multiplex Immuno-LC-MS/MS

Donatien Lefebvre, Kevin Blanco-Valle, Cécile Feraudet-Tarisse, Déborah Merda, Stéphanie Simon, François Fenaille, Jacques-Antoine Hennekinne, Yacine Nia, and François Becher\*



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07545>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

**ABSTRACT:** Staphylococcal enterotoxins (SEs) are responsible for frequent food poisoning outbreaks worldwide. Specific identification of SEs is crucial for confirmation of food poisoning, tracking of the incriminated foods or food ingredients, and removal from the food chain. Here, we report on a new food testing protocol addressing the challenge of low abundance of SEs in contaminated food and high sequence heterogeneity. Multiplex ability of targeted high-resolution mass spectrometry was successfully applied to the simultaneous and quantitative determination of the eight most frequent SEs including sequence variants. In this aim, between three and eight proteotypic peptides of each SE were selected by carefully considering amino acid variations within each type, and sequence homology between types. Quantification of trace levels of SEs directly in food samples was reached by immunoaffinity enrichment and optimized analytical conditions. The assay was validated in dairy food products with a lower limit of quantification down to 0.1 ng/g (in milk), and quantification of SEs was successfully demonstrated in real-life samples collected during staphylococcal food poisoning outbreaks. Importantly, the ability of the method to detect diverse sequence variants was also illustrated. By enabling for the first time the simultaneous quantification of the eight most frequent SEs, the new mass spectrometry-based assay would facilitate the laboratory confirmation of positive samples in situation of food poisoning outbreaks.

**KEYWORDS:** mass spectrometry, enterotoxins, food, immunocapture, quantification

## INTRODUCTION

Food poisoning outbreaks (FPO) represent major public health and economic issues worldwide. In Europe, around 15–20% of FPO are due to bacterial toxins.<sup>1</sup> Staphylococcal enterotoxins (SEs) produced by *Staphylococcus aureus* are identified as the causative agents in half of these cases. Staphylococcal enterotoxins exhibit high stability in food matrices,<sup>2</sup> even under acidic (pH > 3.5) or at high temperatures (121.1 °C, 15 min) conditions,<sup>3</sup> resulting in frequent occurrence of these intoxications even after ingestion of heated meals.

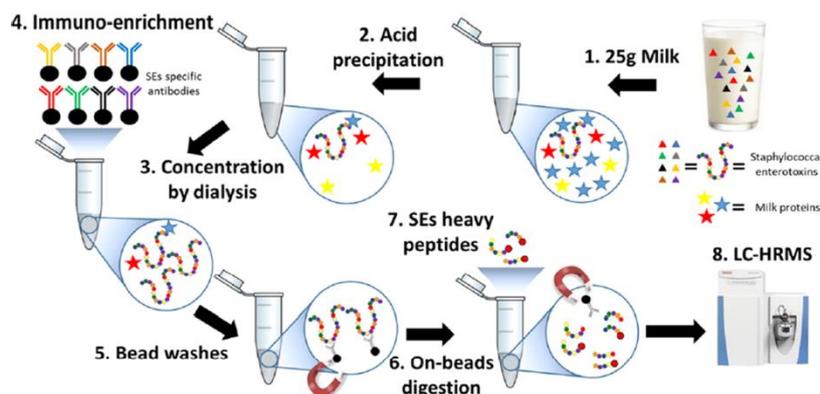
A diversity of SE types has been listed, from the classical SEs (SEA–SEE) initially reported up to the newly described SEs, amounting to a total of 27 currently identified toxin types.<sup>4</sup> Superantigenic activity has been observed for all 27 SEs, whereas emetic activity was demonstrated for the five classical SEs and a large part of the SEs described afterward.<sup>5,6</sup> Evidence was recently provided that the newly described enterotoxins, notably SEG, SEH, and SEI, were responsible for food poisoning outbreaks and must be considered during food analysis.<sup>7</sup> The diversity of SEs is further increased by genetic variations within each type, referred to as toxin variants.<sup>8–10</sup> Identification of SE-contaminated food products requires the detection of as many types and variants as possible to prevent false-negative results. Also, sequence homology between types, e.g., SEA and SEE which share 81% homology, should be considered for accurate detection of the SE type.<sup>11</sup>

Currently, immunoassay-based detection of SEs is the most commonly used approach for foodborne outbreak investigations in suspected samples.<sup>12</sup> In this way, an international protocol allowing qualitative detection of the five classical SEA–SEE toxins was published in 2017.<sup>13</sup> Immunoassays are also commercially available for classical enterotoxins, and ELISA methods were recently reported for detection of novel SEs, e.g., SEG, SEH, or SEI.<sup>14</sup> Immunoassays have high sensitivity for detection of SEs at trace levels, but on the downside, antibodies could be influenced by matrix effects in food samples, cross-reactions, and occurrence of sequence variants.<sup>15</sup> For these reasons, implementation of confirmatory methods based on a different technical approach is recommended.<sup>13</sup> As an alternative to immunoassays, bacterial identification approaches involving culture-based counting or polymerase chain reaction (PCR) highlight the presence of a pathogenic strain and SE-coding genes, but none is able to confirm food poisoning outbreaks since they do not provide direct evidence of the presence of toxins. It is therefore crucial

**Received:** December 1, 2020

**Revised:** February 1, 2021

**Accepted:** February 9, 2021



**Figure 1.** Workflow for absolute quantification of the eight main SEs: (1–2) initial acid precipitation of food samples while SEs remained in soluble state, (3) dialysis, and (4–5) immunocapture to enrich SEs from the acid supernatant, (6) before trypsin digestion, and (7) bottom-up analysis by LC-MS/MS (PRM mode).

to implement new alternatives that are able to identify the diversity of SEs in food matrices.

Mass spectrometry (MS) offers high specificity and multiplex quantitative analysis of toxins.<sup>16–19</sup> Mass spectrometry provides direct measurements and characterization of the protein sequence for unambiguous differentiation of toxin types or variants,<sup>20</sup> addressing potential specificity issues of immunoassays. Up to now, MS was mostly reported for quantification of SEA, SEB, or SED in food matrices with LOD above 2.5 ng/g.<sup>18,21</sup> Immunoaffinity enrichment of SEA and SEB from food matrices was proposed for higher sensitivity.<sup>17,22</sup>

In this work, considering the limitation of current methods for identification of SEs, we report a new MS-based assay for multiplex identification including new SEs and sequence variants. Specific peptide monitoring by targeted high-resolution MS was combined with immunoaffinity enrichment for higher detection sensitivity (Figure 1). Multiplex ability of the assay was improved by thorough optimization of the sample preparation and MS acquisition protocols. We achieved specific quantification of eight classical and novel SEs, i.e., SEA–SEI, at trace levels in contaminated dairy products, in line with the low symptomatic doses.<sup>23</sup> At least three proteotypic peptides of each SE were selected by considering amino acid variations within each type, and sequence homology between types. Relevance of the assay was established by successful SEs quantification, including a large panel of variants of SEI, in the context of foodborne outbreak investigations.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemicals and Reagents.** Phosphate-buffered saline (PBS), phosphate-buffered saline Tween 10× (PBST 10×), sodium phosphate monobasic and dibasic, ammonium bicarbonate (AB), sodium acetate, bovine serum albumin (BSA), dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), analytical grade formic acid, hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide, disodium hydrogen phosphate, sodium chloride, acetonitrile, poly(ethylene glycol) 20 000 (PEG), and endoproteinase sequencing-grade Glu-C were from Sigma Chemical Co (St Louis, MO). RapiGest SF was from Waters Corporation (Milford, MA). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Plus purifier (Millipore, Bedford, MA). Dynabeads M-280 tosylactivated magnetic beads were obtained from Thermo Fisher Scientific, Waltham. Dialysis membrane MWCO: 6000–8000 Da (Spectra/Por1, Spectrum, New Brunswick) and sequencing-grade-modified trypsin were from Promega (Fitchburg, WI). Mouse monoclonal antibodies SEAS, SEA7, SEB26, SEB27, SEG27, SEG41, SEH1,

SEH19, SEI26, and SEI27 were produced in house (CEA-LERI) as reported previously.<sup>24</sup> SEA, SEB, SEC, SED, and SEE native toxins were obtained from Toxin Technology (Sarasota), as well as goat polyclonal antibodies SLC1111, SLDI303, and SLEI404 directed against SEC, SED, and SEE toxins, respectively. rSEA, rSEG, rSEH, and rSEI recombinant toxins were produced in house (CEA-LERI) (Figure S1). Synthetic heavy peptides with labeled Lys [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>] (+8 Da) and Arg [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>] (+10 Da) were synthesized by Thermo Scientific (Bremen, Germany) in Pepotec grade. Sequences of peptides are provided in Table S1. Semiskimmed milk, Morbier cheese, and Tomme cheese were purchased from local stores. Naturally contaminated food, i.e., French cheese (Morbier, Tomme), raw sheep milk, and raw cow milk samples, were obtained from Anses (Maison-Alfort, France).

**Safety Precaution.** Due to the high toxicity of SEs, experiments were performed with strict adherence to safety rules for the handling of toxic substances and using personal protection equipment. SE-contaminated solutions and consumables were inactivated overnight with 2 M NaOH.

**Protein Sequence Information.** The Uniprot (<http://www.uniprot.org>) sequence entries of native SEA, SEB, SEC, SED, and SEE from Toxin Technology were POA0L2, P01552, P34071, P20723, and P12993, respectively. The sequence of recombinant rSEA, rSEG, rSEH, and rSEI is indicated in Figure S1. Recombinant proteins were produced with N-terminal His-tag.

**SE Characterization.** The purity of the standards was checked by SDS-PAGE analyses. The sequence was confirmed by bottom-up mass spectrometry analyses using trypsin or Glu-C and data-dependent acquisition on a Q-Exactive (Thermo) instrument as described in Figure S1. Concentrations of SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, and SEI standards were determined by UV absorption at 280 nm.

**Production of Doped Food Matrices and Quality Control Samples.** Calibration samples and quality control samples (QCs) were prepared in semiskimmed milk and cheese. A mixture of eight SEs was spiked in standard matrices (milk) at 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, and 10 ng/g and in two cheese matrices (Morbier, Tomme) at 0, 1, and 5 ng/g. Incubation for 1 day at 4 °C was performed after spiking to obtain a good distribution of SEs in the matrix.

**SEs Extraction from Food Matrices.** The extraction procedure was based on the EN ISO 19020 protocol for food contaminated with *Staphylococcus* species.<sup>13</sup> A 25 ± 0.1 g portion of the food matrix was weighed. For cheese, grinding was applied followed by the addition of 40 mL water. The matrix was acidified with HCl to a pH between 3.5 and 4.0. After centrifugation at 3130g for 15 min at 4 °C, the supernatant was neutralized with sodium hydroxide to a pH between 7.4 and 7.6. A second centrifugation step at 3130g for 15 min at 4 °C was then carried out. The supernatant was dialyzed (6–8 kD) overnight in 30% (w/v) PEG solution. The protein in the dialysis membrane was recovered with 5 mL of PBS.

**Multiplex Immunocapture of SEs.** Each antibody was coupled to Dynabeads M-280 tosylactivated magnetic<sup>17,25</sup> beads with a ratio of 4  $\mu\text{L}$  (30 mg/mL) of beads to 1  $\mu\text{g}$  of antibody and incubated overnight in PBS. The mixture of magnetic beads (11  $\mu\text{L}$ ) separately coated with the 13 antibodies was used for immunocapture, containing 2  $\mu\text{g}$  of each polyclonal antibody and 0.5  $\mu\text{g}$  of each monoclonal antibody. Incubation and washing steps were performed on a King Fisher Duo Prime robot (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Incubation with the beads was done in 900  $\mu\text{L}$  of food extract and 100  $\mu\text{L}$  of PBS-Tween 10 $\times$  for 1 h at RT. Successive bead washing steps with PBS-Tween 1 $\times$ , PBS, and pure water were performed before final washing elution in 300  $\mu\text{L}$  of ultrapure water.<sup>17,25</sup> The dry beads were then resuspended in 20  $\mu\text{L}$  of RapiGest SF (0.05% in 50 mM ammonium bicarbonate buffer pH 8) before on-beads digestion.

**On-Beads Digestion of SEs.** DTT (10  $\mu\text{L}$ , 20 mM) was added to the beads and subsequently heated for 15 min at 95  $^{\circ}\text{C}$  to induce toxin denaturation. Then, 10  $\mu\text{L}$  of 45 mM IAA was added and incubated for 45 min in the dark at room temperature. Digestion was performed with 0.5  $\mu\text{g}$  of trypsin for 2 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After incubation, the digestion was stopped with 5  $\mu\text{L}$  of 1 M HCl and 10  $\mu\text{L}$  of the mixture of 29 labeled peptides was added to the samples. Twenty microliters were injected into the LC-MS system.

**Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Quantification.** LC-MS/MS experiments were performed using an Ultimate 3000 chromatography system coupled to a Q-Exactive (Quadrupole-Orbitrap) mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Peptide separation was performed on an Aeris peptide XB-C18 reverse-phase column (150 mm  $\times$  2.1 mm; 1.7  $\mu\text{m}$ ; 100  $\text{\AA}$ ; Phenomex, Torrance) at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The mobile phases consisted of water with 0.1% formic acid (A) and ACN with 0.1% formic acid (B). An isocratic step at 5% phase B was followed by a gradient from 5 to 40% phase B in 20 min with a mobile phase flow rate of 0.5 mL/min, before equilibration for 5 min. Eluted peptides were introduced into the Q-Exactive instrument by an electrospray ionization (ESI) source. Data were acquired in the positive-ion mode, and the instrument was operated in the parallel reaction monitoring (PRM) mode. The capillary voltage and temperature were set at 4 kV and 320  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. Precursor ions from unlabeled and internal standard peptides were selected in the quadrupole. The isolation mass window was fixed at 6 Da, meaning that isotopologue pairs of light and heavy peptides were isolated together by the broad-band mode.<sup>26</sup> Optimized collision energies of all peptides in the HCD cell are reported in Table S1. All fragment ions were introduced into the Orbitrap. The AGC target was constantly set at  $1 \times 10^6$ , fill time was adjusted at 128 ms, and Orbitrap resolution was set at 35 000 at  $m/z$  400 (FWHM) to reach at least 10 acquisition points per chromatographic peak. Conditions of the data-dependent acquisition for sequence characterization of SEs are described in the Supporting Information.

**Data Analysis and Quantification Protocol.** PRM data were processed with Xcalibur 2.2 software according to an optimized processing method.<sup>17</sup> The most intense and noninterfered  $y$ -ion fragments were selected for peptide identification and quantification. Selected fragments were verified with Skyline version 19.1. Signals of selected fragments were summed, and the resulting extracted-ion chromatogram (XIC) was used for quantification. Co-elution ( $\pm 0.2$  min) between labeled and unlabeled peptides was verified for each selected peptide. Quantification was based on external calibration curves prepared in milk spiked with each SE protein standards. To overcome the impact of partial recovery or stability during SE extraction or trypsin digestion, the calibration curves were processed similarly and simultaneously to the dairy food samples.

**Method Evaluation.** A seven-point calibration curve was generated for each SE from 0.1 to 10 ng/g in milk. Quality control (QC) samples at concentrations of 1 and 5 ng/g SE were prepared and analyzed in seven replicates for each matrix, i.e., milk and the two cheese types. The ratio between the XIC peak area of unlabeled peptides and the XIC peak area of heavy peptides was determined in each sample. A linear regression with  $1/x$  weighting was applied to

generate the standard curve. Coefficient of variation (CV%) of the QC samples was determined.

**Genomic Methods for Identification of Enterotoxins Genes.** Whole-genome sequencing (WGS) was performed as described previously.<sup>11</sup> Briefly, an in-house genomic tool (NAuRA) was used to identify staphylococcal enterotoxin genes in the *S. aureus* strains used in this study.

Detection of SE genes by PCR was performed according to Roussel et al.<sup>27</sup> Briefly, the method allows the detection of 11 SE genes (sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, selj, sep, ser). Primers were synthesized by Eurofins (MWG Operon, France). The reaction mixture (25  $\mu\text{L}$ ) contained 1 U Fast Start Taq DNA polymerase from Roche, Diagnostics (Meylan, France), 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM dNTPs, 1 $\times$  PCR buffer, and 0.2  $\mu\text{M}$  of DNA primer for all SE genes, except for sec/ser and sed, which used 0.8 and 0.6  $\mu\text{M}$  DNA primer, respectively. A Veriti PCR cycler (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) was used. The thermal cycle was at 94  $^{\circ}\text{C}$  for 3 min at the beginning, followed by 35 cycles at 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, then at 56  $^{\circ}\text{C}$  40 s, and finally at 72  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min 30 s, and 72  $^{\circ}\text{C}$  for 7 min for the last cycle.

**Obtaining Naturally Produced Toxins from Isolated Strains.** A total of 12 strains were isolated from Staphylococcal food poisoning outbreaks (SFPO) samples or from reference strains. The strains were incubated 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  on Plate Count Agar Milk. The bacterial colonies were then injected in 40 mL of BHI (brain heart infusion) at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 18 h. Centrifugation at 8000 rpm 15 min was performed to eliminate the bacterial pellet. The supernatant was filtered through a 20 mL syringe with a 0.2  $\mu\text{m}$  diameter filter before analysis.<sup>28</sup>

**ELISA Assay for SEA, SEB, SEC, SED, SEE.** An in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for quantification of SEs in the contaminated dairy matrices. Briefly, double-sandwich ELISA assays were used for SEA, SEC, SED, and SEE, whereas a single-sandwich assay was used for SEB. Commercially available antibodies (Toxin Technology, Sarasota, Florida) were used as coating (catalogue numbers SLAI101, SLBI 202, SLCI 111, SLDI 303, SLEI 404) and probing antibodies (catalogue numbers LAI101, LBC 202, LCI 111, LDI 303, and LEI 404). Immunoglobulins coupled to horseradish peroxidase (goat-anti-rabbit antibodies coupled to peroxidase) was used for detection by a colorimetric measurement at 405/630 nm (Exc/Em) after addition of the substrate ABTS– $\text{H}_2\text{O}_2$  (KPL).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Sequence Characterization of Toxin Standards and Selection of Proteotypic Peptides.** Amino acid sequences of native, i.e., SEA–SEE, and recombinant, i.e., SEG–SEL, toxins were investigated by bottom-up proteomics using two proteolytic enzymes used in parallel, i.e., trypsin and Glu-C, and data-dependent acquisition (DDA). The total sequence coverage was between 46.3 and 91.7% depending on the toxin and the enzyme considered (Figure S1). Minor parts of the sequences were not identified due to too small peptide sizes. Best coverage was obtained with trypsin, between 77.8 and 91.7% (Figure S1), which was selected for further quantitative experiments.

Identification of specific representative peptides of each SE is crucial for targeted detection<sup>29</sup> in view of the high sequence homology between SEs, such as SEA and SEE with 82% identity. Selected peptides should also ensure detection of all SEs within each type, avoiding positions in the sequence where mutations were reported.<sup>8</sup> Selection of proteotypic peptides for each toxin was based on sequence alignments performed with all sequences available in the ANSES repository (around 411 sequences in total for SEA–SEI toxins)<sup>11</sup> and the Uniprot database (<http://www.uniprot.org>, downloaded on March 11, 2019). Although a single unique tryptic peptide would be in theory enough to identify each SE, monitoring several peptides generally increases assay specificity.<sup>17</sup> A minimum of three

Table 1. Detection and Quantification of SEI Toxin Produced by Distinct Strains<sup>a</sup>

Strains	Canonic peptides				Variant-specific peptides											
	QGDIGVGNLR		LVTAQEIDVK		VLFHLNNEK		VLFHLNDEK		YLQEEYNI-YGHNNNTGK		YLQEEYNI-YGHNNNGK		IPINLWVNGK		IPINLWINGK	
	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD	Ratio	SD
05CEB51	1	0.12	1		ND		1.1	0.1	0.7	0.1	ND		0.2	0.09	ND	
05CEB52	1.1	0.2	1		ND		1.2	0.2	ND		ND		0.3	0.11	ND	
12CEB446	1	0.14	1		3	0.2	ND		0.6	0	ND		0.2	0.05	ND	
16SBCL899	1.1	0.01	1		ND		1.3	0	ND		0.4	0.1	ND		0.3	0.12
12CEB512	1.1	0.19	1		3	0.2	ND		0.6	0.2	ND		0.3	0.1	ND	
14SBCL770	0.9	0.09	1		ND		1.4	0.2	ND		0.4	0	ND		0.2	0.06
15SBCL1438	1.2	0.33	1		ND		1.5	0.2	0.8	0.2	ND		0.2	0.02	ND	
16SBCL1204	0.8	0.04	1		ND		0.6	0.1	ND		ND		ND		ND	
17SBCL25	0.9	0.11	1		ND		0.6	0.1	0.8	0.1	ND		ND*		ND	
18SBCL855	1.3	0.02	1		2.5	0.2	ND		0.6	0	ND		0.2	0.02	ND	
19SBCL464	0.9	0.05	1		ND		1.1	0.1	0.7	0.1	ND		0.2	0.04	ND	
09CEB329	ND		ND		ND		ND		ND		ND		ND		ND	
rSEI standard	ND		1		2.5	0.1	ND		0.6	0	ND		0.1	0.01	ND	

<sup>a</sup>Twelve strains were analyzed, corresponding to 11 SEI variants and 1 strain not containing SEI (as negative). The recombinant SEI standard was also included. The ratio of mean peak area (and S.D.) of each detected peptide, divided by peak area of reference peptide LVTAQEIDVK ( $n = 2$ ), is illustrated. Green color indicates a match between the LC-MS/MS results and the predicted protein sequence by WGS. ND = not detected. \*: Signal of peptide IPINLWVNGK not detected due to the low SEI level produced by this strain.

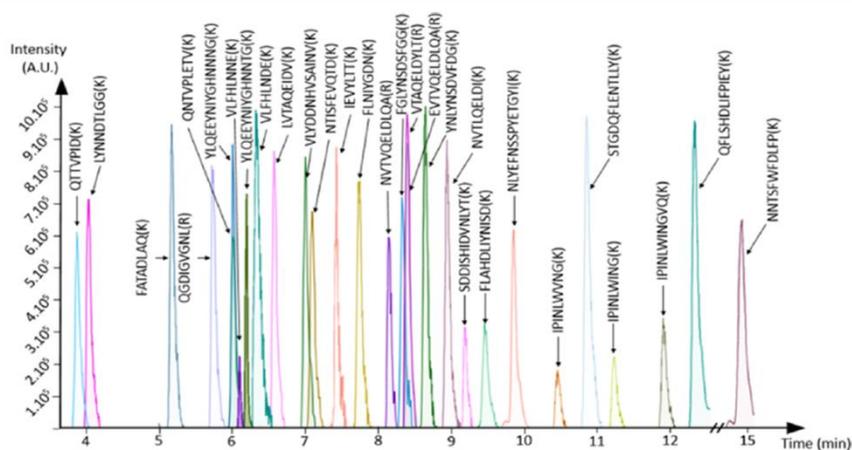


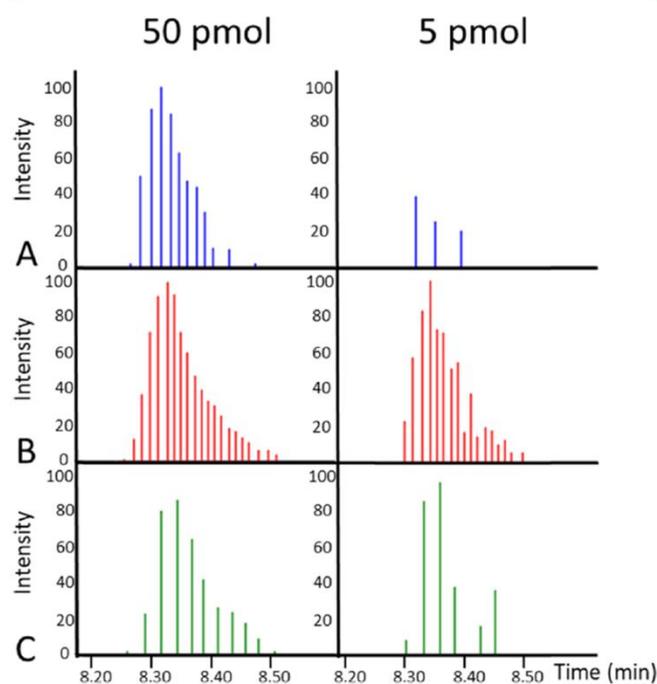
Figure 2. Extracted-ion chromatogram (XIC) of the 29 proteotypic peptides corresponding to SEA to SEI, obtained by spiking all heavy peptides.

peptides per SE were therefore selected for detection of toxins SEA to SEH to avoid false positives or negatives (Table S1), also considering that new sequence variants are continuously discovered. Regarding SEI toxin, 11 distinct sequences were listed in the repository (Figure S2) and a combination of 2 canonic peptides and 6 variant-specific peptides was required to reach the set of 3 peptides (Table 1).

Additional criteria for peptides inclusion were based on the recommendations for targeted proteomics regarding size and amino acid composition, i.e., lack of amino acid prone to chemical modification like methionine or cysteine.<sup>29</sup> In addition, LC-MS/MS detectability of each selected peptide was confirmed by DDA experiments performed on trypsin-digested SEs as described above (Figure S1).

**Optimization of Targeted LC-HRMS Acquisition.** Most methods for toxin quantification are based on selected reaction monitoring (SRM) using a triple-quadrupole instrument.<sup>30</sup> The recently developed parallel reaction mode (PRM) has the advantages of easier method development and much higher MS/MS selectivity thanks to the high resolution of the Orbitrap mass analyzer.<sup>31,32</sup> Several ion fragments can be monitored simultaneously to increase the specificity of peptide detection. A PRM method was implemented to target the 29 selected peptides all eluting within 11 min (Table S1), following optimization of peptide separation on the C18 column, as shown in Figure 2. To have enough data acquisition points for quantification while maintaining assay sensitivity, sequential data acquisition with a narrow RT window of 0.4

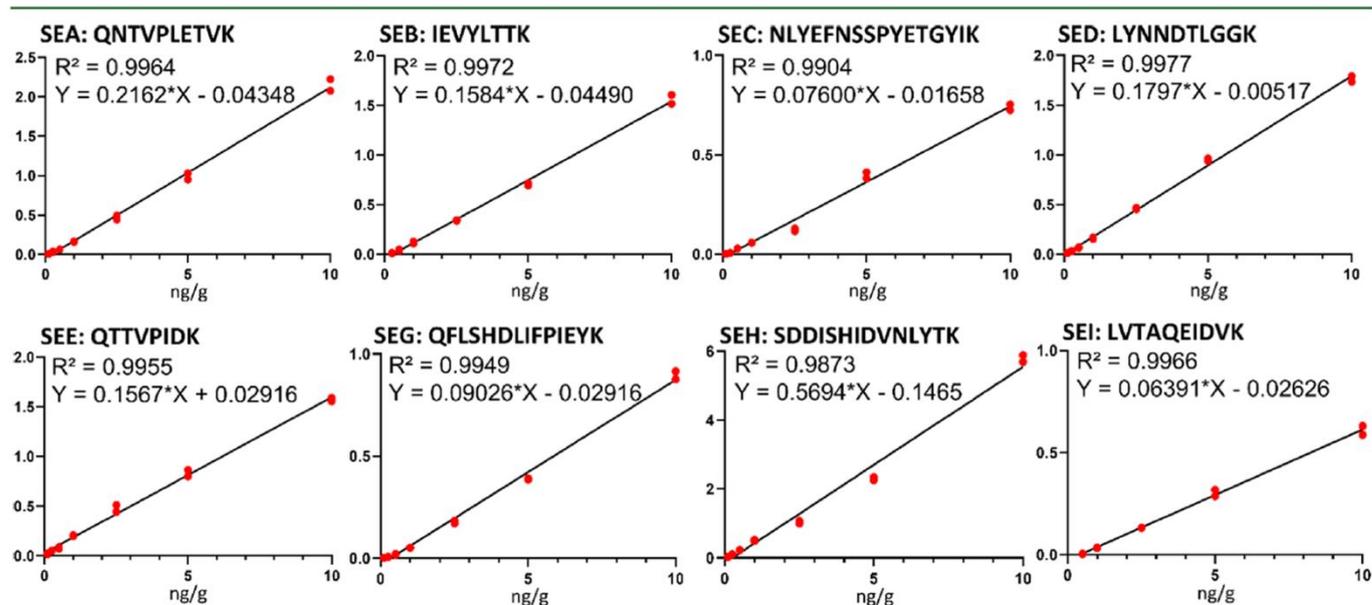
min was implemented. PRM acquisition parameters were also optimized. In the first setting, a maximum fill time of 64 ms was found compatible with the LC peak width, resulting in around 10 data acquisition points when analyzing 50 pmol of the most co-eluted peptide, i.e., FGLYNSDSFGGK from SEE (Figure 3A). Faster acquisition speed together with higher fill



**Figure 3.** Optimization of PRM acquisition parameters: representative results obtained at 5 and 50 pmol of peptide FGLYNSDSFGGK (SEE) eluting at 8.35 min. (A) Acquisition in simplex mode: fill time, 64 ms; resolution, 17 500; window, 2 Da; MSX 1. (B) Acquisition in broad-band mode: fill time, 128 ms; resolution, 35 000; window, 6 Da; MSX 1. (C) Acquisition in multiplex mode of light and heavy peptides: fill time, 128 ms; resolution, 35 000; window 2 Da; MSX 2.

time was developed, either by the multiplex mode or by the so-called broad-band mode,<sup>26,33</sup> where quadrupole isolates simultaneously isotopologue pairs of light and heavy peptides. As illustrated in Figure 3B, best results regarding peak area and number of acquisition points for peptide FGLYNSDSFGGK were obtained with the broad-band mode, fill time set at 128 ms, and resolution of 35 000. No improvement of peak area was observed when using the multiplex mode, which improved the resolution but not the fill time (Figure 3C).

**Sample Preparation Optimization for SE Quantification in Food Matrices.** Sample preparation is essential to improve the sensitivity of the mass spectrometry detection. Protocols based on immunocapture are among the most efficient for protein toxin detection in complex food matrices,<sup>34</sup> including SEA and SEB.<sup>17,35</sup> To reach high sensitivity for detection of the eight SEs, a multiplex enrichment protocol was optimized and combined with an efficient sample preparation step upstream of the immunocapture (Figure 1). The early step homogenizes the cheese samples and preconcentrates large volume of food samples by acid precipitation and dialysis (Figure 1).<sup>3</sup> The SE enrichment factor at this early phase was found at 250%, as measured by spiking a mix of SEs before and after the acidification/dialysis step. The subsequent immunocapture step of SEs could be impacted by potential sequence variants, especially for SEA, SEB, SEG, SEH, and SEI where monoclonal antibodies are involved. For instance, we observed that SEA antibody A7 did not bind the SEA variant uniprot A0A068A244 having only a difference of two amino acids compared to the SEA P0A0L2 variant, which was efficiently immunocaptured (Table S2). A mixture of two monoclonal antibodies per SE having different epitopes, as shown by ELISA sandwich experiments, was therefore selected for SEA, SEB, SEG, SEH, and SEI. The quantity of each antibody was then optimized to reach a linearity of 2 log, i.e., between 0.1 and 10 ng/g (Figure S3). Under these conditions, efficient capture yields were observed in milk at 45, 40, 50, 40, 69, 62, 43, and 67% for SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, and SEI, respectively, in line with



**Figure 4.** Representative linear standard curves of each SEs (weighing  $1/x$ ). SEs were spiked in milk at seven concentrations in duplicate ranging from 0.1 to 10 ng/g. Peak area of extracted-ion chromatograms (XIC) was used for quantification after normalization with peak area of the corresponding heavy peptide.

previous works.<sup>17,25</sup> The capture efficiency of recombinant and native toxins was evaluated, when both are available, considering that possible protein conformation differences might affect antibody binding. Similar yields of 42 and 45% ( $n = 2$ ) for recombinant and native SEAs, respectively (Table S3), confirmed that both protein toxins behave the same.

**Performance of the Method for SE and Variant Quantification.** The method was then evaluated in terms of linearity, reproducibility, and sensitivity. Experiments were done in milk as a complex protein-rich matrix regularly involved in SFPO. A seven-point standard curve was performed in duplicate, together with 7 quality control (QC) spiked at two levels of SEs, i.e., 1 and 5 ng/g, to evaluate method reproducibility. Reproducibility on two different days, measured at 1 and 5 ng/g, indicated a CV% of less than 20% for all selected peptides and an accuracy of 80–120% as specified in the recommendations for bioanalytical method validation (Table S4).<sup>36</sup> A linear response was obtained for all SEs from 0.1 to 10 ng/g, with  $R^2 > 0.985$  (Figure 4). The lower limit of quantification (LLOQ) was determined for all selected peptides, based on bias below 20%. For each SE, we observed at least two best peptides showing LLOQ at or below 0.5 ng/g (Table S1). The LLOQ of each SE was determined in the 0.1–0.5 ng/g range depending on the toxin (Figure 4), based on those two best responding peptides. At LLOQ, the third selected peptides were detected, even though the measured bias did not meet the 20% criteria. Sensitivity of the assay matched with SE levels previously reported in dairy products by ELISA during SFPO.<sup>9</sup>

Importantly, the method was also applied to naturally produced toxins containing sequence variants. In this objective, 12 strains of *S. aureus* containing single or multiple SE-coding genes covering the eight SEs were grown under conditions favoring toxin production.<sup>28</sup> The sequence of the SE-coding genes was characterized by whole-genome sequencing (WGS) in all strains before the new MS assay was applied to the 12 supernatants (Table S5). Up to four SEs were detected by MS in these strains, with concentrations found above the LLOQ (Table S5). Notably, all SEA to SEI types predicted by genomic were successfully identified at the protein level and their respective concentration levels were estimated based on the two best proteotypic peptides (Table S5).

Regarding SEI, the 11 strains with genes coding for SEI contained 11 distinct sequences at the protein level. The 8 peptides selected by sequence alignment to cover known SEI variants were experimentally confirmed (Table 1), and SEI was identified in all 11 strains with a minimum of 3 peptides, including the 2 canonic peptides that were detected in all strains. The peak area of each peptide was normalized with the corresponding labeled standard allowing the quantification of SEI (Table S5). In addition, relative abundance of each peptide to the common peptide LVTAQEIDVK was generally similar between strains, showing no predictable impact of the protein sequence of SE variants on peptide release by trypsin (Table 1). Globally, selected proteotypic peptides and the sample preparation conditions allowed successful identification of all types and variants included in the study, which is most important in view of the diversity of SEs. The MS method has therefore proven efficient for quantification of SEA to SEI toxins, including variants, in milk.

**Quantification of SEs in Naturally Contaminated Dairy Matrices.** The method developed in this work is intended to be used for investigations of SFPO or in the frame

of food industry's own check and official control. French cheese samples (Tomme, Morbier, and raw sheep's milk cheese) and raw cow milk were tested here. In this aim, two levels of QC samples at 1 and 5 ng/g were spiked in cheese (Tomme and Morbier) to identify any potential matrix effects in cheese in comparison to milk (Table S6). The bias observed in Morbier at 5 ng/g was related to the difficulty of spiking solid matrices (Table S6). Globally, the results indicated a weak influence of the cheese matrix showing the reliability of our extraction protocol. This result should be confirmed further in a dedicated validation study performed using a wider range of food matrices. The assay was then applied to naturally contaminated samples originating from the dairy industry, in parallel to PCR and ELISA testing. Parallel evaluation by PCR identified the SED and SER-coding genes in Tomme (08BAC554) and Morbier (08BAC553), whereas ELISA indicated the presence of SED at 1.1 and 1.2 ng/g in Tomme and Morbier, respectively. The new MS method detected SED at 0.7 and 1.0 ng/g in Tomme and Morbier, respectively, in agreement with the ELISA assay (Table S7). Another own-check sample, raw cow milk (19SBCL01), was found positive by PCR for SED-, SEJ-, and SER-coding genes. ELISA indicated the presence of SED toxin at 11.5 ng/g, and the MS method also identified the SED at 10.1 ng/g (Table S7). Sample (19SBCL380) was from raw sheep milk cheese, where the SEC-coding genes were detected by PCR test. ELISA indicated the presence of SEC toxin at 1.1 ng/g, and the new method also identified the presence of SEC at 1.4 ng/g. In the four incurred samples studied, the combination of multiplex antibody enrichment and quantitative MS successfully identified the incriminated toxins in agreement with PCR results and gave concentration in good agreement with the ELISA method (Table S7).

In conclusion, we have successfully developed a multiplex MS-based assay to identify and quantify simultaneously eight SEs at low levels in milk and cheese samples, covering the concentration range found in SFPO samples. The selection of multiple proteotypic peptides by sequence alignment and the use of a panel of antibodies for a more efficient and broad-spectrum immunoenrichment of SEs avoided false-negative samples due to toxin heterogeneity, as illustrated with strains containing 11 distinct SEI sequences. The newly established assay constitutes a complementary approach to current immunoassay protocols, avoiding potential false-positive results due to cross-reaction of antibodies or false-negative results related to SE variants. The assay is intended to be implemented in food testing laboratory for characterization or confirmation of the SFPO sample by alternative technical approaches. Further assay evaluation would be required by testing the method on various food matrices and a larger diversity of toxin variants in a dedicated method validation study. The multiplex ability of the method could be further increased to the whole superfamily of SEs. Indeed, only genomic tests (PCR, WGS) can detect the presence of enterotoxin-coding genes other than SEA–SEI, but none is able to confirm food poisoning outbreaks since they do not provide direct evidence of the presence of toxins. Detection by MS of all SEs could be implemented by antibody-free extraction protocols depending on the required sensitivity or the availability of suitable antibodies.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c07545>.

SE sequence coverage and selected peptides; sequence alignment of SEI variant; optimization of antibody amount for higher assay linearity; peptides selected for quantification of the eight SEs; impact of SEA variants in strains SEA2 and SEA3 (as determined by WGS); immunocapture efficiency of the antibody pair A5 A7; reproducibility (CV%) and accuracy (bias%) of SE quantification in milk; quantitative analysis of native toxin SEA–SEI produced by strains of *Staphylococcus aureus* possessing different enterotoxin-coding genes; matrix effect in different cheese matrices compared to milk; and summary of analysis performed in naturally contaminated dairy matrices (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

François Becher – Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, 91191 Gif-sur-Yvette, France; [orcid.org/0000-0002-1075-9980](https://orcid.org/0000-0002-1075-9980); Phone: 33-1-69-08-13-15; Email: [francois.becher@cea.fr](mailto:francois.becher@cea.fr); Fax: 33-1-69-08-59-07

### Authors

Donatien Lefebvre – Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, 91191 Gif-sur-Yvette, France; Laboratory for Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France

Kevin Blanco-Valle – Laboratory for Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France

Cécile Feraudet-Tarisse – Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Déborah Merda – Laboratory for Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France

Stéphanie Simon – Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, 91191 Gif-sur-Yvette, France

François Fenaille – Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, 91191 Gif-sur-Yvette, France; [orcid.org/0000-0001-6787-4149](https://orcid.org/0000-0001-6787-4149)

Jacques-Antoine Hennekinne – Laboratory for Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France

Yacine Nia – Laboratory for Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c07545>

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by the joint ministerial program of R&D against CBRNE risks.

## ■ REFERENCES

- (1) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2016. *EFSA J.* **2017**, *15*, No. e05077.
- (2) Anderson, J. E.; Beelman, R. R.; Doores, S. Persistence of Serological and Biological Activities of Staphylococcal Enterotoxin A in Canned Mushrooms. *J. Food Prot.* **1996**, *59*, 1292–1299.
- (3) Tatini, S. R. Thermal Stability of Enterotoxins in Food. *J. Milk Food Technol.* **1976**, *39*, 432–438.
- (4) Zhang, D.-F.; Yang, X.-Y.; Zhang, J.; Qin, X.; Huang, X.; Cui, Y.; Zhou, M.; Shi, C.; French, N. P.; Shi, X. Identification and Characterization of Two Novel Superantigens among *Staphylococcus aureus* Complex. *Int. J. Med. Microbiol.* **2018**, *308*, 438–446.
- (5) Hu, D.-L.; Nakane, A. Mechanisms of Staphylococcal Enterotoxin-Induced Emesis. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *722*, 95–107.
- (6) Fisher, E. L.; Otto, M.; Cheung, G. Y. C. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, No. 436.
- (7) Jørgensen, H. J.; Mathisen, T.; Lovseth, A.; Omoe, K.; Qyale, K. S.; Loncarevic, S. An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Caused by Enterotoxin H in Mashed Potato Made with Raw Milk. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *252*, 267–272.
- (8) Blaiotta, G.; Ercolini, D.; Pennacchia, C.; Fusco, V.; Casaburi, A.; Pepe, O.; Villani, F. PCR Detection of Staphylococcal Enterotoxin Genes in *Staphylococcus* Spp. Strains Isolated from Meat and Dairy Products. Evidence for New Variants of SeG and SeI in *S. aureus* AB-8802. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 719–730.
- (9) Hennekinne, J.-A.; De Buyser, M.-L.; Dragacci, S. *Staphylococcus aureus* and Its Food Poisoning Toxins: Characterization and Outbreak Investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 815–836.
- (10) Duracova, M.; Klimentova, J.; Fucikova, A.; Dresler, J. Proteomic Methods of Detection and Quantification of Protein Toxins. *Toxins* **2018**, *10*, 99.
- (11) Merda, D.; Felten, A.; Vingadassalon, N.; Denayer, S.; Titouche, Y.; Decastelli, L.; Hickey, B.; Kourtis, C.; Daskalov, H.; Mistou, M.-Y.; Hennekinne, J.-A. NAuRA: Genomic Tool to Identify Staphylococcal Enterotoxins in *Staphylococcus aureus* Strains Responsible for FoodBorne Outbreaks. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1483.
- (12) Nia, Y.; Mutel, I.; Assere, A.; Lombard, B.; Auvray, F.; Hennekinne, J.-A. Review Over a 3-Year Period of European Union Proficiency Tests for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Food Matrices. *Toxins* **2016**, *8*, 107.
- (13) ISO 19020. Microbiology of the Food Chain, Horizontal Method for the Immunoenzymatic Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foodstuffs. 2017.
- (14) Hait, J. M.; Nguyen, A. T.; Tallent, S. M. Analysis of the VIDAS Staph Enterotoxin III (SET3) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins G, H, and I in Foods. *J. AOAC Int.* **2018**, *101*, 1482–1489.
- (15) Ono, H.; Hachiya, N.; Suzuki, Y.; Naito, I.; Hirose, S.; Asano, K.; Omoe, K.; Nakane, A.; Hu, D.-L. Development of an Immunoassay for Detection of Staphylococcal Enterotoxin-Like J, A Non-Characterized Toxin. *Toxins* **2018**, *10*, 458.
- (16) Picard, G.; Lebert, D.; Louwagie, M.; Adrait, A.; Huillet, C.; Vandenesch, F.; Bruley, C.; Garin, J.; Jaquinod, M.; Brun, V. PSAQ Standards for Accurate MS-Based Quantification of Proteins: From the Concept to Biomedical Applications: PSAQ Standards for Accurate Protein Quantification. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1353–1363.

- (17) Dupré, M.; Gilquin, B.; Fenaille, F.; Féraudet-Tarisse, C.; Dano, J.; Ferro, M.; Simon, S.; Junot, C.; Brun, V.; Becher, F. Multiplex Quantification of Protein Toxins in Human Biofluids and Food Matrices Using Immunoextraction and High-Resolution Targeted Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 8473–8480.
- (18) Gilquin, B.; Jaquinod, M.; Louwagie, M.; Kieffer-Jaquinod, S.; Kraut, A.; Ferro, M.; Becher, F.; Brun, V. A Proteomics Assay to Detect Eight CBRN-Relevant Toxins in Food. *Proteomics* **2017**, *17*, No. 1600357.
- (19) Kull, S.; Pauly, D.; Störmann, B.; Kirchner, S.; Stämmler, M.; Dörner, M. B.; Lasch, P.; Naumann, D.; Dörner, B. G. Multiplex Detection of Microbial and Plant Toxins by Immunoaffinity Enrichment and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2916–2924.
- (20) Kalb, S. R.; Baudys, J.; Rees, J. C.; Smith, T. J.; Smith, L. A.; Helma, C. H.; Hill, K.; Kull, S.; Kirchner, S.; Dörner, M. B.; Dörner, B. G.; Pirkle, J. L.; Barr, J. R. De Novo Subtype and Strain Identification of Botulinum Neurotoxin Type B through Toxin Proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 215–226.
- (21) Muratovic, A. Z.; Hagström, T.; Rosén, J.; Granelli, K.; Hellenäs, K.-E. Quantitative Analysis of Staphylococcal Enterotoxins A and B in Food Matrices Using Ultra High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Toxins* **2015**, *7*, 3637–3656.
- (22) Dupuis, A.; Hennekinne, J.-A.; Garin, J.; Brun, V. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for Improved Investigation of Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks. *Proteomics* **2008**, *8*, 4633–4636.
- (23) Asao, T.; Kumeda, Y.; Kawai, T.; Shibata, T.; Oda, H.; Haruki, K.; Nakazawa, H.; Kozaki, S. An Extensive Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Due to Low-Fat Milk in Japan: Estimation of Enterotoxin A in the Incriminated Milk and Powdered Skim Milk. *Epidemiol. Infect.* **2003**, *130*, 33.
- (24) Féraudet-Tarisse, C.; Mazuet, C.; Pauillac, S.; Krüger, M.; Lacroux, C.; Popoff, M. R.; Dörner, B. G.; Andréoletti, O.; Plaisance, M.; Volland, H.; Simon, S. Highly Sensitive Sandwich Immunoassay and Immunochromatographic Test for the Detection of Clostridial Epsilon Toxin in Complex Matrices. *PLoS One* **2017**, *12*, No. e0181013.
- (25) Hansbauer, E.-M.; Worbs, S.; Volland, H.; Simon, S.; Junot, C.; Fenaille, F.; Dörner, B. G.; Becher, F. Rapid Detection of Abrin Toxin and Its Isoforms in Complex Matrices by Immuno-Extraction and Quantitative High Resolution Targeted Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 11719–11727.
- (26) Gallien, S.; Bourmaud, A.; Kim, S. Y.; Domon, B. Technical Considerations for Large-Scale Parallel Reaction Monitoring Analysis. *J. Proteomics* **2014**, *100*, 147–159.
- (27) Roussel, S.; Felix, B.; Vingadassalon, N.; Grout, J.; Hennekinne, J.-A.; Guillier, L.; Brisabois, A.; Auvray, F. *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Food Poisoning Outbreaks in France: Comparison of Different Molecular Typing Methods, Including MLVA. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, No. 882.
- (28) Hennekinne, J. A.; Kerouanton, A.; Brisabois, A.; De Buyser, M. L. Discrimination of *Staphylococcus aureus* Biotypes by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macro-Restriction Fragments. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 321–329.
- (29) Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring for Quantitative Proteomics: A Tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 222.
- (30) Gillette, M. A.; Carr, S. A. Quantitative Analysis of Peptides and Proteins in Biomedicine by Targeted Mass Spectrometry. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 28–34.
- (31) Peterson, A. C.; Russell, J. D.; Bailey, D. J.; Westphall, M. S.; Coon, J. J. Parallel Reaction Monitoring for High Resolution and High Mass Accuracy Quantitative, Targeted Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, 1475–1488.
- (32) Gallien, S.; Duriez, E.; Crone, C.; Kellmann, M.; Moehring, T.; Domon, B. Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, 1709–1723.
- (33) Barthélemy, N. R.; Fenaille, F.; Hirtz, C.; Sergeant, N.; Schraen-Maschke, S.; Vialaret, J.; Buée, L.; Gabelle, A.; Junot, C.; Lehmann, S.; Becher, F. Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 667–676.
- (34) Kalb, S. R.; Krilich, J. C.; Dykes, J. K.; Lúquez, C.; Maslanka, S. E.; Barr, J. R. Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F in Foods by Endopep-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1133–1141.
- (35) Hennekinne, J.-A.; Brun, V.; De Buyser, M.-L.; Dupuis, A.; Ostyn, A.; Dragacci, S. Innovative Application of Mass Spectrometry for the Characterization of Staphylococcal Enterotoxins Involved in Food Poisoning Outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 882–884.
- (36) Jenkins, R.; Duggan, J. X.; Aubry, A.-F.; Zeng, J.; Lee, J. W.; Cojocar, L.; Dufield, D.; Garofolo, F.; Kaur, S.; Schultz, G. A.; Xu, K.; Yang, Z.; Yu, J.; Zhang, Y. J.; Vazvaei, F. Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics. *AAPS J.* **2015**, *17*, 1–16.

## SUPPORTING INFORMATION

### **Quantitative Determination of *Staphylococcus Aureus* Enterotoxins types A to I and variants in dairy food products by multiplex immuno-LC-MS/MS.**

Donatien Lefebvre<sup>†,§</sup>, Kevin Blanco-Valle<sup>§</sup>, Cécile Feraudet-Tarisse<sup>†</sup>, Déborah Merda<sup>§</sup>,  
Stéphanie Simon<sup>†</sup>, François Fenaille<sup>†</sup>, Jacques-Antoine Hennekinne<sup>§</sup>, Yacine Nia<sup>§</sup>, François  
Becher<sup>†</sup>

<sup>†</sup> Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS),  
SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

<sup>§</sup> Laboratory for Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety  
(ANSES), Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France.

Corresponding author: [francois.becher@cea.fr](mailto:francois.becher@cea.fr)

Figure S1 SEs sequence coverage and selected peptides. ....	2
Figure S2 Sequence alignment of SEI variants. ....	3
Figure S3 Optimization of antibody amount for higher assay linearity. ....	4
Table S1 peptides selected for quantification of the 8 SEs.....	4
Table S2 Impact of SEA variants in strain SEA2 and SEA3 (as determined by WGS).....	5
Table S3 Immunocapture efficiency of the antibody pair A5 A7. ....	6
Table S4 Reproducibility (CV%) and accuracy (Bias%) of SE quantification in milk .....	7
Table S5 Quantitative analysis of native toxin SEA-SEI produced by strains of staphylococcus aureus possessing different enterotoxin-coding genes.....	8
Table S6 Matrix effect in different cheese matrix compared to milk. ....	9
Table S7 Summary of analysis performed in naturally contaminated dairy matrices .....	10

Supplementary methods

11

**>SEA Toxin technology**  
SEKSEEINEK DLRKKSELQG TALGNLKQIY YYNEKAKTEN KESHQDQFLQH TILFKGFFTD  
HSWYNDLLVD FDSKDIVDKY KGKQVDLYGA YGYQCAGGT PNKTACMYGG VTLHDNNRLT  
EEKKVPINLW LDGKONTVPL ETVKTNKKNV TVQELDLQAR RYLQEKYNLY NSDVFQGRVQ  
RGLIVFHTST EPSVNYDLFG AQQQYSNTLL RIYRDNKTIN SENMHIDIYL YTS

**>SEB Toxin technology**  
ESQPDPKPDE LHKSSKFTGL MENMKVLYDD NHVSAINVKS IDQFLYFDLI YSIKDTKLGK  
YDNVRVEFKN KDLADKYKDK YVDVFGANY YQCYFSKKTN DINSHQTDKR KTCMYGGVTE  
HNGNQLDKYR SITVRVFDG KNLFSFDVQT NKKKVTAOEL DYLTRHYLVK NKKLYEFNNS  
PYETGYIKFI ENENFWYDM MPAPGDKFDQ SKYLMYNDN KMVDSKDVKI EYVLTTRKK

**>SEC2 Toxin technology**  
ESQPDPTPDE LHKSSSEFTGT MGNMKYLYDD HYVSATKVMS VDKFLAHDLI YNISDKKLKN  
YDKVKTELLN EDLAKKYKDE VVDVYGSNYY VNCYFSSKDN VGKVTGGKTC MYGGITKHEG  
NHFDNGNLQN VLIRVYENKR NPTISFEVOTD KKSQVTAQELD IKARNFLINK KNLYEFNNSF  
YETGYIKFIE NNGNTFWYDM MPAPGDKFDQ SKYLMYNDN KTVDSKSVKI EVHLTTKNG

**>SED Toxin technology**  
NENIDSVKEK ELHKSELSS TALNNMKHSY ADKNPIIGEN KSTGDOFLEN TLLYKQFFTD  
LINFEDLLIN FNSKEMAQHF KSKNVDVYAI RYSINCYGGE IDKTACTYGG VTPHEGNKLN  
ERKKIPTNLW INGVOKEVSL DKVQTDKKNV TVQELDAQAR RYLQKDLKLY NNDTLOGKIQ  
RGKIEFDSSD ESKVSYDLFD VKGDFPEKQL RIYSDNKTLS TEHLHIDIYL YEK

**>SEE Toxin technology**  
SEKSEEINEK DLRKKSELQR NALSNLRQIY YYNEKAITEN KESDDQFLEN TLLFKGFFTG  
HPWYNDLLVD LGSKDATNKY KGKQVDLYGA YGYQCAGGT PNKTACMYGG VTLHDNNRLT  
EEKKVPINLW IDGKQTTVPI DKVKTSSKQV TVQELDLQAR HYLHGKFGLY NSDSFGGRVQ  
RGLIVFHSSE GSTVSYDLFD AQQQYPTLL RIYRDNKTIN SENLHIDLIL YTT

**>rSEA recombinant toxin**  
MSEKSEEINE KDLRKKSELQ GTALGNLKQI YYYNEKAKTE NKESHQDQFLQ HTILFKGFFTD  
DHSWYNDLLV DFDSKDIVDK YKQKVDLYG AYYGYQCAGG TPNKTACMYG GVTLHDNNRL  
TEEKKVPINL WLDGKONTVPL ETVKTNKKNV TVQELDLQAR RYLQEKYNLY NSDVFQGRV  
QRGLIVFHTS TEPVSYDLFD GAQQQYSNTL LRIYRDNKTIN SENMHIDIY LYTSLEHHHH  
HH

**>rSEG recombinant toxin**  
MQPDPKDEL NKVSDYKNNK GTMGNVMNLY TSPPEGRGV INSRQFLSHD LIFPIEYKSY  
NEVKTELENT ELANNYKDKK VDFGVPYFY TCIIPKSEPD INQNFGCCM YGGLTFNSSE  
NERDKLITVQ VTIDNRQSLG FTITTNKMNVTIQELDYKAR HWTKEKKLY EFDGSFESG  
YIKFTEKNT SFWFDLFPKK ELVFPVYKFLNIYGDNEV DSKSIKMEVF LNTLHEHHHH  
HH

**>rSEH recombinant toxin**  
MEDLHDKSEL TDLALANAYG QYNHPFIKEN IKSDEISGEK DLIFRNQGDS GNDLRVKFAT  
ADLAQKFKNK SVDIYGASFY YKCEKISENI SECLYGGTTL NSEKLAQERV IGANVWVDGI  
QKETEILRTN KKNVTQELD IKIRKILSDK YKIYYKDEI SKGLIEFDMK TPRDYSFDIY  
DLKGENDYEI DKIEDNKTLLKSDDISHIDV NLYTKKVVLE HHHHHH

**>rSEI recombinant toxin**  
MQGDIGVGNL RNFYTKHDIY DLKGVTDKNL PIANQLEFST GTNDLISESN NWDEISKFKG  
KKLDIFGIDY NGPCKSKYMY GGATLSGQYL NSARKIPINL WVNGKHKTIS TDKIATNKKL  
VTAQELDVKL RRYLQEEYNI YGHNNTGK GK EYGYKSKFYS GFNNGKVLPH LNNEKSFYSYD  
LFYTGHLPLV SFLKIYEDNT IIESEKFHLD VEISYVDSNL EHHHHHH

Figure S1: SEs sequence coverage and selected peptides. Uniprot database for SEA SEB SEC SED SEE were P0A0L2, P01552, P34071, P20723, P12993 respectively. Amino-acid sequence of rSEA rSEG rSEH rSEI recombinant toxins is indicated. Identified peptides by data-dependent MS/MS acquisitions after trypsin digestion are marked in green, targeted peptides by PRM mode are indicated in red. Sequence coverage was the following for trypsin: SEA 89.3%, SEB 86.2%, SEC 91.2%, SED 86.7%, SEE 86.2%, rSEA 87.2%, rSEG 91.7%, rSEH 77.8%, rSEI 84.1% and for Glu-C: SEA 67.0%, SEB 53.6%, SEC 46.4%, SED 64.2%, SEE 70.8%, rSEG 46.3%, rSEH 60.6%, rSEI 58.2%

```

rSEI -----MQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 37
05CEB52_sei_2 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGLIDKNLPSANQLE 60
16SBCL1204_sei_12 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGLIDKNLPSANQLE 60
12CEB446_sei_3 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60
18SBCL855_sei_15 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60
12CEB512_sei_6 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60
15SBCL1438_sei_11 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60
17SBCL25_sei_13 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60
19SBCL464_sei_17 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60
05CEB51_sei_1 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60
16SBCL899_sei_5 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60
14SBCL770_sei_10 MKKFKYSFIVVFIILFFNVNDFSQAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60
.....*****.*****.*****.*****.*****

rSEI FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 97
05CEB52_sei_2 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
16SBCL1204_sei_12 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
12CEB446_sei_3 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
18SBCL855_sei_15 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
12CEB512_sei_6 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
15SBCL1438_sei_11 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
17SBCL25_sei_13 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
19SBCL464_sei_17 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
05CEB51_sei_1 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
16SBCL899_sei_5 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
14SBCL770_sei_10 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120
***.*****.*****.*****.*****.*****

rSEI INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 157
05CEB52_sei_2 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
16SBCL1204_sei_12 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
12CEB446_sei_3 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
18SBCL855_sei_15 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
12CEB512_sei_6 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 165
15SBCL1438_sei_11 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
17SBCL25_sei_13 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
19SBCL464_sei_17 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
05CEB51_sei_1 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
16SBCL899_sei_5 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
14SBCL770_sei_10 INLWVNGKHKTISTDKIATNKKLVTAQEI DVKLRRLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSK 180
*****.*****.*****.*****.*****

rSEI FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGLPVSVFLKIYEDNTIIESEKFHLDVEISYVD 217
05CEB52_sei_2 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGVVPSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
16SBCL1204_sei_12 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGVVPSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
12CEB446_sei_3 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGLPVSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
18SBCL855_sei_15 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGLPVSVFMKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
12CEB512_sei_6 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGLPVSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 198
15SBCL1438_sei_11 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGVVPSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
17SBCL25_sei_13 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGVVPSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
19SBCL464_sei_17 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGVVPSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
05CEB51_sei_1 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGLPVSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
16SBCL899_sei_5 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGLPVSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
14SBCL770_sei_10 FYSGFNNGKGVLFHLNNEKSFSYDLFYTG DGLPVSVFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240
*****.*****.*****.*****.*****

rSEI SNLEHHHHHH 227
05CEB52_sei_2 SNK----- 243
16SBCL1204_sei_12 SNK----- 243
12CEB446_sei_3 SN----- 242
18SBCL855_sei_15 SN----- 242
12CEB512_sei_6 SN----- 200
15SBCL1438_sei_11 SN----- 242
17SBCL25_sei_13 SN----- 242
19SBCL464_sei_17 SN----- 242
05CEB51_sei_1 SN----- 242
16SBCL899_sei_5 SN----- 242
14SBCL770_sei_10 SN----- 242
**.....

```

Figure S2: Sequence alignment of SEI variants. Signal peptides are indicated in yellow, position of targeted peptides by PRM mode are in red.

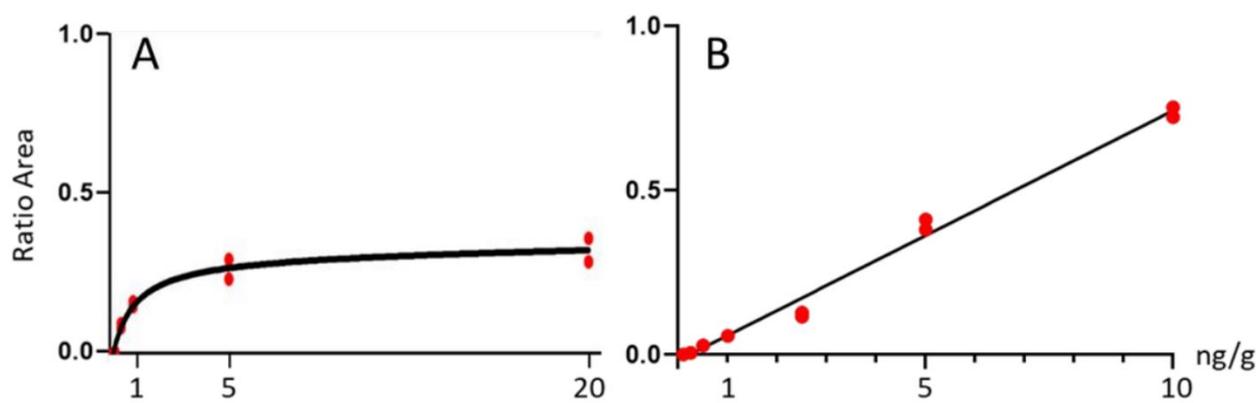


Figure S3: Optimization of antibody amount for higher assay linearity. Representative result for SEC peptide NLYEFNSSPYETGYIK is illustrated, A) 0.1 µg of antibody coated on beads and B) 0.5 µg coated on beads.

Table S1: peptides selected for quantification of the 8 SEs. Mass to charge ratio (monoisotopic), charge (z), retention time (RT), collision energy (CE), lower limit of quantification (LLOQ) in milk and selected fragments for quantification are indicated.

SE	Peptide	<i>m/z</i>	<i>z</i>	RT (min)	NCE (%)	LLOQ (ng/g)	Fragments
SEA	NVTVQELDLQAR	695.8749	2	8.2	21	0.5	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>10</sub> <sup>+</sup>
SEA	YNLYNSDVFVDGK	719.834	2	8.7	18	0.5	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>10</sub> <sup>+</sup>
SEA	QNTVPLETVK	566.8202	2	6.0	21	0.25	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>
SEB	VLYDDNHVSAINVK	530.9463	3	6.9	15	0.1	Y <sub>11</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>12</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>13</sub> <sup>++</sup>
SEB	VTAQELDYLTR	657.3454	2	8.4	18	0.25	Y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>+</sup>
SEB	IEVYLTTK	485.7825	2	7.1	18	0.1	Y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>+</sup>
SEC	NTISFEVQTDK	643.3233	2	7.0	18	1	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>10</sub> <sup>+</sup>
SEC	FLAHDLIYNISDK	518.2758	3	9.7	18	0.25	Y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>11</sub> <sup>++</sup>
SEC	NLYEFNSSPYETGYIK	964.9554	2	10.0	15	0.25	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>10</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>11</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>12</sub> <sup>+</sup>
SED	STGDQFLENTLLYK	816.9156	2	11.0	21	1	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>+</sup>
SED	IPINLWINGVQK	699.915	2	12.0	21	0.25	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>10</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>11</sub> <sup>++</sup>
SED	LYNNDTLGGK	549.7811	2	4.1	18	0.25	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>+</sup>
SEE	FGLYNSDSFGGK	648.3049	2	8.3	21	0.25	Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>11</sub> <sup>+</sup>
SEE	EVTVQELDLQAR	703.3747	2	8.4	21	0.5	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>
SEE	QTTVPIDK	453.2567	2	3.9	21	0.25	Y <sub>2</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
SEG	FLNIYGDNK	544.2807	2	7.8	18	0.25	Y <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
SEG	QFLSHDLIFPIEYK	585.3142	3	12.4	18	0.1	Y <sub>5</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
SEG	NNTSFWFDLFPK	760.3706	2	14.9	18	0.25	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>+</sup>
SEH	SDDISHIDVNLTK	541.9376	3	9.2	18	0.1	Y <sub>10</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>11</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>12</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>13</sub> <sup>++</sup>
SEH	NVTLQELDIK	588.8333	2	9.0	18	0.25	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>
SEH	FATADLAQK	484.7621	2	5.2	18	0.1	Y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>
SEI	QGDIGVGNLR	517.2799	2	5.7	21	ND	Y <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>6</sub> <sup>+</sup>
SEI	LVTAQEIDVK	560.3226	2	6.6	18	0.5	Y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup>
SEI	IPINLWVNGK	579.3436	2	10.6	21	2.5	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>++</sup>
SEI	IPINLWINGK	586.3515	2	11.4	21	ND	Y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>9</sub> <sup>++</sup>
SEI	VLFHLNNEK	373.2089	3	6.1	15	0.25	Y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>++</sup>
SEI	VLFHLNDEK	373.5369	3	6.5	15	ND	Y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , Y <sub>7</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>8</sub> <sup>++</sup>
SEI	YLQEEYNIYGHNNNGK	653.9700	3	6.0	15	ND	Y <sub>12</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>13</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>14</sub> <sup>++</sup>
SEI	YLQEEYNIYGHNNTGK	649.6382	3	6.2	18	0.5	Y <sub>11</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>13</sub> <sup>++</sup> , Y <sub>14</sub> <sup>++</sup>

Table S2: Impact of SEA variants as illustrated with strain 16SBCL899 and 14SBCL770 (sequence determined by WGS) on immuno-enrichment by SEA antibodies A5 and A7 or both. Experiment was performed by using magnetic coated beads as described in the Methods.

Strains	Antibody A5	Antibody A7	Antibody A5+A7
Standard_SEA	Detected	Detected	Detected
16SBCL899	Detected	Not Detected	Detected
14SBCL770	Detected	Detected	Detected

Table S3: Immunocapture efficiency of the antibody pair A5 A7, measured by the 3 proteotypic peptides of SEA, as a function of native or recombinant SEA spiked in milk.

Peptides (SEA)	Immunocapture recovery (n=2)			Mean
	QNTVPLETVK	NVTVQELDLQAR	YNLYNSDVFDGK	
Native SEA	45.1%	49.5%	40.9%	45.1%
Recombinant rSEA	43.6%	43.7%	40.0%	42.3%

Table S4: Reproducibility (CV%) and accuracy (Bias%) of SE quantification in milk, determined with 7 QC spiked at 1 and 5 ng/g in milk. Results of the representative best peptides of each toxin is illustrated.

	QC 1 ng/g (Milk)		QC 5 ng/g (Milk)	
	CV%	Bias%	CV%	Bias%
SEA: QNTV	5.5%	4.8%	7.80%	6.9%
SEB: IEVY	4.0%	3.4%	9.80%	7.8%
SEC: NLYE	8.1%	8.6%	19.20%	15.7%
SED: LYNN	8.3%	6.6%	13%	11.2%
SEE: QTTV	5.8%	7.5%	8.80%	7.4%
SEG: QFLS	5.7%	16.4%	17.10%	16.4%
SEH: SDDI	5.0%	4.5%	10.50%	7.6%
SEI: LVTA	8.0%	6.0%	5%	4.1%

Table S5: Quantitative analysis of native toxin SEA-SEI produced by strains of staphylococcus aureus possessing different enterotoxin-coding genes.

Strain number	Species	Origin	Date	Location of isolation	Genes (WGS)	SEA	SEB	SEC	SED	SEE	SEG	SEH	SEI
05CEB51	<i>S. aureus</i>	SFPO: riz	2005	France	sec, seg, seh, sei			>10 ng/g			1.4 ng/g	>10 ng/g	1.9 ng/g
05CEB52	<i>S. aureus</i>	SFPO: cheese	2005	France	seb, seg, sei		>10 ng/g				5.0 ng/g		1.2 ng/g
12CEB446	<i>S. aureus</i>	SFPO: chicken	2012	France	sec, seg, sei			7.8 ng/g			3.8 ng/g		4.0 ng/g
16SBCL899	<i>S. aureus</i>	SFPO: meat	2016	France	sea, seg, sei	>10 ng/g					2.3 ng/g		1.3 ng/g
12CEB512	<i>S. aureus</i>	SFPO: cheese	2012	France	seg, sei						3.8 ng/g		2.8 ng/g
14SBCL770	<i>S. aureus</i>	SFPO: pork	2014	France	sea, seg, sei	>10 ng/g					2.7 ng/g		1.5 ng/g
15SBCL1438	<i>S. aureus</i>	SFPO: cheese	2015	France	sec, sei			3.5 ng/g					0.3 ng/g
16SBCL1204	<i>S. aureus</i>	SFPO: chicken	2016	France	seg, sei						3.0 ng/g		3.0 ng/g
17SBCL25	<i>S. aureus</i>	SFPO: chicken	2017	France	seb, sei		>10 ng/g						0.4 ng/g
18SBCL855	<i>S. aureus</i>	SFPO: sandwich	2018	France	sed, seg, sei				>10 ng/g		5.8 ng/g		6.1 ng/g
19SBCL464	<i>S. aureus</i>	SFPO: meat	2019	France	seg, sei						0.4 ng/g		3.3 ng/g
09CEB329	<i>S. aureus</i>	SFPO: cheese	2009	France	see					>10 ng/g			

Table S6: Matrix effect in different cheese matrices compared to milk. QCs at 1 and 5 ng/g were spiked in milk, Morbier and Tomme and determined against a calibration curve prepared in milk. Measured concentrations in QCs are indicated.

	QC SEA QNTV 1 ng/g (n=2)		QC SEA QNTV 5 ng/g (n=2)		Mean Bias
	Measured concentration	CV	Measured concentration	CV	
Milk	1 ng/g	1.1%	5 ng/g	5.4%	0%
Morbier	1.6 ng/g	8.8%	9.2 ng/g	13.3%	72%
Tomme	1.0 ng/g	6.2%	4.5 ng/g	0.7%	5%

Table S7: Summary of analysis performed in naturally contaminated dairy matrices

Sample	Matrix	SE-coding genes identified by PCR	SE concentration by ELISA (ng/g)	SE concentration by LC-MS (ng/g)
08BAC554	Tomme cheese	sed, ser	1.1 (SED)	0.7 (SED)
08BAC553	Morbier cheese	sed, ser	1.2 (SED)	1.0 (SED)
19SBCL01	Cow milk	sed, sej, ser	11.5 (SED)	10.1 (SED)
19SBCL380	Sheep cheese	sec	1.1 (SEC)	1.4 (SEC)

## Supplementary methods

### Characterization of SE standards by DDA

Characterization of toxin standards was performed by DDA (data dependent acquisition) (Top 5) with a resolution of 70'000 (Full MS) or 17'500 (ddMS2) at m/z 200 (FWHM), and normalized collision energy fixed to 18%. The AGC target was constantly set at  $1 \times 10^6$ , fill time was adjusted at 128 ms. Data analyses was performed using Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific).

## II.A.3 Conclusion et discussion de l'article 1

Dans cet article, nous avons développé une méthode multiplexe basée sur l'immunocapture et la spectrométrie de masse ciblée pour l'analyse de 8 ESs par LC-MS. Cette méthode a permis d'obtenir des limites de détection comprises en 0.1 et 0.5 ng/g de lait, matrice alimentaire complexe étant donné sa forte concentration en protéines.

La méthode développée a pris en compte les problématiques liées aux homologies de séquences entre types d'ESs en sélectionnant des peptides spécifiques de chaque type. Elle permet aussi l'identification de l'ensemble des variants de séquences connues à ce jour, mais ne peut pas les discriminer. En effet, les peptides ont été choisis pour être représentatifs de l'ensemble des variants identifiés. Dans les cas les plus extrêmes, comme décrit pour SEI, plusieurs peptides complémentaires ont été sélectionnés afin d'obtenir un minimum de trois peptides par variant. Dans la même logique, et de manière à détecter l'ensemble des variants, l'étape d'immunocapture que nous avons développé utilise deux anticorps spécifiques de chaque type avec des épitopes différents (dans le cas des monoclonaux). Pour répondre à la question de la différenciation des variants, une approche top-down sera développée au chapitre 2.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail aux matrices alimentaires laitières car il s'agit d'une matrice régulièrement impliquée dans des épisodes de TIACs ou d'autocontrôles. En effet, comme expliqué précédemment, cette matrice riche en protéines est un milieu propice au développement du *S. aureus* et peut être contaminée facilement lors d'infections de type mammite. De plus, les études sur l'analyse des ESs en matrices alimentaires par spectrométrie de masse, utilisant du lait de vache comme matrice de référence sont nombreuses<sup>165,229,236,302</sup> et nos résultats peuvent donc être comparés. Ainsi, nous avons obtenu une bien meilleure sensibilité par rapport à celles rapportées précédemment (les LOD étaient établies entre 10-100 ng/mL pour les méthodes sans immunocapture, cf paragraphe I.C.5.4), malgré le suivi de 8 toxines en parallèle. Seule la méthode publiée par Dupré et al,<sup>165</sup> en 2015 possède une sensibilité satisfaisante, avec une LOD de 0,25 ng/mL dans du lait proche de celle de notre méthode (article 1 tableau S1). Mais les deux protocoles sont en fait similaires, la nouvelle méthode pouvant être présentée comme une version multiplexe de l'article publié par le Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments (CEA/LEMM) en 2015, avec l'ajout de l'étape de dialyse – concentration.

Un des objectifs de cette étude étant d'obtenir un outil pour l'analyse des échantillons réels provenant de TIACs ou d'autocontrôles, des tests ont été réalisés sur de vrais échantillons provenant du laboratoire de santé des aliments de l'ANSES. Il s'agit de 4 autocontrôles, dont les deux premiers sont des fromages Tomme et Morbier (08BAC554 et 08BAC553) provenant du même industriel, les prélèvements avaient été effectués en 2008. Suite aux résultats positifs de la méthode officielle, l'industriel a dû détruire entre 100-200 kg de fromage et le laboratoire de santé des aliments a pu conserver plusieurs kg de fromage pour des analyses de stabilité dans ces échantillons réels ou pour évaluer de nouvelles méthodes comme celle présentée ici. Les résultats des tests PCR indiquent pour les deux fromages la présence des gènes codant pour les toxines SED et SER, l'ELISA SED a permis d'obtenir des concentrations de 1,1 ng/g et 1,2 ng/g, très proches de celles mesurées par la méthode LC-MS qui étaient de 0,7 ng/g et 1,0 ng/g. Cependant aucun outil n'a permis d'identifier la présence de la toxine SER dans le fromage étant donné la non disponibilité dans le commerce des anticorps pour

cette toxine. Le troisième autocontrôle a été du lait cru de vache (19SBCL01) où les toxines SED, SEJ et SER ont été identifiées par tests PCR, la SED a été identifiée par ELISA à la concentration de 11,5 ng/g et en LC-MS à une concentration de 10,1 ng/g soit une différence inférieure à 15%. Enfin le quatrième autocontrôle a été du lait cru de chèvre (19SBCL380), le gène codant pour la toxine SEC a pu être identifié, la méthode ELISA a permis d'obtenir une concentration de 1,1 ng/g et la méthode LC-MS une concentration de 1,4 ng/g. Ainsi la méthode LC-MS semble détecter, identifier et quantifier efficacement des ESs dans des échantillons réels et pourrait corroborer les résultats des autres méthodes (PCR, ELISA). En effet, il est possible lors des analyses d'échantillons de TIACs que les résultats des tests PCR et de l'ELISA soient discordants, si le gène n'est pas exprimé ou si une interférence liée à la matrice alimentaire impacte l'ELISA. La méthode LC-MS représente donc une méthode complémentaire de confirmation. Cette méthode LC-MS sera utilisée à l'ANSES en cas d'épisodes de TIACs, après une validation analytique exhaustive. En perspective, cette méthode sera donc évaluée sur d'autres matrices alimentaires régulièrement impliquées dans des épisodes de TIACs. La norme NF EN ISO 16140-2 indique quel type de matrice doit être utilisé pour la validation d'une méthode (qualitative ou quantitative), il s'agit de produits carnés, de produits de la mer, de desserts, de produits laitiers et de plats préparés.

## II.A.4 Etudes complémentaires en lien avec l'article 1

Des expériences complémentaires ont été réalisées concernant l'analyse des 8 premières ESs mais n'ont pas ou peu été décrites dans l'article 1. La nouvelle méthode utilise des anticorps monoclonaux (SEA, SEB, SEG, SEH, SEI) ou polyclonaux (SEC, SED, SEE). Nous présenterons des résultats concernant l'affinité de ces anticorps vis-à-vis des différents types ou variants d'ESs, puis nous discuterons les données obtenues lors de l'analyse d'échantillons additionnels provenant de TIACs.

### II.A.4.1 Affinité des anticorps monoclonaux et cas des variants de séquence

Comme observé dans l'article 1 tableau S2, aucun signal LC-MS n'a été obtenu pour SEA lors de la capture du variant SEA<sub>4</sub> produit par la souche 14SBCL766 avec l'anticorps « SEA\_7 » seul, contrairement à la même expérience réalisée avec le second anticorps « SEA\_5 ». Le variant SEA<sub>3</sub> de la souche 18SBCL850 a bien été détecté dans les mêmes conditions (*une erreur sur le nom des souches a été relevé dans les « supplementary data », et sera corrigé*). L'affinité des anticorps monoclonaux semble donc être impactée par la présence de variants de séquence, probablement lorsque la modification de séquence se produit sur l'épitope.

Afin d'étudier plus globalement l'impact des variants de séquence sur notre méthode utilisant des anticorps monoclonaux, des tests de détection ont été réalisés sur des surnageants de culture de souche de *S. aureus* porteuse de gènes codant pour divers ESs et variants. Les souches ont été incubées dans du milieu BHI pendant 16h à 37°C (comme décrit dans l'article 1) pour produire les ESs. Plus de 500 souches de *S. aureus* avec des origines diverses (TIACs, autocontrôles, souches de références) ont été séquencées au laboratoire de santé des aliments de l'ANSES par la méthode « Whole Genome Sequencing » (WGS). Les gènes codant pour les ESs ont été recherchés via l'outil bio-informatique NAuRA. Via cet outil, de nombreux



Tableau 10 Détection des variants pour les toxines SEA, SEB, SEG, SEH et SEI provenant de 38 souches (colonne de gauche) avec les méthodes ELISA monoclonaux (colonne du milieu) et Immunocapture LC-MS (colonne de droite). Le numéro indique la présence du gène et la référence du variant, la couleur verte indique que la méthode a identifié la toxine et le rouge la non détection.

Souches	ELISA ABGHI					IC LCMS ABGHI				
	sea	seb	seg	seh	sei	sea	seb	seg	seh	sei
05CEB51			1	1	1			1	1	1
05CEB52		2	2		2		2	2		2
06CEB196	3					3				
08CEB393			3		4			3		4
09CEB231	3					3				
09CEB89		1					1			
10CEB282			3		4			3		4
11CEB110			7		4			7		4
12CEB294	3					3				
12CEB304	2					2				
12CEB368		1					1			
12CEB446			3		3			3		3
12CEB496	3	3		3		3	3		3	
12CEB512			5		6			5		6
13CEB437			3		3			3		3
14SBCL1004	3					3				
14SBCL766	4					4				
14SBCL770	1		4		10	1		4		10
15SBCL1151		1	3		4		1	3		4
15SBCL1438					11					11
15SBCL452	3		3		4	3		3		4
16SBCL1204			2		12			2		12
16SBCL1368	4					4				
16SBCL246			3					3		
16SBCL899	4		4		5	4		4		5
17SBCL25		3			13		3			13
17SBCL330			3		3			3		3
17SBCL693	3			2		3			2	
18SBCL601				4					4	
18SBCL669			9		14			9		14
18SBCL850	3					3				
18SBCL855			3		15			3		15
19SBCL1059			3		4			3		4
19SBCL464			14		17			14		17
19SBCL591	3			2		3			2	
20SBCL08			7		4			7		4
337E		4	3		4		4	3		4
352E					8					8

Ainsi, la méthode ELISA détecte bien le variant SEA<sub>3</sub>, il s'agit du variant de référence d'Uniprot (POA0L2) utilisé pour la sélection du couple d'anticorps. Les variants SEA<sub>1,2,4</sub> n'ont par contre pas été détectés, comme indiqué Tableau 10, alors que les analyses LC-MS identifient l'ensemble des variants de la SEA. Le variant SEA<sub>2</sub> a une identité de séquence de 91.4% par rapport à SEA<sub>3</sub> (voir Figure 46) soit 21 acides aminés de différence. Cette grande différence de séquences peut expliquer la mauvaise affinité d'un des anticorps pour le variant SEA<sub>2</sub>, en lien avec une modification affectant l'épitope (non connu). Cependant, les variants SEA<sub>1</sub> et SEA<sub>4</sub> ont une identité de séquence de 98.7% et 99.1% respectivement, soit une différence de seulement 3 et 2 acides aminés. Les variants SEA<sub>1</sub> et SEA<sub>4</sub> ont 2 mutations en commun sur les acides aminés D60N et Y205N, le variant SEA<sub>1</sub> a une mutation supplémentaire en T21A (la première lettre correspond à l'acide aminé sans mutation, le nombre correspond au numéro de l'acide aminé et la dernière lettre correspond à l'acide aminé après mutation) (voir Figure 46). Nous pouvons faire l'hypothèse que l'une ou l'autre des deux mutations communes à

SEA<sub>1</sub> et SEA<sub>4</sub> serait localisée sur l'épitope d'un des deux anticorps, plus probablement l'anticorps SEA\_7 d'après le résultat présenté dans le tableau S2 de l'article. En perspective, Il serait intéressant d'identifier quelle est la mutation responsable de la perte d'affinité soit par épitope mapping par MS<sup>307</sup>, ou en produisant une SEA recombinant avec une seule des deux mutations.

Il est possible d'estimer la proportion de ces variants, pour évaluer le risque de résultats faux négatifs, avec une technique comme l'ELISA monoclonal. Dans le souchier de l'ANSES, la proportion des variants de la SEA n'est pas équivalente entre eux. En effet, sur les 173 souches porteuses du gène codant pour la toxine SEA, 74.6% porte le variant SEA<sub>3</sub> pour seulement 4.6% portant SEA<sub>1</sub>, 5.7% portant SEA<sub>2</sub> et 5.7% portant SEA<sub>4</sub>. Cette répartition au sein du souchier n'est pas forcément représentative des variants retrouvés naturellement, mais semble indiquer que le variant SEA<sub>3</sub> (de référence) est reconnu par les ELISA et est largement majoritaire.

De même pour la détection de la toxine SEB, le variant SEB<sub>2</sub> n'a pas été identifié par la méthode ELISA, mais la combinaison des deux anticorps assure la capture de ce variant pour la détection par LC-MS. Un résultat similaire a été observé pour le variant SEI<sub>13</sub>.

Nos résultats illustrent l'impact potentiel des variants sur les méthodes de détection des ESs selon les anticorps sélectionnés, avec un risque de résultats faux négatifs par seulement quelques acides aminés modifiés. Ce problème a déjà été identifié pour la toxine botulique où l'impact des variations de séquences, dénommées « sous type », a été plus étudié<sup>308</sup> que pour les ESs. En effet, une perte d'affinité des anticorps monoclonaux a été observée en fonction du sous type de la toxine botulique<sup>309-311</sup>.

Afin de limiter l'impact des variants de séquence et de la « trop forte spécificité » des anticorps monoclonaux, deux anticorps/type ont été utilisés lors de l'étape d'immunocapture comme décrit dans l'article 1. Cette même approche avait également été réalisée pour la toxine botulique par Kalb et al,<sup>164</sup> en 2015. Les tests réalisés sur les 38 surnageants de culture démontrent bien l'intérêt de notre approche pour détecter l'ensemble des variants de SEA-SEI (voir Tableau 10). Tous les variants ont bien été détectés par la méthode immunocapture LC-MS, mais l'impact sur la quantification absolue n'a pas été évalué au cours de ce travail. Comment la capture par un seul anticorps (au lieu de deux) modifie la mesure de la concentration du variant? Il faudrait pour cela disposer d'étalons protéiques pour chacun des variants et comparer les signaux générés par la méthode avec chacune des protéines. A noter que ces anticorps très spécifiques pourraient permettre de discriminer des variants entre eux et compléter le travail réalisé au chapitre 2.

#### II.A.4.2 Affinité des anticorps polyclonaux et cas des types, extension de la méthode à la toxine SEP

Les homologies de séquence entre les ESs ont été décrites de nombreuses fois dans la littérature<sup>45,120</sup>. Le seuil de 84% d'homologie décrit par Merda et al,<sup>36</sup> 2020 permet de fixer la limite entre les type d'ESs si l'homologie est inférieure à ce seuil, et d'identifier les variants si

elle est supérieure à ce seuil. Dans le Tableau 11, une matrice d'identité sur les 26 ESs a été réalisée à partir des données d'Uniprot ce qui a permis d'identifier des pourcentages d'identité entre les types d'ESs.

Tableau 11 Matrice d'identité de 26 types d'ESs avec des séquences provenant d'Uniprot, rouge >84%, bleu entre 70-84%, vert entre 60-70%, marron entre 50-60%, blanc <50% d'identité.

	SET	SEY	SEX	SEG	SER	SEI27	SEZ	SEU	SEB	SEC	SEQ	SEI26	SEL	SEK	SEI	SEM	SEV	SEH	SED	SEJ	SEP	SEA	SEE	SEO	SEN	SES
SET	100.0	39.1	13.7	15.2	14.0	19.6	20.2	17.6	19.7	19.0	20.8	19.0	25.3	20.2	20.2	19.0	17.9	18.4	22.5	21.4	22.5	23.1	22.5	15.5	18.8	21.2
SEY	39.1	100.0	14.1	15.5	15.5	17.8	15.6	19.8	19.6	18.3	21.9	20.8	18.9	19.4	19.2	19.8	19.1	22.7	21.2	20.1	23.4	24.5	25.0	18.0	19.7	22.7
SEX	13.7	14.1	100.0	20.0	16.0	18.2	19.2	18.4	17.9	19.4	17.4	17.9	17.1	12.8	14.5	18.5	17.3	18.6	18.2	21.3	18.8	21.0	19.3	18.0	15.1	17.0
SEG	15.2	15.5	20.0	100.0	60.5	44.6	41.4	42.7	47.4	43.8	32.1	29.9	30.1	30.3	29.5	29.0	28.4	31.3	27.7	30.9	32.3	29.5	30.0	35.0	31.9	36.6
SER	14.0	15.5	16.0	60.5	100.0	45.1	38.8	45.9	49.1	45.5	32.1	29.4	31.1	32.3	30.0	30.0	32.0	30.8	30.9	30.4	32.7	32.7	30.0	36.9	34.3	34.7
SEI27	19.6	17.8	18.2	44.6	45.1	100.0	48.3	51.4	49.8	50.4	27.0	25.9	28.4	26.9	24.9	28.2	27.4	27.5	29.3	30.8	29.3	28.8	29.7	33.6	28.4	33.3
SEZ	20.2	15.6	19.2	41.4	38.8	48.3	100.0	46.9	47.4	50.9	23.8	23.7	27.2	27.8	24.8	26.2	24.2	26.4	25.0	27.9	26.8	26.4	26.4	33.3	26.7	32.1
SEU	17.6	19.8	18.4	42.7	45.9	51.4	46.9	100.0	59.1	59.6	31.4	30.2	33.7	34.4	31.5	36.8	33.3	32.7	34.7	35.7	34.7	35.2	33.8	38.5	32.2	33.0
SEB	19.7	19.6	17.9	47.4	49.1	49.8	47.4	59.1	100.0	68.2	31.5	27.3	32.5	30.8	28.1	32.4	30.3	33.0	35.7	34.2	35.3	36.2	34.4	36.8	32.6	34.1
SEC	19.0	18.3	19.4	43.8	45.5	50.4	50.9	59.6	68.2	100.0	31.8	29.2	31.8	28.6	24.2	30.8	27.1	27.7	32.4	28.8	29.3	29.3	30.7	34.4	27.5	30.0
SEQ	20.8	21.9	17.4	32.1	32.1	27.0	23.8	31.4	31.5	31.8	100.0	64.8	59.6	59.3	62.0	63.0	61.6	32.3	34.5	35.0	35.5	37.0	35.0	33.7	28.9	35.9
SEI26	19.0	20.8	17.9	29.9	29.4	25.9	23.7	30.2	27.3	29.2	64.8	100.0	60.1	60.2	60.2	58.5	59.5	30.1	33.3	35.8	34.8	35.3	34.8	33.0	27.8	35.7
SEL	25.3	18.9	17.1	30.1	31.1	28.4	27.2	33.7	32.5	31.8	59.6	60.1	100.0	60.9	61.4	54.9	57.3	30.3	34.0	34.0	32.0	34.0	35.0	34.7	29.0	34.3
SEK	20.2	19.4	12.8	30.3	32.3	26.9	27.8	34.4	30.8	28.6	59.3	60.2	60.9	100.0	71.6	57.8	63.0	31.0	33.2	34.6	34.7	32.7	34.2	31.8	28.6	33.0
SEI	20.2	19.2	14.5	29.5	30.0	24.9	24.8	31.5	28.1	24.2	62.0	60.2	61.4	71.6	100.0	57.6	72.7	32.5	32.7	37.8	36.5	37.4	36.9	32.9	30.1	34.5
SEM	19.0	19.8	18.5	29.0	30.0	28.2	26.2	36.8	32.4	30.8	63.0	58.5	54.9	57.8	57.6	100.0	81.6	32.8	35.5	34.6	31.8	33.2	32.2	29.1	28.2	29.7
SEV	17.9	19.1	17.3	28.4	32.0	27.4	24.2	33.3	30.3	27.1	61.6	59.5	57.3	63.0	72.7	81.6	100.0	30.6	32.8	37.8	33.3	35.8	33.3	32.0	30.3	32.7
SEH	18.4	22.7	18.6	31.3	30.8	27.5	26.4	32.7	33.0	27.7	32.3	30.1	30.3	31.0	32.5	32.8	30.6	100.0	38.5	36.1	37.6	38.5	39.0	36.3	39.4	37.9
SED	22.5	21.2	18.2	27.7	30.9	29.3	25.0	34.7	35.7	32.4	34.5	33.3	34.0	33.2	32.7	35.5	32.8	38.5	100.0	53.7	51.1	51.5	54.1	40.7	40.6	43.1
SEJ	21.4	20.1	21.3	30.9	30.4	30.8	27.9	35.7	34.2	28.8	35.0	35.8	34.0	34.6	37.8	34.6	37.8	36.1	53.7	100.0	62.3	66.2	65.4	44.7	39.7	40.0
SEP	22.5	23.4	18.8	32.3	32.7	29.3	26.8	34.7	35.3	29.3	35.5	34.8	32.0	34.7	36.5	31.8	33.3	37.6	51.1	62.3	100.0	78.1	79.0	41.6	42.9	40.0
SEA	23.1	24.5	21.0	29.5	32.7	28.8	26.4	35.2	36.2	29.3	37.0	35.3	34.0	32.7	37.4	33.2	35.8	38.5	51.5	66.2	78.1	100.0	82.0	41.6	41.5	40.0
SEE	22.5	25.0	19.3	30.0	30.0	29.7	26.4	33.8	34.4	30.7	35.0	34.8	35.0	34.2	36.9	32.2	33.3	39.0	54.1	65.4	79.0	82.0	100.0	41.6	41.1	39.6
SEO	15.5	18.0	18.0	35.0	36.9	33.6	33.3	38.5	36.8	34.4	33.7	33.0	34.7	31.8	32.9	29.1	32.0	36.3	40.7	44.7	41.6	41.6	41.6	100.0	43.8	46.5
SEN	18.8	19.7	15.1	31.9	34.3	28.4	26.7	32.2	32.6	27.5	28.9	27.8	29.0	28.6	30.1	28.2	30.3	39.4	40.6	39.7	42.9	41.5	41.1	43.8	100.0	49.6
SES	21.2	22.7	17.0	36.6	34.7	33.3	32.1	33.0	34.1	30.0	35.9	35.7	34.3	33.0	34.5	29.7	32.7	37.9	43.1	40.0	40.0	40.0	39.6	46.5	49.6	100.0

Sont représentées en rouge les toxines avec une homologie de séquence supérieure à 84% d'identité ; En bleu, les toxines comprises entre 70 et 84% d'identité soit un groupe comprenant SEI, SEM, SEV (71-81% d'identité) et un autre groupe comprenant SEA, SEE, SEP (78-82% identité). On observe également que 15 toxines partagent au moins 60% d'identité avec une autre toxine (en vert) et plus de 19 toxines si le seuil descend à 50% (en marron).

Ono et al,<sup>128</sup> ont montré en 2018 les réactions croisées qui peuvent se produire avec un anticorps polyclonal anti-SEA lors de la révélation en western blot des bandes des toxines SEA, SEE, SEP. La même expérience, mais avec une analyse ELISA, a été réalisée lors de ma thèse avec des anticorps polyclonaux anti-SEA et anti-SEE. Nous avons détecté les protéines recombinantes SEA et SEE et des souches productrices de toxines SEA, SEE et SEP avec les ELISA, comme indiqué dans le Tableau 12. Le protocole des ELISA est similaire à celui décrit dans l'article 1 de la thèse. Les anticorps polyclonaux proviennent de Toxin Technology et la révélation colorimétrique a été réalisée à 405/630 nm (Exc/Em) après addition du substrat ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KLP).

Tableau 12 Analyse ELISA des réactions croisées des anticorps polyclonaux anti-SEA et anti-SEE contre les toxines SEA, SEE et SEP. Standard concentré à 20 ng/mL.

Souche	Gènes	Variants	ELISA SEA Polyclonaux	ELISA SEE Polyclonaux
14SBCL766	a, x	SEA <sub>4</sub>	Détection	Détection
18SBCL850	a, x	SEA <sub>3</sub>	Détection	Détection
46A	e, q	SEE <sub>1</sub>	Détection	Détection
09CEB329	e, x	SEE <sub>2</sub>	Détection	Détection
16SBCL259	e, x	SEE <sub>4</sub>	Détection	Détection
16SBCL1038	p, x	SEP <sub>3</sub>	Détection	Détection
08CEB402 T-	x, y		pas de signal	pas de signal
07CEB132 T-	d, j, r, x		pas de signal	pas de signal
Standard SEA T+		SEA <sub>3</sub>	Détection	Détection
Standard SEE T+		SEE <sub>1</sub>	Détection	Détection

Les résultats de l'analyse ELISA sont concordants avec les observations de Ono et al, 2018<sup>128</sup> comme décrit dans le Tableau 12. Ainsi, nous observons également une réaction croisée des anticorps anti-SEA avec SEE et SEP. De plus l'ELISA anti-SEE indique également une réaction croisée avec SEA et SEP. Dans les deux ELISA polyclonaux, l'ensemble des variants testés ont été détectés. De même, les protéines recombinantes utilisées comme témoins positifs ont également montré des réactions croisées. Cependant, la toxine SED (souche 07CEB132), la plus proche en terme d'homologie de séquence (51-54% d'identité) des 3 toxines SEA, SEE et SEP, n'a pas été détectée par les ELISA, illustrant l'absence de réaction croisée avec ce type (voir Tableau 12).

Il est donc possible de détecter des entérotoxines qui ne possèdent pas d'anticorps spécifiques comme pour SEP, en exploitant les réactions croisées. Cependant avec la technique ELISA, il est impossible d'identifier quelle toxine a été détectée. L'utilisation de l'immunocapture en amont d'une méthode LC-MS permettrait de fixer les toxines avec une homologie de séquence proche via l'utilisation de ces anticorps polyclonaux et de les détecter par spectrométrie de masse. Ainsi, cette méthode se baserait sur la « semi » spécificité des anticorps polyclonaux ou des réactions croisées et la spécificité de l'analyse LC-MS. Le paragraphe suivant présente les développements analytiques réalisés en ce sens.

L'optimisation de la méthode LC-MS pour la détection de la toxine SEP a été réalisée en l'absence de protéine recombinante dédiée, indisponible dans le commerce. Pour identifier les peptides protéotypiques, la séquence des variants de SEP a été obtenue par analyse WGS de 44 souches puis un alignement de séquences a été réalisé, présenté en annexe 1. La séquence est très conservée entre les 6 variants de SEP identifiés, proche de 99% d'identité et il n'est donc pas compliqué d'identifier des peptides communs. Cependant la forte homologie de séquence avec les toxines SEA et SEE (voir Tableau 11), comprise entre 78.1%

et 79%, doit être prise en compte, afin que les peptides permettent l'identification spécifique de la SEP. 7 peptides répondant aux critères de spécificité précédemment décrits et aux critères décrits dans la partie « introduction : choix des peptides pour la quantification » (sans méthionine/cystéine, entre 6-20 acides aminés...) ont été choisis, ils sont reportés Tableau 13. Des peptides alourdis aux isotopes stables ont été obtenus pour les 7 peptides identifiés de SEP (marquage de Lysine/Arginine, Pepotec, Thermo). Ces peptides marqués ont permis la mise en place de la méthode LC-MS. Nous avons repris la méthode chromatographique présentée dans l'article 1 et l'identification des temps de rétention a été réalisée par acquisition PRM sur une large fenêtre de temps de rétention de 2-20 min. Les états de charge majoritaires ont été sélectionnés, avant optimisation de la fragmentation HCD pour chacun des 7 peptides (voir Tableau 13).

Tableau 13 Résultat de la sélection et de l'optimisation des peptides de SEP.

Peptides	RT (min)	EC (%)	charge	m/z	m/z alourdi
SELQGTALSCLR	9.2	21	2+	644.8464	649.8505
QTYHNGSAIENK	6.5	18	2+	819.3995	823.4066
ESNDQFLK	6.2	18	2+	490.7378	494.7449
NTILFNDFFTGHQWYNDLLVDLGSK	18.5	18	2+	1479.2271	1483.2342
DTANIYK	3.7	18	2+	412.7111	416.7182
QNTVPLGTVK	7.4	21	2+	528.806	532.8131
HYLHETYNLYNTDAFNGK	9.2	18	2+	1100.5083	1104.5154

Les peptides SELQGTALSCLR, ESNDQFLK, DTANIYK et QNTVPLGTVK de la toxine SEP ont été incorporés à la méthode proposée dans l'article 1, car ils possèdent la meilleure intensité. Afin d'identifier quels anticorps sont capables de fixer la SEP, une immunocapture a été réalisée en utilisant soit chacun des anticorps polyclonaux pour la toxine SEA appelés SLAI101 et LAI101, soit chacun des anticorps polyclonaux pour la toxine SEE appelés SLEI404 et LEI404 (Toxin Technology). En parallèle, un contrôle négatif a été réalisé avec le couple d'anticorps monoclonaux anti-SEA comme décrit dans l'article 1. Les concentrations de billes magnétiques et d'anticorps utilisés sont les mêmes que celles décrites dans l'article 1 (cf. anticorps polyclonaux SEE) et les souches étudiées sont les mêmes que celles utilisées au Tableau 12. Les résultats, reportés Tableau 14, indiquent que comme pour les ELISA, les toxines SEA, SEE et SEP ont toutes été fixées par l'ensemble des 4 anticorps polyclonaux. De plus, grâce à la spécificité de l'analyse LC-MS, les ESs ont pu être identifiées comme étant SEA, SEE ou SEP dans l'ensemble des 6 souches et des 3 témoins positifs (protéines SEA et SEE). Ainsi via cette méthode utilisant des anticorps polyclonaux « semi » spécifiques, il est possible de détecter et d'identifier de nouvelles toxines comme SEP. Dans l'article 1 nous utilisons uniquement l'anticorps SLEI404 anti-SEE, c'est donc cet anticorps qui sera conservé pour l'analyse de la SEP dans la méthode multiplexe. Enfin nous confirmons la très forte spécificité du couple d'anticorps monoclonaux anti-SEA car aucun signal n'a été détecté pour les souches porteuses de SEE ou SEP (voir Tableau 14). Il est important de noter que cette méthode permet d'identifier le type de toxines mais ne permet pas d'identifier le variant produit par la souche de *S. aureus*.

*Tableau 14 Analyse LC-MS des réactions croisées des anticorps polyclonaux anti-SEA et anti-SEE contre les toxines SEA, SEE et SEP. Etalon concentré à 20 ng/mL. Si détection positive, la toxine identifiée est indiquée.*

Souche	Gènes	Variants	SLAI101 polyclonal anti-SEA	LAI101 polyclonal anti-SEA	SLEI404 polyclonal anti-SEE	LEI404 polyclonal anti-SEE	SEA_5 et SEA_7 monoclonaux anti-SEA
14SBCL766	a, x	SEA <sub>4</sub>	+SEA	+SEA	+SEA	+SEA	+SEA
18SBCL850	a, x	SEA <sub>3</sub>	+SEA	+SEA	+SEA	+SEA	+SEA
46A	e, q	SEE <sub>1</sub>	+SEE	+SEE	+SEE	+SEE	-
09CEB329	e, x	SEE <sub>2</sub>	+SEE	+SEE	+SEE	+SEE	-
16SBCL259	e, x	SEE <sub>4</sub>	+SEE	+SEE	+SEE	+SEE	-
16SBCL1038	p, x	SEP <sub>3</sub>	+SEP	+SEP	+SEP	+SEP	-
08CEB402 T-	x, y	-	-	-	-	-	-
07CEB132 T-	d, j, r, x	-	-	-	-	-	-
Etalon SEA T+		SEA <sub>3</sub>	+SEA	+SEA	+SEA	+SEA	+SEA
Etalon SEE T+		SEE <sub>1</sub>	+SEE	+SEE	+SEE	+SEE	-
Etalon SEE/SEA		SEA <sub>3</sub> /SEE <sub>1</sub>	+SEA/+SEE	+SEA/+SEE	+SEA/+SEE	+SEA/+SEE	+SEA

Cette méthode, basée sur les réactions croisées des anticorps, pourrait être utilisée pour détecter et identifier d'autres nouvelles toxines si l'homologie de séquence le permet. Cependant le manque d'anticorps polyclonaux commerciaux ciblant un groupe de toxines ne permet pas d'étendre la recherche. En parallèle, une recherche d'anticorps commerciaux possédant une faible spécificité vis-à-vis des types d'ESs a permis d'identifier un anticorps monoclonal (My BioSource) décrit comme ayant une affinité pour les 5 premières ESs de 65%, 100%, 82%, 49% et 24% pour respectivement SEA, SEB, SEC, SED et SEE. Cet anticorps MBS211928 a été testé pour l'étape d'immunocapture. Les concentrations sélectionnées en billes magnétiques et en anticorps sont les mêmes que pour les anticorps polyclonaux, c.a.d. les concentrations les plus importantes. L'analyse a été réalisée sur chacune des 8 toxines (SEA-SEI) individuellement à une concentration de 20 ng/mL. En parallèle, la méthode avec les anticorps de l'article 1 a été appliquée de manière individuelle pour chaque toxine.

*Tableau 15 Analyse par immunocapture LC-MS des réactions croisées de l'anticorps commercial monoclonal MBS211928 anti-SEA à SEE, avec les pourcentages d'affinité indiqués par le fabricant par rapport à SEB. Ac Spé SEB et SEI sont les anticorps spécifiques de la méthode de l'article 1. En vert la détection des toxines, en vert claire la détection des toxines avec peu d'intensité. Les 8 étalons sont surchargés à 20 ng/mL*

	SEA	SEB	SEC	SED	SEE	SEG	SEH	SEI
MBS211928	65%	100%	82%	49%	24%			
Ac Spé SEB								
Ac Spé SEI								

Les résultats, Tableau 15, indiquent que l'anticorps MBS211928 ne fixe que la SEB et la SEI dans nos conditions contrairement aux indications du fournisseur. Étonnamment, nous observons une réaction croisée avec les toxines SEB et SEI possédant une homologie de

séquence relativement éloignée, de 28.1%. Au contraire la SEC a une homologie à 68.2% avec SEB, mais n'a pas été détectée. Cependant, l'intensité du signal pour ces deux toxines était nettement inférieure (environ 10 fois moins) à l'intensité obtenue avec les anticorps « classiques » de la méthode de l'article 1. Cela indiquerait une plus faible affinité globale de cet anticorps et donc une sensibilité moins importante.

Etant donné l'absence d'anticorps spécifique pour toutes les nouvelles ESs, l'approche par réaction croisée semble prometteuse. Cependant, il faudrait disposer d'anticorps polyclonaux « semi » spécifiques pour étendre la détection au-delà de la SEP. Il est envisageable à plus long terme que plusieurs toxines soient utilisées pour activer la réponse immunitaire lors de la conception des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dans l'objectif d'obtenir des anticorps polyclonaux « semi » spécifiques ou dans l'idéal un anticorps monoclonal « semi » spécifique. Cette approche permettrait potentiellement de fixer des groupes avec des homologies de séquence assez élevées tel que : SEB, SEC, SEI27, SEZ et SEU avec 50-68% d'identité ; SEQ, SEI26, SEK, SEI, SEM, SEV avec 55-82% d'identité ; SEA, SED, SEE, SEJ et SEP avec 51-82% d'identité.

Nous avons pu constater au cours de cette section que les anticorps monoclonaux et polyclonaux ont des avantages et des inconvénients. En effet, de par leur trop forte spécificité, les anticorps monoclonaux peuvent induire des faux négatifs avec certains variants de séquence, même avec seulement 2-3 modifications d'acides aminés. Ce travail montre l'intérêt de combiner 2 anticorps lors de l'étape d'immocapture pour limiter l'impact des variants dans la détection LC-MS. Au contraire, les anticorps polyclonaux génèrent des réactions croisées entre différents types d'ESs avec une forte homologie de séquence. Cependant, cet « inconvénient » s'avère être un avantage en immunocapture LC-MS pour la détection et l'identification de nouvelles toxines. La méthode proposée dans l'article 1 permet maintenant la détection de 9 entérotoxines (SEP), mais sans la possibilité de quantifier la toxine SEP étant donné l'absence d'étalon.

### II.A.4.3 Analyse d'échantillons réels

Dans cette partie nous verrons les applications réelles de la méthode développée dans l'article 1. La méthode n'étant pas encore validée pour l'ensemble des matrices, seules les TIACs et autocontrôles avec suffisamment de quantités de matrice pour l'ensemble des analyses (NF EN ISO 19020, ELISA, dénombrement) ont pu être analysés. De plus la pandémie liée au SARS-CoV-2 a limité la restauration collective et donc le nombre de TIACs durant les deux années 2020 et 2021 (chiffres qui ne sont pas encore disponibles). Durant cette thèse, 7 TIACs et 5 autocontrôles ont pu être analysés par la méthode de l'article 1.

#### II.A.4.3.1 Échantillons issus d'autocontrôles

Quatre autocontrôles ont déjà été décrits dans l'article 1, le cinquième est issu du fromage bleu de Gex (08BAC552) provenant du même industriel que les échantillons 08BAC553 et 08BAC554. De même, la souche contient les gènes codant pour les toxines SED et SER, la méthode ELISA a permis d'identifier la présence de SED à une concentration de 0,2 ng/g. Des traces de SED dans l'échantillon 08BAC552 ont été identifiées par la méthode LC-MS mais

n'ont pas pu être quantifiées car la LOD pour la toxine SED est de 0,25 ng/g. L'ensemble des résultats pour les autocontrôles est résumé dans le Tableau 16. On peut constater que les résultats pour l'ensemble des 4 méthodes (PCR, NF EN ISO 19020, ELISA, LC-MS) sont en adéquation.

Tableau 16 Résumé des résultats obtenus sur les autocontrôles avec les différentes méthodes : dénombrement, PCR, ELISA, et LC-MS.

N° échantillon	Matrice	Dénombrement UFC/g	PCR	EN ISO 19020	ELISA	LC-MS
19 SBCL 01	Lait cru de vache maturée	10 <sup>3</sup>	sed, sej, ser	positif	SED 11.5 ng/g	SED 10.1 ng/g
19 SBCL 380	fromage au lait cru de brebis	1.8*10 <sup>6</sup>	sec	positif	SEC 1.1 ng/g	SEC 1.4 ng/g
08 BAC 552	fromage bleu gex	100*10 <sup>3</sup>	sed, ser	positif	SED 0.2 ng/g	SED <LOD
08 BAC 553	fromage morbier	100*10 <sup>3</sup>	sed, ser	positif	SED 1.2 ng/g	SED 1.0 ng/g
08 BAC 554	fromage Tomme	100*10 <sup>3</sup>	sed, ser	positif	SED 1.1 ng/g	SED 0.7 ng/g

#### II.A.4.3.2 Échantillons issus de TIACs

La partie suivante décrit les analyses réalisées sur des échantillons issus de 7 TIACs différentes. Les informations de contexte (nombre de cas, d'hospitalisation) des TIACs ne sont pas toujours transmises lors de l'analyse, cependant nous avons pu obtenir des informations plus complètes pour 3 des 7 TIACs. Pour l'ensemble des TIACs la méthode officielle (NF EN ISO 19020) a été positive, ainsi le résultat officiel indique que ces 7 TIACs sont dues au *S. aureus*.

La TIAC 19SBCL601 provient d'une Paella de restaurant (nombre de cas inconnu), la présence de *S. aureus* a été déterminée et des analyses PCR ont permis d'identifier les gènes codant pour les toxines SEA et SEC. Une analyse ELISA a permis d'identifier et de quantifier les toxines SEA et SEC à 1,1 ng/g et 0,04 ng/g respectivement. La méthode LC-MS a pu identifier la présence de la toxine SEA à une concentration de 1,9 ng/g mais n'a pas détecté la présence de SEC. Cela est dû à la LOD pour la méthode LC-MS indiquée à 0,25 ng/g pour la toxine SEC. Cette LOD a été décrite dans une matrice laitière mais n'a pas été vérifiée pour des matrices de plats préparés de type paella. Il est intéressant de constater que la méthode pour le moment validé uniquement en matrice laitière, permet de quantifier la SEA dans une paella avec un résultat proche de l'ELISA.

La TIAC 19SBCL590 a eu lieu dans un camping de l'Hérault et provient de tranches de jambon non conservées au froid après le repas du midi et qui ont été consommées à nouveau le soir par 3 personnes dont un enfant. Ces personnes ont été hospitalisées suite à des symptômes classiques de vomissement, diarrhée, et nausée. La présence de *S. aureus* a été déterminée et des analyses PCR ont permis d'identifier les gènes codant pour les toxines SEA et SEH. Une analyse ELISA a permis d'identifier et de quantifier les toxines SEA et SEH à 0,7 ng/g et 0,08 ng/g respectivement. La méthode LC-MS a pu identifier la présence de la toxine SEA à une concentration de 2,7 ng/g, mais n'a pas pu identifier la présence de la toxine SEH étant donné une trop faible concentration, la LOD de la méthode LC-MS pour la toxine SEH étant de 0,1 ng/g. De plus la matrice jambon semble avoir un impact sur la quantification car une concentration près de 4 fois supérieure a été identifiée par la méthode LC-MS pour la SEA par rapport à la méthode ELISA. Des tests de validation sur les produits carnés pourraient expliquer cette différence.

La TIAC 16SBCL1220 a eu lieu dans l'Ain durant un mariage, les aliments incriminés sont des choux à la crème pâtissière. Après enquête, la cause provoquant la TIAC a pu être identifiée, le pâtissier à l'origine de la pièce montée de choux à la crème l'avait réalisé la veille du mariage. La pièce montée étant trop imposante, elle ne pouvait plus rentrer dans la chambre froide, le pâtissier a alors pris la décision de la garder à température ambiante dans la cuisine jusqu'au mariage. 26 cas sur les 80 consommateurs, dont cinq enfants et une femme enceinte, se sont plaints de douleurs abdominales suivies de nausées et vomissements. Suite à cela, trois personnes ont été hospitalisées dont une personne ayant fait un malaise. L'analyse de l'aliment a permis d'identifier la présence de *S. aureus* et les tests PCR ont détecté les gènes codant pour la toxine SEA. La méthode ELISA a permis d'identifier la présence de la SEA à 17,9 ng/g mais également la présence de la toxine SEC à une concentration de 0,9 ng/g. La présence de la toxine SEC sans la présence du gène codant pour SEC indique une divergence des résultats sans la possibilité de confirmer l'une ou l'autre des méthodes. La méthode LC-MS a permis d'identifier la présence de la toxine SEA à une concentration supérieure à 10 ng/g (pas de quantification exacte car il n'y avait plus assez d'échantillons pour faire des dilutions), mais n'a pas détecté la toxine SEC en accord avec la méthode PCR alors que la LOD de la méthode LC-MS pour la toxine SEC (0,25 ng/g) est nettement inférieure à la concentration de 0,9 ng/g indiqué par l'ELISA. Il est possible d'avoir des réactions croisées avec des ELISA utilisant des anticorps polyclonaux comme vu précédemment ce qui explique la divergence de résultat, ainsi La LC-MS a permis de confirmer le résultat de la PCR et de lever l'ambiguïté. La LC-MS a permis de confirmer le résultat de la PCR et de lever l'ambiguïté.

La TIAC 18SBCL551 a eu lieu dans un restaurant de Seine-et-Marne, le plat incriminé était une paëlla, 49 cas sur les 75 clients du restaurant ont eu des vomissements, diarrhées, et nausées, mais aucune hospitalisation. L'analyse de l'aliment a permis d'identifier la présence de *S. aureus* et les tests PCR ont détecté les gènes codant pour SEA et SEH. L'analyse ELISA a permis de détecter une très forte concentration à 62,6 ng/g de SEA, mais pas la toxine SEH. Egalement, la méthode LC-MS a identifié une très forte concentration de SEA 31,5 ng/g. Cependant, et contrairement à l'ELISA, la SEH a pu être identifiée à une concentration de 3,8 ng/g en accord avec les résultats de tests PCR. Les ELISA monoclonaux anti-SEH n'ont pas permis d'identifier la SEH, cela peut être dû à la présence d'un variant de séquence, modifiant l'épitope retrouvé sur l'anticorps empêchant sa fixation. L'utilisation du couple d'anticorps pour l'immunocapture a permis la détection de la toxine en LC-MS.

Les TIACs 19SBCL628 et 19SBCL622 n'ont pas de donnée épidémiologique disponible, les deux aliments incriminés sont du poulet et des sandwichs. Du *S. aureus* en faible quantité a pu être retrouvé sur les deux aliments et les analyses PCR ont indiqué la présence des gènes codant pour les toxines SEA, SEB, SEG, SEH et SEI. Comme décrit précédemment la méthode officielle (NF EN ISO 19020) a indiqué la présence de toxines, cependant ni la méthode ELISA ni la méthode LC-MS n'ont détecté la toxine dans l'aliment. Cela pourrait s'expliquer par une trop faible concentration des toxines et par le fait qu'une analyse multiplexe comme celle utilisée par la méthode officielle pourrait sommer les signaux de différentes toxines permettant ainsi de détecter un signal sans différencier les toxines présentes, ou cela peut encore être dû à un effet matrice empêchant la fixation des anticorps durant l'ELISA et l'immunocapture.

La TIAC 19SBCL867 n'a pas de donnée épidémiologique disponible, la TIAC provient d'Italie et a été envoyée en confirmation dans le cadre du LRUE (laboratoire de référence européen). La matrice incriminée est du steak haché, aucune souche de *S. aureus* n'a été retrouvée dans

l'aliment donc aucun test PCR n'a été réalisé, cette absence est sûrement en lien avec la cuisson du steak qui a détruit les bactéries. Cependant, comme décrit précédemment, les ESs sont particulièrement résistantes à la température<sup>57</sup>, ainsi les analyses ELISA ont permis d'identifier la présence de SEA et de SEH à 6,5 ng/g et 6,6 ng/g respectivement. De même l'analyse LC-MS a pu identifier les toxines SEA et SEH à 9,1 ng/g et 5,5 ng/g respectivement. Les deux méthodes ELISA et LC-MS ont permis de confirmer avec certitude la présence de deux toxines lors de la TIAC, même en absence de données de culture et génomiques.

## II.A.5 Conclusion et perspective partie A

Comme le montre le Tableau 17, les résultats obtenus avec la nouvelle méthode LC-MS ont permis de confirmer des résultats parfois divergents entre les méthodes PCR et ELISA là où aucune réponse claire ne pouvait être apporté auparavant, illustrant ainsi l'intérêt de disposer d'une approche analytique complémentaire. Cependant, nous avons pu constater dans certains cas un manque de sensibilité, pouvant provoquer des faux négatifs. Ainsi, un travail pour améliorer la sensibilité pourra être réalisé afin de mieux approcher les LOD observées avec les méthodes ELISA. Soit par une optimisation de la méthode sur d'autres matrices alimentaires que le lait, soit par une optimisation de la préparation d'échantillons ou des changements techniques au niveau de l'instrumentation. Des possibilités seront présentées en perspective à la fin de ce chapitre.

*Tableau 17 Résumé des résultats obtenus pour les échantillons de TIACs avec les différentes méthodes dénombrement, PCR, ELISA, et LC-MS.*

N° échantillon	Matrice	Dénombrement UFC/g	EN ISO 19020	PCR	ELISA	LC-MS
19 SBCL 601	Paella	75*10 <sup>6</sup>	positif	sea, sec	SEA 1.1 ng/g SEC 0.04 ng/g	SEA 1.9 ng/g SEC ND
19 SBCL 590	Jambon	140*10 <sup>6</sup>	positif	sea, seh	SEA 0.7 ng/g SEH 0.08 ng/g	SEA 2.7 ng/g SEH ND
16 SBCL 1220	Choux à la crème pâtissière	15*10 <sup>6</sup>	positif	sea	SEA 17.9 ng/g SEC 0.9 ng/g	SEA > 10 ng/g SEC ND
18 SBCL 551	Paëlla riz cuit avec viande	1.1*10 <sup>9</sup>	positif	sea, seh	SEA 62.6 ng/g SEH NR	SEA 31.5 ng/g SEH 3.8 ng/g
19 SBCL 628	Poulet	28*10 <sup>3</sup>	positif	sea, seb, seh, seg, sei	ND	ND
19 SBCL 622	Club sandwich	4.2*10 <sup>3</sup>	positif	sea, seb, seh, seg, sei	ND	ND
19 SBCL 867	Steak haché (Italie)	Pas de souches	positif	Pas de souches	SEA 6.5 ng/g SEH 6.6 ng/g	SEA 9.1 ng/g SEH 5.5 ng/g

Concernant la validation de la méthode, elle sera réalisée après ma thèse au laboratoire ANSES. Le choix des matrices a une importance cruciale car la variété des aliments doit être représentée par un minimum de matrices. La validation doit être faite sur les 5 familles de matrices incriminées dans les TIACs à SCP soit : plats préparés, produits de la mer, desserts, produits laitiers et produits carnés. La norme EN ISO 16140 partie 2 est une norme de validation des méthodes biologiques et chimiques et sera utilisée pour valider la nouvelle méthode LC-MS.

Afin d'améliorer la sensibilité, il est possible d'ajouter des étapes de préparation de l'échantillon de sorte à purifier ou à concentrer l'analyte. Ainsi, une séparation sur gel SDS-PAGE après immunocapture, permet de reconcentrer l'échantillon. Cette méthode a été réalisée par Dupuis et al, 2008<sup>242</sup>. Les auteurs ont utilisé une immunocapture pour extraire la toxine SEA de la matrice alimentaire suivie d'une reconcentration par gel SDS- PAGE. L'objectif n'étant pas de faire migrer sur le gel les protéines pour les séparer entre elles mais juste de concentrer la toxine sur la première partie du gel appelée « gel de stacking », ainsi les auteurs ont fait un « short-run » en gel SDS- PAGE e suivi d'une digestion enzymatique des ESs sur gel. De plus le SDS permet une forte dénaturation des toxines et pourrait permettre une meilleure digestion par la trypsine. Cependant cette étape allonge fortement le protocole, des tests préliminaires permettraient d'évaluer si le bénéfice est suffisant par rapport au temps de manipulation.

Au niveau instrumentation, la question se pose de l'intérêt de transférer la méthode sur un appareil de type triple quadripôle. Cependant la sensibilité ne semble pas être améliorée comme décrit par Ronsein et al, 2015<sup>312</sup>, où les auteurs ont comparé les modes SRM et PRM pour l'analyse quantitative de peptides du HLD (High-density lipoprotein). Leur conclusion indique qu'outre la complexité de mise en place d'une méthode SRM (optimisation de chaque transition SRM), cette méthode n'apporte pas de bénéfice concret concernant la sensibilité. Plus récemment, Millet et al,<sup>313</sup> ont comparé en 2021 le Q Exactive+ au Qtrap 6500 pour la quantification d'un anticorps (Nivolumab) en protéomique bottom-up ciblée. La limite de détection obtenue en mode PRM (LC-MS/HRMS) a été de 2 µg/mL et en mode SRM de 5 µg/mL. Ainsi l'appareil de type orbitrap semble avoir une meilleure sensibilité, cependant les auteurs ont utilisé une génération d'Orbitrap plus récente que celle utilisée au laboratoire. Il est également possible d'utiliser une chaîne nano-LC pour améliorer la sensibilité de la méthode. Olkowicz et al,<sup>314</sup> en 2014 ont comparé une chaîne micro-LC (diamètre de 1 mm) et une chaîne nano-LC (diamètre de 0.075 mm) en termes de sensibilité sur des peptides issus de la protéine troponin T, la micro-LC permet d'obtenir une LLOQ de 0.05 pg/µL et la nano-LC une LLOQ de 0.00025 pg/µL soit un gain multiplié par 200 en tampon. A titre de comparaison, la colonne utilisée dans l'article 1 a pour diamètre 2.1 mm. Cette sensibilité, si elle est conservée après immunocapture de matrices alimentaires, pourrait nous permettre d'atteindre les sensibilités des méthodes ELISA.

Le principal inconvénient de la méthode développée dans l'article 1 est l'utilisation d'anticorps pour la préparation d'échantillons, et donc leur disponibilité. Afin d'éviter l'utilisation d'anticorps pour l'analyse des ESs dans les matrices alimentaires, des tests préliminaires sans anticorps ont été réalisés au cours de ma thèse. Pour cela, des gels SDS- PAGE ont été utilisés afin de concentrer les ESs et de les séparer des autres protéines en fonction de leurs tailles. Ce travail préliminaire est résumé en annexe 2.

En conclusion de ce chapitre, nous avons donc réussi à développer une nouvelle méthode par spectrométrie de masse pour la détection, l'identification et la quantification des toxines SEA à SEI. Des optimisations analytiques ont été réalisées pour détecter de manière simultanée ces 8 premiers types d'ESs et limiter l'impact des variants de séquence lors de l'utilisation d'anticorps très ou « trop » spécifiques dans certains cas. Combiner l'immunocapture avec la spectrométrie de masse ciblée nous a permis d'atteindre des limites de détection en accord avec les concentrations relevées dans les échantillons de TIACs. C'est l'approche analytique la plus sensible développée jusqu'à aujourd'hui en protéomique/spectrométrie de masse,

d'après la littérature. Elle reste cependant encore limitée dans quelques TIACs où des concentrations inférieures à 0.1 ng/mL ont été relevées. Des améliorations méthodologiques sont envisageables comme l'utilisation de la nano-chromatographie. Au final, la LC-MS apporte en l'état, par rapport aux méthodes de la norme NF EN ISO 19020, de l'ELISA et de la PCR, une confirmation lors de résultats discordants pour incriminer avec certitude une TIAC à SCP. Elle devra donc être validée dans une diversité de matrices avant implémentation dans des laboratoires de contrôle alimentaire.

Nous avons mis en évidence l'impact potentiel des variants sur la détection des ESs, illustrant l'intérêt de déterminer quel variant est présent dans l'échantillon pour mieux comprendre un éventuel résultat discordant. Notre méthode LC-MS ne permet pas de discriminer le variant présent. Seules les analyses génomiques par WGS ont cette capacité, mais sans aucune indication quant à son expression. Une analyse des ESs sous forme de protéine entière (top-down) sera proposée au chapitre suivant.

## II.B Résultat partie B : Analyse top-down des entérotoxines staphylococciques

### II.B.1 Introduction partie B

Depuis l'essor des outils de séquençage génomique, de nombreuses ESs émergentes ont été identifiées et décrites dans la littérature, avec jusqu'à 35 types identifiés à ce jour<sup>28</sup>. Les outils génomiques ont permis également d'identifier la présence de mutations parmi des types d'ESs, les protéines mutées sont appelées des variants<sup>45</sup>. Un variant a généralement de 1 à 30 acides aminés de différence avec la toxine de référence et, dans certains cas, cela peut aller jusqu'à 60 acides aminés comme pour des variants de SEN<sup>36</sup>. Il a été proposé par Merda et al, 2020<sup>36</sup> de fixer un seuil de 84% d'identité au-dessus duquel les toxines pourront être identifiées comme variant, et non comme nouveau type.

L'étude des variants peut aider à comprendre des résultats incohérents entre les différentes méthodes d'analyse. Ainsi, l'apparition de mutations sur les sites de fixation des amorces PCR pourrait engendrer un résultat faux négatif pour cette technique comme cela a pu être le cas avec des RT-PCR pour détecter le SARS-CoV-2<sup>315</sup>. Il en est de même avec les tests ELISA, si une mutation modifie l'épitope reconnu par un des anticorps utilisés comme vu précédemment (cf paragraphe II.A.4.1). La méthode LC-MS développée chapitre II.A pourrait aussi être impactée par la présence de variants si la séquence des peptides sélectionnés était modifiée. C'est une des raisons pour lesquelles nous avons sélectionné un minimum de 3 peptides. Nous avons également utilisé un mélange de deux anticorps lors de l'étape d'immunocapture, comme discuté au chapitre II.A.4.1.

Identifier les variants les plus couramment incriminés dans les TIACs pourrait aussi permettre de faciliter les investigations nécessaires pour remonter à la source de contamination, en utilisant des outils davantage ciblés sur tel ou tel variant. Pour ce type d'étude, les outils génomiques pourraient apporter une partie de la réponse sans pour autant confirmer la présence du variant dans l'aliment incriminé. En effet, afin d'avoir une certitude de la présence d'un variant dans l'aliment, il faut rechercher directement la toxine et non la présence des gènes. D'autant plus que la bactérie peut être dégradée durant la préparation de l'aliment, comme lors de la TIAC 19SBCL867 présentée au chapitre II.A.4.3.2, et il n'est alors plus possible d'obtenir le génome. D'autre part, les méthodes de PCR ne permettent pas d'identifier la mutation et donc de discriminer des variants car seules les mutations localisées sur le site de fixation des amorces impactent la méthode et l'identification du gène. Les méthodes WGS informent sur la présence et la nature des mutations au niveau génomique, mais rien ne permet d'indiquer si le gène porteur de la mutation est viable et s'il est capable de produire la toxine. Quant aux méthodes immunologiques comme l'ELISA ne permettent pas de distinguer les variants présents, sauf si une mutation est ciblée par un anticorps monoclonal très spécifique d'une région, comme cela a pu être présenté dans le chapitre II.A.4.1, où seul le variant SEA<sub>3</sub> était détecté par l'ELISA anti-SEA avec des anticorps monoclonaux. Il serait également possible en théorie de développer des anticorps spécifiques de chacune des mutations connues. Dans un autre contexte, Ercan-Herbst et al,<sup>316</sup> en 2019 ont ainsi testé 32

anticorps monoclonaux différents ciblant la protéine Tau pour identifier des anticorps spécifiques de protéoformes. Il serait ainsi possible de discriminer l'ensemble des variants connus via des anticorps spécifiques, mais cela prendrait beaucoup de temps et de ressources financières tout en ne permettant pas la détection de nouveaux variants.

La spectrométrie de masse semble être une méthode adaptée pour la discrimination de variants étant donné sa spécificité et sa capacité à identifier les modifications post-traductionnelles<sup>317</sup>. La protéomique bottom-up décrit dans la partie 1 des résultats pourrait être adaptée à l'identification de peptides spécifiques de chaque variant. Comme décrit dans l'article 1, certains peptides de SEI sont spécifiques d'un groupe de variants, et sont appelés « variant-specific peptides » (Article 1, Table 1). Il est ainsi possible de rechercher des peptides spécifiques possédant la ou les variations de séquence en mode d'acquisition ciblé ou non (DDA ou DIA). Dans un contexte d'analyse de biomarqueurs, Simon et al,<sup>272</sup> ont étudié en 2012 la protéine apolipoprotéine E (ApoE) qui possède des isoformes : ApoE2, ApoE3, ApoE4 qui diffèrent par 1 ou 2 acides aminés. L'isoforme ApoE4 est un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer, son identification permet donc de poser un diagnostic et les auteurs ont donc recherché de manière spécifique le peptide possédant la mutation. Cependant les variations peuvent être localisées dans des zones non analysables, si par exemple le peptide est trop petit ou trop grand après digestion trypsique (il est alors soit non ou trop retenu sur la colonne de chromatographie) ou s'il se trouve dans des zones de « miss cleavage ».

Une autre alternative est d'analyser en spectrométrie de masse la protéine entière sans digestion par protéomique « top-down ». L'avantage de cette technique par rapport au « bottom-up » est l'observation et l'identification globale de la protéine. En effet, il est possible d'analyser, avec un appareil à haute résolution, des protéines entières dont la masse est comprise entre 25 et 30 kDa (masse des ESs) avec une erreur de masse inférieure à 20 ppm<sup>318</sup>. Ainsi une variation de masse due à une mutation sera facilement identifiable. De plus, il est possible de fragmenter la protéine avec une analyse en mode MS/MS (cf paragraphe I.C.2.1.2), pour séquencer tout ou partie de la protéine<sup>319,320</sup>. Cependant, la protéomique « top-down » reste moins sensible que le « bottom-up », notamment en raison de la dispersion du signal sous de multiples états de charge<sup>183</sup>. La quantification absolue est limitée par la disponibilité d'étalons internes entièrement marqués comme des PSAQ, solution idéale pour la quantification « top-down » et utilisée récemment par Lanshoeft et al,<sup>275</sup> 2017 pour des anticorps monoclonaux.

L'objectif de cet article 2 a été d'apporter une nouvelle approche d'identification des variants à l'aide de la protéomique « top-down », tout en proposant des solutions pour atteindre une quantification absolue et sensible. La toxine SEA a été utilisée dans cette étude comme preuve de concept, l'idée étant d'étendre la méthode aux autres ESs ultérieurement. Une étape d'immunocapture a été réalisée afin d'extraire la toxine de la matrice. Suite à cela, une méthode protéomique « top-down » a été développée afin de déterminer la masse moléculaire de la toxine et donc d'identifier la présence de variants. Elle a été suivie d'une seconde analyse de la toxine avec fragmentation HCD générant des fragments MS/MS communs (dans un objectif de quantification) et spécifiques (confirmation de séquence) de chaque variant. Une quantification absolue des variants a été développée à l'aide du mode

d'acquisition ciblé PRM et en exploitant le signal des fragments communs. Pour pallier l'indisponibilité d'étalon interne, nous avons utilisé un variant particulier de la SEA (variant SEA<sub>2</sub>). Ce variant SEA<sub>2</sub> a la caractéristique d'être rare car il n'a été retrouvé qu'une seule fois parmi les 160 souches contenant des gènes codant pour la toxine SEA et disponibles à l'ANSES. De plus ce variant est fortement muté avec seulement 91.4% d'identité et il ne possède ainsi aucun fragment MS/MS commun avec les autres variants de SEA. Il est ainsi possible de le distinguer des autres variants lors de l'acquisition PRM. Aussi, il répond aux critères de sélection d'un étalon interne, tant par sa fixation à l'anticorps lors de l'immunocapture que par un temps de rétention identique aux autres variants de SEA<sup>262</sup>. Après mise au point de la méthode, nous avons comparé en termes de sensibilité et de précision, d'une part l'analyse sans fragmentation en mode d'acquisition non ciblée (full HRMS) avec traitement des données par déconvolution ou par suivi des trois états de charges majoritaires, et d'autre part l'analyse avec fragmentation HCD en mode ciblée (PRM). Notre travail présenté dans l'article suivant montre la complémentarité entre ces deux modes d'acquisition pour la détection, l'identification et la quantification absolue des variants. Ainsi, la quantification par top-down a été évaluée par rapport à l'ELISA et à la méthode « bottom-up » présentée à l'article 1.

## II.B.2 Article 2 Top-down mass spectrometry for trace level quantification of enterotoxin variants.

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00886>

# 1 Top-Down Mass Spectrometry for Trace Level Quantification of 2 Staphylococcal Enterotoxin A Variants

3 Donatien Lefebvre, François Fenaille, Déborah Merda, Kevin Blanco-Valle, Cécile Feraudet-Tarisse,  
4 Stéphanie Simon, Jacques-Antoine Hennekinne, Yacine Nia, and François Becher\*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00886>



Read Online

ACCESS |



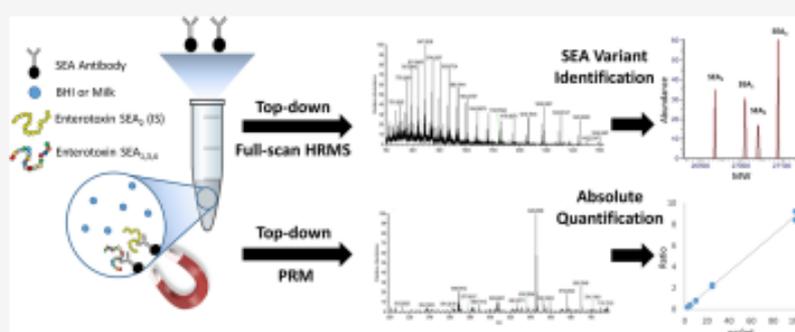
Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information



5 **ABSTRACT:** We addressed here the need for improved sensitivity of top-down mass spectrometry for identification, differentiation,  
6 and absolute quantification of sequence variants of SEA, a bacterial toxin produced by *Staphylococcus aureus* and regularly involved in  
7 food poisoning outbreaks (FPO). We combined immunoaffinity enrichment, a protein internal standard, and optimized acquisition  
8 conditions, either by full-scan high-resolution mass spectrometry (HRMS) or multiplex parallel reaction monitoring (PRM) mode.  
9 Deconvolution of full-scan HRMS signal and PRM detection of variant-specific fragment ions allowed confident identification of  
10 each SEA variant. Summing the PRM signal of variant-common fragment ions was most efficient for absolute quantification,  
11 illustrated by a sensitivity down to 2.5 ng/mL and an assay variability below 15%. Additionally, we showed that relative PRM  
12 fragment ion abundances constituted a supplementary specificity criterion in top-down quantification. The top-down method was  
13 successfully evaluated on a panel of enterotoxin-producing strains isolated during FPO, in parallel to the conventional whole genome  
14 sequencing, ELISA, and bottom-up mass spectrometry methods. Top-down provided at the same time correct identification of the  
15 SEA variants produced and precise determination of the toxin level. The raw files generated in this study can be found on PASSEL  
16 (Peptide Atlas) under data set identifier PASS01710.

17 **KEYWORDS:** mass spectrometry, variants, enterotoxins, bacterial toxins, immunoaffinity enrichment, absolute quantification, top-down,  
18 intact protein

## 19 ■ INTRODUCTION

20 *Staphylococcus aureus* produces a wide variety of toxins,  
21 including enterotoxins (SEs) which cause food poisoning  
22 outbreaks (FPOs), resulting in nausea, vomiting, abdominal  
23 cramps, and diarrhea. SEs represent the third leading cause of  
24 FPOs in Europe and were identified as the causative agents in  
25 half of the FPOs due to bacterial toxins.<sup>1</sup> A diversity of SEs is  
26 reported, with up to 27 types and molecular weights ranging  
27 from 19 to 29 kDa.<sup>2,3</sup> In addition, many sequence variants were  
28 recently observed by genome sequencing, and are continuously  
29 described, resulting in modifications of a few amino acids at  
30 distant positions in the protein sequence.<sup>2,4,5</sup>

31 Confident identification of SEs is crucial for confirmation of  
32 food poisoning. Characterization of the sequence of all  
33 potential variants is essential to prevent false-negative results,

34 for source tracking in an FPO, or to assist in studies on the  
35 virulence of *Staphylococcus aureus* isolates. The high homology  
36 between sequence variants<sup>2</sup> constitutes a major challenge for  
37 analytical methods. Only whole genome sequencing (WGS)  
38 allows identification of all possible sequence variants,<sup>2</sup> albeit  
39 with uncertainty in gene expression.<sup>6</sup> Conventional antibody-  
40 based methods, such as ELISA, provide direct and quantitative

Received: November 18, 2021

SEA <sub>2</sub>	SEKSEEI <b>E</b> KDL <b>R</b> KKSELQ <b>G</b> AL <b>N</b> L <b>Q</b> IYY <b>N</b> KA <b>T</b> ENKES <b>H</b> QFLQHTILF <b>G</b> FFTD	60
SEA <sub>3</sub>	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYNEKAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTD	60
SEA <sub>1</sub>	SEKSEEINEKDLRKKSELQ <b>G</b> ALGNLQIYYNEKAKTENKESHQFLQHTILFKGFF <b>T</b>	60
SEA <sub>4</sub>	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYNEKAKTENKESHQFLQHTILFKGFF <b>T</b> *****:****:*****:..*:*:****:* * *****:*****:*****:	60
SEA <sub>2</sub>	H <b>W</b> YNDLLVDFDSK <b>R</b> D <b>K</b> YK <b>G</b> KKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT	120
SEA <sub>3</sub>	HSWYNDLLVDFDSKIDVDKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT	120
SEA <sub>1</sub>	HSWYNDLLVDFDSKIDVDKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT	120
SEA <sub>4</sub>	HSWYNDLLVDFDSKIDVDKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT * ***** :.*****:*****:*****:*****:*****:	120
SEA <sub>2</sub>	EEKKVPINLWLDGKQNTVPLETVKTNK <b>R</b> VTVQELDLQAR <b>Y</b> L <b>G</b> KYNLYNS <b>D</b> FDGKVQ	180
SEA <sub>3</sub>	EEKKVPINLWLDGKQNTVPLETVKTNKGNVTVQELDLQARRYLQEKYNLYNSDVFQDGVQ	180
SEA <sub>1</sub>	EEKKVPINLWLDGKQNTVPLETVKTNKGNVTVQELDLQARRYLQEKYNLYNSDVFQDGVQ	180
SEA <sub>4</sub>	EEKKVPINLWLDGKQNTVPLETVKTNKGNVTVQELDLQARRYLQEKYNLYNSDVFQDGVQ *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	180
SEA <sub>2</sub>	RGLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQQ <b>S</b> NTLLRIYRDNKTINSENMHIDIYLY <b>T</b>	233
SEA <sub>3</sub>	RGLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQQ <b>S</b> NTLLRIYRDNKTINSENMHIDIYLY <b>T</b> S	233
SEA <sub>1</sub>	RGLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQ <b>S</b> NTLLRIYRDNKTINSENMHIDIYLY <b>T</b> S	233
SEA <sub>4</sub>	RGLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQ <b>S</b> NTLLRIYRDNKTINSENMHIDIYLY <b>T</b> S *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	233

Figure 1. Sequence alignment of the 4 SEA variants of SEA. Amino acids highlighted in red are mutations with regard to the consensus sequence SEA<sub>1</sub>.

41 evidence of the presence of the toxin during FPOs,<sup>7</sup> but are  
42 unable to discriminate between variants.

43 Mass spectrometry-based methods using the bottom-up  
44 strategy, in which the protein is digested into proteotypic  
45 peptides by trypsin,<sup>8–11</sup> are commonly employed for reliable  
46 quantification of bacterial toxins.<sup>12–14</sup> In this way, we recently  
47 reported the detection and quantification of several types of  
48 SEs by monitoring canonic peptides representative of the  
49 toxin.<sup>8</sup> Although the bottom-up assay was able to detect all  
50 reported sequence variants, identification and discrimination of  
51 the variant involved in the FPO was not achieved. Bottom-up  
52 assays are indeed not well suited for discrimination between  
53 sequence variants due to only partial sequence coverage and  
54 loss of information on sequence modifications.<sup>15</sup>

55 As an alternative, top-down or intact protein analysis delivers  
56 the most comprehensive information on the protein  
57 sequence<sup>16</sup> by direct measurement of the whole protein,  
58 revealing unexpected modifications, e.g., sequence variants or  
59 post-translational modifications. Also, avoiding the digestion  
60 by trypsin results in faster analytical protocols, a relevant  
61 consideration for poisonous biological toxins requiring early  
62 identification. Although improved performance of HRMS  
63 (high-resolution mass spectrometry) instruments has expanded  
64 the scope of applications,<sup>17–24</sup> top-down analysis is less  
65 sensitive when applied to medium-sized proteins with  
66 molecular weights of 25–30 kDa or above, due to signal  
67 dilution by multiple charging or strong ionization suppression  
68 in complex matrices.<sup>25</sup> Also, internal standard approaches to  
69 achieve absolute quantification are limited.<sup>23</sup> Consequently,  
70 the top-down approach has rarely been applied to absolute  
71 quantification of trace level proteins and was never reported for  
72 SE.

73 Considering top-down mass spectrometry most attractive for  
74 quantitative identification of toxins and sequence variants, we  
75 report on the development of such a method for SEA, the SE

most frequently involved in food-borne outbreaks. Keeping the  
aforesaid challenges in mind, top-down sensitivity was  
dramatically increased by combining optimized acquisition  
conditions on a high-resolution Orbitrap with prior affinity  
enrichment of the toxin. Following addition of a protein  
internal standard to the workflow, top-down quantification of  
SEA variants at trace level, down to 2.5 ng/mL, was achieved  
in culture supernatant or milk. Performance of the top-down  
assay was finally compared with conventional assays such as  
WGS, ELISA, and bottom-up mass spectrometry, using a panel  
of enterotoxin-producing strains isolated from food involved in  
SFPO. The results showed that the top-down assay was able to  
identify which variant was produced among all reported  
sequences of SEA and also achieved absolute quantification.

## METHODS

### Chemicals and Reagents

Phosphate-buffered saline (PBS), phosphate-buffered saline  
Tween 10X, sodium phosphate monobasic and dibasic,  
ammonium bicarbonate, sodium acetate, bovine serum  
albumin, dithiothreitol, iodoacetamide, analytical grade formic  
acid, hydrochloric acid, sodium hydroxide, disodium hydrogen  
phosphate, sodium chloride, and acetonitrile were from Sigma  
Chemical Co. (St. Louis, MO). RapiGest SF was from Waters  
Corporation (Milford, MA). Ultrapure water was obtained  
using a Milli-Q Plus purifier (Millipore, Bedford, MA).  
Dynabeads M-280 tosylactivated magnetic beads were from  
Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Sequencing grade  
modified trypsin was from Promega (Fitchburg, WI). Murine  
monoclonal antibodies (ab) ab<sub>SEA5</sub> and ab<sub>SEA7</sub> were  
produced in-house (CEA-LERI) as reported previously.<sup>7</sup> SEA  
toxin standard was obtained from Toxin Technology (Sarasota,  
FL) and previously characterized.<sup>8</sup> Brain heart infusion (BHI)  
medium was from Oxoid Thermo Fisher Scientific (Waltham, 108

109 MA). BHI was processed on 0.2  $\mu\text{m}$  filters 16534K from  
110 Sartorius (Göttingen, Germany).

#### 111 Safety Precaution

112 Experiments were performed with strict adherence to safety  
113 rules for the handling of toxic substances and using personal  
114 protection equipment. SEA contaminated solutions and  
115 consumables were inactivated overnight with 2 M NaOH.

#### 116 SEA Sequence Information

117 The Uniprot (<http://www.uniprot.org>) sequence entry of the  
118 SEA standard obtained from Toxin Technology was P0A0L2  
119 (SEA<sub>3</sub>), corresponding to the consensus sequence. The  
120 sequences of additional SEA variants produced during this  
121 study by overnight culture (SEA<sub>1</sub>, SEA<sub>2</sub>, and SEA<sub>4</sub>) are  
122 indicated in Figure 1. The molecular weights, i.e., mono-  
123 isotopic and average masses, are indicated in Table S1.

#### 124 Calibration and Quality Control Samples

125 Range and quality control samples (QCs) were prepared in  
126 BHI. SEA<sub>3</sub> standard (weight of 27 091 Da) was spiked in BHI  
127 at 0, 2.5, 5, 10, 25, and 100 ng/mL (corresponding to 92.3,  
128 185, 369, 923, and 3692 fmol/mL) in duplicate for the  
129 calibration samples. Five QCs were obtained by spiking SEA<sub>3</sub>  
130 at 25 ng/mL. SEA<sub>3</sub> was also spiked in quintuplet in  
131 semiskimmed milk at 25 ng/mL.

#### 132 Immunocapture

133 Ab\_SEA5 and Ab\_SEA7 antibodies were coupled separately to  
134 Dynabeads M-280 tosylactivated magnetic beads<sup>9,26</sup> with 16  
135  $\mu\text{L}$  (30 mg/mL) of beads for 4  $\mu\text{g}$  of antibody and incubated  
136 overnight in PBS. Incubation and washing steps were  
137 performed on a KingFisher Duo Prime robot (Thermo Fisher  
138 Scientific, Bremen, Germany). Incubation with the mix of  
139 beads was performed for 1 h at RT in 600  $\mu\text{L}$  of BHI or milk  
140 samples, 300  $\mu\text{L}$  of BHI supernatant from strain 13CEB193 as  
141 internal standard and 100  $\mu\text{L}$  of PBS-Tween 10 $\times$ . Successive  
142 bead washing with PBS-Tween 1 $\times$ , PBS, and pure water was  
143 performed before a final washing step with 300  $\mu\text{L}$  of ultrapure  
144 water. The dry beads were then resuspended in 20  $\mu\text{L}$  of the  
145 elution solution consisting of 80/20 water/acetonitrile  
146 containing 1% HCOOH and 0.002% bovine serum albumin,  
147 and mixed for 10 min at 1100 rpm.

#### 148 Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for

##### 149 Top-Down Quantification

150 LC-MS was performed with an Ultimate 3000 chromatography  
151 system coupled to a Q-Exactive (Quadrupole-Orbitrap) mass  
152 spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France).  
153 Protein separation was done on an ACQUITY UPLC Protein  
154 BEH C4 reverse-phase column (300A, 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  150  
155 mm, Waters Corporation Milford) maintained at 50  $^{\circ}\text{C}$  using a  
156 15 min gradient. The mobile phases consisted of water with  
157 0.1% formic acid (A) and ACN with 0.1% formic acid (B). An  
158 isocratic step at 5% phase B was followed by a gradient from 5  
159 to 50% phase B in 10 min with a mobile phase flow rate of 0.5  
160 mL/min, before equilibration for 5 min. Eluted SEA variants  
161 were introduced into the Q-Exactive instrument by an  
162 electrospray ionization source. The capillary voltage and  
163 temperature were set at 4 kV and 320  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. Data  
164 were acquired in the positive-ion mode, and the instrument  
165 was operated successively in full-scan HRMS mode and then in  
166 targeted PRM. Eight microliters were injected into the LC-MS  
167 system for both acquisitions. In the full-scan HRMS mode, the  
168 AGC target was set at  $1 \times 10^6$ , fill time at 256 ms and Orbitrap

resolution at 17 500 at  $m/z$  200 (full width at half-maximum, 169  
fwhm). The PRM mode targeted the three most abundant 170  
charge states (30+, 31+, 32+) at  $m/z$  901.4150, 872.3700, and  
845.1400, respectively (Table S2). The isolation mass window 172  
was fixed at 8  $m/z$  units for the simultaneous isolation of the  
SEA variants. The AGC target was set at  $1 \times 10^5$ , fill time at 174  
170 ms for each charge state, and Orbitrap resolution at 175  
140 000 at  $m/z$  200 (fwhm). Collision energies in the HCD 176  
cell were set at 18%. 177

#### Data Analysis

178  
179 Analysis of the HRMS data was based first on intensity of the  
deconvoluted signal. The signal from SEA was deconvoluted 180  
by Protein Deconvolution software v4.0 (Thermo Fisher 181  
Scientific, USA, Waltham) using 10 charge states and a mass 182  
tolerance of 20 ppm. The ratio with the intensity of the 183  
internal standard (SEA<sub>2</sub>) was then determined. Alternatively, 184  
the second processing method was performed using Xcalibur 185  
2.2 (Thermo Fisher Scientific, USA, Waltham) and based on 186  
the peak area of extracted-ion chromatogram (XIC) of the 3 187  
most intense charge states (30+, 31+, 32+) of each variant 188  
using a mass extraction window of 0.2  $m/z$ . The  $m/z$  values 189  
used are reported in Table S2. A ratio with area of the internal 190  
standard (SEA<sub>2</sub>) was calculated. Regarding the PRM 191  
acquisition, the XIC signals of 4 fragments ( $b_{11}^{2+}$ ,  $b_{18}^{4+}$ , 192  
 $b_{19}^{4+}$ ,  $b_{20}^{4+}$ ) common to SEA<sub>1,3,4</sub> variants, including the three 193  
main isotopes, were summed to increase the MS signal (Figure 194  
S1). Peak area ratio with the XIC signal of the internal 195  
standard (SEA<sub>2</sub>) was calculated. Quantification was based on 196  
external calibration curves prepared in BHI spiked with 197  
increasing concentrations of the SEA<sub>3</sub> standard and constant 198  
concentration of internal standard (SEA<sub>2</sub>). 199

#### 200 Identification of Genes Coding for Enterotoxin in *S. aureus* 201 Strains

202 WGS was performed as described previously in Merda et al.,  
2020.<sup>2</sup> Briefly, an in-house genomic tool (NAuRA) was used to  
203 identify staphylococcal enterotoxin genes in the *S. aureus*  
204 strains used in this study. 205

#### 206 Production of Toxins from Isolated *S. aureus* Strains

207 A total of 15 strains were isolated from food involved in  
staphylococcal food poisoning outbreaks (SFPOs) or from the  
208 reference strain collection (Table S3). The strains were  
209 incubated 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  on plate count agar milk. The  
210 bacterial colonies were then transferred into 40 mL of BHI at  
211 37  $^{\circ}\text{C}$  for 18 h. Centrifugation at 8000 rpm 15 min was  
212 performed to eliminate the bacterial pellet. The supernatant  
213 was filtered through a 20 mL syringe with a 0.2  $\mu\text{m}$  diameter  
214 filter before analysis. 215

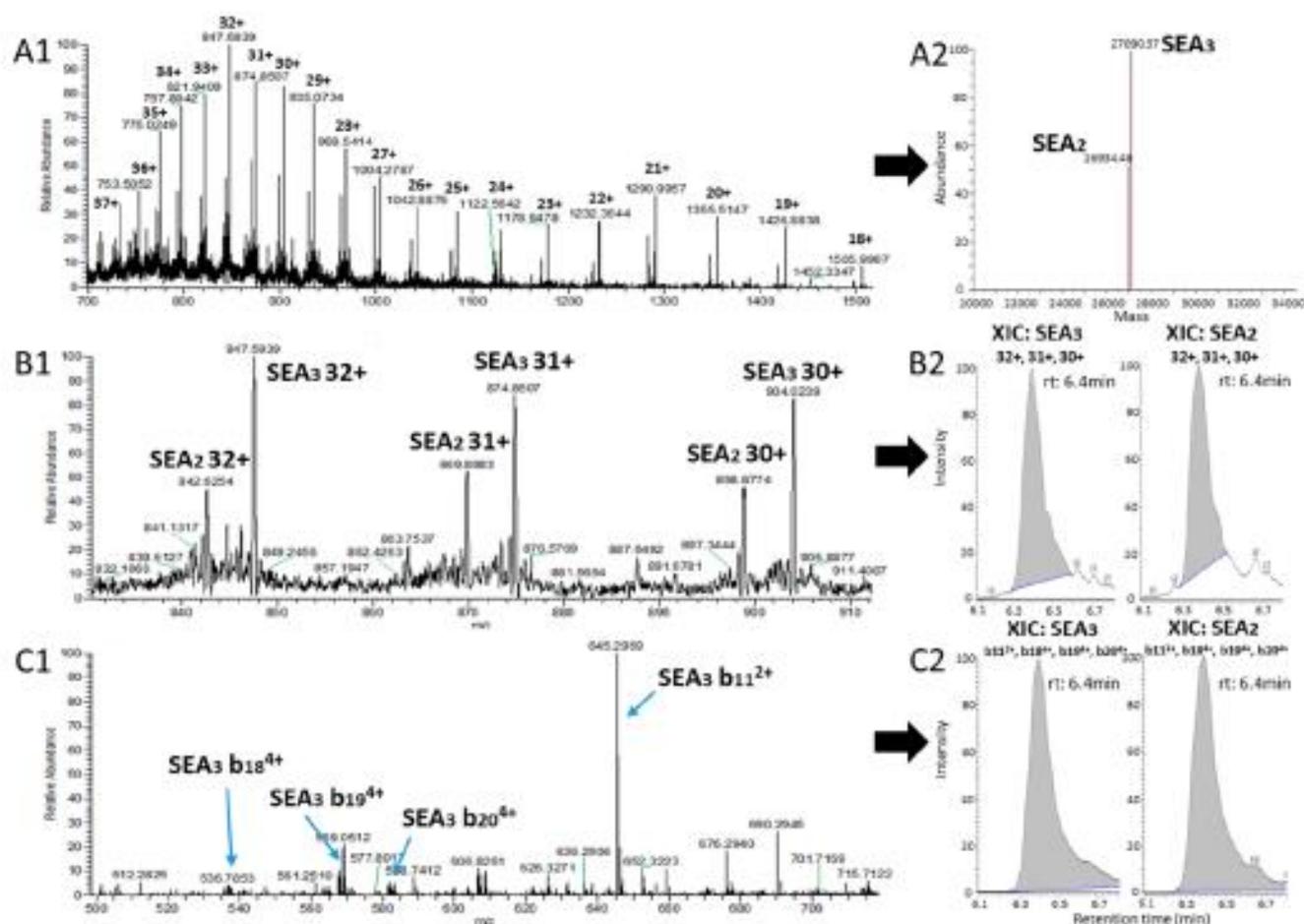
#### 216 ELISA and Bottom-Up Methods

217 The bottom-up analysis was performed as previously described  
218 by Lefebvre et al., 2021.<sup>8</sup> Briefly, after immunoaffinity  
219 enrichment, SEA was digested by trypsin and 3 peptides  
220 from SEA were detected by PRM. The ELISA protocol was  
221 also reported in Lefebvre et al., 2021.<sup>8</sup>

## 222 ■ RESULTS AND DISCUSSION

### 223 Development of the Top-Down Assay for SEA Variants

224 SEA, the most common SE recovered from SFPOs, was  
225 selected for development of the top-down method. SEA is  
226 typical of a medium-sized protein with a molecular weight of  
227 about 27 kDa. Eleven accession numbers are reported for the

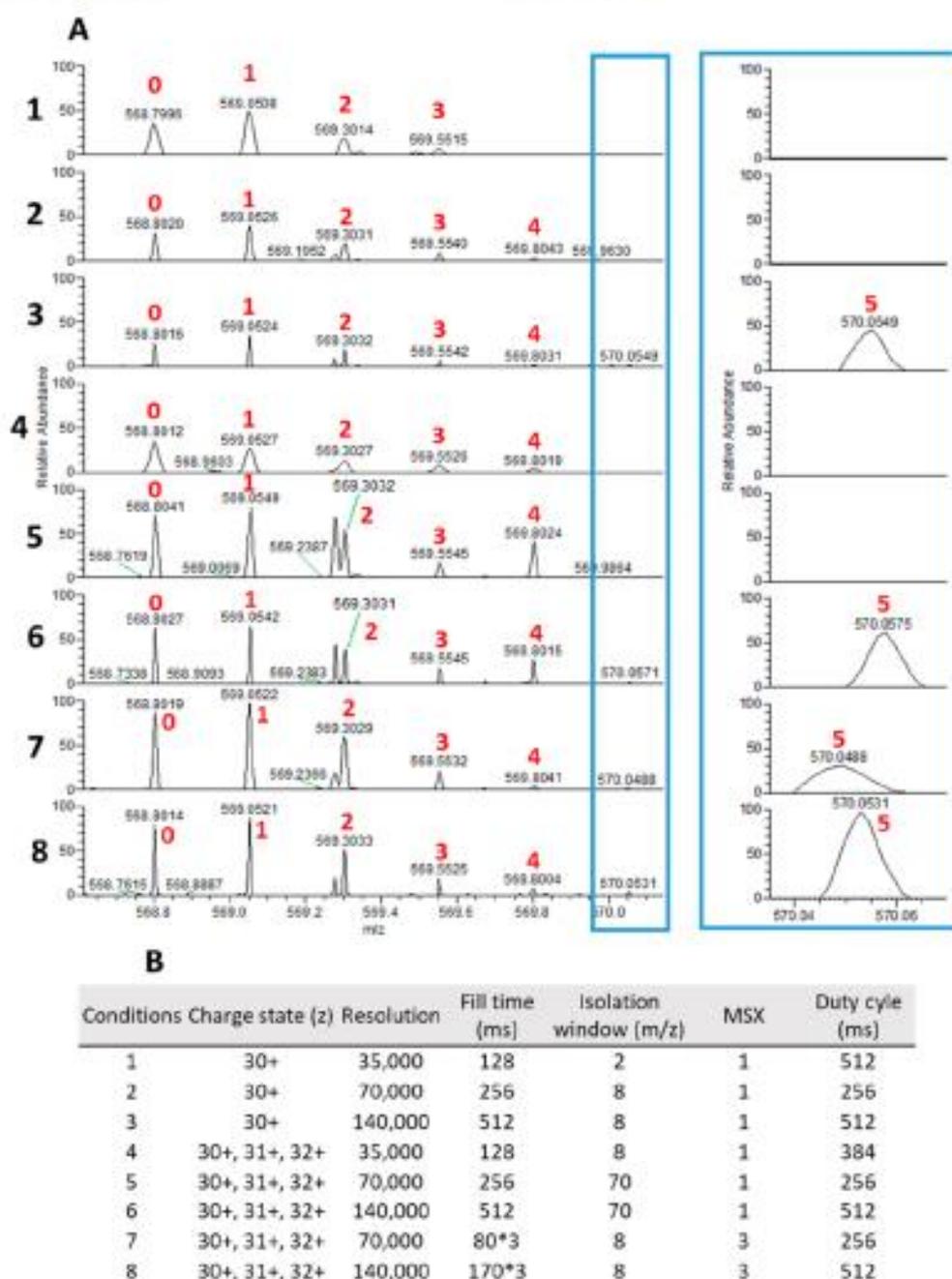


**Figure 2.** Full-scan HRMS and PRM analysis of SEA<sub>3</sub> with SEA<sub>2</sub> spiked as internal standard and data analysis. Signals corresponded to 25 ng/mL of SEA<sub>2</sub> and SEA<sub>3</sub>. A1: raw full-scan HRMS spectrum, A2: deconvoluted signal for SEA<sub>2</sub> and SEA<sub>3</sub>, B1: raw full-scan HRMS, zoom on the main charge states 30<sup>+</sup>/31<sup>+</sup>/32<sup>+</sup>, B2: summed signal after the XIC processing approach for SEA<sub>2</sub> and SEA<sub>3</sub>, C1: raw PRM spectrum at CE 18%, C2: summed signal of common fragments b11<sup>2+</sup>/b18<sup>4+</sup>/b19<sup>4+</sup>/b20<sup>4+</sup> for SEA<sub>2</sub> and SEA<sub>3</sub>.

228 SEA protein in the Uniprot database with sequence homology  
 229 between 98 and 100% (Table S1). Excluding the signal  
 230 peptide, differences in amino acids are located on positions 21,  
 231 60, 205, and 233, resulting in 4 distinct sequences (Figure S2).  
 232 In order to detect all variants, the method was evaluated using  
 233 one representative variant from each sequence. Thus, the  
 234 consensus sequence, i.e., POA0L2 and named SEA<sub>3</sub> in this  
 235 study, was obtained commercially as analytical standard. In  
 236 addition, we produced by overnight culture of SEA-producing  
 237 strains supplementary SEA sequences corresponding to the D  
 238 → N and Y → N amino acid substitutions at position 60 and  
 239 205, respectively (named SEA<sub>4</sub>) and the T → A substitution at  
 240 position 21 (named SEA<sub>1</sub>), as shown in Figure S2. Only the  
 241 sequence corresponding to the substitution at position 257 was  
 242 not available in our strain collection. An additional variant,  
 243 named SEA<sub>2</sub> and isolated by our group in a strain originating  
 244 from an outbreak that occurred in 2013 (Table S2, Figure S2)  
 245 was also included. The sequence homology of SEA<sub>3</sub> was 98.7%,  
 246 91.0%, 99.1% with SEA<sub>1</sub>, SEA<sub>2</sub>, SEA<sub>4</sub>, respectively (Table S1).  
 247 The SEA<sub>2</sub> variant has the lowest sequence homology with  
 248 SEA<sub>3</sub>, with up to 20 amino acids substitutions (Figure 1). In  
 249 comparison, the SEA<sub>1</sub> variant has a difference of only three  
 250 amino acids, and the SEA<sub>4</sub> variant has a difference of two  
 251 amino acids at the N-terminal and C-terminal, respectively.  
 252 Enrichment of SEA prior to mass spectrometry using specific  
 253 antibodies was considered as the most appropriate procedure

to reach low toxin amounts in bacteria culture medium or food  
 samples. Conditions were similar to those of our previous  
 work<sup>5</sup> using immunoaffinity enrichment by two specific  
 antibodies coated on magnetic beads. A mixture of monoclonal  
 antibodies with different epitopes was shown to be beneficial  
 for efficient capture of sequence variants<sup>8</sup> and this was verified  
 here by the detection of the four SEA variants in the culture  
 supernatant (Figure S3, Table S3). After capture and washing,  
 SEA was eluted from the beads by an optimized mixture of  
 water/acetonitrile (80/20) containing 1% HCOOH and  
 0.002% bovine serum albumin (Figure S4).

Full-scan HRMS intact protein analysis of the four SEA  
 variants after immunoaffinity enrichment identified four  
 distinct signals (Figure 2A Figure S5). The average mass of  
 each variant as determined by signal deconvolution matched  
 the sequence predicted by WGS (Figure S3). PRM analysis  
 was then performed on the 3 most intense charge states (i.e., z  
 = 30<sup>+</sup>, 31<sup>+</sup>, 32<sup>+</sup>, Figure 2B). Most of MS/MS fragments  
 observed in the PRM spectrum of the four variants were  
 attributed to b-ion fragments with some identical cleavage sites  
 corresponding to b<sub>11</sub>, b<sub>18</sub>, b<sub>19</sub>, b<sub>20</sub> fragment ions (Figure 2C,  
 Figure S1, Table S4). SEA<sub>1,3,4</sub> variants have similar N-terminal  
 sequences and produced b<sub>11</sub>, b<sub>18</sub>, b<sub>19</sub>, b<sub>20</sub> fragment ions with  
 the same m/z (Figure S1), and differed from the SEA<sub>2</sub> variant  
 by mutations at positions 8 and 13. Fragment y<sub>49</sub> was detected  
 in SEA<sub>4</sub> and SEA<sub>1</sub> (Table S4), but not in SEA<sub>2</sub> and SEA<sub>3</sub>, even



**Figure 3.** Optimization of acquisition parameters for PRM acquisition: (A) Representative results obtained with 25 ng/mL of SEA<sub>3</sub> for the b<sub>10</sub><sup>+4</sup> fragment. The maximum value corresponds to a signal intensity of 2.2 × 10<sup>5</sup>. Isotope number is indicated in red. The right frame is a zoom on the fifth isotope of the b<sub>10</sub><sup>+4</sup> fragment. Optimized conditions are indicated in (B).

280 though the signal intensity of the precursor ion was higher.  
 281 HCD dissociation produced the additional MS/MS fragments  
 282 b<sub>23</sub><sup>+</sup>, b<sub>66</sub><sup>+</sup>, and b<sub>90</sub><sup>+</sup> (Figure S6, Table S4) containing the N-  
 283 terminal differences in amino acids between SEA<sub>4</sub>/SEA<sub>3</sub> and  
 284 SEA<sub>1</sub>/SEA<sub>3</sub>, agreeing with the WGS results. Other fragmenta-  
 285 tion techniques such as electron transfer dissociation and  
 286 infrared multiphoton dissociation, which are known to produce  
 287 more informative MS/MS spectra,<sup>27–29</sup> could be beneficial for  
 288 amino acid sequence confirmation of the SEA<sub>2</sub> variant.

#### 289 Optimization of Acquisition Conditions for Intact SEA

290 Conditions of MS acquisition in the full-scan HRMS and PRM  
 291 modes were optimized for greater assay sensitivity. Orbitrap  
 292 resolution was modified for the full-scan HRMS acquisition  
 293 mode with the aim of obtaining the best signal with a sufficient

number of data points per peak. Resolutions at 17 500, 35 000 294  
 and 70 000 at 200 m/z were tested at a low concentration, i.e., 295  
 25 ng/mL of the SEA<sub>3</sub> standard spiked in BHI. A higher signal- 296  
 to-noise ratio was observed on our instrument at the lowest 297  
 resolution (Figure S7) and the resolution was fixed at 17 500. 298  
 Considering the higher specificity offered by MS/MS 299  
 fragmentation, PRM acquisition was then optimized. b<sub>11</sub><sup>2+</sup>, 300  
 b<sub>15</sub><sup>4+</sup>, b<sub>19</sub><sup>4+</sup>, and b<sub>20</sub><sup>4+</sup> fragments common to all reported SEA 301  
 variants, the rare SEA<sub>2</sub> variant excepted, were monitored. In 302  
 order to increase the signal-to-noise ratio, several acquisition 303  
 conditions were tested by modifying the Orbitrap resolution 304  
 and C-trap fill time, the width of the precursor ion isolation 305  
 window, acquisition in multiplex (MSX) or simplex mode, and 306  
 isolation of the main charge state, i.e., z = 30, or the three main 307 (3)

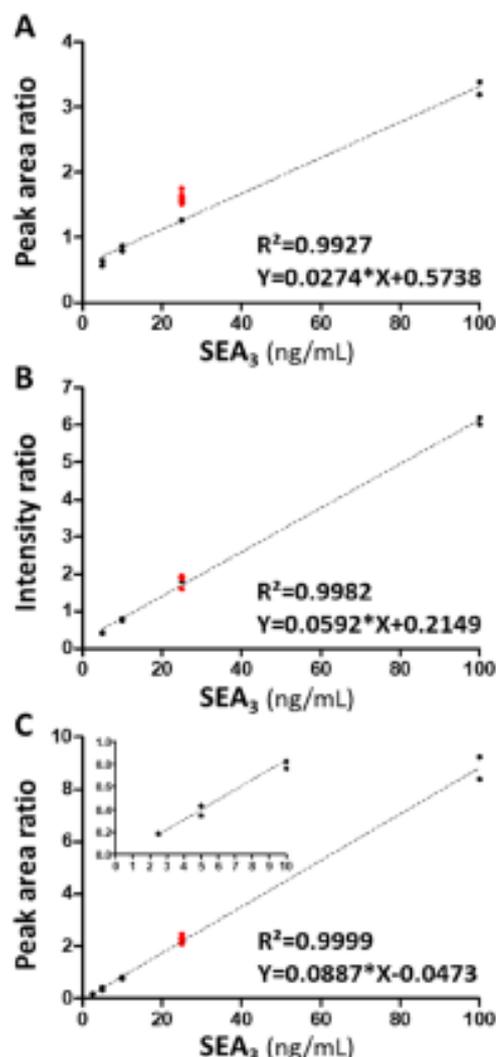
charge states, i.e.,  $z = 30$  to  $z = 32$  (Figure 3B). The representative signal of the  $b_{10}^{4+}$  fragment is illustrated under the eight evaluated conditions in Figure 3A. In condition 1, the quadrupole was isolating one precursor of interest at a time: the main charge state of each variant at  $z = 30$ . The four precursor ions corresponding to each variant (Table S2) were sequentially isolated, which required a resolution of 35 000 and fill time of 128 ms to cope with the requirement for the number of acquisition points. A broad isolation (8  $m/z$  units) was employed in conditions 2 and 3 for concomitant isolation of the four precursor ions, thus allowing a longer filling time and a higher resolution under the same duty cycle time between conditions 1 and 3. The minor isotope of  $b_{10}$  (isotope number 5) was detected with the longer filling time of 512 ms (Figure 3, condition 3). Increasing the resolution up to 70 000 or even 140 000 was also beneficial for assay specificity and allowed discrimination of isobaric MS/MS fragments (Figure 3, conditions 1 to 3). In condition 4, three main charge states, i.e.,  $z = 30$  to  $z = 32$ , of the four variants were sequentially isolated. Signals of the fragment ions were summed during data processing as each charge state produced intense signals of the four common fragments (Figure S8). Condition 4 resulted in a higher intensity compared to condition 1 with the similar fill time and resolution, as proven by the signal detected for isotope number 4 (Figure 3, conditions 1 and 4). In conditions 5 and 6, the isolation window was broadened further at 70  $m/z$  units for concomitant isolation of the three main charge states of the four variants. Concomitant isolation of three charge states resulted in a higher intensity of the fragments in comparison to the former sequential isolation (Figure 3, conditions 5 and 6), most probably due to the subsequent increase in fill time. However, the broadband selection of the precursors contributed to higher signal interference (Figure 3 conditions 5 and 6) and may lead to C-trap saturation. As an alternative, the generated fragment ions were combined in one single Orbitrap scan using the multiplex mode, after sequential isolation at 8  $m/z$  units of the three main charge states (Figure 3, conditions 7 and 8). These two last conditions gave a similar fragment intensity to conditions 5 and 6 while showing less interference (Figure 3, conditions 7 and 8). Condition 8, with the highest resolution and fill time, was selected.

Finally, an internal standard is necessary to compensate for analytical variations in any quantitative method. Spiking the internal standard before sample preparation is ideal in compensating for partial recovery during immunocapture or elution. We selected the  $SEA_2$  variant which was captured by the enrichment antibodies and eluted at the same retention time as the other variants in our LC conditions. A fixed amount of  $SEA_2$  was distributed in all samples before immunocapture and top-down mass spectrometry for assay standardization.

### Performance of the Method for Absolute Quantification of SEA

The method was then evaluated in terms of linearity, reproducibility and sensitivity using the  $SEA_3$  standard. Experiments were performed first in BHI culture medium, a protein-rich complex matrix.<sup>30</sup> A 5-point standard curve, i.e., 2.5, 5, 10, 25, and 100 ng/mL in duplicate, as well as five QCs spiked at 25 ng/mL, were analyzed using the full-scan HRMS and PRM modes to evaluate linearity and reproducibility. Data processing of the full-scan HRMS acquisition was based either on signal deconvolution of the multicharged MS spectra, i.e.,

the 10 charge states around the most abundant (Figure 2A), or on the summed XIC peak area of the three most abundant charge states ( $z = 30, 31, 32$ , Figure 2B), as suggested previously.<sup>23</sup> For the latter, a mass extraction window of 0.2  $m/z$  units was used to reduce signal interference (Figure 2B). The method using the XIC peak area approach after full-scan HRMS acquisition was not linear below 10 ng/mL, and bias of the QC at 25 ng/mL was found at 33.4% (CV: 6.6%) (Figure 4A, Table S5), which could be explained here by the residual



**Figure 4.** Representative linear standard curves for  $SEA_3$ .  $SEA_3$  was spiked in BHI at 5 concentrations in duplicate (black), ranging from 2.5 to 100 ng/mL and  $SEA_2$  (internal standard) was spiked at a constant concentration in each sample. Five quality controls (red) at 25 ng/mL were analyzed. Signals were normalized with  $SEA_2$ . (A) Standard curves obtained by full-scan HRMS, XIC processing approach. (B) Standard curve obtained by full-scan HRMS, signal deconvolution approach. (C) Standard curve obtained by PRM acquisition.

signal interference observed in our conditions. Signal deconvolution was more efficient and allowed quantification of the intact toxin down to 5 ng/mL and bias of the QC was 9.7% (CV: 7.8%) (Figure 4B). This result contrast with that of Lanshoeft et al., 2017,<sup>23</sup> where signal deconvolution was the least accurate approach for immunoglobulin quantification. However, the best results were obtained with the multiplex

Table 1. Identification of SEA Variants from 12 *S. aureus* Strains by Top-Down, Using Full-Scan HRMS and PRM<sup>a</sup>

	strain	strain 1	strain 2	strain 3	strain 4	strain 5	strain 6	strain 7	strain 8	strain 9	strain 10	strain 11	strain 12
	variant	SEA <sub>3</sub>	SEA <sub>3</sub>	SEA <sub>3</sub>	SEA <sub>3</sub>	SEA <sub>1</sub>	SEA <sub>3</sub>	SEA <sub>4</sub>	SEA <sub>4</sub>	SEA <sub>3</sub>	SEA <sub>3</sub>	SEA <sub>3</sub>	SEA <sub>1</sub>
Full-scan HRMS and Deconvolution	Accuracy (ppm)	-2.21	7.75	-11.07	-7.75	-0.37	0	-3.33	6.66	-9.97	-4.06	-2.21	7.03
Variant common PRM fragments (Quantification)	D11 (b <sub>11</sub> )	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	L18 (b <sub>18</sub> )	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Q19 (b <sub>19</sub> )	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	G20 (b <sub>20</sub> )	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Variant specific PRM fragments (Identification)	T21 (b <sub>21</sub> )	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	
	T21A (b <sub>21</sub> )					X							X
	T21/D60 (b <sub>66</sub> )	X	X	X	X		X			X	X	X	
	T21/D60N (b <sub>66</sub> )							ND	ND				
	T21A/D60N (b <sub>66</sub> )					X							X
	Y205N (y <sub>49</sub> )					X		X	X				X

<sup>a</sup>Molecular weight determined by signal deconvolution of the full-scan HRMS spectrum and recalibration with the internal standard was matched (mass accuracy in ppm) with the sequence predicted by whole genome sequencing (WGS). X indicates detection of the PRM fragments in agreement with the amino acid changes predicted by WGS. ND: not detected.

PRM mode showing linearity down to 2.5 ng/mL and QC bias of 5.5% (CV: 5.8%) (Figure 4C, Table S5), in line with the recommendations for the validation of bioanalytical methods.<sup>31</sup> In this mode, the PRM signals of b<sub>11</sub><sup>2+</sup>, b<sub>18</sub><sup>4+</sup>, b<sub>19</sub><sup>4+</sup>, and b<sub>20</sub><sup>4+</sup> fragments, which are common to the SEA<sub>1,3,4</sub> variants, were summed to increase the signal.

Interestingly, we determined the relative abundance of the 4 common fragment ions b<sub>11</sub><sup>2+</sup>, b<sub>18</sub><sup>4+</sup>, b<sub>19</sub><sup>4+</sup>, and b<sub>20</sub><sup>4+</sup> in all the calibration and QC samples (Table S6). Variation of the relative abundance of the 4 common fragments was low, at or below 20% (Table S6). Relative abundance of the fragment obtained could therefore be used for specificity evaluation, by similarity with bottom-up quantification.<sup>32</sup>

Further evaluation of the method was conducted with the reference matrix milk, which is regularly involved in SFPOs. For this purpose, negative controls and five QCs spiked at 25 ng/g with purified SEA<sub>3</sub> were analyzed in milk. No signal was detected in the blank milk, except with the full-scan HRMS/XIC approach showing signal interference, as previously observed in BHI medium (Table S5). Satisfactory CV% were determined, at 5.3% and 6.7% with the full-scan HRMS/deconvolution mode and the PRM mode, respectively. CV% was higher (19.5%) with full-scan HRMS/XIC. No significant matrix effect was observed with milk and BHI, with bias of between 14% and 18% in the QC in milk, compared to the QC in BHI, whatever the acquisition mode (Table S5). Interestingly, fragment ion abundances determined by the PRM mode in milk were similar to those in the BHI medium, showing no impact of the matrix (Table S6). The top-down MS method was therefore successfully evaluated for absolute quantification of SEA in BHI medium and milk. PRM was two times more sensitive than full-scan HRMS with deconvolution. Also, monitoring fragment ion abundance by PRM could be used to confirm identification of SEA. The PRM mode was therefore selected for specific absolute quantification, while full-scan HRMS acquisition was nevertheless performed in

parallel for determination of the exact molecular weight of the SEA variant.

#### Identification, Differentiation, and Absolute Quantification of SEA Variants by Top-Down MS, in Parallel to WGS, ELISA, and Bottom-Up MS

The intact method running successively with the full-scan HRMS and the PRM acquisition was further evaluated for identification, differentiation and absolute quantification of SEA variants produced by strains of *S. aureus* (Table S3). Twelve SEA-producing strains isolated from SFPO samples were included, as well as the commercially available reference strain 42A. WGS combined with NARA<sup>2</sup> identified the four SEA variants, i.e., SEA<sub>1,2,3,4</sub> in the SEA-producing strains. The SEA<sub>3</sub> variant was found in eight strains while the SEA<sub>1</sub> and SEA<sub>4</sub> variants were found in two strains. Only strain 13CEB193 contained SEA<sub>2</sub>. Strains producing other types of enterotoxins with high homology to SEA, i.e., SEE (accession number P12993, 83.7% homology) and SEP (accession number A0A075M4C7, 79.0% homology) (Figure S9), were also tested as negative controls to evaluate method specificity.

SEA was detected in all strains using the full-scan HRMS and PRM modes (Table 1). SEE and SEP were not detected as expected, which confirmed method specificity. (Table S7). In all strains, the method confirmed at the protein level the sequence of the SEA variant produced. First, signal deconvolution after full-scan HRMS acquisition was in agreement with the molecular weight predicted by WGS as illustrated by mass accuracies between 0 and 12 ppm (Table 1). Second, PRM acquisition identified the variant-specific fragments, i.e., the informative fragments of the amino acid changes in variants (Table 1) (Figure S10). N-terminal b<sub>21</sub> and b<sub>66</sub> fragments were detected in all strains, except in strains with variant SEA<sub>4</sub> where fragment b<sub>66</sub> with the single D → N substitution was not identified. Similarly, fragment y<sub>49</sub> was not detected in strains with the N → Y amino acid substitution. Globally, exact molecular measurement and PRM provided

458 complementary information for variant identification, in  
459 agreement with WGS.

460 The commercially available SEA<sub>3</sub> standard was used for  
461 preparation of external calibration standards in the objective of  
462 absolute quantification. Sequence differences between SEA  
463 variants could impact ionization or immunocapture efficiency.  
464 High purity standard of each SEA variants would be necessary  
465 to further evaluate ionization and immunocapture efficiency.  
466 Nevertheless, the top-down assay using the PRM mode  
467 provided SEA concentrations in agreement with a bottom-up  
468 proteomic workflow previously reported in Lefebvre et al.,  
469 2021,<sup>8</sup> and an ELISA assay. A good linear correlation was  
470 observed either with the peptide-based quantification or ELISA  
471 with an  $r^2$ -value of 0.89 and 0.90, respectively, and  $p$ -values  
472 below 0.0001 (Figure 5A). Slopes were respectively 1.18 and  
473 1.01, showing perfect agreement with ELISA (Figure 5A), and  
474 SEA concentrations were slightly higher when measured by the  
475 bottom-up method. Nonetheless, all SEA concentrations were  
476 located within the 95% limits of agreement (from -41.1 to  
477 58.0 ng/mL, with a mean at 8.43 ng/mL) between both

478 methods (Figure 5B). We therefore assumed efficient  
479 quantification by top-down using the commercially available  
480 SEA<sub>3</sub> standard for calibration and SEA<sub>2</sub> as internal standard,  
481 despite potential variation of immunocapture recovery and  
482 electrospray ionization between sequence variants. It should be  
483 noted that the use of the SEA<sub>2</sub> variant as internal standard in  
484 the study precluded quantification of this variant.

485 Relative fragment ion abundances were determined by PRM  
486 acquisition in all strains (Table S5). Most importantly,  
487 fragment abundances were conserved between the different  
488 SEA<sub>1,3,4</sub> variants with variability below 20%, and at a similar  
489 level to the SEA<sub>3</sub> standard (Table S6). This result further  
490 shows the relevance of fragment abundances as identification  
491 criteria in top-down analysis of SEA, in addition to alignment  
492 of retention time (Figure S11) with the internal standard and  
493 exact fragment ion mass measurement. Globally, with the panel  
494 of SEA-producing *S. aureus* strains we confirmed the relevance  
495 of the intact protein assay using PRM acquisition for specific  
496 and sensitive absolute quantification, in agreement with  
497 bottom-up and ELISA methods. Identifications by full-scan  
498 HRMS and variant-specific PRM fragments were in agreement  
499 with the WGS result. The results show the complementarity  
500 between the full-scan HRMS and PRM acquisitions for both  
501 identification and absolute quantification of SEA variants.

## 502 CONCLUSION

503 We have developed a top-down mass spectrometry assay  
504 providing both identification of the variant produced, among  
505 all reported sequences of SEA, and precise determination of  
506 the toxin level at low ng/mL in complex matrices. Optimized  
507 full-scan HRMS and PRM acquisition modes were evaluated  
508 on a panel of variants representative of the sequence diversity  
509 reported in Uniprot for SEA. The method could be also  
510 applied to variants with much lower sequence homology such  
511 as the SEA<sub>2</sub> variant, which was used as internal standard in the  
512 study. Indeed, a mixture of 2 monoclonal antibodies was used  
513 for efficient capture of diverse sequence variants, including  
514 SEA<sub>2</sub>. The targeted acquisition by PRM can be easily adjusted  
515 depending on amino acid substitutions, notably in the N-  
516 terminal sequence at position 20 or below. In this study, we  
517 showed that full-scan HRMS and PRM acquisition modes  
518 deliver complementary information for identification, differ-  
519 entiation, and absolute quantification of SEA variants in  
520 unknown samples. Full-scan HRMS acquisition with signal  
521 deconvolution provided the exact molecular weight of the  
522 variant, in line with the predicted sequence by WGS, while  
523 PRM produced fragment ions informative of the variant  
524 sequences. Identification of the variant involved in SFPOs is an  
525 additional value of the top-down method, which confirms at  
526 the protein level the presence of a new sequence variant and  
527 ensures detection of all potential variants. The method could  
528 also support tracking of the incriminated food. Up to now, only  
529 WGS identifies mutations in the *se* genes, but WGS does not  
530 provide direct evidence of the presence of the toxin. In  
531 addition to variant identification and differentiation, the new  
532 top-down assay provided absolute quantification of the toxin  
533 level. In this aim, the multiplex PRM mode was the most  
534 sensitive and accurate acquisition mode. Moreover, an  
535 additional level of specificity was obtained by monitoring the  
536 relative abundance of the PRM fragment ions. Repeatability of  
537 the top-down assay was in line with the recommendation for  
538 quantitative bioanalytical methods, and measured concen-  
539 trations matched with conventional bottom-up mass spec-

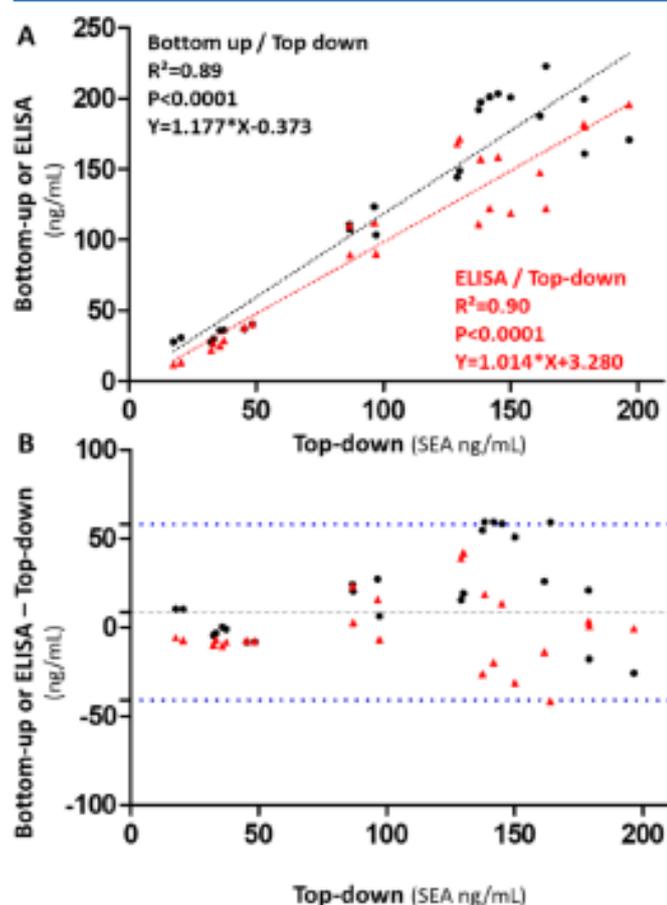


Figure 5. Comparison of the top-down quantification with ELISA and bottom-up in 12 SEA-producing strains. (A) Correlations obtained between bottom-up (●), ELISA (▲), and top-down for quantification of SEA with linear regression (dashed black and red line). (B) Mean of difference between the three methods using the Bland–Altman test. The difference in values ( $y$ -axis) obtained by the two methods was plotted according to the value measured by the top-down method: comparison of top-down to bottom-up (●) and ELISA (▲). The 95% limits of agreement by the Bland–Altman test are shown (dashed blue lines, mean  $\pm$ 1.96 standard deviation). All samples were analyzed in duplicate ( $n = 24$  in total).

540 trometry and ELISA. Importantly, the absence of digestion by  
541 trypsin increased the assay throughput for a fast answer on the  
542 presence of the toxin in a sample. In the end, we have  
543 illustrated with enterotoxin-producing strains isolated from  
544 SFPO the analytical benefit of the top-down mass spectrom-  
545 etry over conventional WGS, ELISA, or bottom-up assay,  
546 allowing variant identification and precise quantification at the  
547 same time. Top-down MS was developed here for SEA as a  
548 proof-of-concept study and could be extended to the other SE  
549 types. A full analytical validation would be needed before  
550 implementation in food analysis laboratories to support SE  
551 identification and quantification in SFPO samples, as an  
552 alternative or complementary approach to WGS and ELISA.

## 553 ■ ASSOCIATED CONTENT

### 554 ● Supporting Information

555 The Supporting Information is available free of charge at  
556 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.1c00886>.

557 Figure S1: Fragments selected for quantification by  
558 PRM; Figure S2: Sequence alignment between all  
559 accession numbers available in Uniprot; Figure S3:  
560 Deconvoluted signal of the 4 SEA variants after full-scan  
561 HRMS acquisition; Figure S4: Workflow for absolute  
562 quantification of SEA and variants; Figure S5: Full-  
563 HRMS spectrum before deconvolution of SEA<sub>1</sub> and  
564 SEA<sub>4</sub>; Figure S6: PRM spectrum of SEA3 standard with  
565 assignment of fragment ions; Figure S7: Full-scan  
566 HRMS spectrum of SEA3 at a resolution of 17 500  
567 and 35 000; Figure S8: The 4 common PRM fragment  
568 ions used for quantification; Figure S9: Sequence  
569 alignment between the SEA3/SEP/SEE<sub>3</sub>; Figure S10:  
570 PRM showing the mutation at amino acid 21 of the  
571 SEA<sub>1</sub> variant; Figure S11: XIC Signal of fragments b<sub>11</sub><sup>2+</sup>/  
572 b<sub>18</sub><sup>+</sup>/b<sub>19</sub><sup>+</sup>/b<sub>20</sub><sup>+</sup> from SEA<sub>1-4</sub>; Table S1: Representative  
573 all accession numbers available in Uniprot; Table S2: m/  
574 z of the main charge states of SEA<sub>1-4</sub> and mass  
575 extraction window; Table S3: *Staphylococcus aureus*  
576 strains used in the study; Table S4: Fragments identified  
577 for each SEA variant following PRM acquisition; Table  
578 S5: Method evaluation in BHI and milk; Table S6:  
579 Relative abundance of the fragment ions observed for  
580 each variant; Table S7: Quantitative analysis of SEA  
581 toxin in supernatants of 13 SEA-producing *S. aureus*  
582 (PDF)

## 583 ■ AUTHOR INFORMATION

### 584 Corresponding Author

585 **François Becher** – Université Paris-Saclay, CEA, INRAE,  
586 Département Médicaments et Technologies pour la Santé  
587 (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France; [orcid.org/0000-0002-1075-9980](https://orcid.org/0000-0002-1075-9980);  
588 Phone: +33 1 69 08 13 15;  
589 Email: [francois.becher@cea.fr](mailto:francois.becher@cea.fr)

### 590 Authors

591 **Donatien Lefebvre** – Université Paris-Saclay, CEA, INRAE,  
592 Département Médicaments et Technologies pour la Santé  
593 (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France; Laboratory for  
594 Food Safety, French Agency for Food, Environmental and  
595 Occupational Health & Safety (ANSES), Université Paris-  
596 Est, 94700 Maisons-Alfort, France

597 **François Fenaille** – Université Paris-Saclay, CEA, INRAE,  
598 Département Médicaments et Technologies pour la Santé

(DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France; [orcid.org/0000-0001-6787-4149](https://orcid.org/0000-0001-6787-4149)

599  
600  
601 **Déborah Merda** – Laboratory for Food Safety, French Agency  
602 for Food, Environmental and Occupational Health & Safety  
603 (ANSES), Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort,  
604 France

605 **Kevin Blanco-Valle** – Laboratory for Food Safety, French  
606 Agency for Food, Environmental and Occupational Health &  
607 Safety (ANSES), Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort,  
608 France

609 **Cécile Feraudet-Tarisse** – Université Paris-Saclay, CEA,  
610 INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la  
611 Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

612 **Stéphanie Simon** – Université Paris-Saclay, CEA, INRAE,  
613 Département Médicaments et Technologies pour la Santé  
614 (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

615 **Jacques-Antoine Hennekinne** – Laboratory for Food Safety,  
616 French Agency for Food, Environmental and Occupational  
617 Health & Safety (ANSES), Université Paris-Est, 94700  
618 Maisons-Alfort, France

619 **Yacine Nia** – Laboratory for Food Safety, French Agency for  
620 Food, Environmental and Occupational Health & Safety  
621 (ANSES), Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort,  
622 France

623 Complete contact information is available at:

624 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.1c00886>

## 625 Notes

626 The authors declare no competing financial interest.

627 All data for this study are provided in a public repository. Data  
628 can be downloaded from PASSEL (Peptide Atlas) at <ftp://PASS01710:TE9358fgj@ftp.peptideatlas.org/>. Data set Identifier:  
629 PASS01710.  
630

## 631 ■ ACKNOWLEDGMENTS

632 This project was supported by the Joint Ministerial Program of  
633 R&D against CBRNE Risks.

## 634 ■ REFERENCES

- 635 (1) The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2021**, *19* (2), e06406. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6406.
- 636 (2) Merda, D.; Felten, A.; Vingadassalon, N.; Denayer, S.; Titouche, Y.; Decastelli, L.; Hickey, B.; Kourtis, C.; Daskalov, H.; Mistou, M.-Y.; Hennekinne, J.-A. NAURA: Genomic Tool to Identify Staphylococcal Enterotoxins in *Staphylococcus Aureus* Strains Responsible for FoodBorne Outbreaks. *Front Microbiol.* **2020**, *11*, 1483.
- 642 (3) Hennekinne, J.-A.; De Buyser, M.-L.; Dragacci, S. *Staphylococcus Aureus* and Its Food Poisoning Toxins: Characterization and Outbreak Investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36* (4), 815–836.
- 646 (4) Chieffi, D.; Fanelli, F.; Cho, G.-S.; Schubert, J.; Blaiotta, G.; Franz, C. M. A. P.; Bania, J.; Fusco, V. Novel Insights into the Enterotoxigenic Potential and Genomic Background of *Staphylococcus Aureus* Isolated from Raw Milk. *Food Microbiol.* **2020**, *90*, 103482.
- 651 (5) Aung, M. S.; Urushibara, N.; Kawaguchiya, M.; Ito, M.; Habadera, S.; Kobayashi, N. Prevalence and Genetic Diversity of Staphylococcal Enterotoxin (-Like) Genes *Sey*, *Selw*, *Selx*, *Selz*, *Sel26* and *Sel27* in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Toxins* **2020**, *12* (5), 347.
- 656 (6) Kwong, J. C.; McCallum, N.; Sintchenko, V.; Howden, B. P. Whole Genome Sequencing in Clinical and Public Health Microbiology. *Pathology (Phila.)* **2015**, *47* (3), 199–210.

- 659 (7) Féraudet Tarrise, C.; Goulard-Huet, C.; Nia, Y.; Devilliers, K.;  
660 Marcé, D.; Dambrune, C.; Lefebvre, D.; Hennekinne, J.-A.; Simon, S.  
661 Highly Sensitive and Specific Detection of Staphylococcal Enter-  
662 otoxins SEA, SEG, SEH, and SEI by Immunoassay. *Toxins* **2021**, *13*  
663 (2), 130.
- 664 (8) Lefebvre, D.; Blanco-Valle, K.; Féraudet-Tarrise, C.; Merda, D.;  
665 Simon, S.; Fenaile, F.; Hennekinne, J.-A.; Nia, Y.; Becher, F.  
666 Quantitative Determination of *Staphylococcus Aureus* Enterotoxins  
667 Types A to I and Variants in Dairy Food Products by Multiplex  
668 Immuno-LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (8), 2603–2610.
- 669 (9) Hansbauer, E.-M.; Worbs, S.; Volland, H.; Simon, S.; Junot, C.;  
670 Fenaile, F.; Dorner, B. G.; Becher, F. Rapid Detection of Abrin Toxin  
671 and Its Isoforms in Complex Matrices by Immuno-Extraction and  
672 Quantitative High Resolution Targeted Mass Spectrometry. *Anal.*  
673 *Chem.* **2017**, *89* (21), 11719–11727.
- 674 (10) Kalb, S. R.; Schieltz, D. M.; Becher, F.; Astot, C.; Fredriksson,  
675 S.-Å.; Barr, J. R. Recommended Mass Spectrometry-Based Strategies  
676 to Identify Ricin-Containing Samples. *Toxins* **2015**, *7* (12), 4881–  
677 4894.
- 678 (11) Fredriksson, S.-Å.; Artursson, E.; Bergström, T.; Östin, A.;  
679 Nilsson, C.; Astot, C. Identification of RIP-II Toxins by Affinity  
680 Enrichment, Enzymatic Digestion and LC-MS. *Anal. Chem.* **2015**, *87*  
681 (2), 967–974.
- 682 (12) Kalb, S. R.; Krilich, J. C.; Dykes, J. K.; Lúquez, C.; Maslanka, S.  
683 E.; Barr, J. R. Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F in Foods  
684 by Endopep-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (4), 1133–1141.
- 685 (13) Wang, D.; Baudys, J.; Rees, J.; Marshall, K. M.; Kalb, S. R.;  
686 Parks, B. A.; Nowaczyk, L.; Pirkle, J. L.; Barr, J. R. Subtyping  
687 Botulinum Neurotoxins by Sequential Multiple Endoproteases In-Gel  
688 Digestion Coupled with Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*  
689 (11), 4652–4658.
- 690 (14) Kalb, S. R.; Baudys, J.; Rees, J. C.; Smith, T. J.; Smith, L. A.;  
691 Helma, C. H.; Hill, K.; Kull, S.; Kirchner, S.; Dorner, M. B.; Dorner,  
692 B. G.; Pirkle, J. L.; Barr, J. R. De Novo Subtype and Strain  
693 Identification of Botulinum Neurotoxin Type B through Toxin  
694 Proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (1), 215–226.
- 695 (15) Janssen, K. A.; Coradin, M.; Lu, C.; Sidoli, S.; Garcia, B. A.  
696 Quantitation of Single and Combinatorial Histone Modifications by  
697 Integrated Chromatography of Bottom-up Peptides and Middle-down  
698 Polypeptide Tails. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30* (12), 2449–  
699 2459.
- 700 (16) Moradian, A.; Kalli, A.; Sweredoski, M. J.; Hess, S. The Top-  
701 down, Middle-down, and Bottom-up Mass Spectrometry Approaches  
702 for Characterization of Histone Variants and Their Post-Translational  
703 Modifications. *PROTEOMICS* **2014**, *14* (4–5), 489–497.
- 704 (17) Vilà-Rico, M.; Colomé-Calls, N.; Martín-Castel, L.; Gay, M.;  
705 Azorin, S.; Vilaseca, M.; Planas, A.; Canals, F. Quantitative Analysis of  
706 Post-Translational Modifications in Human Serum Transthyretin  
707 Associated with Familial Amyloidotic Polyneuropathy by Targeted  
708 LC-MS and Intact Protein MS. *J. Proteomics* **2015**, *127*, 234–246.
- 709 (18) Forstenlehner, I. C.; Holzmann, J.; Toll, H.; Huber, C. G. Site-  
710 Specific Characterization and Absolute Quantification of Pegfilgrastim  
711 Oxidation by Top-Down High-Performance Liquid Chromatogra-  
712 phy–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (18), 9336–9343.
- 713 (19) Fang, H.; Xiao, K.; Li, Y.; Yu, F.; Liu, Y.; Xue, B.; Tian, Z.  
714 Intact Protein Quantitation Using Pseudoisobaric Dimethyl Labeling.  
715 *Anal. Chem.* **2016**, *88* (14), 7198–7205.
- 716 (20) Havlikova, J.; Randall, E. C.; Griffiths, R. L.; Swales, J. G.;  
717 Goodwin, R. J. A.; Bunch, J.; Styles, I. B.; Cooper, H. J. Quantitative  
718 Imaging of Proteins in Tissue by Stable Isotope Labeled Mimetic  
719 Liquid Extraction Surface Analysis Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*  
720 **2019**, *91* (22), 14198–14202.
- 721 (21) dos Santos Seckler, H.; Park, H.-M.; Lloyd-Jones, C. M.;  
722 Melani, R. D.; Camarillo, J. M.; Wilkins, J. T.; Compton, P. D.;  
723 Kelleher, N. L. New Interface for Faster Proteoform Analysis:  
724 Immunoprecipitation Coupled with SampleStream-Mass Spectrome-  
725 try. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2021**, *32*, 1659.
- 726 (22) Sospedra, I.; Soler, C.; Mañes, J.; Soriano, J. M. Rapid Whole  
727 Protein Quantitation of Staphylococcal Enterotoxins A and B by  
Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *728*  
1238, 54–59. 729
- (23) Lanshoeft, C.; Cianferani, S.; Heudi, O. Generic Hybrid Ligand  
730 Binding Assay Liquid Chromatography High-Resolution Mass  
731 Spectrometry-Based Workflow for Multiplexed Human Immunoglo-  
732 bulin G1 Quantification at the Intact Protein Level: Application to  
733 Preclinical Pharmacokinetic Studies. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (4), 2628–  
734 2635. 735
- (24) Chen, Y.; Mao, P.; Wang, D. Quantitation of Intact Proteins in  
736 Human Plasma Using Top-Down Parallel Reaction Monitoring-MS.  
737 *Anal. Chem.* **2018**, *90* (18), 10650–10653. 738
- (25) Cupp-Sutton, K. A.; Wu, S. High-Throughput Quantitative  
739 Top-down Proteomics. *Mol. Omics* **2020**, *16* (2), 91–99. 740
- (26) Dupré, M.; Gilquin, B.; Fenaile, F.; Féraudet-Tarrise, C.; Dano,  
741 J.; Ferro, M.; Simon, S.; Junot, C.; Brun, V.; Becher, F. Multiplex  
742 Quantification of Protein Toxins in Human Biofluids and Food  
743 Matrices Using Immunoextraction and High-Resolution Targeted  
744 Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (16), 8473–8480. 745
- (27) Bourgoin-Voillard, S.; Leymarie, N.; Costello, C. E. Top-down  
746 Tandem Mass Spectrometry on RNase A and B Using a Qh/FT-ICR  
747 Hybrid Mass Spectrometer. *PROTEOMICS* **2014**, *14* (10), 1174–  
748 1184. 749
- (28) Hogan, J. M.; Pitteri, S. J.; Chrisman, P. A.; McLuckey, S. A.  
750 Complementary Structural Information from a Tryptic N-Linked  
751 Glycopeptide via Electron Transfer Ion/Ion Reactions and Collision-  
752 Induced Dissociation. *J. Proteome Res.* **2005**, *4* (2), 628–632. 753
- (29) Shaw, J. B.; Madsen, J. A.; Xu, H.; Brodbelt, J. S. Systematic  
754 Comparison of Ultraviolet Photodissociation and Electron Transfer  
755 Dissociation for Peptide Anion Characterization. *J. Am. Soc. Mass*  
756 *Spectrom.* **2012**, *23* (10), 1707–1715. 757
- (30) *Handbook of Microbiological Media*, 3rd ed.; CRC Press: Boca  
758 Raton, 2004. DOI: 10.1201/9781420039726. 759
- (31) Jenkins, R.; Duggan, J. X.; Aubry, A.-F.; Zeng, J.; Lee, J. W.;  
760 Cojocaru, L.; Duffield, D.; Garofolo, F.; Kaur, S.; Schultz, G. A.; Xu,  
761 K.; Yang, Z.; Yu, J.; Zhang, Y. J.; Vazvaei, F. Recommendations for  
762 Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein  
763 Biotherapeutics. *AAPS J.* **2015**, *17* (1), 1–16. 764
- (32) Carr, S. A.; Abbatiello, S. E.; Ackermann, B. L.; Borchers, C.;  
765 Domon, B.; Deutsch, E. W.; Grant, R. P.; Hoofnagle, A. N.;  
766 Hüttenhain, R.; Koomen, J. M.; Liebler, D. C.; Liu, T.; MacLean, B.;  
767 Mani, D.; Mansfield, E.; Neubert, H.; Paulovich, A. G.; Reiter, L.;  
768 Vitek, O.; Aebersold, R.; Anderson, L.; Bethem, R.; Blonder, J.; Boja,  
769 E.; Botelho, J.; Boyne, M.; Bradshaw, R. A.; Burlingame, A. L.; Chan,  
770 D.; Keshishian, H.; Kuhn, E.; Kinsinger, C.; Lee, J. S. H.; Lee, S.-W.;  
771 Moritz, R.; Oses-Prieto, J.; Rifai, N.; Ritchie, J.; Rodriguez, H.;  
772 Srinivas, P. R.; Townsend, R. R.; Van Eyk, J.; Whiteley, G.; Wiita, A.;  
773 Weintraub, S. Targeted Peptide Measurements in Biology and  
774 Medicine: Best Practices for Mass Spectrometry-Based Assay  
775 Development Using a Fit-for-Purpose Approach\*. *Mol. Cell.*  
776 *Proteomics* **2014**, *13* (3), 907–917. 777

## SUPPORTING INFORMATION

### Top-down mass spectrometry for trace level quantification of staphylococcal enterotoxin A variants

Donatien Lefebvre<sup>1,2</sup>, François Fenaille<sup>1</sup>, Déborah Merda<sup>2</sup>, Kevin Blanco-Valle<sup>2</sup>, Cécile Feraudet-Tarisse<sup>1</sup>, Stéphanie Simon<sup>1</sup>, Jacques-Antoine Hennekinne<sup>2</sup>, Yacine Nia<sup>2</sup>, François Becher<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

<sup>2</sup> Laboratory for Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France.

\*Corresponding author: [francois.becher@cea.fr](mailto:francois.becher@cea.fr)

Figure S1 Fragments selected for quantification by PRM. A) MS/MS spectrum of the 4 variants, B) isotope pattern of b11 <sup>2+</sup> fragment C) sequence alignment of the 4 SEA variants (N-terminal sequence). .....	5
Figure S2 Sequence alignment between all accession number available in Uniprot, signal peptides are highlighted in yellow and mutations relative to POA0L2 are highlighted in red. ....	7
Figure S3 Deconvoluted signal of the 4 SEA variants after full-scan HRMS acquisition (with re-calibration). Theoretical average molecular weights of each SEA variant and mass accuracies are illustrated. The supernatants of strains_1,5,7,13 were mixed at equivalent volume to obtain a solution with the 4 variants.....	8
Figure S4 Workflow for absolute quantification of SEA and variants: immunoaffinity enrichment and removal of non-specifically bound proteins was followed by elution of SEA and intact MS quantification using either full-scan HRMS or PRM acquisition.....	9
Figure S5 Full-HRMS spectrum before deconvolution of strain 14SBCL770 (SEA1) and 16SBCL1368 (SEA4). ....	10
Figure S6 PRM spectrum of SEA3 standard with assignment of fragment ions (SEA3 at 25 ng/mL).....	12
Figure S7 Full-scan HRMS spectrum of SEA3 at 10 ng/g and internal standard at resolution R of 17,500 and 35,000. No signal was detected at R 70,000. ....	13
Figure S8 The 4 common PRM fragment ions used for quantification were identified from each of the three most abundant charge states. ....	14
Figure S9 Sequence alignment between the SEA3/SEP/SEE. Amino acids highlighted in red are mutations with regard to SEA3. ....	17
Figure S10 A1) zoom on targeted PRM fragment b20+4 and A2) zoom on targeted PRM fragment b21+4. B) Sequence alignment between variants showing the mutation at amino acid 21 of the SEA1 variant. ....	19
Figure S11 XIC Signal of fragments b112+/b184+/b194+/b204+ from SEA1-4 following multiplex PRM acquisition. ....	20

Table S1 Description of all the accession number available in Uniprot, comparison of sequence homology with the consensus sequence P0A0L2.....	3
Table S2 m/z of the main charge states of SEA1-4 (top) and mass extraction window (m/z) used for the XIC processing approach (bottom).....	4
Table S3 Staphylococcus aureus strains used in the study.....	6
Table S4 Fragments identified for each SEA variant following PRM acquisition. ....	11
Table S5 Method evaluation in BHI and milk. CV, bias, and signal in blank samples are illustrated. ....	15
Table S6 Relative abundance of the fragment ions observed for each variant, in various spiked concentrations, different strains in milk and BHI, and variations (CV%).....	16
Table S7 Quantitative analysis of SEA toxin in supernatants of 13 SEA-producing S. aureus strains where four variants were identified by WGS, and two SEE- or SEP- producing strains. SEA concentration are reported (in ng/mL). ....	18

Table S1 Description of all the accession number available in Uniprot, comparison of sequence homology with the consensus sequence POA0L2.

Accession number in Uniprot	% homology vs POA0L2, signal peptide included	% homology vs POA0L2, without signal peptide	Average mass (MH <sup>+</sup> )	Monoisotopic mass (MH <sup>+</sup> )	Corresponding variant, as named in the study
POA0L2	100	100	27092.5109	27075.5544	SEA <sub>3</sub>
POA0L1	100	100	27092.5109	27075.5544	SEA <sub>3</sub>
F8V3W6	100	100	27092.5109	27075.5544	SEA <sub>3</sub>
A0A7U7EZ81	100	100	27092.5109	27075.5544	SEA <sub>3</sub>
A0A1X9H080	100	100	27092.5109	27075.5544	SEA <sub>3</sub>
A0A4Y6A7K6	98.0	98.7	26925.3484	26908.5074	
B8Y8C1	98.4	98.7	27012.4271	26995.5394	SEA <sub>1</sub>
A0A0E1XAN6	98.0	98.7	27012.4271	26995.5394	SEA <sub>1</sub>
A0EX09	98.0	98.7	27012.4271	26995.5394	SEA <sub>1</sub>
A0A0H3KHN8	98.0	98.7	27012.4271	26995.5394	SEA <sub>1</sub>
A0A068A244	98.4	99.1	27042.4535	27025.5500	SEA <sub>4</sub>
SEA <sub>1</sub>	98.0	98.7	27012.4271	26995.5394	
SEA <sub>2</sub>	88.3	91.0	26936.3309	26919.4546	
SEA <sub>3</sub>	100	100	27092.5109	27075.5544	
SEA <sub>4</sub>	98.4	99.1	27042.4535	27025.5500	

Table S2 m/z of the main charge states of SEA1-4 (top) and mass extraction window (m/z) used for the XIC processing approach (bottom).

charge state	m/z			
	SEA <sub>1</sub>	SEA <sub>2</sub>	SEA <sub>3</sub>	SEA <sub>4</sub>
30+	901.3881	898.8515	904.0575	902.389
31+	872.3435	869.8888	874.9269	873.3121
32+	845.1143	842.7363	847.6169	846.0526
30+ (+/- 0.2)	901.1881-901.5881	898.6515-899.0515	903.8575-904.2575	902.1890-902.5890
31+ (+/- 0.2)	872.1435-872.5435	869.6888-870.0888	874.7269-875.1269	873.1121-873.5121
32+ (+/- 0.2)	844.9143-845.3143	842.5363-842.9363	847.4169-847.8169	845.8526-846.2526

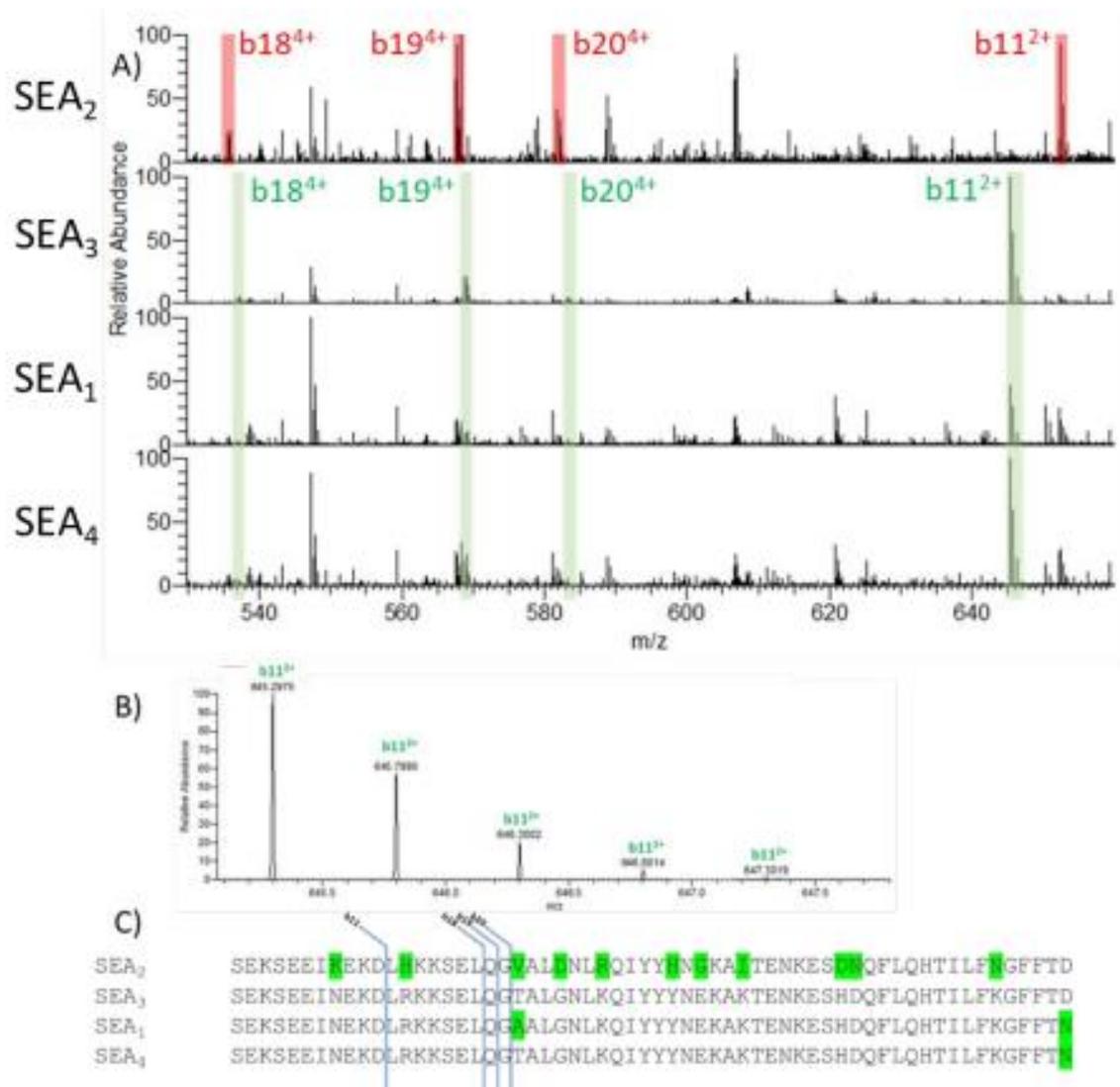


Figure S1 Fragments selected for quantification by PRM. A) MS/MS spectrum of the 4 variants, B) isotope pattern of b11<sup>2+</sup> fragment C) sequence alignment of the 4 SEA variants (N-terminal sequence).

Table S3 Staphylococcus aureus strains used in the study.

Strain	Geographical location	Strain origin	SEA variant	Toxin Uniprot accession number	MS signal after immunocapture	Strain number
<b>06CEB196</b>	France	SFPO	SEA <sub>3</sub>	P0A0L2	ok	Strain_1
09CEB231	France	SFPO	SEA <sub>3</sub>	P0A0L2	ok	Strain_2
10CEB401	France	SFPO	SEA <sub>3</sub>	P0A0L2	ok	Strain_3
<b>13CEB193</b>	France	SFPO	SEA <sub>2</sub>		ok	Strain_13
14SBCL1004	France	SFPO	SEA <sub>3</sub>	P0A0L2	ok	Strain_4
<b>14SBCL770</b>	France	SFPO	SEA <sub>1</sub>	A0A0H3KHN8	ok	Strain_5
15SBCL452	France	SFPO	SEA <sub>3</sub>	P0A0L2	ok	Strain_6
<b>16SBCL1368</b>	France	SFPO	SEA <sub>4</sub>	A0A068A244	ok	Strain_7
16SBCL899	France	SFPO	SEA <sub>4</sub>	A0A068A244	ok	Strain_8
17SBCL693	France	SFPO	SEA <sub>3</sub>	P0A0L2	ok	Strain_9
19SBCL591	France	SFPO	SEA <sub>3</sub>	P0A0L2	ok	Strain_10
349E	unknown	SFPO	SEA <sub>3</sub>	P0A0L2	ok	Strain_11
42A / FRIS6	unknown	Reference Strain	SEA <sub>1</sub>	A0A0H3KHN8	ok	Strain_12
46A / FRI326	unknown	Reference Strain	SEE	P12993	no	Strain_14
18SBCL855	France	SFPO	SEP	A0A075M4C7	no	Strain_15

In bold: strains used for method development

```

SEA_2      MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEEEEDKIRESELOALALNLQQIYYYNN 60
POA0L2    --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOTALTALGNLRQRQIYYYYNN 58
POA0L1    --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOTALTALGNLRQRQIYYYYNN 58
FVU3W6    --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOTALTALGNLRQRQIYYYYNN 58
A0A7U7E2B1 --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOTALTALGNLRQRQIYYYYNN 58
SEA_3      MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOTALTALGNLRQRQIYYYYNN 58
A0A1X9H0B0 --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOTALTALGNLRQRQIYYYYNN 58
A0A4Y6A7K6 --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOALALGNLRQRQIYYYYNN 57
SEA_4      MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOTALTALGNLRQRQIYYYYNN 58
A0A068A244 --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOTALTALGNLRQRQIYYYYNN 58
A0A0E1KAN6 --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOALALGNLRQRQIYYYYNN 58
SEA_1      MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOALALGNLRQRQIYYYYNN 58
A0EX09     --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOALALGNLRQRQIYYYYNN 58
A0A0H3KHN8 --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOALALGNLRQRQIYYYYNN 58
B8Y8c1    --MKETAPLLLLFLIALFLFLTSPLPLVNGSERSEEINEKDLRRESELOALALGNLRQRQIYYYYNN 58
          *****
          .:

SEA_2      KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 120
POA0L2    KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
POA0L1    KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
FVU3W6    KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
A0A7U7E2B1 KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
SEA_3      KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
A0A1X9H0B0 KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
A0A4Y6A7K6 KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 117
SEA_4      KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
A0A068A244 KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
A0A0E1KAN6 KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
SEA_1      KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
A0EX09     KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
A0A0H3KHN8 KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
B8Y8c1    KAKTENKESHDDQFLQHTILFKGFPTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDEYEGREKVDLYGAYYYGG 118
          *****
          .:

SEA_2      QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 180
POA0L2    QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
POA0L1    QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
FVU3W6    QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
A0A7U7E2B1 QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
SEA_3      QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
A0A1X9H0B0 QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
A0A4Y6A7K6 QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 177
SEA_4      QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
A0A068A244 QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
A0A0E1KAN6 QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
SEA_1      QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
A0EX09     QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
A0A0H3KHN8 QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
B8Y8c1    QCAGGTPPKTACMYGGVTLHDNNRLTEERKVFINLMLDGKQNTVPLETVTNKRSVTVQE 178
          *****
          .:

SEA_2      LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 240
POA0L2    LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
POA0L1    LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
FVU3W6    LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
A0A7U7E2B1 LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
SEA_3      LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
A0A1X9H0B0 LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
A0A4Y6A7K6 LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 237
SEA_4      LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
A0A068A244 LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
A0A0E1KAN6 LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
SEA_1      LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
A0EX09     LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
A0A0H3KHN8 LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
B8Y8c1    LELQARRYLQEKYNLYNSDVFDGEVQRGLIVFHTSTEPSVNYDLPGAQQQSWTLLRIYR 238
          *****
          .:

SEA_2      DNKTINSENMHIDIYLYTS 255
POA0L2    DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
POA0L1    DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
FVU3W6    DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
A0A7U7E2B1 DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
SEA_3      DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
A0A1X9H0B0 DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
A0A4Y6A7K6 DNKTINSENMHIDIYLYTS 255
SEA_4      DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
A0A068A244 DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
A0A0E1KAN6 DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
SEA_1      DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
A0EX09     DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
A0A0H3KHN8 DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
B8Y8c1    DNKTINSENMHIDIYLYTS 257
          *****
          .:

```

Figure S2 Sequence alignment between all accession number available in Uniprot, signal peptides are highlighted in yellow and mutations relative to POA0L2 are highlighted in red.

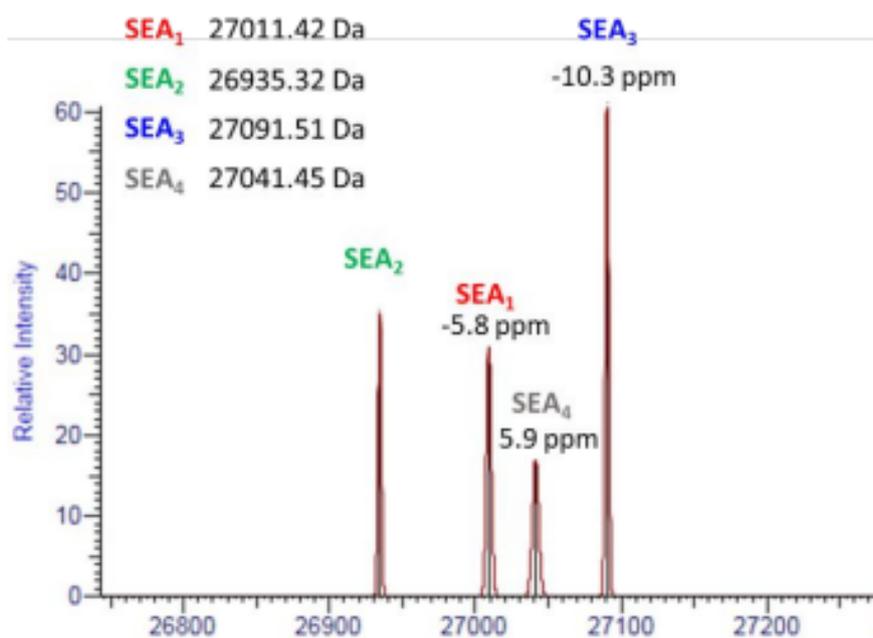


Figure S3 Deconvoluted signal of the 4 SEA variants after full-scan HRMS acquisition (with re-calibration). Theoretical average molecular weights of each SEA variant and mass accuracies are illustrated. The supernatants of strains 1,5,7 and 13 were mixed at equivalent volume to obtain a solution containing the 4 variants.

\*Orbitrap resolution was set at 17500 for maximum sensitivity in full-scan HRMS acquisition. At this resolution, isotopic patterns were not resolved. Average masses were thus determined.

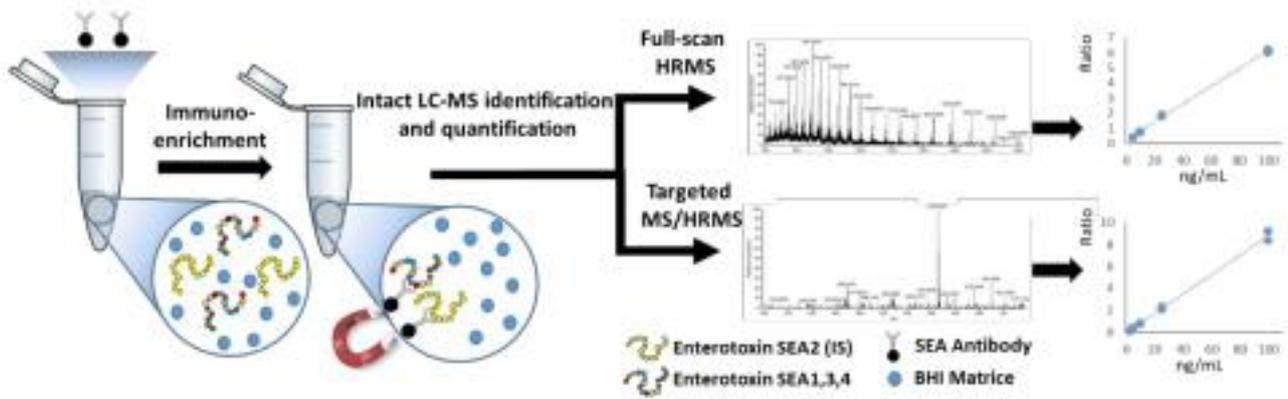


Figure S4 Workflow for absolute quantification of SEA and variants: immunoaffinity enrichment and removal of non-specifically bound proteins was followed by elution of SEA and intact MS quantification using either full-scan HRMS or PRM acquisition.

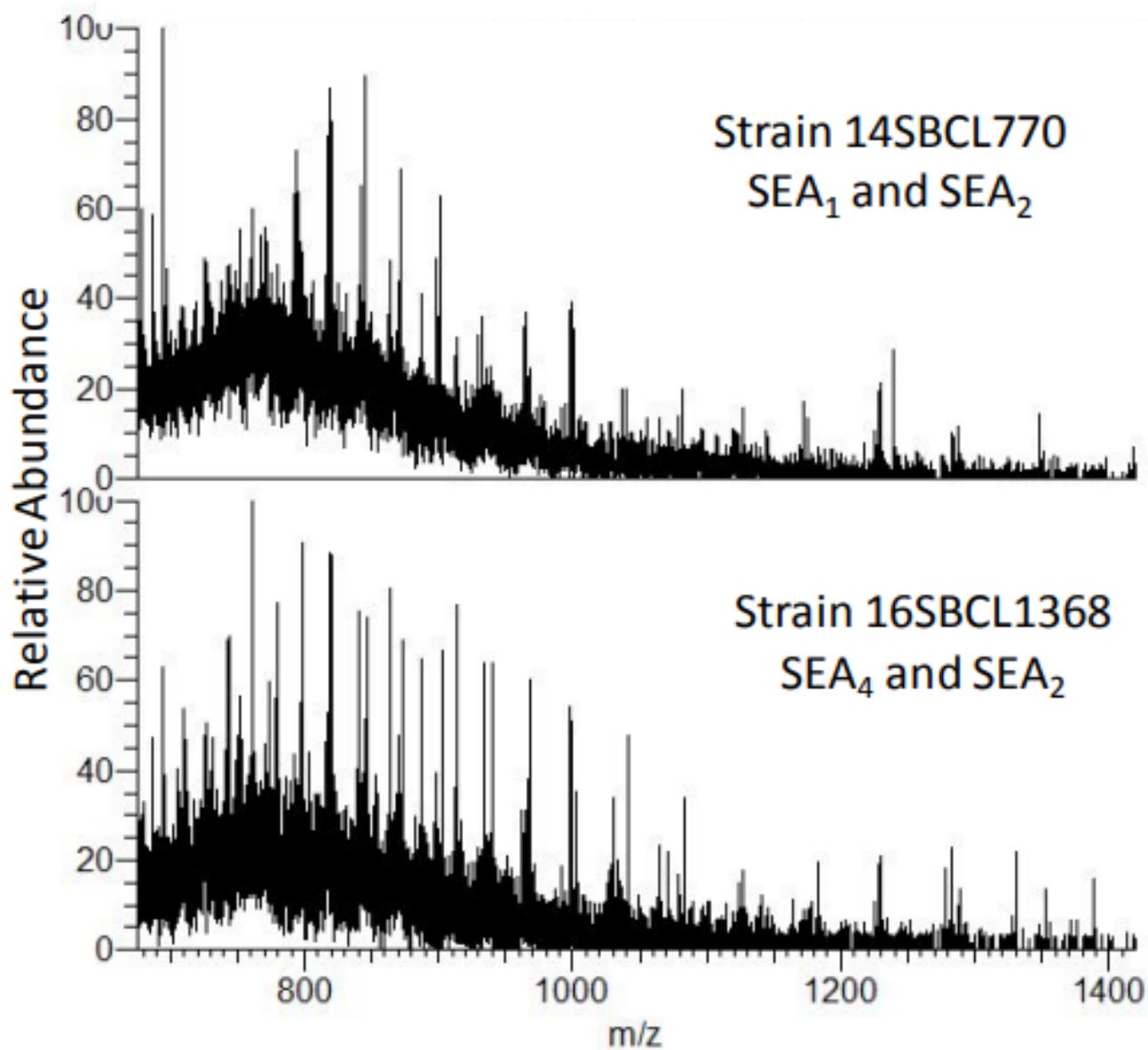


Figure S5 Full-HRMS spectrum before deconvolution of strain 14SBCL770 (SEA1) and 16SBCL1368 (SEA4).

Table S4 Fragments identified for each SEA variant following PRM acquisition.

SEA1		SEA2		SEA3		SEA4	
536.7853 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>18</sub><sup>+4</sup></b>	535.5378 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>18</sub><sup>+4</sup></b>	536.7853 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>18</sub><sup>+4</sup></b>	536.7853 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>18</sub><sup>+4</sup></b>
568.7999 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>19</sub><sup>+4</sup></b>	563.0498 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>19</sub>-H<sub>2</sub>O<sup>+4</sup></b>	568.7999 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>19</sub><sup>+4</sup></b>	568.7999 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>19</sub><sup>+4</sup></b>
583.0553 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>20</sub><sup>+4</sup></b>	567.5524 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>19</sub><sup>+4</sup></b>	583.0553 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>20</sub><sup>+4</sup></b>	583.0553 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>20</sub><sup>+4</sup></b>
600.8146 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>21</sub><sup>+4</sup></b>	581.8078 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>20</sub><sup>+4</sup></b>	603.8146 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>21</sub>-H<sub>2</sub>O<sup>+4</sup></b>	608.3172 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>21</sub><sup>+4</sup></b>
636.2911 <sup>+2</sup>	<b>b<sub>11</sub>-H<sub>2</sub>O<sup>+2</sup></b>	599.5761 <sup>+4</sup>	<b>a<sub>21</sub><sup>+4</sup></b>	608.3172 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>21</sub><sup>+4</sup></b>	645.2964 <sup>+2</sup>	<b>b<sub>11</sub><sup>+2</sup></b>
645.2964 <sup>+2</sup>	<b>b<sub>11</sub><sup>+2</sup></b>	602.0722 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>21</sub>-H<sub>2</sub>O<sup>+4</sup></b>	621.5739 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>22</sub>-H<sub>2</sub>O<sup>+4</sup></b>	947.4635 <sup>+6</sup>	<b>y<sub>49</sub><sup>+6</sup></b>
701.8385 <sup>+2</sup>	<b>b<sub>12</sub><sup>+2</sup></b>	606.5749 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>21</sub><sup>+4</sup></b>	626.0765 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>22</sub><sup>+4</sup></b>		
770.8837 <sup>+2</sup>	<b>b<sub>13</sub>-H<sub>2</sub>O<sup>+2</sup></b>	624.3341 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>22</sub><sup>+4</sup></b>	645.2964 <sup>+2</sup>	<b>b<sub>11</sub><sup>+2</sup></b>		
787.0960 <sup>+10</sup>	<b>b<sub>66</sub><sup>+10</sup></b>	643.3172 <sup>+2</sup>	<b>b<sub>11</sub>-H<sub>2</sub>O<sup>+2</sup></b>	715.3780 <sup>+3</sup>	<b>b<sub>18</sub><sup>+3</sup></b>		
874.4392 <sup>+9</sup>	<b>b<sub>66</sub><sup>+9</sup></b>	652.3224 <sup>+2</sup>	<b>b<sub>11</sub><sup>+2</sup></b>	788.3945 <sup>+10</sup>	<b>b<sub>66</sub>-H<sub>2</sub>O<sup>+10</sup></b>		
947.4635 <sup>+6</sup>	<b>y<sub>49</sub><sup>+6</sup></b>	690.2941	<b>b<sub>6</sub></b>	790.1955 <sup>+10</sup>	<b>b<sub>66</sub><sup>+10</sup></b>		
981.4899 <sup>+8</sup>	<b>b<sub>66</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+8</sup></b>	713.7146 <sup>+3</sup>	<b>b<sub>18</sub><sup>+3</sup></b>	803.9670 <sup>+9</sup>	<b>b<sub>61</sub><sup>+9</sup></b>		
983.6182 <sup>+8</sup>	<b>b<sub>66</sub><sup>+8</sup></b>	744.3795 <sup>+8</sup>	<b>b<sub>51</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+8</sup></b>	810.7539 <sup>+3</sup>	<b>b<sub>21</sub><sup>+3</sup></b>		
		746.5078 <sup>+8</sup>	<b>b<sub>51</sub><sup>+8</sup></b>	817.6940 <sup>+4</sup>	<b>b<sub>29</sub><sup>+4</sup></b>		
		756.4008 <sup>+3</sup>	<b>b<sub>19</sub><sup>+3</sup></b>	834.4329 <sup>+3</sup>	<b>b<sub>22</sub><sup>+3</sup></b>		
		775.4079 <sup>+3</sup>	<b>b<sub>20</sub><sup>+3</sup></b>	875.9913 <sup>+9</sup>	<b>b<sub>66</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+9</sup></b>		
		808.4307 <sup>+3</sup>	<b>b<sub>21</sub><sup>+3</sup></b>	877.8831 <sup>+9</sup>	<b>b<sub>66</sub><sup>+9</sup></b>		
		850.4349 <sup>+7</sup>	<b>b<sub>51</sub>-H<sub>2</sub>O<sup>+7</sup></b>	964.8564 <sup>+11</sup>	<b>b<sub>90</sub><sup>+11</sup></b>		
		853.0079 <sup>+7</sup>	<b>b<sub>51</sub><sup>+7</sup></b>	966.8438 <sup>+3</sup>	<b>b<sub>26</sub><sup>+3</sup></b>		
				979.6803 <sup>+11</sup>	<b>b<sub>91</sub><sup>+11</sup></b>		
				985.3642 <sup>+8</sup>	<b>b<sub>66</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+8</sup></b>		
				987.4926 <sup>+8</sup>	<b>b<sub>66</sub><sup>+8</sup></b>		

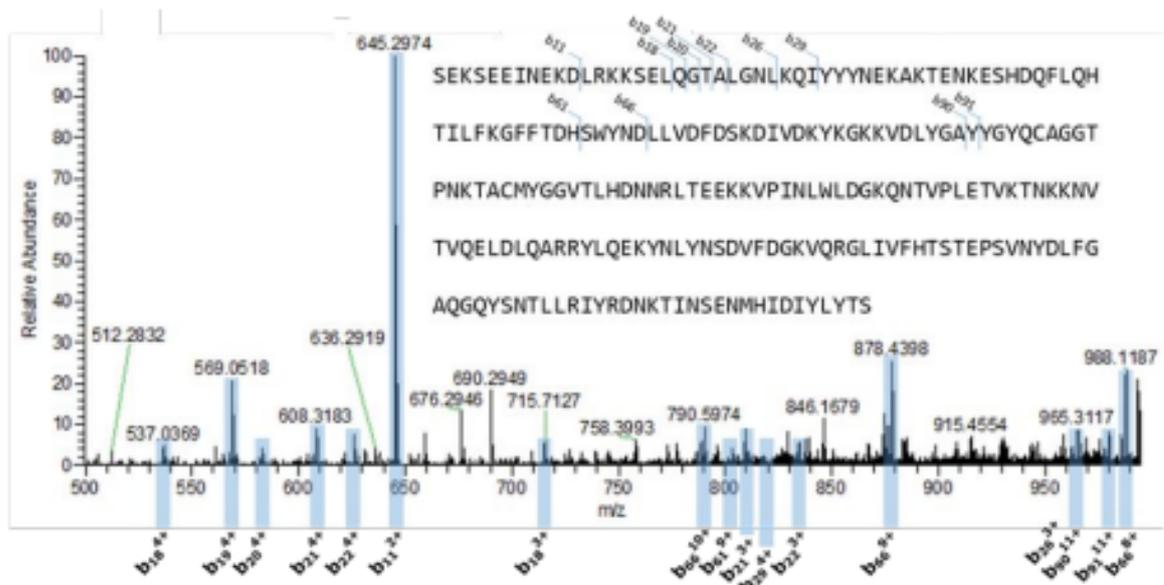


Figure S6 PRM spectrum of SEA<sub>3</sub> standard with assignment of fragment ions (SEA<sub>3</sub> at 25 ng/mL).

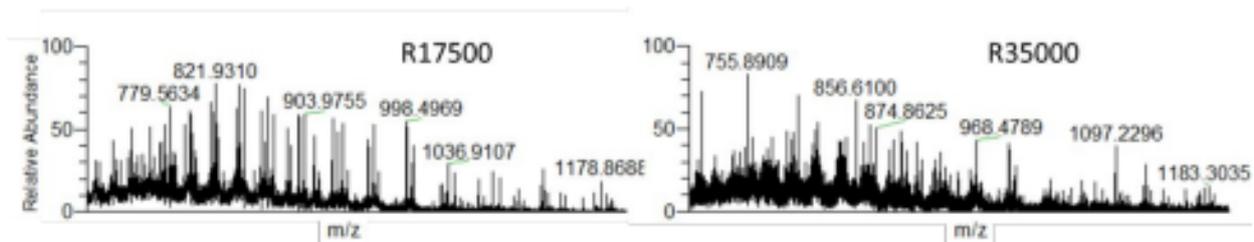


Figure S7 Full-scan HRMS spectrum of SEA3 at 10 ng/g and internal standard at resolution R of 17,500 and 35,000. No signal was detected at R 70,000.

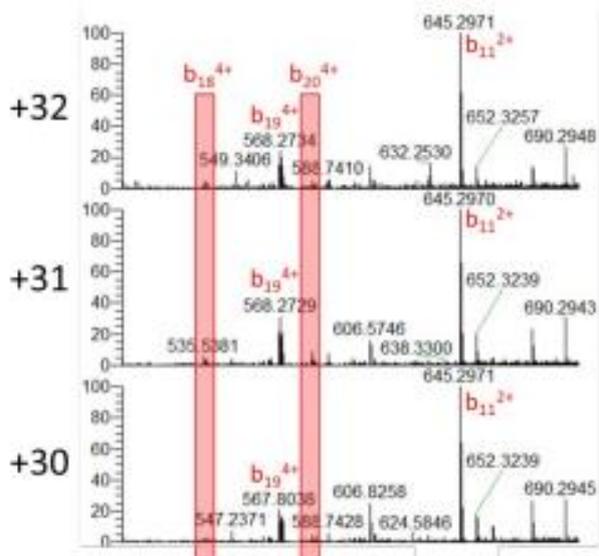


Figure S8 The 4 common PRM fragment ions used for quantification were identified from each of the three most abundant charge states.

Table S5 Method evaluation in BHI and milk. CV, bias, and signal in blank samples are illustrated.

	Targeted PRM	Full-scan HRMS with deconvolution	Full-scan HRMS with XIC
Bias % BHI	5.5	9.7	33.4
CV % BHI	5.8	7.8	6.6
Blank BHI	ND	ND	Low signal detected
Matrix effect in milk (% bias milk vs BHI)	14.3	17.8	15.9
CV % milk	6.4	5.3	19.5
Blank milk	ND	ND	Low signal detected

Table S6 Relative abundance of the fragment ions observed for each variant, in various spiked concentrations, different strains in milk and BHI, and variations (CV%).

C/QC level	variant	ratio b18/b11	ratio b19/b11	ratio b19/b11
QC BHI 25 ng/mL	SEA_3	0.066 n=5; CV=7.2	0.293 n=5; CV=5.7	0.061 n=5; CV=10.4
QC Milk 25 ng/mL	SEA_3	0.066 n=5; CV=7.7	0.291 n=5; CV=4.3	0.064 n=5; CV=6.0
C BHI 100 ng/mL	SEA_3	0.061	0.297	0.060
C BHI 25 ng/mL	SEA_3	0.059	0.287	0.055
C BHI 10 ng/mL	SEA_3	0.050	0.288	0.038
C BHI 5 ng/mL	SEA_3	0.036	0.279	0.034
C BHI 2.5 ng/mL	SEA_3	0.061	0.152	0.050
<b>Mean / CV% in BHI</b>	<b>SEA_3</b>	<b>0.056 n=15; CV=19.7</b>	<b>0.266 n=15; CV=21.0</b>	<b>0.050 n=15; CV=22.3</b>
Strains	variant	ratio b18/b11	ratio b19/b11	ratio b19/b11
14SBCL770	SEA_1	0.054 n=2; CV=16.3	0.276 n=2; CV=12.3	0.070 n=2; CV=1.0
42A	SEA_1	0.064 n=2; CV=3.6	0.338 n=2; CV=0.8	0.082 n=2; CV=17.1
06CEB196	SEA_3	0.056 n=2; CV=3.8	0.292 n=2; CV=2.4	0.058 n=2; CV=3.1
09CEB231	SEA_3	0.059 n=2; CV=3.5	0.304 n=2; CV=0.5	0.063 n=2; CV=1.2
10CEB401	SEA_3	0.062 n=2; CV=1.0	0.299 n=2; CV=0.9	0.061 n=2; CV=5.9
14SBCL1004	SEA_3	0.056 n=2; CV=0.8	0.298 n=2; CV=4.1	0.063 n=2; CV=3.2
15SBCL452	SEA_3	0.059 n=2; CV=4.1	0.312 n=2; CV=8.1	0.063 n=2; CV=2.2
17SBCL693	SEA_3	0.062 n=2; CV=8.8	0.286 n=2; CV=2.7	0.066 n=2; CV=4.7
19SBCL591	SEA_3	0.061 n=2; CV=5.2	0.304 n=2; CV=1.2	0.068 n=2; CV=4.3
349E	SEA_3	0.065 n=2; CV=9.6	0.303 n=2; CV=2.3	0.066 n=2; CV=4.5
16SBCL1368	SEA_4	0.056 n=2; CV=17.9	0.286 n=2; CV=5.3	0.070 n=2; CV=19.0
16SBCL899	SEA_4	0.056 n=2; CV=17.2	0.274 n=2; CV=1.2	0.060 n=2; CV=4.3
<b>Mean / CV% Strains</b>		<b>0.059 n=26; CV=5.9</b>	<b>0.298 n=26; CV=5.8</b>	<b>0.066 n=26; CV=9.5</b>
13CEB193	SEA_2	0.693 n=2; CV=14.9	3.014 n=2; CV=8.4	1.283 n=2; CV=9.2
<b>Mean / CV% total</b>				
<b>SEA<sub>1,2,3</sub></b>		<b>0.058 n=44; CV=11.7</b>	<b>0.287 n=44; CV=12.5</b>	<b>0.061 n=44; CV=17.9</b>

QC: quality control

C: calibrator

```

SEP      SEKSEEIN[KDL][KKSELQGTAL][NL][QIYYN][GSA][TENKES][DQFL][NTILF][NFPT]      60
SEA_3    SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYNKAKTENKESHQFLQHTILFKGFPTD      60
SEE      SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYNKAKTENKES[DQFL][NT][LFKGFPT]      60
          *****  ***:*****  _**_*:* **:*_*  *****_*****:***:***_***_

SEP      H[SYNDLLVD][L][SKD][TAN][YKGGKVDLYG][YYGYQC][GGTP][KTACMYGGVTLHDNN][L]      120
SEA_3    HSWYNDLLVDFD[SKDIVDKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT]      120
SEE      H[SYNDLLVD][L][SKD][TAN][YKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLT]      120
          * *****:***  _:  *****_*****:**** *****:*****:

SEP      EEKQVPINLW[LDGKQNTVPI][TVKTNKK][VTVQELDLQ][R][YL][E][YNYLN][D][F][GK][Q]      180
SEA_3    EEKQVPINLWLDGKQNTVPLETVKTNKKNVTVQELDLQARRYLQEKYNYNSDVFDGKQVQ      180
SEE      EEKQVPINLW[LDGKQ][NTVPI][T][VKT][NKK][VTVQELDLQ][AR][YL][GK][GLYNSD][F][GK][VQ]      180
          *****:***_***:  _***_*:* *****:***:***_***_*_*_*_*

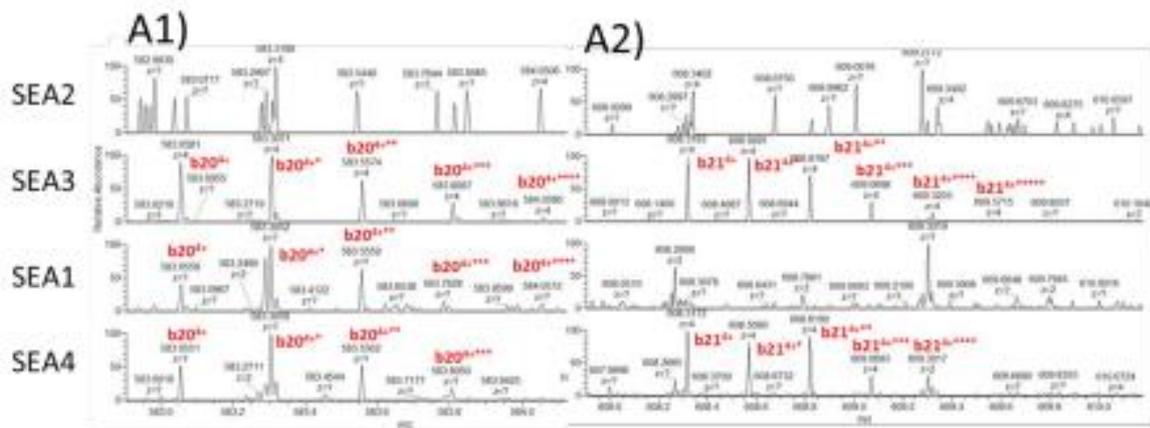
SEP      RGLI[FH][S][GG][SV][YDLFQAQQQY][G][T][LRIYRDNKT][S][NMHIDIYLYT]      233
SEA_3    RGLIVFHTSTEPSVNYDLFQAQQQYSNTLLRIYRDNKTINSENMHIDIYLYTS      233
SEE      RGLIVFH[S][GG][SV][YDLF][AQQQY][G][T][LLRIYRDNKTINSEN][HID][YLYT]      233
          ****  **  *  _:***_*****  :* *****:***:***:*****:

```

Figure S9 Sequence alignment between the SEA3/SEP/SEE. Amino acids highlighted in red are mutations with regard to SEA3.

Table S7 Quantitative analysis of SEA toxin in supernatants of 13 SEA-producing *S. aureus* strains where four variants were identified by WGS, and two SEE- or SEP- producing strains. SEA concentration are reported (in ng/mL).

Strains	SEA variant	Top-down by targeted PRM	Bottom-up proteomics	ELISA
06CEB196	SEA <sub>3</sub>	92.0	109	87.3
09CEB231	SEA <sub>3</sub>	188	165	191
10CEB401	SEA <sub>3</sub>	129	146	170
14SBCL1004	SEA <sub>3</sub>	170	190	165
14SBCL770	SEA <sub>1</sub>	19.0	29.8	12.5
15SBCL452	SEA <sub>3</sub>	142	200	158
16SBCL1368	SEA <sub>4</sub>	32.7	29.8	13.5
16SBCL899	SEA <sub>4</sub>	36.5	35.8	25.2
17SBCL693	SEA <sub>3</sub>	140	198	113
19SBCL591	SEA <sub>3</sub>	91.5	119	113
349E	SEA <sub>3</sub>	157	211	121
42A	SEA <sub>1</sub>	46.9	38.3	39.2
13CEB193	SEA <sub>2</sub>	NR	35.1	19.6
46A	SEE	ND	ND	ND
18SBCL855	SEP	ND	ND	ND



B)

SEA<sub>2</sub>: SEKSEEINEKDLRKKSEIQGVALNLRQIYYNEKAKTENKESDQFLQHTILFKGFFTD  
 SEA<sub>3</sub>: SEKSEEINEKDLRKKSEIQGVALGKQIYYNEKAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTD  
 SEA<sub>1</sub>: SEKSEEINEKDLRKKSEIQGVALGKQIYYNEKAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTD  
 SEA<sub>4</sub>: SEKSEEINEKDLRKKSEIQGVALGKQIYYNEKAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTD

Figure S10 A1) zoom on targeted PRM fragment b20+4 and A2) zoom on targeted PRM fragment b21+4. B) Sequence alignment between variants showing the mutation at amino acid 21 of the SEA1 variant.

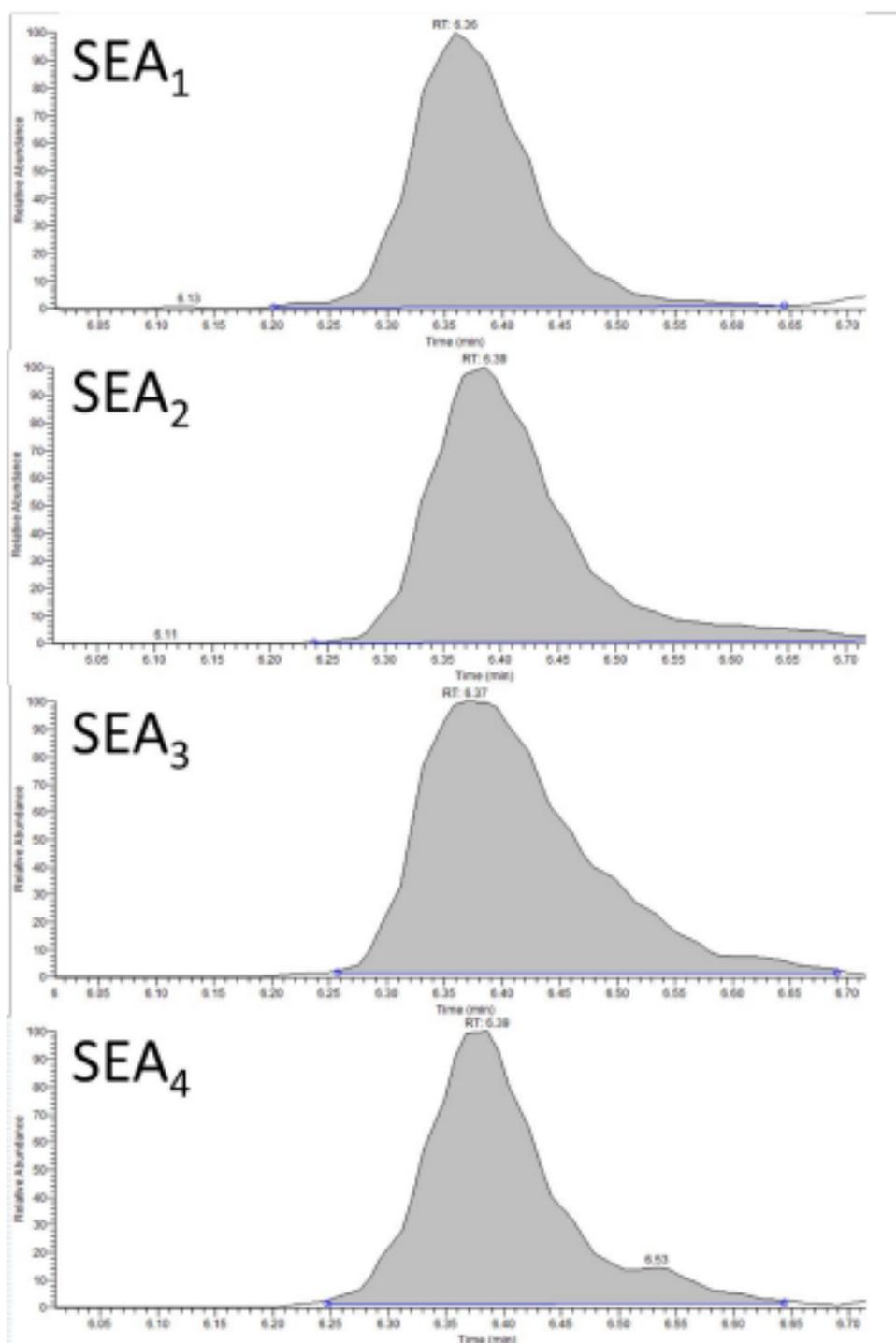


Figure S11 XIC Signal of fragments b112+/b184+/b194+/b204+ from SEA1-4 following multiplex PRM acquisition.

## II.B.3 Conclusion et discussion de l'article 2

Dans cet article, nous avons développé une méthode de détection et de quantification des variants de la toxine SEA par protéomique « top-down ». L'optimisation du mode d'acquisition non ciblé (full HRMS) a permis de discriminer les quatre variants de la SEA. Ce mode d'acquisition non ciblé offre la possibilité à terme de détecter la présence de nouveaux variants de la SEA. En parallèle, l'acquisition ciblée PRM, après optimisation, est la méthode la plus sensible (LOQ à 2.5 ng/mL de SEA) et la plus spécifique (via le suivi de l'abondance relative des ions fragments) pour la quantification absolue.

Dans un premier temps, nous avons optimisé la préparation de l'échantillon. Cela a consisté à reprendre les conditions d'immunocapture proposées dans l'article 1 mais en augmentant les concentrations de billes et d'anticorps (par un facteur huit) tout en conservant un même ratio. L'immuno-enrichissement a été suivi d'une étape d'élution pour séparer la toxine des anticorps. L'optimisation de cette étape d'élution n'a pas été décrite dans l'article 2 mais sera présentée à la page suivante. Nous avons ensuite optimisé les conditions d'acquisition par spectrométrie de masse. Pour le mode d'acquisition full HRMS, deux méthodes de traitement des données ont été proposées : soit par déconvolution du signal, soit par extraction du signal des 3 principaux états de charge (XIC). L'avantage de la méthode par déconvolution est de pouvoir détecter la présence de n'importe quel variant de SEA, même s'il est encore inconnu, par la mesure de la masse moléculaire. L'analyse de souches productrices des 4 variants de SEA avec cette approche a permis de confirmer la détection et l'identification des variants avec une erreur de mesure de masse inférieure à 15 ppm. L'analyse des variants en mode d'acquisition PRM a mis en évidence des fragments communs ( $b_{11}$ ,  $b_{18}$ ,  $b_{19}$ ,  $b_{20}$ ) permettant ainsi la quantification absolue mais aussi des fragments spécifiques ( $b_{21}$ ,  $b_{66}$ ,  $y_{49}$ ) pour confirmer la présence de mutations. Le mode d'acquisition PRM a été optimisé au travers de différentes conditions : les états de charge ciblés, la résolution de l'Orbitrap, le « fill time », la fenêtre d'isolation et le multiplexage ; ce mode apparaît au final comme le plus sensible avec une LOQ de 2.5 ng/mL dans le milieu BHI. L'acquisition PRM a aussi détecté et quantifié la présence de la toxine SEA dans du lait. Enfin, des analyses de souches productrices des toxines SEE et SEP n'ont généré aucun signal, confirmant la forte spécificité de cette méthode. Une étude de corrélation a été réalisée entre les résultats obtenus par protéomique top-down (acquisition PRM) et ceux obtenus par bottom-up (article 1) ou par ELISA. Avec des pentes de la droite de corrélation ( $y=Ax+B$ ) observées à  $A=1.177$  avec le bottom-up et  $A=1.014$  avec l'ELISA, nous confirmons la très forte corrélation entre la quantification par top-down et les deux autres méthodes.

Avec cette nouvelle méthode, il est désormais possible de détecter et de discriminer des variants de SEA connus ou non avec une technique autre que les outils génomiques classiques (WGS), et de confirmer leur production. De plus, il est possible d'atteindre une quantification absolue en milieu de culture BHI mais aussi dans une matrice alimentaire comme le lait.

En perspective, et dans l'optique d'obtenir une meilleure sensibilité de la méthode, il sera possible d'utiliser des boudins de dialyse lors de l'extraction de la toxine de la matrice (cf article 1). Cette dialyse concentration a pour effet de concentrer l'échantillon à partir de grands volumes (25 mL) avant l'étape d'immunocapture. Un gain d'un facteur 2 à 3 a pu être ainsi observé suite à l'utilisation de cette méthode lors des analyses par protéomique bottom-up. Il est donc tout à fait envisageable d'obtenir ce même gain pour la méthode top-down.

Une autre solution pour accroître la sensibilité de la méthode serait l'utilisation d'une chaîne nano-LC, comme déjà proposé en perspective à l'article 1. Mohr et al,<sup>321</sup> en 2010 ont testé deux types de chaînes : une micro-LC (diamètre de colonne 1 mm) et une nano-LC (0.1 mm), pour des analyses top-down sur plusieurs protéines de différentes tailles et avec un analyseur Orbitrap. Ainsi, la LOD est descendue de 206 fmol en micro-LC à 8.1 fmol en nano-LC, soit un gain d'un facteur 25 environ, pour la protéine carbonic anhydrase dont la masse est la plus proche de celles des ESs (29006.68 Da). La colonne utilisée dans l'article 2 possède un diamètre de 2.1 mm, il est donc envisageable d'obtenir un gain important de sensibilité en passant par une chaîne nano-LC.

Afin de répondre à la problématique de temps et de rapidité de rendu des résultats en période d'analyse de TIAC, il faudra regrouper en une seule analyse, avec et sans fragmentation, les acquisitions full HRMS et PRM. En effet le pic chromatographique étant d'environ 20 secondes, il y aurait suffisamment de temps pour multiplexer les deux acquisitions sans perdre de signal (nous réalisons 2 injections consécutives pour le moment).

Cette méthode pourrait ensuite être étendue aux variants des autres toxines (SE A, B, C, D, E, G, H, I). Nous avons notamment montré la capacité du Q Exactive à détecter et caractériser en mode d'acquisition full HRMS ou PRM ces différentes toxines sous forme intacte (travail décrit à la suite).

Cette approche top-down pourrait être mise en place dans les laboratoires de contrôle des aliments pour confirmer les analyses génomiques. En effet, un gène codant pour un variant pourrait ne pas être exprimé par le *S. aureus*, le variant doit donc être détecté au niveau protéique. De plus, il arrive que *S. aureus* ne soit pas retrouvé lors d'une TIAC à SCP après chauffage de l'aliment, ainsi l'analyse génomique WGS ne pourra pas identifier le variant incriminé. Pour le moment, notre approche top-down permet de détecter des nouveaux variants, mais pas de caractériser leur séquence. Il s'agit donc d'un outil complémentaire aux analyses génomiques. En effet, les données générées par notre méthode top-down ne permettent pas seules de remonter à la séquence protéique et donc à l'identification des mutations du variant. Cependant, l'utilisation d'une cellule de collision plus adaptée au séquençage protéique, telle que l'ETD<sup>157</sup> ou l'IRMPD<sup>158</sup> avec l'aide d'un logiciel de séquençage de *novo*, pourrait permettre de caractériser de manière plus exhaustive la séquence des nouveaux variants, sous réserve d'une sensibilité suffisante. A plus long terme, cela permettrait d'avoir un outil de caractérisation des variants pour mieux comprendre la biologie des ESs, comme par exemple l'impact des mutations observées dans la toxicité du variant.

## II.B.4 Etudes complémentaires en lien avec l'article 2

### II.B.4.1 Optimisation de l'élution des toxines

Lors des analyses par protéomique bottom-up, décrites dans l'article 1, aucune étape d'élution n'était nécessaire car la digestion enzymatique était réalisée directement sur le complexe bille - anticorps - toxine de manière à libérer rapidement les peptides du complexe. Cependant, les analyses protéomique top-down ne contiennent pas d'étape de digestion et nous devons donc éluer la toxine pour la libérer du complexe formé avec l'anticorps. Adrait et al,<sup>241</sup> ont réalisé en 2012 une élution de SEA par l'acide formique à 0.5%. Le risque avec

cette approche est d'avoir un phénomène d'accrochage aux parois du tube d'élution ou au cône de pipette si la protéine est en trop faible concentration, ceci malgré l'utilisation de plastique « low bind ». Pour limiter ce phénomène, il est possible d'augmenter la concentration en protéines dans le milieu avec l'ajout de BSA et/ou d'augmenter l'hydrophobicité du milieu en ajoutant un solvant comme l'acétonitrile de manière à réduire les fixations hydrophobes des protéines aux parois.

Dans l'article 2, nous avons proposé un protocole pour éluer la toxine, ce protocole a été optimisé au niveau de la concentration en acide formique, en BSA et en acétonitrile afin de limiter le phénomène d'accrochage. Six conditions au total ont été testées, regroupées Tableau 18, avec une acquisition en mode full HRMS (conditions de l'article 2) et à une concentration de SEA à 100 ng/g dans du BHI.

*Tableau 18 Résultats et conditions de l'optimisation de l'élution de la SEA après immunocapture.*

Condition	Paramètres			Résultats		
	Acide Formique	BSA	Acétonitrile	Intensité	CV %	Résultat en %
1	0.1%	0.01%	10%	39049114	17.6	78.7
2	0.1%	0.01%	20%	43935230	2.5	88.5
3	1%	0.002%	10%	38403740	12.8	77.4
4	0.1%	0%	20%	44192938	0.4	89.1
5	1%	0.002%	20%	49626954	6.0	100.0
6	1%	0.01%	20%	25010304	0.7	50.4

L'intensité du signal a été mesurée après déconvolution, le résultat exprimé en % est un ratio avec la plus forte intensité observée (100%). Pour les 6 conditions, les CV sont inférieurs à 20% donc interprétables. On peut observer que le pourcentage de BSA à 0.01% semble impacter l'intensité du signal, probablement par effet matrice (condition 6). Le CV% est inférieur à 10% lorsque le pourcentage d'acétonitrile est augmenté à 20%, limitant certainement la variabilité liée aux phénomènes d'accrochage. La condition 5 avec 20% d'acétonitrile et 0.002% de BSA a été retenue car elle propose la plus forte intensité, même si l'écart d'intensité est faible avec la condition 4 sans ajout de BSA. Nous avons préféré conservé un faible pourcentage de BSA, sans impact négatif observé sur le signal, pour limiter un éventuel accrochage à des concentrations inférieures à 100 ng/g de SEA

#### II.B.4.2 Analyse par protéomique top-down des protéines SE A, B, C, D, E et rA, rG, rH, rI en tampon.

Durant cette thèse, 9 protéines correspondant à différentes ESs étaient disponibles : 5 (SE A, B, C, D, E) provenant de Toxin Technology (TT) sous forme de protéines natives issues de *S. aureus* et 4 (SE rA, rG, rH, rI) produites au CEA/LERI sous forme de protéines recombinantes. Afin de caractériser ces protéines de manière globale, une analyse top-down a été réalisée avec l'acquisition full HRMS pour confirmer la masse de la protéine et observer de potentielles modifications de séquence. Puis l'acquisition PRM a permis de fragmenter les toxines dans le but de confirmer les parties N-terminales et C-terminales. Les deux acquisitions sont basées sur le protocole décrit dans l'article 2 mais avec une concentration en toxines de 20 µg/mL et

sans l'étape d'immunocapture. Les résultats de chaque toxine seront décrits dans un premier temps de manière individuelle puis ils seront suivis d'une analyse comparative. Il est important de noter que les toxines ont toutes un pont disulfure dans leur séquence (sauf SEI), pris en compte lors du calcul de la masse moléculaire théorique (analyses réalisées en conditions non-réductrices).

La toxine SEA provenant de TT a été largement décrite précédemment dans l'article 2, aussi elle ne sera pas développée de manière individuelle dans cette partie.

La toxine SEB provenant de TT est décrite par le fournisseur avec la séquence de référence d'Uniprot P01552. L'analyse full HRMS suivie d'une déconvolution a permis d'identifier une masse de 28365.19 Da soit une différence de 1.08 Da (38.1 ppm) par rapport à la masse théorique moyennée de 28366.27 Da. L'analyse en mode d'acquisition PRM a permis de confirmer la partie Nter avec la présence de 7 ions b allant de b5 à b44 et de confirmer la partie Cter avec la présence de 10 ions y allant de y5 à y41 comme décrit Figure 47. Les résultats top-down confirment la séquence théorique décrite dans uniprot.

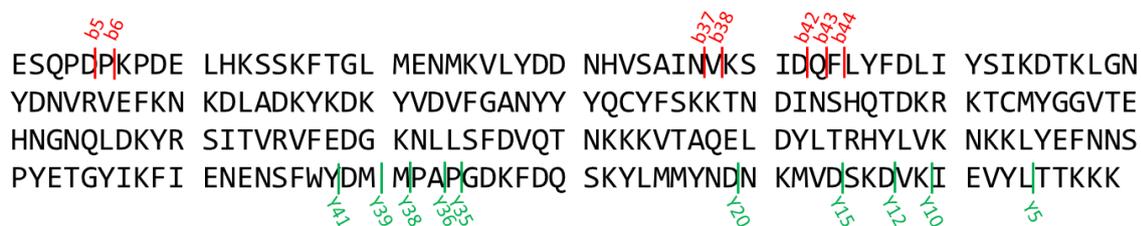


Figure 47 Séquence de la toxine SEB (Uniprot P01552) avec la position des fragments b et y observés.

Concernant la toxine SEC native (P34071), les résultats full HRMS concordent avec la séquence proposée d'Uniprot avec une différence de 1.32 Da (47.8 ppm). L'analyse PRM a permis d'identifier des ions b (4 ions de b5 à b44) et des ions y (10 ions y5 à y43) confirmant ainsi les parties Nter et Cter de la toxine SEC comme décrit Figure 48.

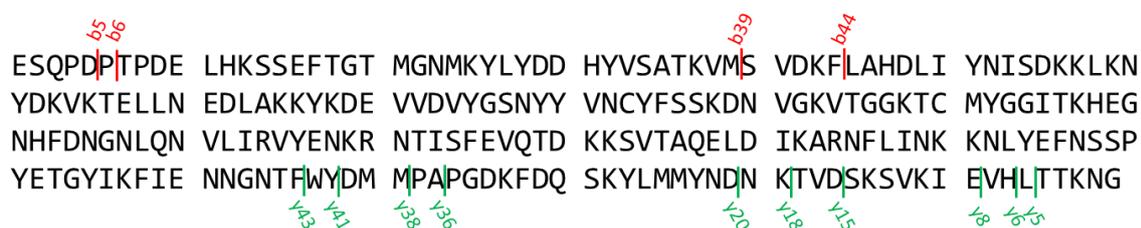
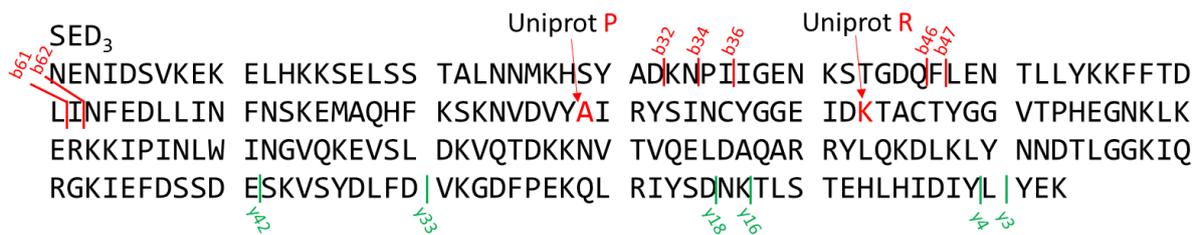


Figure 48 Séquence de la toxine SEC (Uniprot P34071) avec la position des fragments b et y observés.

La toxine SED provenant de TT est décrite par le fournisseur avec la séquence de référence d'Uniprot de P20723. L'analyse full HRMS suivie d'une déconvolution a permis d'identifier une masse de 26957.39 Da soit une différence importante de 16.84 Da (625.1 ppm) par rapport à la masse théorique moyenne de 26940.55 Da. Cependant, l'analyse PRM confirme les séquences Nter avec la présence de 5 ions b allant de b32 à b47 et Cter avec la présence de 6

ions y allant de y3 à y42 comme décrit Figure 49. Suite à ce résultat aberrant, les séquences de SED provenant du soucier de l'ANSES ont été comparées à la masse mesurée. Le variant SED<sub>3</sub> (variant 3) a une masse théorique (26958.57 Da) correspondant à la masse mesurée avec une différence de 1.18 Da (43.8 ppm). La séquence de SED<sub>3</sub> et celle proposée par TT divergent sur deux positions, non couverte par les fragments b et y observés : P89A et R103K comme décrit à la Figure 49. Une analyse par protéomique bottom-up (acquisition DDA) de la toxine TT a identifié les deux peptides avec les mutations de SED<sub>3</sub> (NVDVYAIR et YSINCYGGEIDK), ce qui va dans le sens d'une erreur dans la séquence proposée par TT. Ainsi, notre analyse top-down a mis en évidence une erreur dans la séquence protéique transmise par le fournisseur, résultat confirmé par bottom-up.



Cette prédiction a permis de corroborer l'hypothèse d'un même peptide signal pour SEE et SEA, avec l'ajout de trois acides aminés « SEK » supplémentaires à la séquence SEE proposée par Uniprot (P12993). Avec l'ajout de ces trois acides aminés, la masse théorique obtenue est de 26768.15 Da soit une différence de 0.95 Da (35.5 ppm) en accord avec la masse mesurée. L'analyse PRM a permis de confirmer la partie Nter avec l'identification cette fois-ci de 9 ions b allant de b11 à b47 comme décrit dans la Figure 51. L'identification de ces ions b confirme la présence de trois acides aminés supplémentaires comparés à la séquence de référence proposée par Uniprot. De plus une analyse bottom-up (DDA) a identifié le peptide « SEKSEEINEK », grâce à une position « miss-cleaved » sur la première lysine.

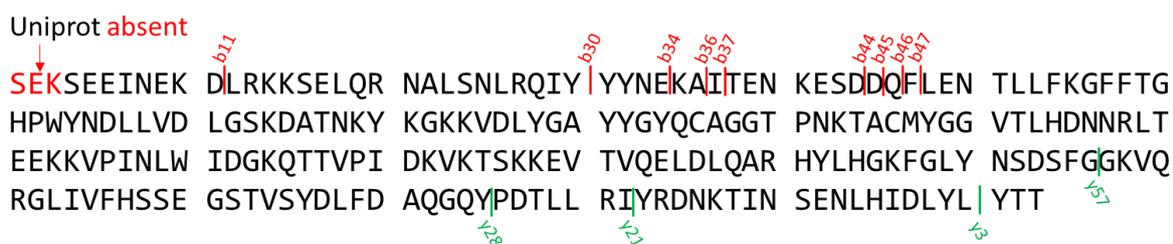


Figure 51 Séquence de la toxine SEE (Uniprot P12993 + SEK) avec la position des fragments b et y observés.

Les 4 prochaines toxines ont été produites de manière recombinante, elles n'ont donc pas une séquence similaire aux protéines natives. En effet, elles possèdent toutes au niveau Nter une méthionine pour initier la transcription et un tag histidine (...LEHHHHH) en Cter pour la purification de la protéine via des colonnes d'affinité de nickel.

La toxine rSEA provenant du CEA/LERI est décrite avec la séquence de référence Uniprot de POA0L2. L'analyse full HRMS suivie d'une déconvolution, Figure 52, génère 5 masses et aucune d'entre elles ne correspond à la masse théorique de 28287.85 Da (en vert dans la Figure 52). Nous observons cependant un écart constant entre les masses d'environ 183 Da (voir Figure 52). Cet écart de masse correspond exactement à la masse d'une molécule utilisée pour inhiber les protéases, l'AEBFS, afin de protéger les protéines de la protéolyse. Cependant, après un long temps de stockage, cette molécule peut aussi interagir avec la protéine d'intérêt<sup>323</sup>. Retirer 183 Da aux masses observées ne permet cependant aucune correspondance avec la masse théorique. Nous avons fait l'hypothèse que la première méthionine a été supprimée, ainsi nous avons soustrait la masse de la méthionine pour aboutir à une masse théorique de 28157.02 Da (en bleu Figure 52), correspondant à une des masses observées en tenant compte de la masse de l'AEBFS (28340.02 Da), différence de 0.36 Da (12.8 ppm). Actuellement aucune explication n'a pu être donnée concernant les masses observées à 28219.76 Da, 28403.24 Da et 28586.79 Da. Il pourrait s'agir de la rSEA avec une autre modification non identifiée.

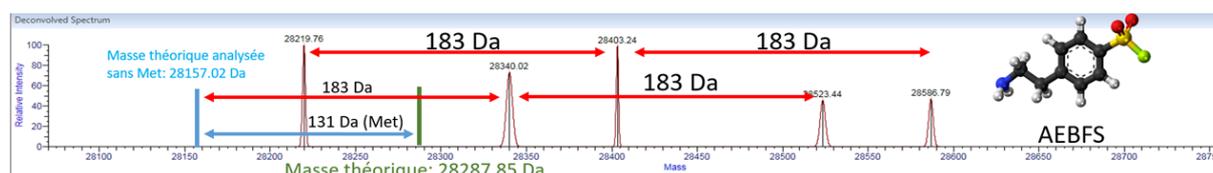


Figure 52 Déconvolution du signal de rSEA et schéma de la molécule AEBFS.

L'hypothèse de la perte d'une méthionine a été confirmée, Figure 53, par l'attribution de 5 fragments b spécifiques de la partie Nter sur la séquence sans méthionine, allant de b11 à b22. De plus, 11 fragments y compris entre y8 et y50 confirment la partie Cter avec le tag histidine.

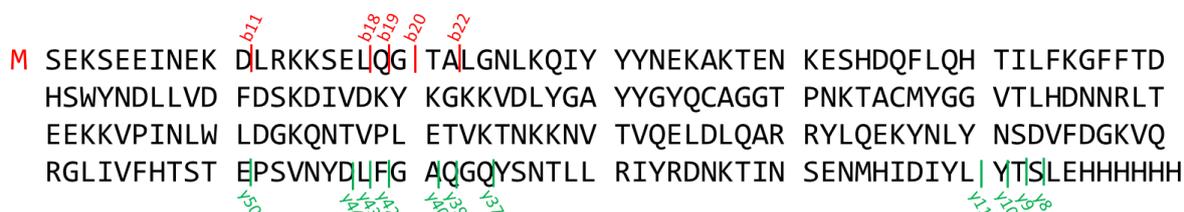


Figure 53 Séquence de la toxine rSEA (Uniprot POA0L2 + tag his) avec la position des fragments b et y observés.

La toxine rSEG provenant du CEA/ LERI est décrite avec la séquence de référence d'Uniprot de POA0L8. L'analyse full HRMS suivie d'une déconvolution a permis d'identifier une masse de 28234.66 Da soit une différence de 0.55 Da (19.5 ppm) par rapport à la masse théorique moyennée de 28235.21 Da. Aucune masse correspondant à un gain de 183 Da pour la molécule AEBFS n'a été identifiée, cela pourrait être dû à une conformation de la protéine limitant les sites de fixation de la molécule AEBFS. L'analyse PRM a permis de confirmer la partie Nter avec la présence de 5 ions b allant de b25 à b29 et de confirmer la partie Cter avec la présence de 8 ions y allant de y11 à y49 comme décrit Figure 54. Les résultats top-down confirment la séquence théorique décrite.



Figure 54 Séquence de la toxine rSEG (Uniprot POA0L8 + met + tag his) avec la position des fragments b et y observés.

La toxine rSEH provenant du CEA/LERI est décrite avec la séquence de référence Uniprot Q6VAM8. L'analyse full HRMS suivie d'une déconvolution révèle 3 masses, comme le montre la Figure 55, et aucune d'entre elles ne correspond à la masse théorique de 26310.72 Da. Une différence de masse de 183 Da a pu être identifiée entre les trois masses, correspondant à la molécule AEBFS.

Aucun fragment y n'ayant pu être identifié, nous avons fait l'hypothèse d'une dégradation d'une partie du tag histidine.

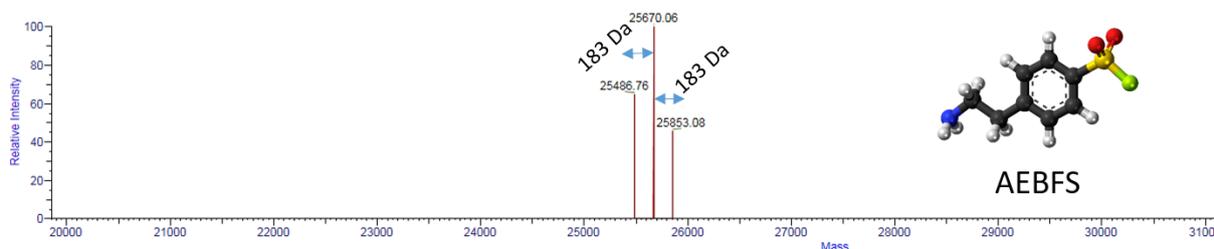


Figure 55 Déconvolution du signal de rSEH et schéma de la molécule AEBFS.

En effet, l'élimination des 6 histidines en Cter permet d'obtenir une masse théorique de 25487.85 Da équivalente à celle analysée (25486.76 Da) avec une différence de masse de 1.09 Da (42.8 ppm). De plus, la perte des 6 histidines en Cter a été confirmée par l'attribution de 12 fragments y allant de y12 à y52, décrits Figure 56, sur la séquence ne comportant pas les 6 histidines. De même, 7 fragments b compris entre b12 et b18 confirment la partie Nter avec la présence de la méthionine.

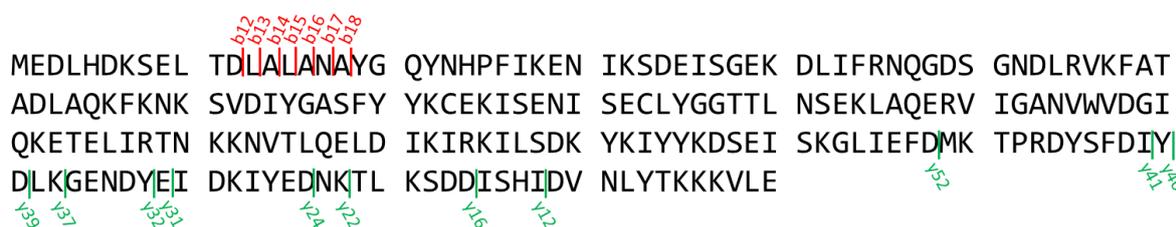


Figure 56 Séquence de la toxine rSEH (Uniprot Q6VAM8 + met + sans tag his) avec la position des fragments b et y observés.

La toxine rSEI provenant du CEA/LERI est décrite avec la séquence de référence d'Uniprot de Q7X0E6. L'analyse full HRMS suivie d'une déconvolution révèle deux masses, Figure 57, et aucune des deux ne correspond à la masse théorique de 26116.47 Da. Une différence de masse de 183 Da a pu être identifiée entre les deux masses correspondant à la molécule AEBFS. Une différence de 33.76 Da est encore présente entre la masse théorique et la masse analysée la plus proche, ce qui pourrait correspondre à une di-oxidation sur une alanine.

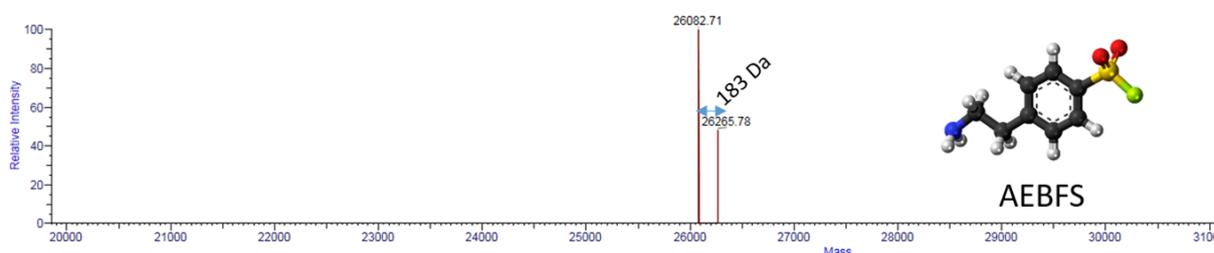


Figure 57 Déconvolution du signal de rSEH et schéma de la molécule AEBFS.

En effet, le recouvrement de séquence par protéomique bottom-up (en bleu sur la Figure 58) n'est pas total avec des portions de séquences non couvertes et possédant des alanines ou des arginines. Enfin, l'analyse PRM a permis de confirmer la partie Nter comportant une méthionine avec 6 ions b allant de b23 à b29, et de confirmer la partie Cter incorporant le tag his avec 5 ions y allant de y9 à y26, comme décrit dans la Figure 58.

b23  
b25  
b27  
b28  
b29  
b26  
b14  
b12  
b10

MQGDIGVGNL RNFYTKHDYI DLKGVITDKNL PIANQLEFST GTNDLISESN NWDEISKFKG  
 KKLDIFGIDY NGPCKSKYMY GGATLSGQYL NSARKIPINL WVNGKHKHTIS TDKIATNKKL  
 VTAQEIDVKL RRYLQEEYNI YGHNNTGK GK EYGYKSKFYS GFNNGKVLFH LNNEKSFSDY  
 LFYTGHLPLV SFLKIYEDNT IIESEKFHLD VEISYVDSNL EHHHHHH

Figure 58 Séquence de la toxine rSEI (Uniprot Q7X0E6 + met + tag his) avec la position des fragments b et y observés et en bleu le recouvrement de séquence en analyse bottom-up (par digestion trypsique).

A noter qu'une erreur de masse systématiquement proche de +1 Da est observée pour l'ensemble des analyses full HRMS réalisées sur les 9 protéines, conduisant à des écarts de masse de l'ordre de 30-40 ppm, écart supérieur à ce qui est indiqué dans la littérature avec un analyseur Orbitrap<sup>318</sup>. Aucune explication n'a pu être trouvée. Dans l'article 2 nous avons utilisé la masse mesurée pour l'étalon interne SEA<sub>2</sub> afin de recalibrer les spectres, ce qui explique pourquoi les écarts de masse sont inférieurs à 15 ppm.

La fragmentation HCD réalisée lors de l'acquisition PRM a permis dans la plupart des cas de confirmer les parties Nter et Cter des 9 standards, avec l'identification de plusieurs ions fragments b et y majoritaires. Il est intéressant de rechercher une explication à la présence de ces fragments majoritaires. Ives et al,<sup>324</sup> ont récemment décrit en 2020 l'existence de sites de fragmentation préférentiels lors d'une fragmentation HCD, selon l'état natif ou dénaturé de la protéine (Figure 59). Dans notre cas, nous sommes entre l'état natif et l'état dénaturé. En effet, les entérotoxines sont analysées en milieu non réducteur et possèdent donc toujours leur pont disulfure (sauf pour SEI). D'autre part, les conditions de solvant et de température de la source d'ionisation tendent à dénaturer la toxine (conditions non natives). Nous pouvons tout de même faire un lien avec les observations de Ives et al, 2020<sup>324</sup>.

L'acide aminé D (acide aspartique) est celui qui possède de loin la plus forte probabilité d'être

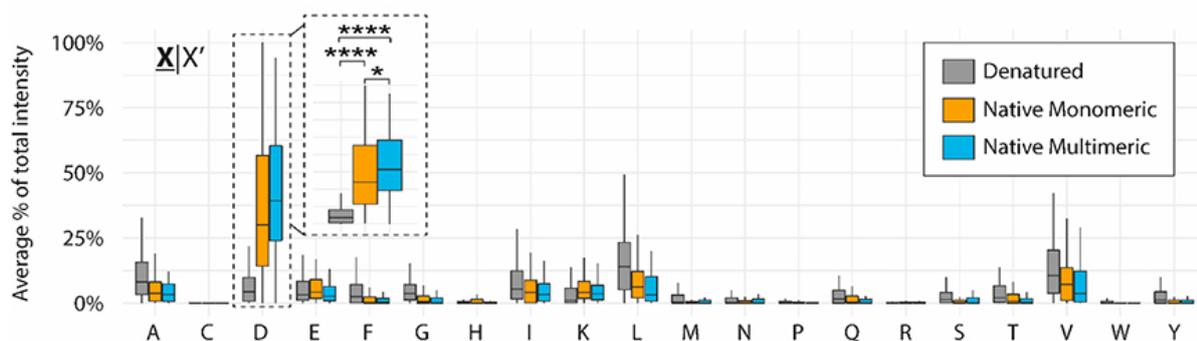


Figure 59 Probabilité d'observer les fragments b en fonction de l'acide aminé précédent, d'après Ives et al 2020.

à l'origine d'une fragmentation d'après leurs travaux, comme le montre la Figure 59. Il est intéressant de constater que 7 des 9 toxines que nous avons analysées possèdent des fragments b majoritaires après un acide aspartique. Comme par exemple avec la toxine SEB, Figure 60, où l'on peut observer la présence d'un fragment b intense au niveau d'un acide aspartique (b5). D'après la Figure 59 les acides aminés A, D, E, I, K, L et V sont ceux qui ont la plus forte probabilité d'être à l'origine d'une fragmentation, et nous retrouvons 58% des fragments b (29/50 fragments) possédant un de ces acides aminés en dernière position.

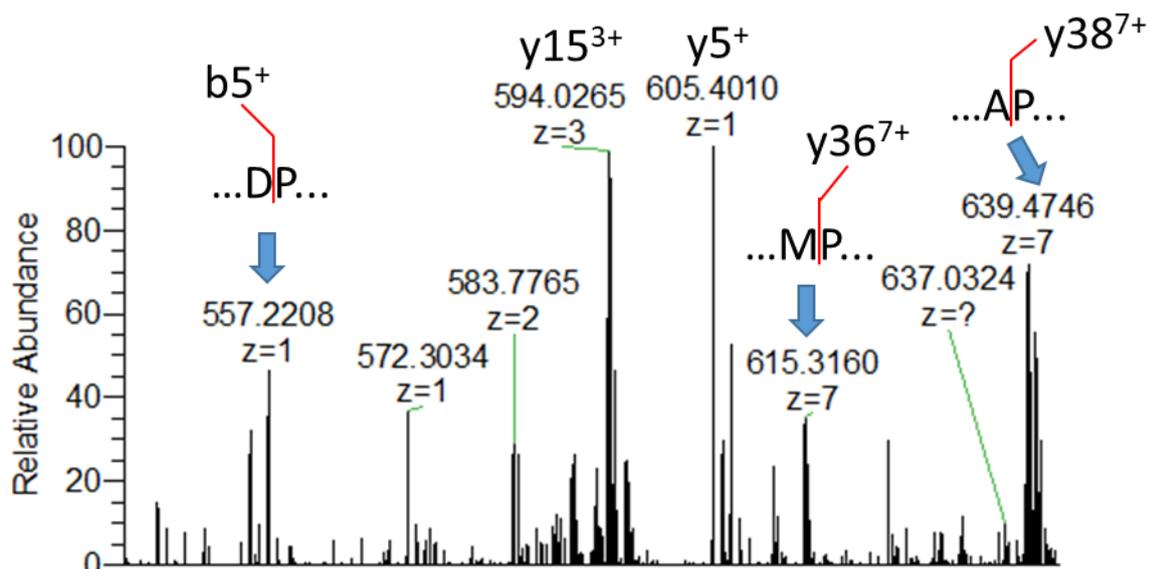


Figure 60 Spectre de fragmentation de la toxine SEB, identification des fragments majoritaires

Ives et al,<sup>324</sup> 2020 ont également étudié la fragmentation en partie Cter produisant des ions y, la probabilité d'observer les fragments y est illustrée Figure 61.

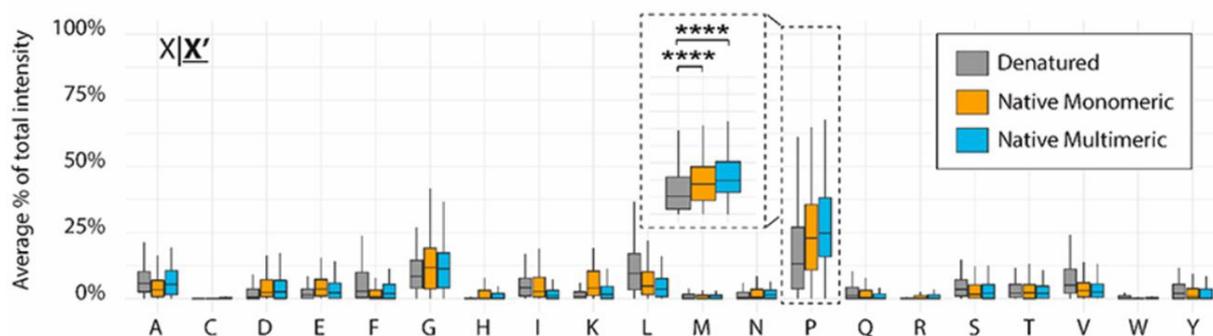


Figure 61 Probabilité d'observer les fragments y en fonction de l'acide aminé précédent, d'après Ives et al 2020.

L'acide aminé P (proline) serait celui qui possède la plus forte probabilité d'être à l'origine d'une fragmentation. Cela est confirmé par nos analyses. Sur les 11 prolines retrouvées en partie Cter de nos toxines, 8 sont à l'origine d'une fragmentation soit environ 81% de probabilité de fragmentation, score proche de celui proposé par Ives et al 2020<sup>324</sup>. Toujours pour la toxine SEB, Figure 60, nous observons deux fragments intenses après des prolines (y36 et y38).

Il est intéressant de noter que les fragments b observés avec la SEA native issue de TT et la rSEA sont en partie équivalents (b11, b18, b19, b20, b22), notamment l'ion b11, comme illustré Figure 62, nettement majoritaire dans les deux cas (voir également article 2 Figure 1.C1). Cette observation s'explique probablement par la présence de l'acide aspartique en position 11, site de fragmentation préférentiel en Nter comme suggéré par Ives et al 2020<sup>324</sup>. A noter que la SEA de TT n'a pas généré d'ion y comparé à la rSEA, les histidines chargées positivement devant favoriser la détection des fragments en Cter.

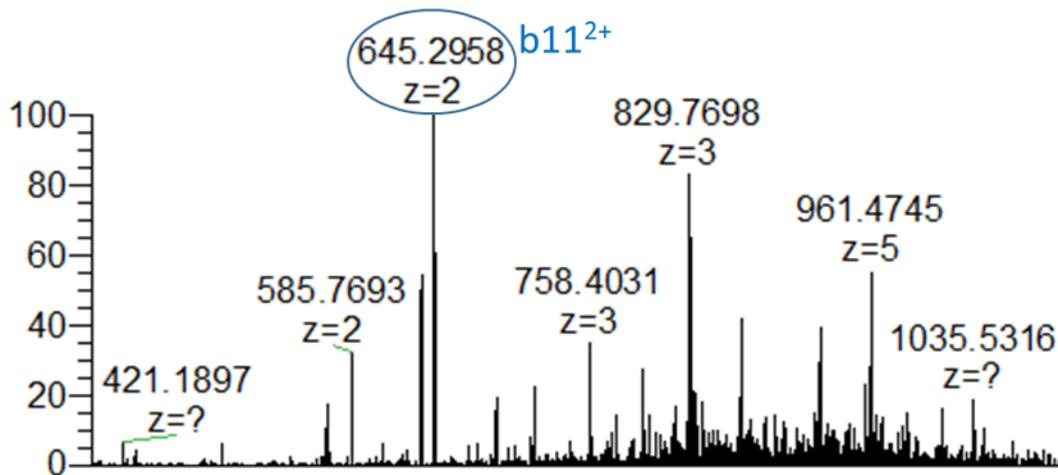


Figure 62 Spectre de fragmentation de la toxine rSEA, identification du fragment b11

## II.B.5 Conclusion et perspective partie B

En conclusion, nous avons pu caractériser l'ensemble des protéines (sauf rSEI) par protéomique top-down. Ce type d'analyse a permis de mettre en évidence dans certains cas des écarts de masse notables par rapport aux séquences de références proposées d'Uniprot, dûs soit à une séquence protéique erronée ou soit à une erreur d'identification du peptide signal. Pour les protéines recombinantes, il a régulièrement été retrouvé la présence de AEBFS, une molécule inhibitrice des protéases, utilisée pour conserver les protéines recombinantes, induisant un écart de masse de 183 Da. Dans le cas de la rSEA, nous avons pu identifier une perte de la première méthionine, confirmée par les ions fragments b. Concernant la toxine rSEH, la perte du tag histidine a pu être identifiée puis confirmée par les ions fragments y. Pour la toxine rSEI une interrogation reste sur sa séquence où des pistes ont pu être proposées mais par manque de temps non explorées. Enfin, les ions fragments majoritaires y et b identifiés pour l'ensemble des protéines permettront de développer dans le futur une méthode multiplexe d'identification et de quantification par protéomique top-down de l'ensemble de ces 8 toxines, comme proposé dans l'article 2.

## II.C Résultats partie C : Détection et quantification d'un large panel d'entérotoxines sans l'utilisation d'anticorps, et applications.

### II.C.1 Introduction partie C

A ce jour, 35 types d'entérotoxines staphylocoques sont décrites dans la littérature dont 20 types possèdent une activité émétique démontrée<sup>9,11,18,27,40,41,75</sup>. Comme décrit précédemment, la norme NF EN ISO 19020 ne permet de détecter que les cinq premières ESs, les « classiques »<sup>123,124</sup>. La méthode LC-MS développée dans l'article 1 permet la détection et la quantification des 8 premières ESs dans les matrices alimentaires. Dans la littérature, des auteurs ont proposé des méthodes ELISA simplexe permettant la détection de 11 entérotoxines autres que les classiques (SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEK, SEM, SEP, SEQ, SER, SEY et SE02) (cf paragraphe I.B.2.2). Cependant, ces méthodes ELISA ont pour la plupart du temps été développées dans le cadre d'une étude précise et ne sont donc pas disponibles dans le commerce. De plus, assurer le maintien à long terme de la production d'anticorps pour un large panel d'ESs est la contrainte principale rencontrée lors de la mise en place des méthodes ELISA. La solution consisterait à proposer un nouvel outil d'analyse utilisant des réactifs disponibles dans le commerce. Afin de couvrir une large gamme d'entérotoxines, cet outil doit être multiplexe, spécifique et suffisamment sensible pour pouvoir détecter les faibles concentrations d'ESs dans des matrices complexes.

La spectrométrie de masse apparaît comme une alternative intéressante aux méthodes immuno-enzymatiques. Nous avons illustré dans l'article 1 l'intérêt de la protéomique bottom-up : sensibilité (après immunocapture), spécificité et quantification multiplexe. Nous avons vu l'apport de l'immunocapture pour la sensibilité, néanmoins la préparation d'échantillons avant analyse par spectrométrie de masse ne nécessite pas forcément l'utilisation d'anticorps. Il est néanmoins nécessaire de connaître la séquence en acides aminés des entérotoxines et des variants pour identifier les peptides protéotypiques et proposer une méthode LC-MS ciblée.

Malgré l'intérêt de la LC-MS pour la caractérisation des ESs, peu d'études ont été publiées sur la détection multiplexe des ESs par LC-MS. Les études se sont principalement concentrées sur la détection des 5 ESs classiques (SEA-SEE). Seulement quelques méthodes ont été publiées sur la détection de 7 ESs émétiques par LC-MS: SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEQ<sup>224,231,289-295,305</sup>. Aucune étude robuste dédiée à la détection des 16 autres ESs par LC-MS n'a été décrite. De plus, la détection de ces nouvelles ESs a le plus souvent été réalisée dans le cadre d'analyses non ciblées (DDA) du protéome sécrété par *S. aureus*. Ainsi, la spécificité de ces méthodes pour la détection des ESs n'a pas été évaluée. Enfin, il n'existe pas de base de données peptidiques établie (i.e. peptides protéotypiques) utilisable pour l'analyse LC-MS et couvrant un grand nombre d'ESs et de leurs variants.

Un autre point concerne l'absence d'étalon de haute pureté et certifié, ceci pour un grand nombre d'ESs, rendant la mise en œuvre de méthodes quantitatives difficile. En effet, seuls

des étalons pour les 5 ESs classiques sont disponibles dans le commerce. Il est néanmoins possible de proposer une méthode de quantification absolue par spectrométrie dans ces conditions. Ainsi, la méthode dite "Hi3" présentée au chapitre I permettrait de s'affranchir de l'absence d'étalon dédié comme décrit par Silva et al, 2006<sup>280</sup>. En effet, cette méthode permet une semi-quantification en utilisant l'étalon d'une protéine autre que celle recherchée. Pour ce faire, la moyenne des signaux des trois « best » peptides des protéines recherchées est comparée à celle des signaux des trois « best » peptides d'un étalon protéique commun.

Le premier objectif de ce chapitre est de proposer une méthode LC-MS permettant la détection d'une large gamme d'entérotoxines sans utiliser d'anticorps, et d'estimer la concentration des ESs sans étalon dédié. La méthode LC-MS a d'abord été optimisée en utilisant des entérotoxines naturellement produites dans un milieu de culture par des souches de *S. aureus*. Pour ce faire, 49 souches de *S. aureus* ont été sélectionnées parmi les 500 souches disponibles à l'ANSES. Ces souches ont été précédemment séquencées et caractérisées par WGS, notamment au niveau des gènes codant les entérotoxines staphylococciques. Les souches ont été sélectionnées pour couvrir à la fois l'ensemble des ESs disponibles (soit 24) et leurs variants associés (soit 162 variants). L'extraction des ESs produites par les souches de *S. aureus* a été réalisée par précipitation des protéines en acidifiant le milieu de culture. Dans un premier temps, une analyse en mode non ciblé (DDA) nous a permis d'identifier les peptides générés par digestion à la trypsine des ESs et détectables par LC-MS. Au total, 207 peptides ont été identifiés. Une méthode ciblée PRM a ensuite été développée pour accroître la sensibilité de détection, et aussi confirmer les « best » peptides parmi ces 207 peptides, c'est-à-dire les peptides prototypiques générant les signaux les plus intenses en LC-MS. Concrètement, au moins trois peptides spécifiques pour chaque type d'ES ont été sélectionnés. Comme décrit dans l'article 1 pour la toxine SEI, augmenter le nombre de peptides par toxine permet de couvrir chaque variant. Ainsi, 93 peptides spécifiques ont été sélectionnés pour les 24 entérotoxines ciblées, et ont été inclus dans la méthode PRM finale puis utilisés pour la quantification Hi3. Nous avons réalisé la quantification Hi3 à partir d'une gamme d'étalonnage moyenne issue des 5 solutions étalons disponibles pour les entérotoxines SEA à SEE. Nous avons évalué ce protocole par le biais calculé entre la quantification Hi3 et la quantification à partir des étalons dédiés (i.e. gammes d'étalonnage individuelles de SEA à SEE). Enfin, la base de données peptidiques générée sur un large panel d'entérotoxines sera mise à la disposition de la communauté scientifique (article 3) et constitue un autre résultat de l'étude.

## II.C.2 Article 3: Multiplex detection of 24 staphylococcal enterotoxins in culture supernatant using Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry (LC-MS)

Donatien Lefebvre <sup>1,2</sup>, Kevin Blanco-Valle <sup>1</sup>, Jacques-Antoine Hennekinne <sup>1</sup>, François Fenaille <sup>2</sup>, François Becher <sup>2</sup>, and Yacine Nia <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory for Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France; donatien.lefebvre@anses.fr ; kevin.blancovalle@anses.fr ; jacques-antoine.hennekinne@anses.fr ; yacine.nia@anses.fr

<sup>2</sup> Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France; francois.fenaille@cea.fr ; francois.becher@cea.fr

\*Correspondence: yacine.nia@anses.fr ; Tel.: +33 1 49 77 27 56

**Abstract:** Staphylococcal food poisoning outbreaks are caused by the ingestion of food contaminated with staphylococcal enterotoxins (SEs). Among the 27 SEs described in the literature, only few enterotoxins can be detected using immuno-enzymatic based methods which implementation depends strongly on the availability of antibodies. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) was proposed but for detection of a limited number of enterotoxins. In this work, LC-MS was developed for the detection and quantification of 24 SEs in culture supernatant. A database of 93 specific signature peptides and LC-MS parameters were optimized using sequences of 24 SEs including their 162 variants. A Label-free quantification protocol was established to overcome the absence of calibration standards. The LC-MS method showed high performance in terms of specificity, sensitivity and accuracy. It was successfully applied on 49 samples of culture supernatant naturally contaminated with SEs. SEs concentration measured depends both on SEs type and on the *S.aureus* strains. This study indicates that LC-MS is an alternative and complementary tool to ELISA methods mainly used for SEs detection. LC-MS advantage clearly lies both in the multiplex analysis of a large number of SEs, and in the automation of the analysis of a large number of samples.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; Staphylococcal enterotoxins; Mass Spectrometry; signature peptides

**Key Contribution:** A database of 93 specific signature peptides and LC-MS parameters were optimized using sequences of 24 SEs including their 162 variants. SEs expression by *S.aureus* in culture supernatant strains depends both on SEs type and on the *S. aureus* strains.

## 1. Introduction

Staphylococcus enterotoxins (SEs) are potent gastrointestinal exotoxins produced by Coagulase Positive Staphylococci (CPS) including *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*). They are resistant to conditions (heat treatment, low pH) that easily destroy CPS, and to proteolytic enzymes, hence retaining their activity in the digestive tract after ingestion [1]. Consumption of food contaminated by a few nanograms of SEs induce rapidly and abruptly symptoms such as nausea, copious vomiting, abdominal cramps and diarrhea. Reported dose levels of SE involved with foodborne outbreak are scarce and varying. The lowest suspected dose was estimated for the type SEA at 0.06 ng of SEA /g [2]. Since 2011, the annual zoonotic reports of the European Food Safety Authority [3] have highlighted SEs as a serious causative agent of foodborne outbreaks. Thus, SEs are assumed a threat to public health.

SEs constitute a family of more than 27 different serological types sharing similarities in structure, function and sequences. However, emetic activity has only been demonstrated for 20 SEs (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEY)[4–8]. SEs types SEIJ, SEIU, SEIV, SEIW, SEIX, SEIZ, SEI26, SEI27 have not yet tested for their emetic activity [9–12]. The genes encoding the different SEs are located on accessory genetic elements, i.e., prophages, plasmids, pathogenicity islands (SaPIs), enterotoxin gene clusters (*egc*) and the staphylococcal cassette chromosome (SCC). Recently, the implementation of Whole Genome Sequencing tools showed that one *S. aureus* strain could contain between 1 and 11 types of staphylococcal enterotoxin genes (*se*) that can express SEs simultaneously. Indeed, studies carried out on the investigation of Staphylococcal Food Poisoning Outbreak demonstrated that one *S. aureus* strain is able to produce at least two types of SEs in the contaminated food [13,14]. Moreover, the divergence of SEs is further increased by genetic and amino-acid variations within each types, referred to as toxin variants [15]. For example, 17 variants were reported for the type SEI.

Present detection methods for SEs include bio-assays, Mass-Spectrometry (MS) and immunoenzymatic assays. This last one is the most often used. Currently, only the so called classical enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED, and SEE) can be detected using commercially available detection kits. For SEB, due to its potential dual use, more than 17 commercial kits are available [16]. In food matrices, the five classical SEs can be analyzed according to the EN ISO 19020 using two validated commercial kits, Vidas SET2 (Biomérieu®) and Ridascreen SET Total (Rbio-pharm®).

Today, there are no commercially available reagents or kits allowing detection of the other SEs having emetic activity (SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEY). In fact, very limited studies were published on the detection of these SEs [17–24]. In these studies, authors mainly focused on the development of ELISA methods using in-house produced anti-SEs antibodies, which is the major drawbacks that have prevented these methods from being implemented on a large scale.

Mass spectrometry (MS) method is an interesting alternative to immunoassay. This technique has the advantage of being sensitive, specific and allowing multiplex protein detection. MS method can be optimized for multiplex analysis, once the sequences of the SE are characterized. Unlike ELISA methods, LC-MS can be implemented without the need of specific reagents, which allows overcoming the need of antibodies. Moreover, LC-MS can be extended to the newly described enterotoxins.

Only few studies were published on multiplex SE detection by MS technique. Among the 27 SEs described, studies mainly focused on the detection of the five classical SEs (SEA-SEE) in order to overcome the lack of specificity of immuno-enzymatic assays. Few studies have been published on the detection of the other 7 emetic SEs by LC-MS (SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEQ) [25–33]. However, no studies have been published on a multiplex detection of all emetic SEs.

Studies dedicated to the implementation of enzyme-linked immunosorbent assays and MS methods for the detection of SEs have not taken into account the diversity of the sequence variants of SEs, which may have an impact on their specificity. Only Lefebvre et al, 2021 used sequences of 8 SEs (SEA to SEE, SEG, SEH and SEI) and their variants for development of MS method [34]. Last but not least, only the SEA, SEB, SEC, SED and SEE standards can be purchased in lyophilized form and then reconstituted in the laboratory which can induce a significant bias. Thus, the lack of SEs calibration solution for all SEs prevents the implementation of quantitative methods. To overcome this issue, the so-called “Hi3” using a proven label-free quantification method can be implemented [35]. It has been described that the concentration of a protein in a complex mixture can be estimated using the signal of the three most intense peptides obtained from standard solution. This approach was used in different studies for the analysis of the cytoplasm of various mutants of *S. aureus* and *B. subtilis* allowing an absolute quantification of several proteins of the cytosolic proteome [36,37].

In this study, a label and antibody-free LC-MS method based on the bottom up proteomics approach was optimized for the multiplex quantification of the 24 SE types in medium culture

i.e. SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEIU, SEIX, SEY, SEIZ, TSST1. In order to overcome the lack of antibodies for the new described SEs, a quick acid precipitation protocol was developed. A 93 signatures peptides database was established for 24 SEs types taking into account 162 variants. The LC-MS method was tested on 24 SEs produced in medium culture by a panel of 49 representative *S.aureus* strains characterized by WGS tool for their content on *se* genes. The LC-MS method was evaluated in term of specificity, sensitivity and accuracy. Finally, SE quantification was performed by the label free Hi3 method in order to overcome the absence of SEs standard solution. Types of SEs and their concentrations secreted by each *S.aureus* strain were estimated, showing the ability of each strain to produce simultaneously several types of SEs and at different concentration levels depending on the type of SE.

## 2. Results and discussion

### 2.1. *Se* genes characterization

Reference of *S. aureus* strains, types of *se* genes and their variants were presented in (Table 1). More detailed information on *S. aureus* strains were reported in Supplementary Materials (Supplementary data origin of strains).

Among the 49 *S. aureus* strains. 45 strains (92%) were isolated from food samples mainly involved in food poisoning outbreaks indicating their ability to express SEs. They were sequenced and analyzed using NAuRA [15] genomic tool. Results showed that each *S. aureus* strain harbors between two and 11 *se* genes. 11 *se* genes contain between two and five variants: *sea* (4), *seb* (4), *sed* (4), *see* (3), *seh* (4), *sej* (4), *sep* (3), *seq* (5), *ser* (4), *ses* (2), *sez* (4). Eight enterotoxins contain between six and ten variants: *seg* (6), *sec* (10), *sek* (8), *sem* (9), *sen* (9), *seu* (10), *sey* (6), and *tsst1* (6). The four *se* enterotoxin *sel*, *sei*, *seo* and *sex* contains 11, 12, 13 and 20 variants, respectively. Finally, SET type has no variants. The *sev*, *sew*, *sel26* and *sel27* genes were not detected in the strains analyzed in this work. This may be explained by the rarity of presence of these genes [15]. In total, 24 *se* genes and their 162 variants were harbored by the 49 *S.aureus* strains which were used to prepare SEs naturally contaminated medium samples.

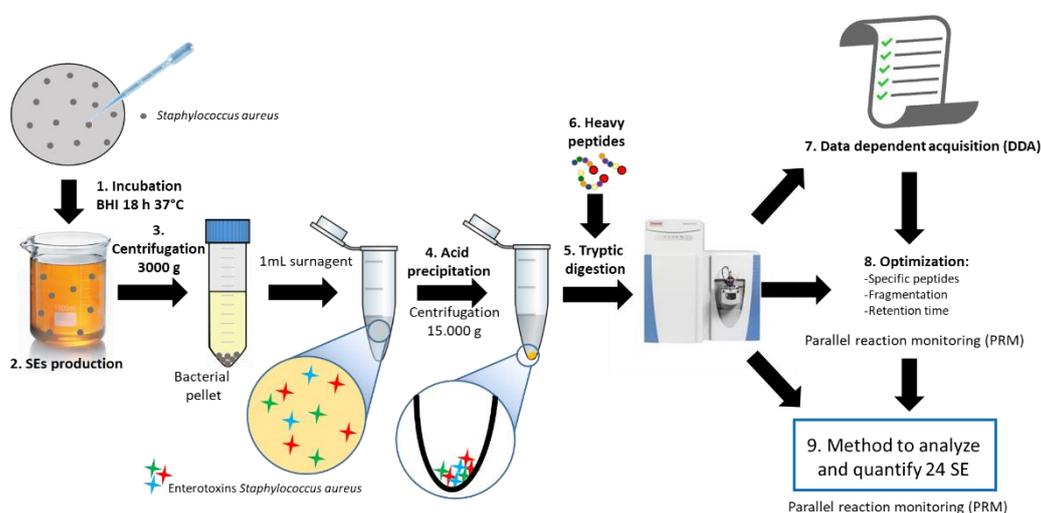
### 2.2. Establishment of signature peptides database for each enterotoxin types:

The contaminated Brain Heart Infusion Broth (BHI) samples by SEs were prepared for each *S.aureus* strain and then were submitted to the acid precipitation protocol, tryptic digestion and LC-MS analysis as described in Figure 1.

SEs peptides obtained in contaminated BHI samples were analyzed by LC-MS in DDA mode (non-targeted analysis) and were processed by X!TandemPipeline 0.4.3 [38] using both genomic sequences obtained by NARA genomic software [15] and DDA data. This step allows to determine all peptides and their corresponding retention times (RT). In total, for the 24 SEs and their variants, a first large list of 207 peptides was established (Supplementary data list of 207 peptides). Between four to 13 peptides were detected for each ES type (number of peptides): SEA (12), SEB (12), SEC (14), SED (9), SEE (8), SEG (7), SEH (10), SEI (10), SEIJ (6), SEK (10), SEL (8), SEM (7), SEN (6), SEO (8), SEP (5), SEQ (13), SER (11), SES (7), SET (9), SEIU (4), SEIX (9), SEY (8), SEIZ (5) and TSST1 (9). These 207 peptides were fragmented with 3 different collision energies 15, 18, and 21% CE. The best collision energy was selected on the Extracted-ion chromatogram (XIC) of the three most intense fragments for each peptide. Fragment selection was performed using Skyline version 21.1 software [39], only the y ions were analyzed. The fragmentation energies and the selected fragments for further quantification are shown in Supplementary data (list of 207 peptides). An example of optimized collision energy for SEA is shown in Table 2.

These 207 peptides were analyzed in PRM mode for identification of the best responder peptides as described in Lefebvre et al, 2021 [34]. Among these best peptides, the most intense and non-interfered y-ion fragments were selected for peptide detection and quantification. At least three specific peptides were selected for each type of enterotoxin taking into account SEs variants. Therefore, 93 specific signature peptides covering the 24 SEs and their variants were selected and included in a signature peptide database. Enterotoxins (and their number of specific peptides) are: SEA (5), SEB (3), SEC (4), SED (3), SEE (4), SEG (5), SEH (4), SEI (5), SEIJ (4), SEK (4), SEL (4), SEM (4), SEN (3), SEO (3), SEP (4), SEQ (3), SER (3), SES (4), SET (3), SEIU (4), SEIX (4), SEY (4), SEIZ (5) and TSST1 (4) (see Supplementary Materials). An example of the optimization and identification of specific peptides for enterotoxin SEA is described in Table 2. Only one common specific peptide (QNTVPLETVK, m/z = 564.8166) was detected in the four variants. In order to avoid negative deviation, this result highlight the importance to optimize several specific peptides for each type of SEs taking into account sequence variants.

All peptides reported for SEA to SED in the literature were also detected in the list of 207 peptides [40–44]. For enterotoxins SEA, SEB and SED, authors determined between two to four specific peptides that we confirmed in this study [40–44]. Muratovic et al [40] reported a set of eight peptides for SEA and eight peptides for SEB. These SEB peptides were identified in our set of peptides. For SEA, six over eight peptides were available in our set of peptides. There is no published work on the signature peptides representative of a larger set of SEs as performed in this work. Moreover, for the first time, genomic data related to SEs variants were taken into account for the selection of specific signature peptides. Thus, the established list of the 93 specific signature peptides can be considered as a reference database for further works on the detection of SEs using LC-MS method, and could be used for further applications in food matrices.



*Figure 1: Workflow for detection and quantification novels SEs: 1-2) Production of SEs by S. aureus, 3) elimination of S. aureus by centrifugation, 4) concentration of SEs by acid precipitation, 5-6) tryptic digestion and addition of heavy pep-tides, 7) DDA analysis for peptide identification, 8) optimization of PRM for identified peptides by DDA and 9) method for analyzing and quantifying SEs.*

Table 1: identification of genes coding for enterotoxins with the NAuRA tool in 49 strains. Each number corresponds to a variant coding for an enterotoxin.

Strain	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>sek</i>	<i>sel</i>	<i>sem</i>	<i>sen</i>	<i>seo</i>	<i>sep</i>	<i>seq</i>	<i>ser</i>	<i>ses</i>	<i>set</i>	<i>seu</i>	<i>sex</i>	<i>sey</i>	<i>sez</i>	<i>tsst1</i>			
05CEB51			1			1	1	1			1	1	1	19							17	17					
05CEB52		2				2		2				2	2	2							2	4	2	2			
05CEB53			3			3		3			5	3	3	3							5						
06CEB196	3			5					1	5							4	1					45				
06CEB83			8								6												4		2		
08CEB393						3		4	3			15	3	3	2		1	3					9				
08CEB402																						36	7				
09CEB231	3			1					1								5						5				
09CEB303									2								2	1	1				5				
09CEB314					2																		12				
10CEB282						3		4				6	3	3									9				
10CEB401	3		4							2	4						2						5				
11CEB110						7		4				4	7	6							5	34	6				
12CEB137			2								2												14		4		
12CEB368		1								3							1						15	3			
12CEB496	3	3						3															16				
12CEB512						5		6				4	5	3							4	10	1				
13CEB193	2		2								2												7		2		
13CEB437			3			3		3			10	3	3	3									6				
14A / FRI361			3	1		3		3	1		5	8	3	3			1						5				
14SBCL1004	3		10								4												5				
14SBCL770	1					4		10				5	4	4									1		3		
15SBCL1151		1				3		4		7		4	3	3		5							9				
15SBCL1428						3		4				4	3	3									4	10	1		
15SBCL1438			7					11			1		6	5									9	22	4	1	5
15SBCL452	3					3		4	1			4	3	3			4						9				
16SBCL1028															3								1				

16SBCL1204								2		12					2	8	7			10	4	2	2		
16SBCL1368	4		1												8						5		1		
16SBCL246								3		1					4		8			4	24				
16SBCL259								3													25				
16SBCL899	4							4		5					5	4	4			1			3		
17SBCL25			3							13					9	9	9			11	28				
17SBCL330								3		3					12	8	3	3		5			6		
17SBCL693	3									11					2						3				
18SBCL601										4											3				
18SBCL855								2		3					15	1					9				
19SBCL1059										3					4						9				
19SBCL591	3									2					9					2	3				
20SBCL08										1					7	4	7	6			5	3			
337E										4					3	4					5	41			
349E	3														4					1	5				
352E															13						9	22	4	1	5
356E										3					4						4	10	1		
42A / FRIS6	1	1													1					1	5				
43A / FRI137										1	1	1			1	1	1	1			7	17			
44A / FRI1230															4					4	1	5	3		
45A / FRI1151M										3					1					1	5				
46A / FRI326																				3			5		
Number of variants	4	4	10	4	3	6	4	12	4	8	11	9	9	13	3	5	4	2	1	10	20	6	4	6	

Table 2: Optimization and identification of best peptides for SEA: Each peptide was identified by DDA analysis. Optimization for retention time (RT), charge (z) / mass (m/z), fragmentation energy (EC%), and fragment ion. WGS result for the representativeness of the peptide.

SEA Peptide	m/z	z	RT (min)	EC%	Fragments <sup>(1)</sup>	Detected <sup>(2)</sup>	Not detected <sup>(3)</sup>	common SEs <sup>(4)</sup>	Specific peptide <sup>(5)</sup>
GLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQYSNTLLR	1109.8930	3+	14.9	18	y <sub>9</sub> <sup>+</sup> , y <sub>10</sub> <sup>+</sup> , y <sub>12</sub> <sup>+</sup>	2, 3	1, 4		x
NVTVQELDLQAR	693.3728	2+	9.5	21	y <sub>9</sub> <sup>+</sup> , y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , y <sub>10</sub> <sup>+</sup>	1, 3, 4	2		x
QNTVPLETVK	564.8166	2+	7.3	18	y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , y <sub>6</sub> <sup>++</sup> , y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	1, 2, 3, 4			x
SELQGTALGNLK	615.8381	2+	8.5	21	y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , y <sub>9</sub> <sup>+</sup> , y <sub>10</sub> <sup>+</sup>	3, 4	1, 2		
YNLYNSDVFDGK	717.8304	2+	10	18	y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , y <sub>9</sub> <sup>+</sup> , y <sub>10</sub> <sup>+</sup>	1, 3, 4	2		x
GFFTDHSWYNDLLVDFDSK	769.3515	3+	15.9	18	y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	3	1, 2, 4		
QIYYYNEK	560.7691	2+	6.0	18	y <sub>4</sub> <sup>+</sup> , y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	1, 3, 4	2	SEE1, 2, 3	
SELQGAALGNLK	600.8328	2+	8.5	18	y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , y <sub>8</sub> <sup>+</sup> , y <sub>9</sub> <sup>+</sup>	1	2, 3, 4		
GLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQNSNTLLR	1093.5529	3+	14.4	18	y <sub>9</sub> <sup>+</sup> , y <sub>10</sub> <sup>+</sup> , y <sub>12</sub> <sup>+</sup>	1, 4	2, 3		
GFFTNHSWYNDLLVDFDSK	769.0235	3+	15.4	18	y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	1, 4	2, 3		
EVTVQELDLQAR	700.8726	2+	9.8	18	y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , y <sub>7</sub> <sup>+</sup> , y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	2	1, 3, 4	SEE1, 2, 3	x
SELQGVALDNLR	657.8542	2+	10.1	18	y <sub>5</sub> <sup>+</sup> , y <sub>6</sub> <sup>+</sup> , y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	2	1, 3, 4		

<sup>(1)</sup> fragments selected for detection

<sup>(2)</sup> peptide was detected in variant number x (number of variant is available in Table 1)

<sup>(3)</sup> peptide was not detected in variant number x (number of variant is available in Table 1)

<sup>(4)</sup> peptide detected in another type of SEs

<sup>(5)</sup> five specific signature peptides were selected for the detection of type SEA, taking into account the four variants

### 2.3 Assessment of qualitative performance

Sensitivity, specificity and accuracy of the developed LC-MS method were calculated for each type of SEs based on the analysis of the contaminated BHI samples. Qualitative performances obtained for each type of SEs were reported in Table 3.

#### LC-MS Specificity

Specificity describes the ability to obtain a negative result for a sample that does not contain SEs whatever the SEs type and the variant analyzed (blank sample). In this work, specificity was determined by confrontation of the signal detected by PRM to the WGS results. Therefore, absence of PRM signal was expected when *se* gene was not detected by genomic tool. It was calculated as follows:

$$\text{Specificity (\%)} = \frac{\text{Number of samples correctly analysed as negative for type } x}{\text{Number of blank BHI samples}} \times 100$$

Where number of blank BHI samples is the culture sample prepared with *S.aureus* strain negative for the targeted *se* gene. For example, when SEA type is analyzed, blank sample must be negative for *sea* gene even it contain other type of *se* genes. Specificity calculated was 100% whatever the type of the SEs meaning the absence of positive deviation. This highlighted the absence of interference between different enterotoxin types. In fact, results obtained were negative for the targeted enterotoxin despite the presence of other SEs types.

#### LC-MS Sensitivity

Sensitivity describes the ability to detect the correct type of SE for a sample that does contain the SE type analyzed. In this work, sensitivity was calculated assuming that all *se* genes, detected by genomic tool, expressed the corresponding SEs in BHI supernatant. For example, if *S. aureus* strain added and incubated in the same contain *sea* gene, the enterotoxin SEA must be detected by LC-MS, even this *S. aureus* was able to produce several types of SEs. Therefore, sensitivity for the LC-MS method was calculated as follows:

$$\text{Sensitivity (\%)} = \frac{\text{Number of SEs type correctly detected}}{\text{Number of BHI samples containing the type of } se \text{ targeted}} \times 100$$

The LC-MS method had a sensitivity of 100% for 20 SEs. However, for types SEL, SEN, SEO and SEIU, sensitivity of the method was 93.8% (15/16), 76.0% (19/25), 88.5% (23/26) and 90.0% (18/20), respectively. For SEN, SEO and SEIU types, negative deviations observed could be due to the very low amount of enterotoxins expressed by *egc* operon. In fact, this operon is harboring five types of SEs, SEG, SEI, SEM, SEN, SEO and SEIU. Even the sensitivity of the method was 100% for types SEG, SEI and SEM. The measured concentrations were the lowest and were close to the limited of detection (1 ng/mL), Table 5. This observation was reported by Schwendimann et al, 2021 [45] that confirmed the expression of *egc* enterotoxins at very low concentration comparing with the rest of SEs types. Finally, for type SEL, only one negative deviation was observed (15/16) and could be due to a lack of expression of the *sel* gene by this strain or to the very low amount produced in the BHI.

It is also possible to evaluate a global sensitivity for the 24 SEs. In fact, in the 49 BHI samples analyzed, 335 enterotoxins were expected to be detected assuming that all *se* genes express their corresponding SEs in the BHI supernatant. LC-MS method detected 323 SEs among them giving a global sensitivity of 96.3%.

Sensitivity values obtained in our study can be considered as satisfactory taking into account the multiplex detection of 24 SEs types and the bias that can be introduced by the non-expression of *se* genes.

#### LC-MS accuracy

Accuracy combine specificity and sensitivity performances. It describes the ability to obtain a correct result for samples negative for SEs and for samples that contain SEs. It was calculated as follows:

$$\text{Accuracy (\%)} = \frac{\text{Number of SE types correctly detected or not detected}}{\text{Total number of analysis}} \times 100$$

Where the number of SE types correctly detected or not detected is the sum of number of correct positive results when SE was expected to be detected and the number of correct negative results when the SE was expected to be not detected, and Total number of analysis corresponds to the sum of number of strains containing the targeted *se* genes and number of strains negative for the targeted *se* gene (see Table 3).

LC-MS method developed in this study showed a 100% of accuracy for 20 SE types. For SEL, SEN, SEO and SEIU types, LC-MS accuracy was 98.0% (48/49), 87.7% (43/49), 93.9% (46/49) and 95.9% (47/49), respectively. As explained above, *egc* enterotoxins expression is the only identified source of this deviation.

A global accuracy of LC-MS method can be calculated for the multiplex detection of 24 SEs. Therefore, 1164 correct analysis were obtained in the 49 BHI samples over the 1176 analysis carried out. Therefore, the global accuracy for the multiplex LC-MS method was 99.0%.

Qualitative performance criteria highlighted the high specificity of the optimized LC-MS method dedicated to the detection of 24 SEs. Specificity, sensitivity and accuracy values can be considered as satisfactory regarding the large number of targeted enterotoxins. In the literature, such qualitative performance criteria were mainly reported for ELISA methods and for very limited number of SEs. Nia et al, 2021 [17] calculated performance criteria for the standard EN ISO 19020 for five classical enterotoxins SEA, SEB, SEC, SED and SEE in five categories of food matrices. Specificity varied between 90 and 100% and sensitivity between 87 and 100% for the two most efficient immuno-enzymatic assays. Féraudet-Tarisse et al 2021 [46] developed immuno enzymatic tests for enterotoxins types SEA, SEG, SEH and SEI in medium and evaluated the specificity on only eight *S.aureus* strains. Results showed absence of cross reactions and were not interpreted in term of specificity, sensitivity and accuracy. For LC-MS methods, specificity and sensitivity was evaluated only in case of three types of SEs, SEA, SEB and SED. In this work, performance criteria were calculated using data obtained from a large set of 24 SEs and their variants naturally produced in medium. This work is the first comprehensive evaluation of LC-MS performance for detection of 24 SEs in medium culture.

Table 3 qualitative performance of LC-MS method for the 24 enterotoxins

Toxins	SEA	SEB	SEC	SED	SEE	SEG	SEH	SEI	SEJ	SEK	SEL	SEM	SEN	SEO	SEP	SEQ	SER	SES	SET	SEIU	SEIX	SEY	SEIZ	TSST1	Total
Strains containing the <i>se</i> gene	14	7	17	6	3	23	6	26	9	8	16	24	25	26	5	9	9	2	1	20	42	10	6	9	323
Strains negative for targeted <i>se</i> gene	35	42	32	43	46	26	43	23	40	41	33	25	24	23	44	40	40	47	48	29	7	39	43	40	853
Corresponding enterotoxin detected	14	7	17	6	3	23	6	26	9	8	15	24	19	23	5	9	9	2	1	18	42	10	6	9	311
Positive deviation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
Negative deviation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Specificity (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sensitivity (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93.8	100	76.0	88.5	100	100	100	100	100	90.0	100	100	100	100	96.3
Accuracy (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98.0	100	87.7	93.9	100	100	100	100	100	95.9	100	100	100	100	99.0

#### 2.4. SEs quantification in BHI culture supernatant

Only five purified SEs standards are available in the market (SEA, SEB, SEC, SED and SEE). In order to estimate concentration levels of the 24 SEs produced in the BHI and to overcome the absence SEs standard solutions, an unlabeled quantification method according to Silva et al, 2006 [35] "Hi3" was used. Briefly, protein concentration can be estimated by the MS signal of the sum of the three most reactive peptides of each protein compared to the best three peptides of a standard at a known concentration [36,37].

In this study, a mixture of five SEs standard solutions (SEA to SEE) was spiked in 12 BHI samples to obtain a calibration curve covering 12 concentrations: 0, 4, 10, 20, 40, 100, 200, 400, 1 000, 2 000, 4 000, 10 000, 20 000 fmol/mL (corresponding to 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ng/mL at 25 kDa, respectively). Three best quantitative peptides of each SE standard were used for quantification. For signal normalization, a set of 28 heavy peptides was added at the same concentration in each sample and used as external standard.

The calibration curve, established according to Hi3 procedure, was tested individually for each type of SEs standard solutions at the 12 concentrations in duplicat. Then, bias were calculated and reported in Table 4.

The  $R^2$  of each range is above 0.95 and the CV of replicates were below 20%. Calculated bias can be interpreted as follow:

- At very low concentrations, (10 and 20 fMol): over the 10 calculated bias, 6 values were > 30%.
- Between 40 and 20 000 fMol: SEA showed bias between 3.6 and 22.6%, excepted at 40 fMol, 37.9%. For SEB, bias varied between 0.5 and 28.6%. For SED, varied between -7.5 and -37.8%. For SEE, bias varied between 12.2 and 35.9%. Finally, SEC showed a high bias comparing to SEA, SEB, SED and SEE where values varied between 28.1 and 36.5%, excepted at concentration 40 fMol, -1.5%. Finally, among the 45 bias values calculated in this range of standard curve, 10 values varied between 30% and 40%. However, among these 10 bias values, 6 were obtained only for SEC.

In conclusion, the calibration curve obtained according to Hi3 procedure can be considered as representative for the four SEs types SEA, SEB, SED and SEE. For SEC, the calibration curve can be used as semi quantitative due to the considerable bias observed.

The limit of quantification (LOQ) was determined the five SE, based on bias below 20%. For each SE, we observed at least two best peptides showing LOQ at 40 fMol corresponding to 1 ng/ml. (Figure 2).

In the absence of standard solution for 19 SEs studied in this work, it is difficult to extrapolate the observations obtained for the 5 SEs (SEA to SEE) to the 19 SEs. However, we assume that the standard curve obtained according to Hi3 can be implemented to obtain a semi-quantitative SEs concentration in BHI medium.

Table 4: Bias (%) calculated for SEA, SEB, SEC, SED and SEE at the 12 concentrations of the calibration curve, established according to Hi3 procedure

fMol	10	20	40	100	200	400	1000	2000	4000	10000	20000
SEA	-79.7	-49.4	-37.9	-22.6	-13.0	-9.0	-12.6	-10.5	-9.0	-12.6	-3.6
SEB	-53.6	-26.5	-28.6	-18.6	-11.8	-3.7	-8.3	-8.5	-6.4	-10.0	0.5
SEC	-43.3	24.6	-1.5	28.1	29.4	34.9	33.9	31.9	32.6	32.0	36.5
SED	-90.5	-47.6	-37.8	-35.2	-26.7	-20.1	-23.0	-21.5	-20.1	-18.7	-7.5
SEE	-26.7	-4.4	17.8	26.1	27.3	35.9	32.5	27.8	24.5	15.7	12.2

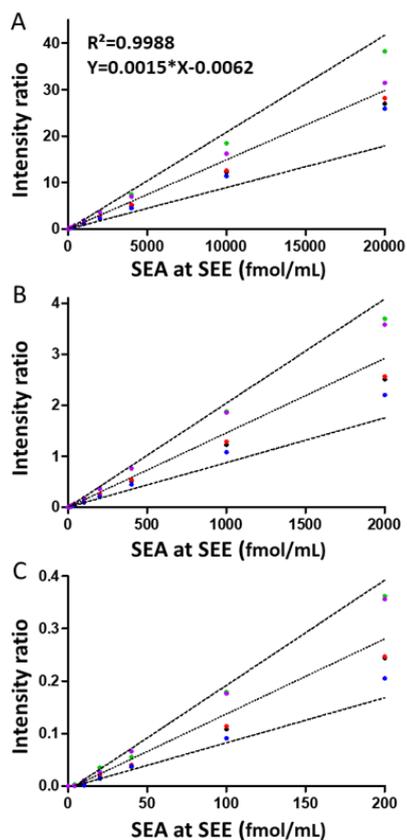


Figure 2 : Calibration range of SEA ●, SEB ●, SEC ●, SED ● and SEE ● toxins. Mean of the five ranges used for quantification (dotted line) and mean  $\pm$  40% (dashed line). A/ Range up to 20,000 fmol/mL. B/ Range zoom up to 2,000. C/ Range zoom up to 200.

## 2.5. Application of LC-MS method for multiplex analysis of 24 enterotoxins produced by *S.aureus* strains in culture supernatant

SEs were analyzed in the 49 BHI samples prepared for each *S.aureus* strain by LC-MS method using the signature peptides data base and the Hi3 calibration curve implemented in this study. Measured concentrations and median obtained for each type of SEs were reported in Table 5.

Results obtained showed that one strain was able to produce between two to 11 SEs. Measured concentrations varied between LOQ (< 1ng/g) and 21943.4 ng/g. Among 335 enterotoxins that were expected to be produced by strains in supernatant, 323 enterotoxins (96%) were detected by LC-MS. Among them, 215 (67%) were quantified and 108 (33%) were detected below the LOQ (<1 ng/g) (Table 5). However, concentration levels depend strongly on the type of SEs. Therefore, four SEs groups can be distinguished depending on their concentration expressed by *S.aureus* strains:

- Very low level: SEG, SEI, SEN, SEM, SEO and SEIU, expressed by the genomic cluster *egc*, were detected at very low level comparing to other SEs. Their concentrations were below 1 ng/g excepted for SEM (median 2.4 ng/g, n = 24). Also, SEIJ was produced at very low concentration.
- Low level: the six enterotoxins SEL, SEP, SES, SEIX, SEY and SEIZ were weakly produced with median between 5.0 ng/g (SEY, n = 10) and 11.6 ng/g (SEIX, n = 42). It should be noted that the type SES was analyzed only twice at 6 and 18 ng/g. In this group, concentration measured depended also on the strain.
- Medium level: SEA, SED, SEE, SEH, SEK, SEQ, SER, SET, and TSST1 were produced at relatively similar concentrations with a median between 29.6 ng/g (SER, n=9) and 60.5 ng/g (SEA, n=14). SET was very rarely detected and was analyzed only in one sample at 65.6 ng/g. For these nine enterotoxins, concentration could vary depending on the strain. For example, for 14 strains, SEA concentration varied between 13.7 ng/g and 124.1 ng/g, with median 60.5 ng/g.
- High level: very high concentration were obtained for only SEB and SEC types with a median 1731.3 (n = 17) and 3285.9 ng/g (n = 7), respectively. For SEB, concentrations varied between 710.8 and 21943.1 ng/g, excepted for strain 337E (20.2 ng/g). For SEC, concentrations varied between 65.2 and 8364.9 ng/g, excepted for strain 15SBCL1438 (2.2 ng/g).

The total amount of SEs produced by each strain were reported in table 5. The lowest value was 3.4 ng/g and a maximum of 22103 ng/g. Generally, strains containing SEB or SEC types were the most toxin producing strains. However, strain containing only *egc* operon *se* genes seemed to be the less producing enterotoxin. This was observed by several authors who concluded that *egc* enterotoxins were less expressed than the classical enterotoxins [45–48].

The five types SEH, SEK, SEQ, SER, SET exhibited concentration levels comparable to classical enterotoxins SEA, SED and SEE. The type SEH was reported only one time as involved in food poisoning outbreak due to consumption of contaminated mashed potatoes. However, SEK, SEQ, SER, SET were never detected in the frame of food poisoning outbreak investigations due to the lack of methods targeting these enterotoxins [49]. Therefore, the present work showed that SEK, SEQ, SER and SET should be studied for their toxicity and their possible involvement in SFPO.

Even the set of 24 SEs was naturally expressed in the culture supernatant and quantified using a semi-quantitative procedure. Results obtained highlighted the need of specific and sensitive tools targeting a large number of SEs to properly investigate food borne outbreaks.

Table 5: SEs concentrations measured in the 49 contaminated BHI samples using LC-MS method, the signature peptides database and Hi3 procedure. LOQ = 1 ng/mL ; <sup>(1)</sup> blank box: se gene note detected by genomic analysis and SEs was not detected by LC-MS ; <sup>(2)</sup> < 1: below LOQ ; <sup>(3)</sup> ND: se gene detected by genomic analysis but corresponding SE was not detected by LC-MS

BHI sample contaminated with strain:	Concentration of staphylococcal enterotoxins type																								Total [SE] in the sample	
	A	B	C	D	E	G	H	I	IJ	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	IU	IX	Y	IZ	TSST1		
16SBCL1204	<sup>(1)</sup>					< 1 <sup>(2)</sup>		< 1				< 1	ND <sup>(3)</sup>	< 1						< 1	1.4	2.0	< 1			3.4
10CEB282						< 1		< 1				2.3	< 1	< 1								1.5				3.9
15SBCL1428						< 1		< 1				1.2	< 1	< 1						< 1	< 1	6.1				7.3
08CEB402																						5.1	2.8			7.9
08CEB393						< 1		< 1	< 1			< 1	< 1	< 1	< 1		4.6	6.0				1.9				12.5
11CEB110						1.3		< 1				3.8	< 1	< 1						1.6	< 1	6.5				13.2
19SBCL1059						< 1		< 1				3.8	< 1	< 1	5.4							8.9				18.0
356E						1.1		< 1				5.2	< 1	< 1						2.9	9.1	5.0				23.2
16SBCL1028																8.0						17.1				25.1
16SBCL246						1.1		< 1				5.7		< 1						2.7	17.0					26.6
337E		20.2				< 1		< 1				2.5	< 1	< 1						< 1	7.2					29.9
15SBCL1438			2.2					< 1			10.0		ND	ND						< 1	< 1	4.4	11.2	2.9		30.7
14SBCL770	13.7					< 1		< 1				< 1	ND	< 1						< 1				28.7		42.4
12CEB512						< 1		< 1				4.2	< 1	< 1						1.5	32.0	5.0				42.8
18SBCL601							60.0															13.5				73.5
09CEB231	26.8			28.4					< 1													4.5				76.8
16SBCL899	18.6					< 1		< 1				< 1	ND	ND						< 1				59.6		78.2
16SBCL259					44.5																	46.8				91.3
09CEB314					23.0																	70.1				93.1
45A				80.1					< 1													15.2		2.1		97.4
12CEB137			65.2								10.1											1.7			38.2	115.1
18SBCL855				57.7		1.2		< 1	< 1			4.7	< 1	< 1	11.9					29.6		15.1				120.2
09CEB303									7.0																	129.9
46A					106.1																				27.7	170.7

15SBCL452	98.1					< 1	< 1	< 1				4.3	< 1	< 1				30.5					38.4				171.3
349E	82.4			62.2				< 1										31.4					4.6				180.7
352E			116.1					< 1			6.4		ND	ND						ND	< 1	3.7	5.6	73.0			204.8
06CEB196	39.9			67.4				< 1	27.0								40.0	33.2					12.2				219.7
19SBCL591	56.5						62.6			32.4								69.7					25.9				247.1
43A			218.4			< 1	121.9	< 1			30.2	< 1	< 1	< 1						ND	11.0						381.5
20SBCL08			393.7			1.9		4.6			18.9	7.2	1.3	< 1						4.2	32.6						464.4
17SBCL693	76.5		157.4				32.4			49.2	10.3						112.4					31.1					469.3
16SBCL1368	28.2		167.2								11.1											45.7			386.9		639.2
44A			550.5							37.8					< 1	61.4						9.7		5.9			665.4
05CEB52		710.8				2.6		1.3				2.3	< 1	2.0						3.1	52.5	35.4	3.6				813.7
05CEB53			1731.3			< 1		< 1			3.4	1.8	< 1	< 1						1.0							1737.5
15SBCL1151		2434.4				3.6		6.9		41.3		12.6	1.4	2.7			95.8					62.1					2660.7
13CEB193	66.0		2592.1								6.9											< 1			460.5		3125.5
12CEB368		3285.9								32.1							41.0					1.5	7.4				3367.9
17SBCL330			3371.7			< 1		< 1			7.2	2.7	< 1	< 1						1.4				25.1			3408.2
06CEB83			3323.9								79.5											6.5			129.0		3538.9
05CEB51			4341.8			< 1	52.1	< 1			12.5	< 1	ND	< 1						< 1	33.8						4440.3
17SBCL25		5154.5						< 1				1.0	< 1	< 1						< 1	46.2						5201.7
13CEB437			5524.9			< 1		< 1			ND	2.6	< 1	< 1							1.5						5529.0
12CEB496	124.1	5651.8					45.9															29.5					5851.2
10CEB401	64.4		6238.2							20.5	13.5						44.5					9.5					6390.7
14A			7798.6	30.1		< 1		< 1	< 1		7.9	2.0	< 1	< 1			47.1			< 1							7885.7
14SBCL1004	94.1		8364.9								17.7											16.3					8493.0
42A	43.7	21943.4								35.4							59.8					20.9					22103.2
Median	60.5	3285.9	1731.3	60.0	44.5	< 1	56.0	< 1	< 1	33.9	10.3	2.4	< 1	< 1	5.4	59.8	29.6	12.0	65.6	< 1	11.6	5.0	5.8	59.6			
max	124.1	21943.4	8364.9	80.1	106.1	3.6	121.9	6.9	7.0	49.2	79.5	12.6	1.4	2.7	11.9	112.4	47.1	18.0	65.6	4.2	70.1	35.4	36.9	460.5			
min	13.7	20.2	2.2	28.4	23.0	< 1	32.4	< 1	< 1	20.5	3.4	< 1	< 1	< 1	< 1	27.7	4.6	6.0	65.6	< 1	< 1	2.0	< 1	2.9			
SE number	14	7	17	6	3	23	6	26	9	8	16	24	25	26	5	9	9	2	1	20	42	10	6	9			

### 3. Conclusions

This work highlights the interest of LC-MS method for SEs multiplex analysis without need of specific reagents such in the case of immuno-enzymatic assays. Highly specific and sensitive LC-MS method was developed for multiplex detection of 24 SEs types in culture medium. The protocol was based on acid precipitation and enzymatic digestion followed by specific peptide detection. To enhance the accuracy of the method, a database of 93 signature peptides was optimized using the complete sequences of the 24 SEs including their 162 variants available in supplementary data.

The LC-MS method was successfully tested on 49 naturally contaminated BHI samples. Hi3 procedure was adopted to overcome the absence of SEs standard solution for 19 SEs. Results showed the ability of *S. aureus* strains to produce simultaneously between one and 11 types of SEs. However, the concentrations expressed depend strongly on the type of SEs. The lowest concentrations were obtained for enterotoxins SEG, SEI, SEM, SEN, SEO, SEIU expressed by *egc* operon (< 1 ng/g). SEB and SEC were expressed at very high concentration and achieved the µg/g level.

The present study indicates that the newly described SEs should be taken into consideration during food borne outbreak investigation, as *S. aureus* strain is able to express simultaneously several SEs including these new SEs. The LC-MS is a promising method for multiplex detection of SEs and deserves more development to be applied to food.

### 4. Materials and Methods

#### 4.1. Chemicals and Reagents.

Ammonium bicarbonate (AB), brain heart infusion (BHI), dithiothreitol (DTT), iodo-acetamide (IAA), analytical grade formic acid, hydrochloric acid (HCl), trichloroacetic acid (TCA) were purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA), RapiGest SF from Waters Corporation (Milford, MA), Ultrapure water from a Milli-Q plus purifier (Millipore, Bedford, MA). Sequencing grade-modified trypsin was purchased from Promega (Fitchburg, WI, USA).

Highly purified freeze-dried SEs were purchased from Toxin Technology, Sarasota, FL, USA (batch 120794A for SEA, 61499B1 for SEB, 113094C2 for SEC, 12802D for SED and no 70595E for SEE) and were rehydrated according to the manufacturer's instructions to obtain stock

solutions. Briefly, 1 mL of osmosed water was added to 1 mg of SE powder to obtain a theoretical concentration equal to 1 mg/mL. The Uniprot (<http://www.uniprot.org>) sequence entries were P0A0L2, P01552, P34071, P20723, and P12993, respectively. Synthetic heavy peptides with labeled Lys [13C6; 15N2] (+8 Da) and Arg [13C6; 15N4] (+10 Da) were synthesized by Thermo scientific (Bremen, Germany) in Pepotec grade (supplementary data list of 207 peptides).

Safety Precaution: due to the high toxicity of SE, experiments were performed in accordance to safety rules for the handling of toxic substances and using personal protection equipment. SE contaminated solutions and consumables were inactivated overnight with 2 M NaOH before elimination.

#### 4.2. *S. aureus* strains and enterotoxins sequences

49 *S. aureus* strains were used in this study: 6 reference strains obtained from Pasteur Institute collection (France) and 43 *S. aureus* strains from Anses collection including 40 strains isolated from different types of foods involved in Staphylococcus Food Poisoning Outbreaks and three strains isolated from own check. The origin of the strains are detailed in Supplementary data. The enterotoxin genes profiles were analysed for their staphylococcal enterotoxins genes using the genomic tool NAuRA (<https://github.com/afelten-Anses/NAuRA>). The screening of the enterotoxins was performed using the gene sequence and their relative protein sequence of the already described 27 SE and the estimated parameters of Blast in Merda et al. Alignment of sequences is detailed in Supplementary data.

#### 4.3. *SE* expression in culture supernatant and sample preparation.

Strains were incubated for 24 hours at 37°C on Plate Count Agar Milk. Colonies were then transferred in 40 mL of BHI at 37 °C for 18 hours and centrifuged at 3,000 g during 15 min to discard the bacterial pellet. The supernatant was filtered through 0.2 µm filter before SE analysis [34] (Lefebvre et al, 2021). 1.2 mL of the filtered supernatant was centrifuged at 15,000 g during 10 min to discard residues. Then, 1 mL was recovered and mixed with 50 µL of TCA 100% during 5 min and toxins were precipitated by centrifugation at 15,000 g during 10 min. The supernatant was removed and the protein pellet was resuspended with 20 µL of RapiGest 0.05% in AB500 (Ammonium bicarbonate 500 mM). Ten microliters of 20 mM DTT were added and heated for 15 min at 95 °C to induce proteins denaturation. Then, 10 µL of 45 mM IAA

was added and incubated for 30 min in the dark at room temperature. Digestion was performed with 1 µg trypsin for 3 h at 37 °C. After incubation, digestion was stopped with 5 µL of 1 M HCl and 10 µL of the mixture of labeled peptides was added to the samples. Ten microliters were sampled for LC-MS analysis.

#### 4.4. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry analysis.

LC-MS analysis were performed using an Ultimate 3000 chromatography system coupled to a Q-Exactive (Quadrupole-Orbitrap) mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Peptide separation was performed on an Aeris peptide XB-C18 reverse phase column (150 mm × 2.1 mm; 1.7 µm; 100 Å; Phenomex, Torrance, USA) at 60 °C during 30 min. The mobile phases were prepared in water with 0.1% formic acid (A) and ACN with 0.1% formic acid (B). Following an isocratic step at 5% phase B, followed by a gradient from 5 to 40% phase B in 20 min was realized at a mobile phase flow rate of 0.5 mL/min, before equilibration during 5 min. Eluted peptides were introduced into the Q-Exactive instrument by an electrospray ionization (ESI) source. Data was acquired in the positive ion mode, capillary voltage was set at 4 kV and temperature at 320 °C.

DDA mode (Data Dependent Acquisition) (Top 5) was performed with a resolution of 70'000 (Full MS) or 17'500 (ddMS2) at m/z 200 (FWHM), and normalized collision energy fixed to 18%. The automatic gain control (AGC) target was constantly set at  $1 \times 10^6$ , fill time was adjusted at 128 ms. For PRM mode (parallel reaction monitoring), the isolation mass window was fixed at 1.2 Da. Collision energy was optimized in the HCD for each peptide as showed in Supplementary data. The AGC target was constantly set at  $1 \times 10^6$ , fill time was adjusted at 128 ms and an Orbitrap resolution set at 35'000 at m/z 200 (FWHM) to reach at least 10 acquisition points per chromatographic peak.

**Supplementary Data:** Annexe 3 de la thèse.

## 5. References

- (1) TATINI, S. R. Thermal Stability of Enterotoxins in Food. *Journal of Milk and Food Technology* 1976, 39 (6), 432–438. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-39.6.432>.
- (2) Guillier, L.; Bergis, H.; Guillier, F.; Noel, V.; Auvray, F.; Hennekinne, J.-A. Dose-Response Modelling of Staphylococcal Enterotoxins Using Outbreak Data. *Procedia Food Science* 2016, 7, 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.05.002>.
- (3) The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021, 19 (2), e06406. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.
- (4) Munson, S. H.; Tremaine, M. T.; Betley, M. J.; Welch, R. A. Identification and Characterization of Staphylococcal Enterotoxin Types G and I From *Staphylococcus Aureus*. *Infection and Immunity* 1998, 66 (7), 3337–3348. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.7.3337-3348.1998>.
- (5) Hu, D.-L.; Omoe, K.; Shimoda, Y.; Nakane, A.; Shinagawa, K. Induction of Emetic Response to Staphylococcal Enterotoxins in the House Musk Shrew (*Suncus Murinus*). *Infection and Immunity* 2003, 71 (1), 567–570. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.567-570.2003>.
- (6) Ono, H. K.; Omoe, K.; Imanishi, K.; Iwakabe, Y.; Hu, D.-L.; Kato, H.; Saito, N.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K. Identification and Characterization of Two Novel Staphylococcal Enterotoxins, Types S and T. *Infection and Immunity* 2008, 76 (11), 4999–5005. <https://doi.org/10.1128/IAI.00045-08>.
- (7) Omoe, K.; Hu, D.-L.; Ono, H. K.; Shimizu, S.; Takahashi-Omoe, H.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K.; Imanishi, K. Emetic Potentials of Newly Identified Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins. *Infection and Immunity* 2013, 81 (10), 3627–3631. <https://doi.org/10.1128/IAI.00550-13>.
- (8) Ono, H. K.; Hirose, S.; Naito, I.; Sato'o, Y.; Asano, K.; Hu, D.-L.; Omoe, K.; Nakane, A. The Emetic Activity of Staphylococcal Enterotoxins, SEK, SEL, SEM, SEN and SEO in a Small Emetic Animal Model, the House Musk Shrew. *Microbiology and Immunology* 2017, 61 (1), 12–16. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12460>.
- (9) Wilson, G. J.; Seo, K. S.; Cartwright, R. A.; Connelley, T.; Chuang-Smith, O. N.; Merriman, J. A.; Guinane, C. M.; Park, J. Y.; Bohach, G. A.; Schlievert, P. M.; Morrison, W. I.; Fitzgerald, J. R. A Novel Core Genome-Encoded Superantigen Contributes to Lethality of Community-Associated MRSA Necrotizing Pneumonia. *PLOS Pathogens* 2011, 7 (10), e1002271. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002271>.
- (10) Ono, H. K.; Sato'o, Y.; Narita, K.; Naito, I.; Hirose, S.; Hisatsune, J.; Asano, K.; Hu, D.-L.; Omoe, K.; Sugai, M.; Nakane, A. Identification and Characterization of a Novel Staphylococcal Emetic Toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 2015, 81 (20), 7034–7040. <https://doi.org/10.1128/AEM.01873-15>.
- (11) Spoor, L. E.; Richardson, E.; Richards, A. C.; Wilson, G. J.; Mendonca, C.; Gupta, R. Kr.; McAdam, P. R.; Nutbeam-Tuffs, S.; Black, N. S.; O'Gara, J. P.; Lee, C. Y.; Corander, J.; Ross Fitzgerald, J. Recombination-Mediated Remodelling of Host–Pathogen Interactions during *Staphylococcus Aureus* Niche Adaptation. *Microb Genom* 2015, 1 (4), e000036. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000036>.
- (12) Zhang, D.-F.; Yang, X.-Y.; Zhang, J.; Qin, X.; Huang, X.; Cui, Y.; Zhou, M.; Shi, C.; French, N. P.; Shi, X. Identification and Characterization of Two Novel Superantigens among *Staphylococcus Aureus* Complex. *International Journal of Medical Microbiology* 2018, 308 (4), 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.03.002>.
- (13) Guidi, F.; Duranti, A.; Gallina, S.; Nia, Y.; Petruzzelli, A.; Romano, A.; Travaglini, V.; Olivastri, A.; Calvaresi, V.; Decastelli, L.; Blasi, G. Characterization of A Staphylococcal Food Poisoning Outbreak in A Workplace Canteen during the Post-Earthquake Reconstruction of Central Italy. *Toxins* 2018, 10 (12), 523. <https://doi.org/10.3390/toxins10120523>.
- (14) Denayer, S.; Delbrassinne, L.; Nia, Y.; Botteldoorn, N. Food-Borne Outbreak Investigation and Molecular Typing: High Diversity of *Staphylococcus Aureus* Strains and Importance of Toxin Detection. *Toxins* 2017, 9 (12), 407. <https://doi.org/10.3390/toxins9120407>.
- (15) Merda, D.; Felten, A.; Vingadassalon, N.; Denayer, S.; Titouche, Y.; Decastelli, L.; Hickey, B.; Kourtis, C.; Daskalov, H.; Mistou, M.-Y.; Hennekinne, J.-A. NAuRA: Genomic Tool to Identify Staphylococcal Enterotoxins in *Staphylococcus Aureus* Strains Responsible for FoodBorne Outbreaks. *Frontiers in Microbiology* 2020, 11, 1483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01483>.
- (16) Nia, Y.; Rodriguez, M.; Zeleny, R.; Herbin, S.; Auvray, F.; Fiebig, U.; Avondet, M.-A.; Munoz, A.; Hennekinne, J.-A. Organization and ELISA-Based Results of the First Proficiency Testing to Evaluate the Ability of European Union Laboratories to Detect Staphylococcal Enterotoxin Type B (SEB) in Buffer and Milk. *Toxins* 2016, 8 (9), 268. <https://doi.org/10.3390/toxins8090268>.
- (17) Nia, Y.; Lombard, B.; Gentil, S.; Neveux, L.; Mutel, I.; Guillier, F.; Messio, S.; Paireaud, S.; Herbin, S.; Guillier, L.; Auvray, F.; Hennekinne, J. A. Development and Validation of the Standard Method EN ISO 19020 - Microbiology of the Food Chain — Horizontal Method for the Immunoenzymatic Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology* 2021, 354, 109319. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109319>.

- (18) Ostyn, A.; Buysler, M. L. D.; Guillier, F.; Groult, J.; Félix, B.; Salah, S.; Delmas, G.; Hennekinne, J. A. First Evidence of a Food Poisoning Outbreak Due to Staphylococcal Enterotoxin Type E, France, 2009. *Eurosurveillance* 2010, 15 (13), 19528. <https://doi.org/10.2807/ese.15.13.19528-en>.
- (19) Hennekinne, J.-A.; De Buysler, M.-L.; Dragacci, S. Staphylococcus Aureus and Its Food Poisoning Toxins: Characterization and Outbreak Investigation. *FEMS Microbiology Reviews* 2012, 36 (4), 815–836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>.
- (20) Ono, H. K.; Hachiya, N.; Suzuki, Y.; Naito, I.; Hirose, S.; Asano, K.; Omoe, K.; Nakane, A.; Hu, D.-L. Development of an Immunoassay for Detection of Staphylococcal Enterotoxin-Like J, A Non-Characterized Toxin. *Toxins* 2018, 10 (11), 458. <https://doi.org/10.3390/toxins10110458>.
- (21) Aguilar, J. L.; Varshney, A. K.; Pechuan, X.; Dutta, K.; Nosanchuk, J. D.; Fries, B. C. Monoclonal Antibodies Protect from Staphylococcal Enterotoxin K (SEK) Induced Toxic Shock and Sepsis by USA300 Staphylococcus Aureus. *Virulence* 2017, 8 (6), 741–750. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1231295>.
- (22) Schubert, J.; Podkowik, M.; Bystron, J.; Bania, J. Production of Staphylococcal Enterotoxins D and R in Milk and Meat Juice by Staphylococcus Aureus Strains. *Foodborne Pathogens and Disease* 2017, 14 (4), 223–230. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2210>.
- (23) Aziz, F.; Hisatsune, J.; Yu, L.; Kajimura, J.; Sato'o, Y.; Ono, H. K.; Masuda, K.; Yamaoka, M.; Salasia, S. I. O.; Nakane, A.; Ohge, H.; Kusunoki, Y.; Sugai, M. Staphylococcus Aureus Isolated from Skin from Atopic-Dermatitis Patients Produces Staphylococcal Enterotoxin Y, Which Predominantly Induces T-Cell Receptor V $\alpha$ -Specific Expansion of T Cells. *Infection and Immunity* 2020, 88 (2), e00360-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00360-19>.
- (24) Hait, J. M.; Nguyen, A. T.; Tallent, S. M. Analysis of the VIDAS® Staph Enterotoxin III (SET3) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins G, H, and I in Foods. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 2018, 101 (5), 1482–1489. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0501>.
- (25) Bernardo, K.; Fleer, S.; Pakulat, N.; Krut, O.; Hüniger, F.; Krönke, M. Identification of Staphylococcus Aureus Exotoxins by Combined Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *PROTEOMICS* 2002, 2 (6), 740–746. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200206\)2:6<740::AID-PROT740>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200206)2:6<740::AID-PROT740>3.0.CO;2-M).
- (26) Nakano, M.; Kawano, Y.; Kawagishi, M.; Hasegawa, T.; Inuma, Y.; Ohta, M. Two-Dimensional Analysis of Exoproteins of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) for Possible Epidemiological Applications. *Microbiology and Immunology* 2002, 46 (1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02671.x>.
- (27) Burlak, C.; Hammer, C. H.; Robinson, M.-A.; Whitney, A. R.; McGavin, M. J.; Kreiswirth, B. N.; DeLeo, F. R. Global Analysis of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Exoproteins Reveals Molecules Produced in Vitro and during Infection. *Cellular Microbiology* 2007, 9 (5), 1172–1190. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00858.x>.
- (28) Pocsfalvi, G.; Cacace, G.; Cuccurullo, M.; Serluca, G.; Sorrentino, A.; Schlosser, G.; Blaiotta, G.; Malorni, A. Proteomic Analysis of Exoproteins Expressed by Enterotoxigenic Staphylococcus Aureus Strains. *PROTEOMICS* 2008, 8 (12), 2462–2476. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700965>.
- (29) Ravipaty, S.; Reilly, J. P. Comprehensive Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Subsp. Aureus COL Secretome by Two-Dimensional Liquid Chromatography and Mass Spectrometry \*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2010, 9 (9), 1898–1919. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900494-MCP200>.
- (30) Wolf, C.; Kusch, H.; Monecke, S.; Albrecht, D.; Holtfreter, S.; Eiff, C. von; Petzl, W.; Rainard, P.; Bröker, B. M.; Engelmann, S. Genomic and Proteomic Characterization of Staphylococcus Aureus Mastitis Isolates of Bovine Origin. *PROTEOMICS* 2011, 11 (12), 2491–2502. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000698>.
- (31) Enany, S.; Yoshida, Y.; Magdeldin, S.; Zhang, Y.; Bo, X.; Yamamoto, T. Extensive Proteomic Profiling of the Secretome of European Community Acquired Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Clone. *Peptides* 2012, 37 (1), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.06.011>.
- (32) Enany, S.; Yoshida, Y.; Magdeldin, S.; Bo, X.; Zhang, Y.; Enany, M.; Yamamoto, T. Two Dimensional Electrophoresis of the Exo-Proteome Produced from Community Acquired Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Belonging to Clonal Complex 80. *Microbiological Research* 2013, 168 (8), 504–511. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.03.004>.
- (33) Busche, T.; Hillion, M.; Loi, V. V.; Berg, D.; Walther, B.; Semmler, T.; Strommenger, B.; Witte, W.; Cuny, C.; Mellmann, A.; Holmes, M. A.; Kalinowski, J.; Adrian, L.; Bernhardt, J.; Antelmann, H. Comparative Secretome Analyses of Human and Zoonotic Staphylococcus Aureus Isolates CC8, CC22, and CC398 \*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2018, 17 (12), 2412–2433. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001036>.
- (34) Lefebvre, D.; Blanco-Valle, K.; Feraudet-Tarisse, C.; Merda, D.; Simon, S.; Fenaille, F.; Hennekinne, J.-A.; Nia, Y.; Becher, F. Quantitative Determination of Staphylococcus Aureus Enterotoxins Types A to I and Variants in Dairy Food Products by Multiplex Immuno-LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69 (8), 2603–2610. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07545>.

- (35) Silva, J. C.; Gorenstein, M. V.; Li, G.-Z.; Vissers, J. P. C.; Geromanos, S. J. Absolute Quantification of Proteins by LCMSE: A Virtue of Parallel Ms Acquisition \*S. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006, 5 (1), 144–156. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500230-MCP200>.
- (36) Kriegeskorte, A.; König, S.; Sander, G.; Pirkl, A.; Mahabir, E.; Proctor, R. A.; Eiff, C. von; Peters, G.; Becker, K. Small Colony Variants of Staphylococcus Aureus Reveal Distinct Protein Profiles. *PROTEOMICS* 2011, 11 (12), 2476–2490. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000796>.
- (37) Muntel, J.; Fromion, V.; Goelzer, A.; Maaß, S.; Mäder, U.; Büttner, K.; Hecker, M.; Becher, D. Comprehensive Absolute Quantification of the Cytosolic Proteome of Bacillus Subtilis by Data Independent, Parallel Fragmentation in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MSE)\*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2014, 13 (4), 1008–1019. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.032631>.
- (38) Langella, O.; Valot, B.; Balliau, T.; Blein-Nicolas, M.; Bonhomme, L.; Zivy, M. X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification. *J. Proteome Res.* 2017, 16 (2), 494–503. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00632>.
- (39) MacLean, B.; Tomazela, D. M.; Shulman, N.; Chambers, M.; Finney, G. L.; Frewen, B.; Kern, R.; Tabb, D. L.; Liebler, D. C.; MacCoss, M. J. Skyline: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. *Bioinformatics* 2010, 26 (7), 966–968. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>.
- (40) Muratovic, A. Z.; Hagström, T.; Rosén, J.; Granelli, K.; Hellenäs, K.-E. Quantitative Analysis of Staphylococcal Enterotoxins A and B in Food Matrices Using Ultra High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Toxins* 2015, 7 (9), 3637–3656. <https://doi.org/10.3390/toxins7093637>.
- (41) Andjelkovic, M.; Tsilia, V.; Rajkovic, A.; De Cremer, K.; Van Looc, J. Application of LC-MS/MS MRM to Determine Staphylococcal Enterotoxins (SEB and SEA) in Milk. *Toxins* 2016, 8 (4), 118. <https://doi.org/10.3390/toxins8040118>.
- (42) Dupré, M.; Gilquin, B.; Fenaille, F.; Feraudet-Tarisse, C.; Dano, J.; Ferro, M.; Simon, S.; Junot, C.; Brun, V.; Becher, F. Multiplex Quantification of Protein Toxins in Human Biofluids and Food Matrices Using Immunoextraction and High-Resolution Targeted Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2015, 87 (16), 8473–8480. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01900>.
- (43) Gilquin, B.; Jaquinod, M.; Louwagie, M.; Kieffer-Jaquinod, S.; Kraut, A.; Ferro, M.; Becher, F.; Brun, V. A Proteomics Assay to Detect Eight CBRN-Relevant Toxins in Food. *PROTEOMICS* 2017, 17 (1–2), 1600357. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600357>.
- (44) Brun, V.; Dupuis, A.; Adrait, A.; Marcellin, M.; Thomas, D.; Court, M.; Vandenesch, F.; Garin, J. Isotope-Labeled Protein Standards: Toward Absolute Quantitative Proteomics \*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007, 6 (12), 2139–2149. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700163-MCP200>.
- (45) Schwendimann, L.; Merda, D.; Berger, T.; Denayer, S.; Feraudet-Tarisse, C.; Kläui, A. J.; Messio, S.; Mistou, M. Y.; Nia, Y.; Hennekinne, J. A.; Graber, H. U. Staphylococcal Enterotoxin Gene Cluster: Prediction of Enterotoxin (SEG and SEI) Production and of the Source of Food Poisoning on the Basis of VSaβ Typing. *Appl Environ Microbiol* 2021, 87 (5), e0266220. <https://doi.org/10.1128/AEM.02662-20>.
- (46) Féraudet Tarisse, C.; Goulard-Huet, C.; Nia, Y.; Devilliers, K.; Marcé, D.; Dambrune, C.; Lefebvre, D.; Hennekinne, J.-A.; Simon, S. Highly Sensitive and Specific Detection of Staphylococcal Enterotoxins SEA, SEG, SEH, and SEI by Immunoassay. *Toxins* 2021, 13 (2), 130. <https://doi.org/10.3390/toxins13020130>.
- (47) Nagaraj, S.; Ramlal, S.; Kingston, J.; Batra, H. V. Development of IgY Based Sandwich ELISA for the Detection of Staphylococcal Enterotoxin G (SEG), an Egg Toxin. *International Journal of Food Microbiology* 2016, 237, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.009>.
- (48) Omoe, K.; Ishikawa, M.; Shimoda, Y.; Hu, D.-L.; Ueda, S.; Shinagawa, K. Detection of Seg, Seh, and Sei Genes in Staphylococcus Aureus Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of S. Aureus Isolates Harboring Seg, Seh, or Sei Genes. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40 (3), 857–862. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.857-862.2002>.
- (49) Jørgensen, H. J.; Mathisen, T.; Løvseth, A.; Omoe, K.; Qvale, K. S.; Loncarevic, S. An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Caused by Enterotoxin H in Mashed Potato Made with Raw Milk. *FEMS Microbiology Letters* 2005, 252 (2), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.005>.

## II.C.3 Conclusion et discussion de l'article 3

Dans ce chapitre de thèse, nous présentons une méthode LC-MS permettant l'analyse de 24 entérotoxines staphylococciques produites naturellement dans un milieu de culture. Le principe est basé sur une extraction par précipitation acide, suivi par une digestion trypsique puis par une détection multiplexe des peptides protéotypiques par LC-MS en mode PRM. Ainsi, cette méthode permet de s'affranchir des contraintes liées à la disponibilité des anticorps, et donc d'augmenter le nombre des entérotoxines détectables. Cette méthode a été développée et optimisée avec des entérotoxines produites naturellement dans un milieu de culture, à l'aide du panel de 49 souches de *S. aureus*. Au final, un minimum de 3 peptides spécifiques pour chaque entérotoxine a été sélectionné en prenant en compte leur présence dans les variants et l'intensité de leur signal en LC-MS, soit un total de 93 peptides spécifiques ou protéotypiques retenus pour l'analyse des 24 ESs.

En termes de performances analytiques qualitatives, la spécificité, la sensibilité et l'exactitude de la méthode ont été calculées pour chaque type d'entérotoxine en se basant sur les données WGS. Ainsi, un gène identifié par WGS signifie que la détection par LC-MS de l'entérotoxine est attendue dans l'échantillon, et vice versa. Dans tous les cas étudiés, les analyses LC-MS ont donné un résultat négatif (non détection de l'entérotoxine) quand le gène correspondant était absent. Tous les types d'entérotoxines ont été détectés quand le gène correspondant a été identifié en WGS, sauf pour quelques cas comme les types SEL, SEN, SEO et SEIU où le gène a été identifié par WGS, mais non détecté par la méthode LC-MS. Ceci peut être dû soit (i) à la sensibilité de la méthode LC-MS optimisée, ou (ii) peut signifier que l'entérotoxine n'a pas été exprimée. A ce jour, nous n'avons pas les moyens de vérifier ces deux hypothèses. De manière général, la méthode WGS et la méthode LC-MS (gène détecté-entérotoxine détectée) ont été en cohérence dans 323/335 analyses, soit une sensibilité de 96,3%. Ces performances obtenues sont comparables à celles publiées pour les méthodes ELISA, réputées les plus sensibles<sup>125</sup>. Cependant, la méthode LC-MS est plus avantageuse vu le nombre important d'entérotoxines détectées en une seule analyse. Nos résultats montrent que la méthode LC-MS optimisée est sensible et spécifique pour la détection des 24 entérotoxines dans le milieu de culture BHI.

Cette méthode LC-MS a été appliquée à l'analyse et à la quantification des 24 entérotoxines produites par les souches de *S. aureus* dans le milieu de culture BHI, après 16 heures d'incubation. Pour ce faire, nous avons opté pour l'approche Hi3 afin de s'affranchir de l'absence d'étalon pour 19 des 24 entérotoxines analysées. Des biais ont été calculés entre les points de gammes de chacun des cinq standards et la gamme de quantification en Hi3. De manière générale, les biais sont inférieurs à 25% sauf pour quelques points de gammes où le biais a été calculé entre 25 et 40% pour les 5 étalons (SEA-SEE). Ne possédant pas d'étalon pour les autres entérotoxines, une projection de ces biais a été proposée pour l'ensemble des autres ESs avec un biais maximum de 40%. Pour cela, notre méthode est considérée comme semi-quantitative.

Une fois la méthode ainsi développée et évaluée, nous avons exploité les résultats obtenus sur les 49 souches pour obtenir une première estimation des niveaux d'expression des

différentes toxines, données jusque-là inaccessibles pour l'ensemble des entérotoxines avec les techniques précédemment développées. L'analyse des 24 entérotoxines produites par les 49 souches de *S. aureus* dans le milieu de culture après 16 heures d'incubation a permis de distinguer 4 groupes d'ESs avec des niveaux de concentrations différents : un niveau de production très faible avoisinant la limite de détection, un niveau faible, un niveau moyen et un niveau élevé, comme décrit dans l'article 3.

En termes d'impact et de perspective, l'analyse des concentrations calculées pour chaque toxine dans l'ensemble des souches peut conduire à quatre observations majeures :

- Les deux entérotoxines SEB et SEC sont les plus fortement produites. Ces deux entérotoxines possèdent une homologie de séquence de 68,2% et leurs gènes peuvent être positionnés sur des plasmides bactériens<sup>65</sup>.
- Les entérotoxines de l'opéron *egc* sont les plus faiblement produites. Cette observation met en question la toxicité des souches qui possèdent uniquement les gènes de l'opéron *egc*. Le seuil de toxicité chez l'Homme pour chacune des ESs présente dans l'*egc* n'est pas connu, de plus leurs effets pourraient être cumulatifs. Ainsi, il serait intéressant de vérifier la capacité de ce type de souche à produire suffisamment de quantité de toxines cumulée pour déclencher les symptômes d'une toxi-infection alimentaire.
- Les concentrations obtenues pour les entérotoxines SEH, SEK, SEQ, SER, SET sont comparables à celles obtenues pour des entérotoxines classiques SEA, SED et SEE, qui sont couvertes par les méthodes officielles et normalisées. Ce résultat montre la nécessité de développer des outils pour détecter ces nouvelles entérotoxines, de plus ces entérotoxines possèdent une activité émétique démontrée.
- La mise en place d'une détection multiplexe a permis de confirmer la capacité des *S. aureus* à produire simultanément jusqu'à 11 entérotoxines. Ce résultat signifie que dans une matrice alimentaire, la toxicité d'une souche doit être évaluée sur sa capacité à exprimer la totalité des gènes qu'elle possède, et éviter de se focaliser uniquement sur les entérotoxines classiques.

Cependant, ces observations ne concernent que les mesures des concentrations des entérotoxines après 16 heures d'incubation, donc une analyse à un point fixe. De plus les concentrations sont seulement estimées par notre méthode. Il est envisageable par la suite de produire pour l'ensemble des 19 autres ESs, des étalons de calibration permettant de passer d'une estimation de la concentration à une quantification absolue.

En conclusion, l'utilisation d'une préparation de l'échantillon sans anticorps préalable à l'analyse par spectrométrie de masse et le panel de 49 souches de *S. aureus* caractérisé par le WGS ont permis (i) d'établir une base de données de peptides protéotypiques pour les 24 entérotoxines staphylococciques et (ii) de mettre en place une méthode LC-MS ciblée et multiplexe. Cette méthode sensible et spécifique a été appliquée avec succès pour détecter et estimer le niveau d'expression des 24 types d'entérotoxines dans un milieu de culture. Les résultats obtenus montrent qu'une souche de *S. aureus* est capable de produire jusqu'à 11 types d'entérotoxines simultanément. Dans cette étude, les concentrations des entérotoxines

ont été mesurées après 16 heures d'incubation. La connaissance des cinétiques d'expression des différentes ESs par les souches de *S. aureus*, pourrait permettre d'identifier les ESs les plus produites et de savoir à quel moment une dose toxique peut être atteinte. Cela permettrait de déterminer les points critiques des prélèvements à effectuer dans les industries de fabrication des aliments afin de prouver l'innocuité des lots à commercialiser. Ainsi, nous proposons d'approfondir cette étude en réalisant des cinétiques d'expression des 24 types d'entérotoxines sur une durée allant d'une heure jusqu'à 24 heures.

#### II.C.4 Étude cinétique d'expression des ESs dans du milieu de culture BHI

Cette étude a pour objectif d'apporter des connaissances sur les profils d'expression des différents types d'ESs par des souches de *S. aureus*. Ces informations permettraient de vérifier à quel stade de leur croissance les souches de *S. aureus* expriment le plus d'ESs, quelles ESs sont produites en premier et en quelles quantités. Cette étude permettrait également d'identifier parmi les nouvelles entérotoxines celles qui peuvent être ciblées en priorité lors de l'investigation des TIACs. Cela permettrait donc de gagner un temps précieux lors de l'analyse des échantillons incriminés. Par ailleurs, comprendre les phases critiques de la production des différents types d'ESs par le *S. aureus* pourrait aider à anticiper leur expression dans les aliments, et donc à adapter la procédure de recherche et d'identification d'ESs pendant la fabrication des aliments.

Dans la littérature, de par le manque de méthodes analytiques, l'étude de l'expression des ESs est souvent réalisée sur un nombre très réduit d'ESs. Seules les ESs « classiques »<sup>96,325</sup> et les types SEG et SEI ont été étudiés<sup>326</sup>.

Le travail réalisé par Schwendimann en 2021 au cours de sa thèse a permis d'étudier l'expression des différents gènes de l'opéron *egc* (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* et *selu*) à différentes étapes de la cinétique de croissance des souches de *S. aureus* par quantification des ARNm. Cependant, seulement deux entérotoxines, SEG et SEI, ont été quantifiées pendant les étapes de croissances des souches de *S. aureus*. Les résultats de cette étude montrent que les ESs sont exprimées à la moitié de la phase exponentielle de croissance de la bactérie, puis leur expression semble s'arrêter à la fin de cette croissance exponentielle. Derzelle et al, 2009<sup>95</sup> ont également suivi par RT-PCR la production de l'ARNm de 18 gènes codant pour des ESs, afin de mieux comprendre leur expression. Les auteurs ont identifié 4 profils d'expression des gènes codant pour les ESs en fonction du stade de croissance du *S. aureus*. Cependant, la quantification des entérotoxines produites par les différentes souches étudiées n'a pas été réalisée par manque d'outils analytiques.

Durant le stage de M2 de Nina AVEILLA que j'ai encadré pendant 6 mois, nous avons utilisé la méthode LC-MS décrite dans la partie II.C.2 pour étudier la cinétique de production de 23 types d'ESs provenant de 6 différentes souches de staphylocoques (TSST1 n'a pas été testé). Les souches utilisées dans cette étude sont pour la plupart à l'origine de TIAC.

#### II.C.4.1 Protocole de cinétique de production des ESs.

Les cinétiques de production des ESs ont été réalisées en incubant durant 24 h les souches *S. aureus* dans un milieu de culture BHI (Brain Heart Infusion) en conditions de croissance optimales, soit à une température de 37°C, en aérobie et sans sel. La croissance des *S. aureus* a été suivie via la réalisation des mesures de densité optique (DO) à une longueur d'onde de 600 nm<sup>326–328</sup>. Dans un premier temps, les colonies de *S. aureus* ont été mises en pré-culture durant 12 h dans 5 mL de BHI. La DO de cette pré-culture a été ensuite mesurée. Une étape de centrifugation a été effectuée afin d'éliminer les ESs potentiellement produites durant la phase de pré-culture, le culot bactérien a été re-suspendu avec 5 mL de BHI propre. Ensuite, les bactéries ont été introduites dans un flacon contenant 100 mL de BHI et mises sous agitation à 200 rpm (rotation par minute) dans une étuve. Afin de s'assurer de toujours démarrer les cinétiques avec la même quantité de bactérie, il a été prélevé un volume calculé de sorte que la DO soit égale à 0,020 au moment de départ de la cinétique (t0). A chaque heure de la cinétique, 3 mL de culture ont été prélevés, leur DO a été mesurée puis la culture a été centrifugée à 3000 g (= 5175 rpm) pendant 5 min afin d'éliminer le culot bactérien. 1,2 mL de surnageant en duplicat ont ensuite été récupérés puis utilisés pour l'analyse en LC-MS suivant le protocole décrit dans l'article 3.

#### II.C.4.2 Sélection des souches de *S. aureus*

Une sélection représentative de souches a été réalisée en se basant sur les données génomiques disponibles au laboratoire de l'ANSES. De plus, l'analyse des souches dans l'article 3 a permis de mesurer la quantité d'ES exprimée après 16 heures de croissance bactérienne. Les résultats de cette étude nous ont permis de sélectionner six souches, décrites en fonction des types d'ESs qu'elles produisent Tableau 19. Comme la méthode développée en LC-MS permet d'analyser 24 ESs, un ensemble de souches permettant de recouvrir ces 23 ESs a été retenu (sauf TSST1). Le choix de ces souches a aussi été effectué en fonction des quantités d'ESs produites, en effet, les souches produisant une quantité élevée d'ESs ont été sélectionnées pour cette étude.

Tableau 19 Souches sélectionnées avec les gènes des ESs identifiés par WGS

Souches	Gènes <i>es</i> (WGS)
09CEB303	sej, ser, ses, set, sex
05CEB52	seb, seg, sei, sem, sen, seo, seu, sex, sey, sez
15SBCL1151	seb, seg, sei, sek, sem, sen, seo, seq, sex
17SBCL693	sea, sec, seh, sek, sel, seq, sex
18SBCL855	sed, seg, sei, sej, sem, sen, seo, sep, ser, sex
46A	see, seq, sez

### II.C.4.3 Résultat de la croissance bactérienne

La croissance des différentes souches de *S. aureus* sélectionnées a été suivie par mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 600 nm. Afin de vérifier la répétabilité, les mesures de DO ont été effectuées à deux reprises pour un point de la cinétique et sur deux colonies provenant de la même souche, ce qui représente un duplicat biologique.

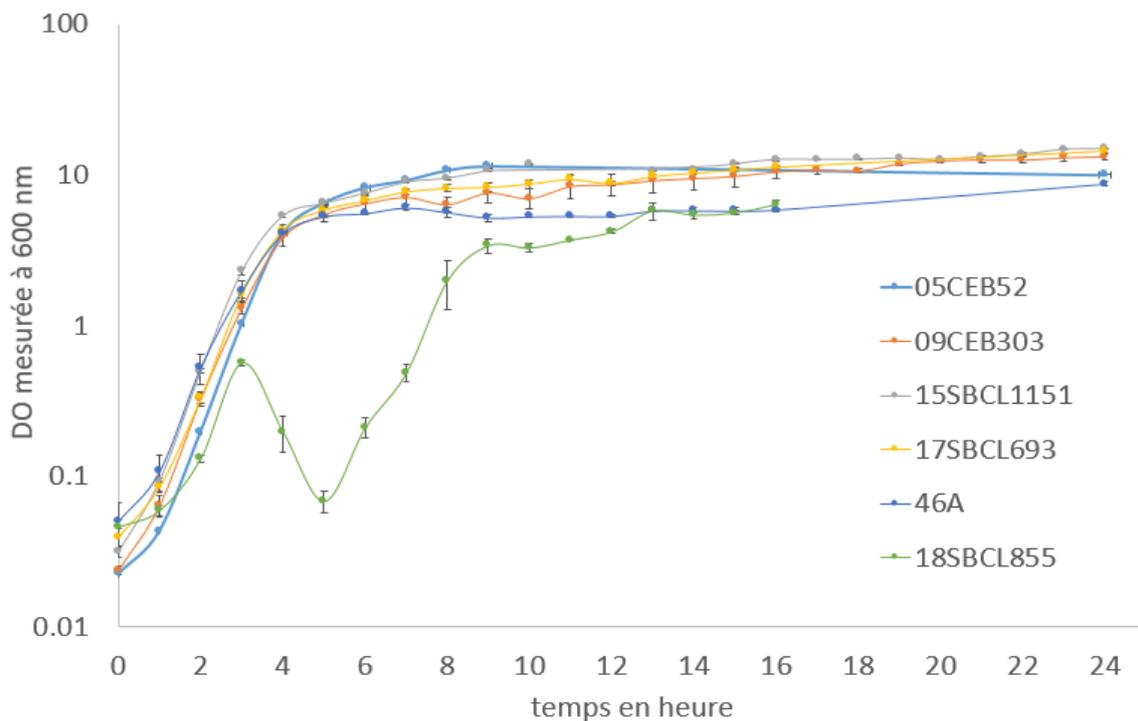


Figure 63 Graphique logarithmique représentant la cinétique de croissance bactérienne des 6 souches étudiées par la densité optique (DO) sur 24h.

Les courbes du graphique, Figure 63, représentent la moyenne des résultats obtenus pour les réplicats sur différents jours. Le suivi de la croissance des souches de *S. aureus* a montré un profil similaire pour cinq souches au cours des 24 heures de cinétique. En effet, trois étapes peuvent être distinguées :

- Une première étape de croissance exponentielle, est appelée phase exponentielle (entre 0 et 4 heures),
- Une seconde étape correspondant à la fin de la croissance exponentielle (entre 4 et 7 heures)
- Et enfin une phase dite stationnaire (de 7 à 24 h) comme le montre la Figure 63.

Concernant la souche 18SBCL855, un profil inhabituel a pu être observé. Durant les manipulations réalisées sur cette souche, il a été noté que les bactéries précipitaient entre le point à 3 h et le point à 4 h de la cinétique. Cette observation pourrait donc expliquer pourquoi les mesures de DO ne sont pas cohérentes avec ce qui est observé dans les autres souches. Les bactéries ayant précipitées, un amas bactérien a été formé et n'a donc pas été pris en

compte lors de la mesure de la DO. Ce phénomène entraîne une sous-estimation du nombre de staphylocoques. En parallèle une recherche sur la présence de gènes codant pour la création de biofilms dans les souches étudiées a été effectuée. Ces recherches n'ont pas donné de résultat probant car il a été démontré que l'ensemble des 6 souches contenaient des gènes codant pour la création de biofilms. Néanmoins, la croissance de cette souche reprend à partir du point à t5h de la cinétique. Une des hypothèses qui pourrait être envisagée pour expliquer ce phénomène est que des colonies de bactéries se sont potentiellement détachées du biofilm et ont pu poursuivre leur croissance dans le BHI. Concernant les cinq autres souches, le profil de croissance observé était bien celui attendu. En effet, des résultats similaires ont été obtenus dans différentes études publiées sur la croissance de souches de *S. aureus*.<sup>326–328</sup>.

#### II.C.4.4 Résultats des cinétiques de production des ESs

La croissance de la souche 05CEB52 ainsi que les ESs quantifiées aux différents points de la cinétique sont représentés Figure 64 Cinétique de production des ESs par la souche 05CEB52, l'axe vertical de droite représente la concentration des ESs en ng/mL de BHI et l'axe vertical de gauche représente la DO à 600nm avec une échelle logarithmique. Le cadre noir représente le zoom du deuxième graphique. L'expression des ESs a été mesurée à l'aide de la méthode présentée dans l'article 3. De manière générale, les résultats obtenus montrent que différents profils de cinétique d'expression des ESs peuvent être identifiés selon la phase de production et la vitesse de production. Les profils des autres souches et entérotoxines (dont la SEQ) sont disponibles en annexe 4.

En effet 3 profils ont pu être identifiés :

Un premier profil indique une production continue des entérotoxines sans atteindre de limite jusque 24 heures (SEB, SEC, SED, SET et SEIX).

Un second profil indique une production rapide au début et qui semble s'atténuer au moment de la phase stationnaire de la bactérie (SEQ, SEA, SEE, SEH, SEK, SEL, SES, SEIJ, SEY, SEP et SER).

Un troisième profil indique une production très tôt dans la cinétique et atteint un plateau à la fin de la phase exponentielle de la bactérie (SEG, SEI, SEM, SEN, SEO, SEIU et SEIZ).

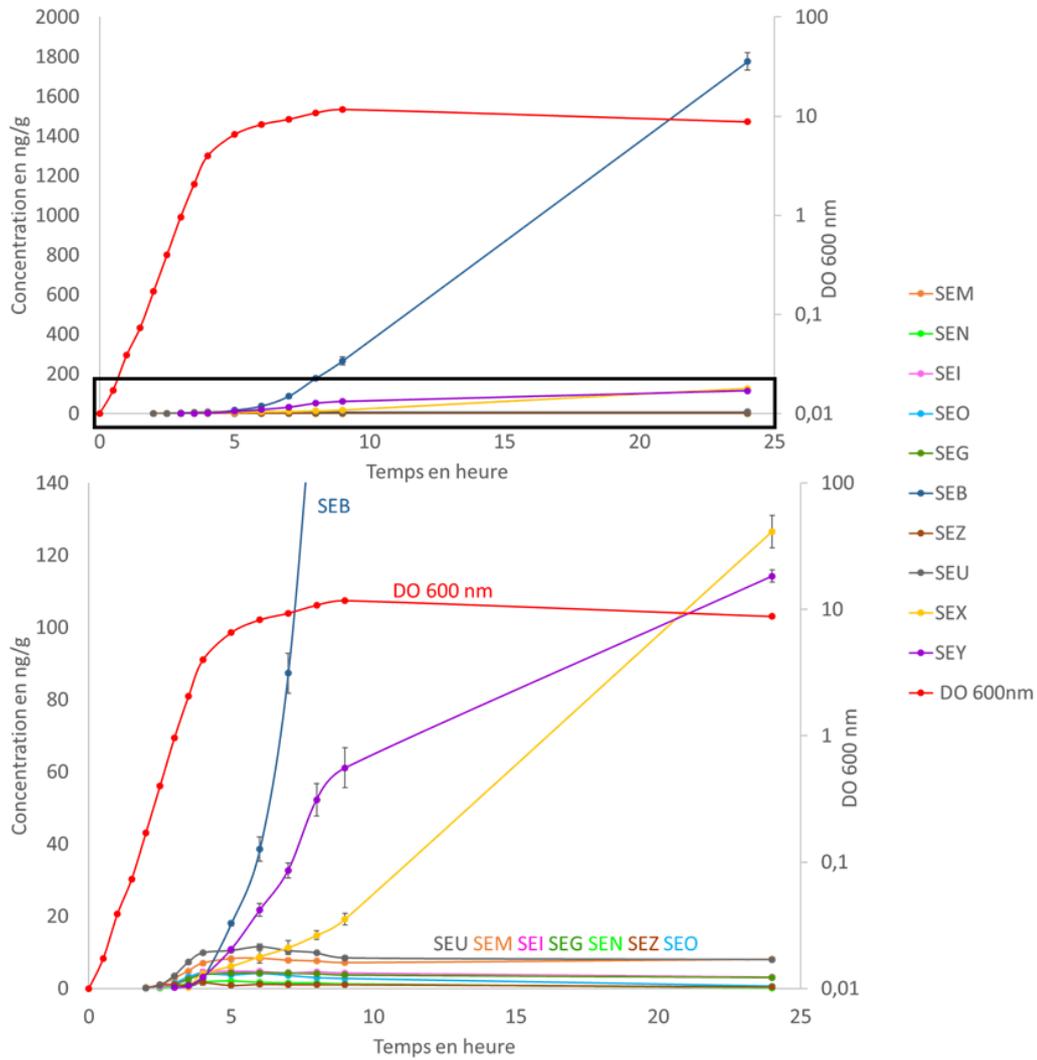


Figure 64 Cinétique de production des ESs par la souche 05CEB52, l'axe vertical de droite représente la concentration des ESs en ng/mL de BHI et l'axe vertical de gauche représente la DO à 600nm avec une échelle logarithmique. Le cadre noir représente le zoom du deuxième graphique.

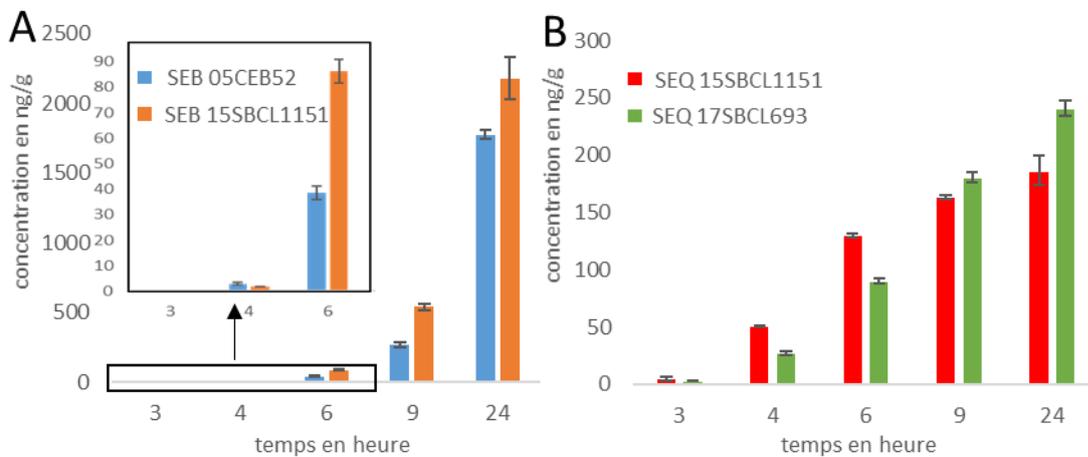


Figure 65 Représentation graphique de la quantité d'ESs produites au cours de la cinétique par type de profils. Figure A comparaison entre deux souches productrices de SEB représentant le premier profil, Figure B comparaison entre deux souches productrices de SEQ représentant le second profil.

A titre d'exemple, les résultats reportés en Figure 65 (A) montrent que le profil de production de la SEB est similaire pour les deux souches étudiées. La SEB, représentant le premier profil, commence à être produite dès t4h et sa quantité de production croît en continu pour atteindre des concentrations très élevées : 1750 et 2200 ng/mL à t24h pour les souches 05CEB52 et 15SBCL1151, respectivement. Concernant la Figure 65 (B) pour la SEQ, le profil d'expression augmente de manière plus lente comparé à la SEB et atteint un plateau vers t9h – t10h. De plus, sa production débute à t3h donc plus tôt que pour la toxine SEB, représentant le second profil.

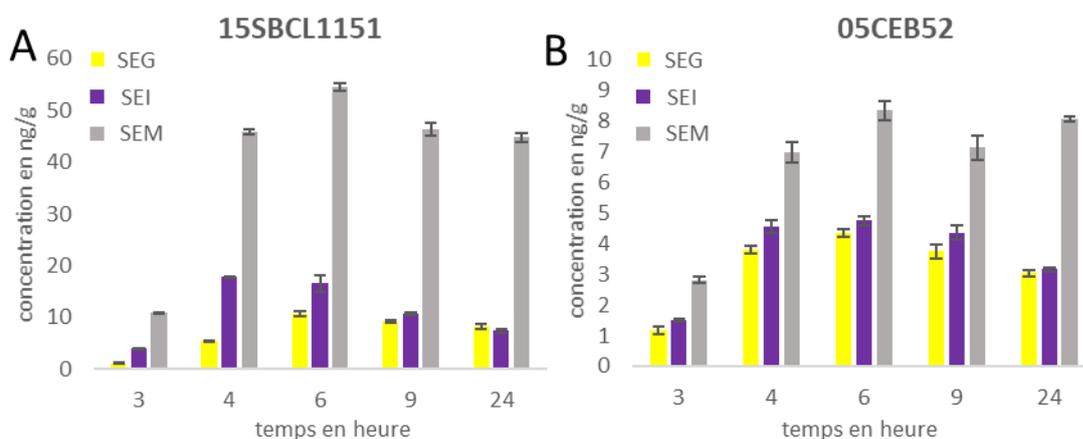


Figure 66 Figure A production de SEG, SEI et SEM par la souche 15SBCL1151, Figure B production de SEG, SEI et SEM par la souche 05CEB52. Représentant le troisième profil.

Le troisième profil représenté ici par les ES G, I et M en Figure 66 décrit une production des ESs dès t3h, en atteignant un plateau très tôt à t4h, ainsi, il semblerait y avoir un arrêt de la production de ces ESs à partir de ce moment de la cinétique. Ces profils ont été obtenus pour

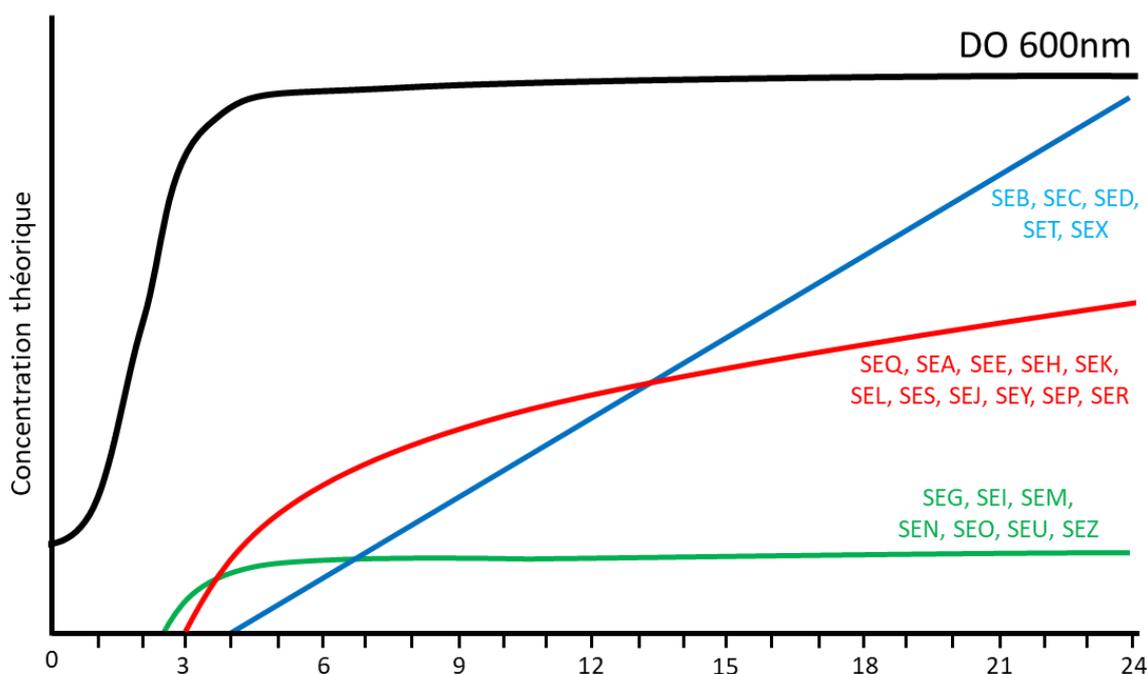


Figure 67 Graphique théorique représentant les trois profils identifiés pour la production des ESs, et en noir la production de *S. aureus*

les deux souches 15SBCL1151 (Figure 66 A) et 05CEB52 (Figure 66 B). Cependant, des différences en termes de concentration des ESs ont été remarquées. En effet, La souche 05CEB52 produit les ESs (SEG/SEI/SEM) en faible concentration : entre 1,2 ng/mL (SEG) jusqu'à 8,4 ng/mL (SEM) contrairement à la souche 15SBCL1151 qui produit les mêmes ESs à des concentrations plus élevées : jusqu'à 55 ng/mL pour la SEM au point t6h. Il est également intéressant de noter que l'ES qui présente le plus fort taux d'expression pour les deux souches est la SEM, suivie de la SEI et enfin la SEG. Cet ordre de concentration est conservé dans ces deux souches et ces gènes sont issus du même opéron (egc).

En conclusion trois profils d'expression, Figure 67 Graphique théorique représentant les trois profils identifiés pour la production des ESs, et en noir la production de *S. aureus*, ont pu être identifiés en fonction de la croissance bactérienne. En effet, un profil (Figure 67 Graphique théorique représentant les trois profils identifiés pour la production des ESs, et en noir la production de *S. aureus* en bleu) montre une expression d'ES continue, débutant vers la fin de la croissance exponentielle de la bactérie et atteignant des concentrations de l'ordre du µg/mL (cas typique de SEB). Pour un autre profil (Figure 67 Graphique théorique représentant les trois profils identifiés pour la production des ESs, et en noir la production de *S. aureus* en rouge), l'expression d'ES a débuté au milieu de la croissance exponentielle de la bactérie puis a atteint un plateau au milieu de la cinétique (cas typique de SEQ). Enfin, un dernier profil (Figure 67 Graphique théorique représentant les trois profils identifiés pour la production des ESs, et en noir la production de *S. aureus* en vert) semble se dessiner avec un début d'expression à la moitié de la phase exponentielle de croissance de la bactérie qui se stabilise et atteint un plateau au même moment que la croissance bactérienne (cas typiques de SEG, SEI, SEM). Ces trois profils ont été représentés schématiquement sur la Figure 67 Graphique théorique représentant les trois profils identifiés pour la production des ESs, et en noir la production de *S. aureus* et l'ensemble des données est accessible en annexe 4.

Derzelle et al 2009<sup>95</sup> ont proposé quatre profils d'expression des ESs. Cependant, le quatrième profil décrit est un mélange entre le profil de la SEQ (Figure 67 Graphique théorique représentant les trois profils identifiés pour la production des ESs, et en noir la production de *S. aureus* en rouge) et le profil de la SEB (Figure 67 Graphique théorique représentant les trois profils identifiés pour la production des ESs, et en noir la production de *S. aureus* en bleu). De plus leurs travaux n'étaient pas basés sur l'analyse des entérotoxines mais seulement sur l'expression des gènes déterminés par RT-PCR. Ainsi ils n'ont pu obtenir aucune information sur la réelle expression des toxines lors de leur cinétique.

Cette étude nous a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur l'expression des ESs par les souches de *S. aureus*. Nous avons pu identifier les entérotoxines produites en premier, leur quantité exprimée et leur profil d'expression. Certaines ESs avec une activité émétique démontrée et actuellement non recherchées lors de TIAC mériteraient plus d'attention. Il s'agit des entérotoxines SEH, SEK, SEQ, SER et SET dont le profil d'expression et les concentrations produites sont similaires aux cinq types des ESs les plus étudiées depuis 1950, SEA à SEE (cf article 3). Ces nouvelles entérotoxines émergentes devraient être plus particulièrement prises en considération lors d'épisodes de TIACs. Cependant, cette étude a été réalisée en milieu de culture BHI et les profils pourraient être différents en matrice alimentaire. Il serait donc intéressant de mimer les conditions de productions naturelles des

ESs dans des aliments en réalisant des cinétiques dans des matrices alimentaires propices pour le développement du staphylocoque. Ce projet aurait donc pour objectif de comprendre comment les souches expriment les ESs dans les denrées alimentaires, et ainsi à plus long terme contribuer à la définition des étapes critiques de la production de l'aliment pendant laquelle le contrôle des ESs doit être effectuée.

Le temps dédié à cette action n'a permis d'étudier que six souches. Il serait nécessaire de confirmer les résultats de cette étude sur un plus grand nombre de souches. Il serait pertinent également d'étudier des souches issues de TIACs d'origines différentes et qui possèdent une variabilité génétique, c.a.d. exprimant différents variants d'ESs.

## II.C.5 Conclusion et perspective partie C

Dans cette partie nous avons proposé une méthode permettant l'analyse des entérotoxines sans l'utilisation d'anticorps. Ainsi, pour la première fois, 24 entérotoxines ont pu être détectées et quantifiées dans du milieu de culture BHI en prenant en compte 162 variants. Ce travail a permis la mise en place d'une base de données de 93 peptides protéotypiques « best peptides » de chaque ES en prenant en compte les variants de séquence. Malgré les limites de l'approche de quantification Hi3, sans étalon dédié, nous avons obtenu de nouvelles données sur le processus d'expression des ESs par le *S. aureus*. Nous avons ainsi mis en évidence trois profils d'expression des ESs qui sont produites à des quantités différentes. Ces résultats, qui doivent être confirmés sur un plus grand nombre de souches, donnent une première orientation sur les nouvelles ESs à rechercher en priorité lors d'épisodes de TIACs. En termes de perspective analytique, le protocole de préparation de l'échantillon sans anticorps devra être évalué sur des matrices alimentaires de complexité croissante, notamment des aliments riches en protéines comme les matrices laitières. Il sera alors certainement nécessaire de réaliser des optimisations pour atteindre une sensibilité compatible avec les concentrations des ESs observées dans les TIACs, par exemple à l'aide d'un fractionnement au niveau peptidique comme décrit dans l'état de l'art (cf paragraphe I.C.3.2). Une autre alternative serait le développement d'anticorps semi-spécifiques comme proposé à la suite de l'article 1.

# III Conclusion

Chaque année, seulement environ 10% des TIACs à staphylocoques sont considérées comme confirmées « strong évidence », faute de disponibilité d'outils analytiques permettant la confirmation de la présence de toutes les ESs. En effet, lors des analyses des échantillons prélevés lors des épisodes de TIACs, les laboratoires agréés et les laboratoires de référence mettent en place la méthode officielle préconisée dans le règlement européen (CE n° 2073/2005 modifié). Cette méthode (norme NF EN ISO 19020), basée sur le principe ELISA, peut détecter cinq ESs « classiques SEA-SEE », sans les discriminer, ni les quantifier. A ce jour, aucune méthode alternative n'est disponible pour détecter l'ensemble des ESs. Au total, 35 ESs ont été décrites dans la littérature dont 20 ESs pour lesquelles une activité émétique a été démontrée. Chacune de ces ESs possède entre 1 jusqu'à quelques dizaines de variants protéiques. Par ailleurs, lors de l'investigation de nombreux foyers humains, il arrive régulièrement qu'aucune ES de type SEA-SEE ne soit retrouvée alors qu'une symptomatologie typique d'intoxication à staphylocoques a été identifiée, et que des souches, possédant d'autres gènes codant les ESs, ont été isolées de produits suspectés être à l'origine de TIACs. Il est donc impératif de disposer d'un outil d'analyse et de confirmation rapide et capable de viser une plus large gamme de toxines. Cet outil permettrait de mieux contrôler les contaminations en ES dans les chaînes alimentaires en détectant les ESs émergentes, et donc mieux protéger le consommateur.

L'état de l'art de ce travail de thèse montre que la communauté scientifique s'est focalisée sur le développement des méthodes de détection des ESs basées sur le principe ELISA, car elles sont réputées pour leur grande sensibilité et sont faciles à mettre en place. L'augmentation du nombre des nouvelles ESs décrites (10 nouvelles ESs lors des cinq dernières années) a mis en évidence la limite majeure de ce type de méthodes : la difficulté de couvrir la totalité des ESs décrites, liée notamment à l'indisponibilité des réactifs spécifiques tels que les anticorps. À cet effet, la spectrométrie de masse, apparaît comme une proposition pertinente étant donné son apport pour les analyses protéomiques : spécificité d'identification de protéines en matrices complexes, robustesse de la quantification, analyses multiplexes, la possibilité de s'affranchir des anticorps. Cependant, les travaux réalisés sur la LC-MS se sont limités à ce jour à l'étude d'un nombre très restreint d'ESs, rarement dans les aliments et sans prendre en compte la présence de variants.

Dans ce projet, nous avons souhaité exploiter les capacités de la spectrométrie de masse pour la détection, la quantification et la caractérisation des ESs dans les aliments et dans des surnageants de culture. Nos avancées par rapport à l'état de l'art nous ont permis de répondre à trois questions majeures :

- La spectrométrie de masse en mode ciblé combinée à une immunocapture offre-t-elle une sensibilité suffisante pour la détection des ESs dans les aliments régulièrement impliqués dans des épisodes de TIACs ? En effet, de très faibles concentrations d'ESs sont souvent retrouvées (inférieures au ng/g). Globalement, quelle serait l'apport d'une telle approche pour l'analyse des échantillons issus de TIAC ?

- D'autre part, comment pouvons-nous envisager l'extension de la spectrométrie de masse à l'ensemble des ESs, notamment celles pour lesquelles des anticorps ne sont pas disponibles ?
- Etant donné le grand nombre de variants caractérisés par la génomique, quelle est la valeur ajoutée de la spectrométrie de masse pour identifier les variants et limiter leur impact sur les méthodes de détection des ESs ?

**La spectrométrie de masse en mode ciblé combinée à une immunocapture offre-t-elle une sensibilité suffisante pour la détection des ES dans les aliments régulièrement impliqués dans des épisodes de TIACs ? Globalement, quelle serait l'apport d'une telle approche pour l'analyse des échantillons issus de TIAC ?**

Dans un premier temps, nous avons répertorié les protocoles les plus sensibles pour l'extraction et l'analyse des ESs par LC-MS dans les matrices alimentaires. L'approche protéomique bottom-up en mode ciblé combinée à l'extraction par immunocapture a été choisie car elle offre la meilleure sensibilité, et a donc été retenue en premier lieu pour évaluer les performances de la LC-MS dans des conditions optimisées. Le protocole mis en place a permis l'identification et la quantification simultanée de huit ESs (SEA-SEE et SEG-SEI) dans des matrices alimentaires. L'acquisition en mode ciblé (PRM) a atteint des limites de quantification comprises entre 0,1 – 0,5 ng/g, soit de l'ordre des concentrations retrouvées dans des échantillons impliqués dans des TIACs. Nous avons également montré comment notre méthode permet de quantifier l'ensemble des variants connus, sans les discriminer, pour limiter le risque de résultat faux-négatif. Les analyses d'échantillons issus de TIACs réalisées à partir de cette méthode ont permis de confirmer l'identification de l'ES impliquée et sa concentration.

Pour certains échantillons naturellement contaminés, la confrontation des résultats obtenus par la LC-MS d'une part, par des ELISA et par des PCR (pour la détection des gènes *se*) d'autres part a montré quelques divergences liées, soit à un manque de sensibilité de la LC-MS, soit à une probable déviation positive des ELISA. Cette méthode LC-MS a ainsi montré son potentiel et sa complémentarité, dans le cadre de la confirmation d'une TIAC à SCP, par rapport aux deux techniques précédentes.

En termes de perspective, cette méthode LC-MS pourrait nécessiter une optimisation supplémentaire afin d'améliorer la sensibilité et atteindre les niveaux pg/g. Pour ce faire, l'utilisation de techniques de séparation performantes en amont (nano-LC) est un facteur à prendre en compte.

Par ailleurs, la méthode LC-MS a été évaluée dans des matrices laitières au cours de cette thèse. Elle doit maintenant être testée et validée sur d'autres catégories de matrices alimentaires, afin d'identifier la sensibilité, la spécificité et la précision pour chaque ES dans chaque catégorie de matrice alimentaire. A ce jour, il n'existe aucun référentiel ISO dédié à la validation des méthodes d'analyse des toxines bactériennes dans les aliments. Afin de caractériser les performances de la méthode développée, nous recommandons de s'inspirer de la norme NF V03-110 Mai 2010 (Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par

construction du profil d'exactitude) ou de la norme ISO 16140-2:2016 Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 2: Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence.

Après validation, la méthode pourra être déployée pour les analyses de routine au laboratoire de référence national français et au laboratoire de référence de l'union européenne tous deux dirigés par l'ANSES.

### **Quelle est la valeur ajoutée de la spectrométrie de masse pour identifier les variants et limiter leur impact sur les méthodes de détection des ESs ?**

Les analyses génomiques par séquençage haut débit de *S. aureus* ont permis d'identifier de nombreux variants de séquence pour chaque type d'entérotoxines. Nous avons observé l'impact potentiel de ces variants, en termes de déviation négative, sur les méthodes de détection basées sur des anticorps monoclonaux ou des peptides protéotypiques. Nous avons pris en compte ce problème lors du développement analytique des méthodes bottom-up, en sélectionnant plusieurs peptides représentatifs de l'ensemble des variants et plusieurs anticorps monoclonaux de capture pour chaque type. Cependant, l'approche bottom-up ne permet pas d'identifier ou de discriminer le variant de séquence présent dans l'échantillon. Les variants des ESs sont pour le moment peu étudiés, probablement car seul le séquençage génomique permet de les identifier. Ces variants pourraient avoir une influence sur l'effet émétique ou super-antigénique des ESs de par leur modification de séquence. Pour cette raison, et aussi pour prévenir leur impact sur les méthodes de détection, une partie de ce travail de thèse a été orienté vers le développement d'une méthode rapide d'identification des variants protéiques. Pour cela, une approche protéomique top-down couplée à une extraction par immunocapture a été mise au point. Le top-down permet d'analyser les protéines dans leur globalité et donc d'observer, en théorie, l'ensemble des modifications de séquences. L'utilisation d'un variant rare (SEA<sub>2</sub>) comme étalon interne a permis de proposer une quantification absolue. La méthode a été confrontée avec succès au séquençage génomique sur un panel de 13 souches de *S. aureus* productrices de quatre variants de SEA. Il est aussi désormais possible avec cet outil de détecter un nouveau variant de SEA via l'acquisition non ciblée, et de confirmer son expression. Cette méthode nécessitera d'être étendue à l'ensemble des ESs, au moins les 8 premières pour lesquelles nous disposons d'anticorps, et d'améliorer la couverture de séquence par MS/MS pour bien caractériser les nouveaux variants.

A noter l'intérêt de cette approche pour vérifier le type de variant présent en cas d'incapacité d'extraire le génome pour le WGS (souche absente, suite à un traitement thermique par exemple). En effet, en cas de TIAC d'ampleur, les analyses génétiques par WGS permettent souvent d'établir le lien entre les souches isolées dans des régions géographiques différentes et/ou chez différents hôtes. Cependant, si l'ES est produite, l'approche développée ici permettrait de comparer non seulement le type de l'ES, mais aussi le variant associé. Ceci peut apporter une information non négligeable pour les autorités compétentes dans la gestion des litiges.

## **Comment envisager l'extension de la spectrométrie de masse à l'ensemble des ESs, notamment celles pour lesquelles des anticorps ne sont pas disponibles ?**

Afin d'élargir la gamme de toxines analysables par spectrométrie de masse, nous avons développé une méthode de quantification LC-MS « label-free » et sans anticorps. En effet, l'extension du protocole basé sur l'immunocapture ne peut être retenue car nous n'avons pas à disposition ni des solutions étalons ni des anticorps couvrant tous les types des ESs.

Une préparation d'échantillons appuyée sur la précipitation acide des protéines a donc été optimisée puis appliquée dans un premier temps à des surnageants de culture de *S. aureus* pour l'analyse de 24 types d'ESs. La quantification absolue à l'aide d'étalon étant impossible, nous avons proposé une méthode semi-quantitative fondée sur le principe Hi3 permettant une estimation de la concentration via un standard protéique différent. Une approche combinée LC-MS et WGS a été mise en place dans cette partie de travail afin de prendre en compte non seulement les 24 types des ESs, mais aussi les séquences de leur variants. Nous avons donc identifié 207 peptides parmi lesquels, 93 ont été confirmés comme « peptides signatures » ou « best peptides » et représentatifs de l'ensemble des variants décrits dans la littérature. Cette liste de 93 peptides constitue la première banque de données peptidiques des 24 ESs, obtenue par une approche combinée LC-MS et WGS. Elle peut être utilisée pour le développement de futures méthodes ciblées par approche bottom-up dans des matrices complexes. Par exemple quand des anticorps spécifiques seront disponibles pour les 24 ESs. Cette approche d'analyse multiplexe de 24 ESs a été mise en place pour quantifier toutes les ESs exprimées dans des surnageants de culture de souches de *S. aureus* (i) après 18 h d'incubation dans du BHI et (ii) en réalisant des cinétiques de suivi de production des 24 ESs pendant 24 h à des conditions optimales. Cette étude nous a permis de :

- Constaté qu'après 18 h d'incubation, tous les gènes disponibles dans une souche de *S. aureus* expriment la totalité de leurs ESs. Pour certaines souches, jusqu'à 11 ESs ont été quantifiées à la fin de l'incubation.
- Répertoire quatre niveaux de concentrations : très faible, faible, moyenne et très forte concentration. Cependant, la quantité des ESs exprimée dépend principalement du type de l'ES.
- Identifier via les cinétiques d'expression (entre 0 h et 24 h), les premières ESs produites ou celles produites en fortes quantités, donc les ESs les plus à risque d'être impliquées dans des TIACs. En plus des ESs classiques, des ESs émergentes et très peu étudiées telles que la SEK, SEQ, SER, SET ont été répertoriées.

Les résultats de cette partie de thèse sont originaux et constituent une avancée considérable non seulement dans la mise en place de la LC-MS pour l'étude des ESs, mais aussi dans l'étude de la production des ESs émergentes par des souches de *S. aureus*.

Pour consolider cette étude, une plus large gamme de souches devra être étudiée afin d'approfondir et de confirmer ces résultats. De même, il serait intéressant d'étudier des cinétiques de production des ESs dans des matrices alimentaires riches en protéines rencontrées régulièrement lors de TIACs. Les cinétiques quantitatives de production des ESs dans ces matrices pourraient permettre de déterminer les points critiques des prélèvements à effectuer dans les industries de fabrication des aliments afin de prouver l'innocuité des lots

à commercialiser.

En termes de perspective, les conclusions de cette étude peuvent être utilisées pour déterminer les types des ES émergentes à prioriser lors du développement de méthodes analytiques (par exemple, pour la production d'anticorps et d'étalons de quantification). Dans les études de toxicité des souches *S. aureus*, ces résultats montrent qu'il est très important de prendre en compte la totalité des ES produites par la souche, et d'éviter de se focaliser sur un seul type d'ES ou un groupe d'ESs lié à un opéron donné.

Au-delà de ces trois conclusions majeures, ce travail de thèse montre que la quantification absolue (ou semi quantitative pour le Hi3) reste un élément clé dans l'étude des ESs et leurs impacts en termes de sécurité des aliments. En effet, la quantification de l'expression des ESs nous a permis d'identifier des ESs qui sont plus exprimées que d'autres. Si certains facteurs comme la « dose toxique » ou « LOD<sub>50</sub> » doivent être pris en compte, la quantification et les effets cumulatifs issus de coproduction d'ESs par une même souche de *S. aureus* semblent être indispensables pour déterminer les ESs à risque, comme cela a pu être décrit par Umeda et al 2021<sup>329</sup> sur l'opéron *egc*.

Actuellement, la détection d'une seule des ESs, lors des analyses des produits avant leur mise sur le marché par les industriels, conduit à la destruction du lot incriminé. A terme, une étude quantitative des seuils « bénéfique/risque » permettrait de limiter la destruction de lots d'aliments qui seraient considérés comme propres à la consommation (même s'ils contiennent une quantité d'ESs jugée non toxique) et d'obtenir des retombées économiques importantes dans le secteur alimentaire et pour la société en limitant les hospitalisations.

La mise en place du projet commun ANSES – CEA « EStaph » sous forme de thèse, à partir de novembre 2021, est le fruit de cette première collaboration réussie. L'objectif est de pouvoir cibler au final une vingtaine d'ESs en mettant en place, à l'aide de nouveaux anticorps, un dispositif de screening rapide (type ELISA rapide et/ou Lateral Flow immunoAssay LFA) et un protocole d'extraction par immunocapture couplé à la technique LC-MS, permettant ainsi une caractérisation fine des intoxications alimentaires au sein des réseaux du Laboratoire National de Référence, et du Laboratoire de Référence de l'Union Européenne. Dans cet objectif, des toxines recombinantes et des anticorps monoclonaux seront produits.

### **Impacts du travail de thèse**

Deux points peuvent être détaillés comme impacts de ce travail de thèse à l'échelle nationale, européenne et internationale

#### *A l'échelle nationale et européenne :*

Disposer d'outils analytiques capables de détecter et quantifier l'ensemble des types ESs et leurs variants est un enjeu majeur pour une meilleure compréhension et/ou caractérisation des TIACs à SCP. Nous avons montré la complémentarité de la configuration la plus sensible, l'immunocapture couplée à une acquisition en mode ciblé, pour l'analyse d'échantillons réels issus de TIACs où nous avons atteint une sensibilité proche de celle des ELISA. La méthode LC-MS proposée dans ce travail peut être utilisée comme alternative et complément lors de la caractérisation d'épisodes toxiques liés à la consommation d'aliments contaminés par des ESs.

Son association avec les méthodes ELISA, PFGE, PCR et WGS va apporter des informations clés lors de l'analyse des aliments et des souches dans des épisodes de TIACs. L'ANSES en tant que Laboratoire National de Référence et Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour les Staphylocoques a planifié la validation de cette méthode pour la mettre en place en routine. La documentation nécessaire pour l'intégrer dans le système de management de la qualité (ISO 17025) est en cours de rédaction. Cette méthode sera donc utilisée pour apporter des informations nécessaires à la prise de décision par les autorités compétentes.

*A l'échelle internationale :*

En plus de l'article publié dans un journal international et les 2 articles en cours de soumission, un processus de normalisation au niveau international (ISO/TC34/SC9/WG30) de la méthode développée a débuté, cette normalisation est portée par un groupe d'experts internationaux pour l'évaluation des résultats de cette validation.

# Annexes

# Annexe 1

## SEP

```
tr|A0A455X4P9|31-254 -----SEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 30
5 MSKIKKTTFFILLSFIALTLTITSPFVNCSEKSEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 60
tr|A0A0E3Z7F5|28-257 -----SEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 30
6 MSKIKKTTFFILLSFIALTLTITSPFVNCSEKSEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 60
4 MSKIKKTTFFILLSFIALTLTITSPFVNCSEKSEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 60
3 MSKIKKTTFFILLSFIALTLTITSPFVNCSEKSEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 60
2 MSKIKKTTFFILLSFIALTLTITSPFVNCSEKSEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 60
1 MSKIKKTTFFILLSFIALTLTITSPFVNCSEKSEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 60
tr|A0A0H3JQX0|31-260 -----SEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 30
tr|A0A390PKN6|31-260 -----SEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 30
tr|A0A0E1VR88|31-260 -----SEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHHN 30
* *****

tr|A0A455X4P9|31-254 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 90
5 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 120
tr|A0A0E3Z7F5|28-257 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 90
6 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 120
4 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 120
3 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 120
2 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 120
1 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 120
tr|A0A0H3JQX0|31-260 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 90
tr|A0A390PKN6|31-260 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 90
tr|A0A0E1VR88|31-260 GSAI IENKESNDQFLKNTILFNDFFTGHQWYNDDLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYYG 90
*****

tr|A0A455X4P9|31-254 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 150
5 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 180
tr|A0A0E3Z7F5|28-257 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 150
6 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 180
4 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 180
3 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 180
2 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 180
1 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 180
tr|A0A0H3JQX0|31-260 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 150
tr|A0A390PKN6|31-260 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 150
tr|A0A0E1VR88|31-260 YQCTGGTTPFKTACMYGGVTLHDNNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTKNKKEVTVQ 150
*****

tr|A0A455X4P9|31-254 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 210
5 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 240
tr|A0A0E3Z7F5|28-257 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 210
6 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 240
4 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 240
3 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 240
2 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 240
1 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 240
tr|A0A0H3JQX0|31-260 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 210
tr|A0A390PKN6|31-260 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 210
tr|A0A0E1VR88|31-260 ELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQGYPDTQLRIY 210
**.*.*.*

tr|A0A455X4P9|31-254 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 224
5 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 262
tr|A0A0E3Z7F5|28-257 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 230
6 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 260
4 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 260
3 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 260
2 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 260
1 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 260
tr|A0A0H3JQX0|31-260 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 230
tr|A0A390PKN6|31-260 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 230
tr|A0A0E1VR88|31-260 RDNKTIKSKNMHIDIYLYTT-- 230
*****.*.*
```

## Annexe 2

### Développement préliminaire d'une méthode par gel SDS-PAGE pour l'analyse des ESs en matrice alimentaire

Une précipitation acide suivie d'un gel SDS- PAGE a donc été proposé, afin de concentrer les ESs et de les séparer des autres protéines. Pour cela un protocole a été optimisé durant le stage de master 2 de Mohamed Amine BERKAL que j'ai encadré à l'ANSES durant 6 mois. Des tests de sensibilité sur la matrice lait ont été réalisés, suivis de tests sur une plus large gamme de matrices alimentaires.

### Protocole de la méthode par gel SDS-PAGE

La précipitation des ESs a été réalisée grâce à l'utilisation du TCA (acide trichloracétique). Tout d'abord une extraction de la toxine a été réalisée, comme décrite dans l'article 1, par dialyse et concentration puis suivie d'une précipitation au TCA, comme décrit dans l'article 3. Le culot récupéré lors de l'étape de précipitation protéique a été solubilisé dans 20  $\mu$ l d'une solution Laemmli 4X (BIORAD)/tampon bicarbonate d'ammonium (50/50). Ensuite, ces 20  $\mu$ l ont été chargés dans les puits d'un gel SDS-PAGE (Thermo Fisher, 12%) immergés préalablement dans du tampon de migration Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, novex®, Bolt™, USA). Une tension de 150 Volt a été appliquée et maintenue pendant 1h15 min. Après migration, la bande protéique contenant les ESs n'est pas visible sur le gel, même après coloration au bleu de Coomassie, car les concentrations en ESs sont trop faibles. Pour localiser les ESs, un marqueur de poids moléculaire (BIORAD, USA) a donc été utilisé, la bande de gel située entre les marqueurs de masse 22 et 29 kDa (contenant les ES) a ainsi été découpée au scalpel. Cette bande a ensuite été découpée en morceaux pour faciliter l'étape de digestion enzymatique. Les étapes du protocole de digestion enzymatique sont décrites Figure 68 :

1ère étape, nettoyage du gel : cette étape consiste à nettoyer les morceaux de gel contenant les ESs par des lavages avec une solution de 60  $\mu$ l d'acétonitrile/ammonium bicarbonate 50mM (50/50) puis une incubation de 15 minutes à RT. Ce lavage a été réalisé deux fois, suivi d'un lavage à l'acétonitrile et d'un séchage à 37°C durant 10 min.

2ème étape, réduction des ponts disulfures : afin d'obtenir une digestion enzymatique efficace, les protéines doivent avoir les ponts disulfures réduits. Pour cela, 60  $\mu$ l de DTT 20 mM ont été ajoutés aux morceaux de gel et le tout a été incubé pendant 30 minutes à 46 °C.

3ème étape, alkylation : cette étape permet de maintenir les cystéines sous forme réduite. Pour cela, 60  $\mu$ l IAA 45 mM ont été ajoutés aux morceaux de gel puis incubés pendant 30 minutes à 37 °C dans l'obscurité.

4ème étape, lavage : 60  $\mu$ l d'acétonitrile/ ammonium bicarbonate 50mM (50/50) ont été ajoutés aux morceaux de gels et incubés pendant 15 min à RT, suivi d'un lavage à l'acétonitrile et d'un séchage à 37°C durant 10 min.

5ème étape, digestion trypsique : Afin de digérer les ESs imprégnées dans le gel de polyacrylamide, 30  $\mu$ l de la solution de trypsine à 40 ng/ $\mu$ L ont été ajoutés aux morceaux de

gel puis incubés pendant 20 minutes à 4 °C. Finalement, 40 µl d'ammonium bicarbonate 50mM ont été ajoutés et le tout a été incubé sur une nuit à 37 °C.

Au cours de la digestion enzymatique des toxines, les peptides produits diffusent de la phase solide (gel) vers la phase liquide (solution de digestion). Afin de récupérer tous les peptides, les morceaux de gel ont été lavés à l'acétonitrile, séchés et éliminés. Une fois les peptides fixés au fond du tube, ils sont alors re-suspendus par ajout de 40 µl acétonitrile/eau (5/95) suivi d'une sonication durant 5 min. Finalement, 10 µl d'une solution de peptides alourdis de toxines SEA-SEI (heavy peptide) a été ajoutée avant injection en LC-MS.

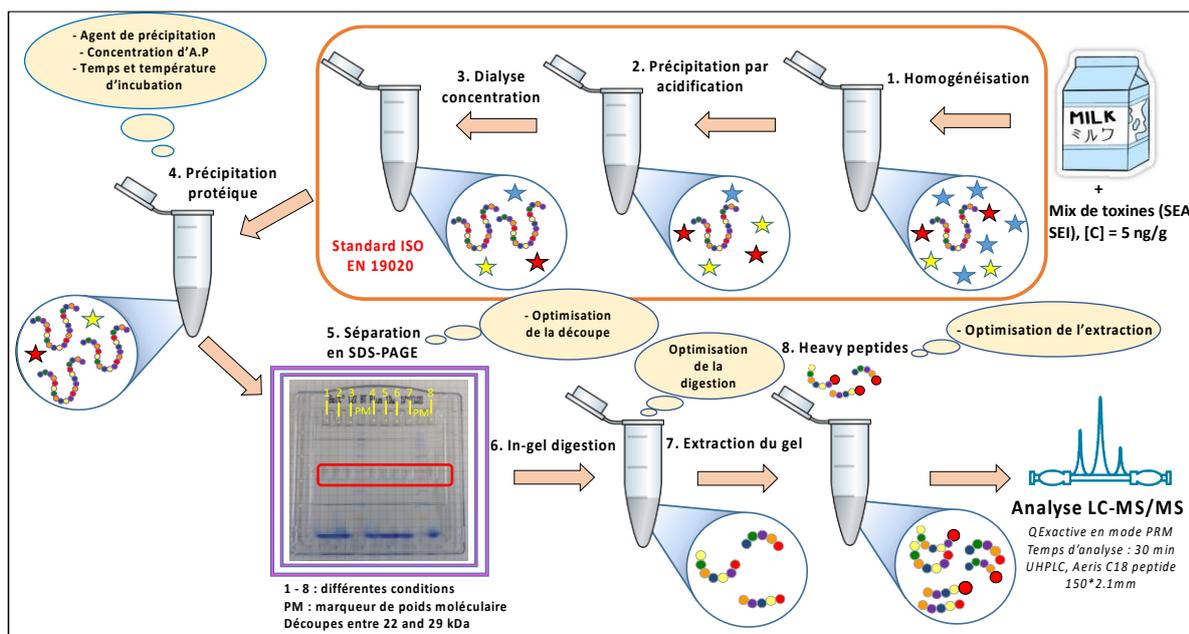


Figure 68 : Protocole d'extraction des ESs sans anticorps (AP agent précipitant)

### Résultat de l'analyse des protéines recombinantes SEA à SEI en matrices alimentaires

L'analyse des ESs via cette méthode a été testée dans du lait demi écrémé. Les 8 standards ont été surchargés dans la matrice à des concentrations de 0.1-1 ng/mL afin d'identifier la limite de détection. Dans la Figure 69: Résultat des gammes de sensibilité des 8 ESs dans le lait par la méthode gel SDS- PAGE, des gammes de chaque ES avec le peptide possédant le signal le plus intense ont été réalisées. On observe qu'il est possible de détecter les 8 ESs avec des concentrations comprises entre 0.5-1 ng/mL de lait. Ces LOD sont dans la gamme de concentration des ESs retrouvées lors d'épisodes de TIACs à SCP. Le problème majeur de cette méthode été la reproductibilité, en effet l'étape de découpage des gels basée uniquement sur l'indication des marqueurs de poids moléculaire induisait des résultats non reproductibles un jour sur l'autre et/ou dépendait de l'expérimentateur.

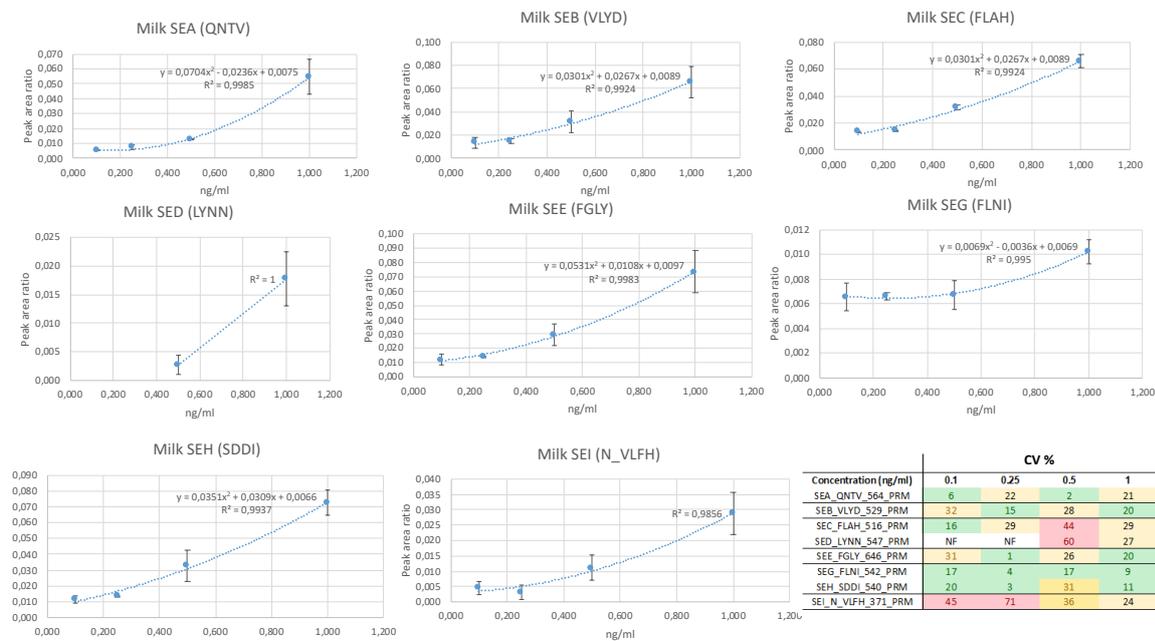


Figure 69: Résultat des gammes de sensibilité des 8 ESs dans le lait par la méthode gel SDS-PAGE

### Conclusion des tests par la méthode gel SDS-PAGE

Cette méthode a donné des résultats intéressants pour la détection des nouvelles ESs dans le lait avec des LOD légèrement supérieures à celles obtenues par immunoprecipitation. Cependant, des optimisations pour obtenir une reproductibilité acceptable est obligatoire pour une application à la caractérisation de TIAC. De plus, une étape supplémentaire à ce protocole déjà long devra être mise en place pour déterminer la quantité de protéines déposée dans les gels SDS-PAGE (afin de d'éviter une saturation) après extraction d'autres matrices alimentaires.

# Annexe 3

## Supporting information Article 3

### S1: Sequence alignment of variants for the 24 enterotoxins

#### SEA

a_2	MKKRKTAFILTLTCIVIMLVTSPLVNG	SEKSEEIKEKDLHKKSELQGVALDNLRQIYYHNG	60
a_3	--MKKTAFTLLLFIALTLTTSPLVNG	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYNE	58
a_1	--MKKTAFILLLFIALTWTTSPLVNG	SEKSEEINEKDLRKKSELQGAALGNLQIYYNE	58
a_4	--MKKTAFILLLFIALTWTTSPLVNG	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYNE	58
	:**** * * * .: . *****:****:***** .** .** :****:*		
a_2	KAITENKESDNQFLQHTILFNGFFTDHPWYNDLLVDFDSKVLADKYKGGKVDLYGAYGY		120
a_3	KAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDKYKGGKVDLYGAYGY		118
a_1	KAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTNHSWYNDLLVDFDSKDIVDKYKGGKVDLYGAYGY		118
a_4	KAKTENKESHQFLQHTILFKGFFTNHSWYNDLLVDFDSKDIVDKYKGGKVDLYGAYGY		118
	** ***** .:*****:****:* ***** .:*****		
a_2	QCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEEKVPI NLWLWDGKQNTVPLETVKTNKKEVTVQE		180
a_3	QCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEEKVPI NLWLWDGKQNTVPLETVKTNKKNVTVQE		178
a_1	QCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEEKVPI NLWLWDGKQNTVPLETVKTNKKNVTVQE		178
a_4	QCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEEKVPI NLWLWDGKQNTVPLETVKTNKKNVTVQE		178
	*****:*****		
a_2	LDLQARHYLHGKYNLYNSDVF DGKVQRGLIVFHTSTEPVNYDLFGAQQYSNTLLRIYR		240
a_3	LDLQARRYLQEKYNLYNSDVF DGKVQRGLIVFHTSTEPVNYDLFGAQQYSNTLLRIYR		238
a_1	LDLQARRYLQEKYNLYNSDVF DGKVQRGLIVFHTSTEPVNYDLFGAQQNSNTLLRIYR		238
a_4	LDLQARRYLQEKYNLYNSDVF DGKVQRGLIVFHTSTEPVNYDLFGAQQNSNTLLRIYR		238
	*****:***:***** .***** ***** *****		
a_2	DNKTINSENMHIDIYLYTT	259	
a_3	DNKTINSENMHIDIYLYTS	257	
a_1	DNKTINSENMHIDIYLYTS	257	
a_4	DNKTINSENMHIDIYLYTS	257	
	*****:*****:		

#### SEB

b_3	MYNRLFVSRVILIFALILVIYTPNVLA	ESQDPKPKDELHKASKFTGLMENMKVLYDDNHV	60
b_1	MYKRLFISHVILIFALILVISTPNVLA	ESQDPKPKDELHKSSKFTGLMENMKVLYDDNHV	60
b_2	MYKRLFISHVILIFVLLVISTPNVLA	ESQDPKPKDELHKASKFTVLMENMKVLYDDNHV	60
b_4	MYKRLFISHVILIFVLLVISTPNVLA	ESQDPKPKDELHKASKFTGLMENMKVLYDDNHV	60
	** .** .*: ***** .***** ***** *****:**** *****		
b_3	SAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGANYYYQC		120
b_1	SAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGANYYYQC		120
b_2	SAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGANYYYQC		120
b_4	SAINVKSIDQFLYFDLIYSIKDTKLGNYDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGANYYYQC		120
	*****		
b_3	YFSKKTNDINSHQTDKRKTCMYGGVTEHNGNQLDKYRSITVRVFEDGKNLLSFDVQTNKK		180
b_1	YFSKKTNDINSHQTDKRKTCMYGGVTEHNGNQLDKYRSITVRVFEDGKNLLSFDVQTNKK		180
b_2	YFSKKTNDINSHQTDKRKTCMYGGVTEHNGNQLDKYRSITVRVFEDGKNLLSFDVQTNKK		180
b_4	YFSKKTNDINSHQTDKRKTCMYGGVTEHNGNQLDKYRSITVRVFEDGKNLLSFDVQTNKK		180
	*****:*****		
b_3	KVTAQELDYLTRHYLVKNKKLYEFNNSPYETGYIKFIESENSFWYDMPAPGDKFDQSKY		240
b_1	KVTAQELDYLTRHYLVKNKKLYEFNNSPYETGYIKFIESENSFWYDMPAPGDKFDQSKY		240
b_2	KVTAQELDYLTRHYLVKNKKLYEFNNSPYETGYIKFIESENSFWYDMPAPGDKFDQSKY		240
b_4	KVTAQELDYLTRHYLVKNKKLYEFNNSPYETGYIKFIESENSFWYDMPAPGDKFDQSKY		240
	*****:*****		
b_3	LMMYNDNKLVDSDVKIEVYLTTKK	266	
b_1	LMMYNDNKMVDSDVKIEVYLTTKK	266	
b_2	LMMYNDNKLVDSDVKIEVYLTTKK	266	
b_4	LMMYNDNKLVDSDVKIEVYLTTKK	266	
	*****:*****		



d\_5 IIGENKSTGDQFLENTLLYKNFFTDLINFEDLLINFNSKEMAQHFKSKNVDVYAIRYSIN 120  
d\_3 IIGENKSTGDQFLENTLLYKFFTDLINFEDLLINFNSKEMAQHFKSKNVDVYAIRYSIN 120  
d\_1 IIGENKSTGDQFLENTLLYKFFTDLINFEDLLINFNSKEMAQHFKSKNVDVYAIRYSIN 120  
d\_2 IIGENKSTGDQFLENTLLYKFFTDLINFEDLLINFNSKEMAQHFKSKNVDVYAIRYSIN 120  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*  
d\_5 CYGGEIDKTACTYGGVTPHEGNKLERKKIPINLWINGVQKEVSLDKVQTDKKNVTVQEL 180  
d\_3 CYGGEIDKTACTYGGVTPHEGNKLERKKIPINLWINGVQKEVSLDKVQTDKKNVTVQEL 180  
d\_1 CYGGEIDKTACTYGGVTPHEGNKLERKKIPINLWINGVQKEVSLDKVQTDKKNVTVQEL 180  
d\_2 CYGGEIDRTACTYGGVTPHEGNKLERKKIPINLWINGVQKEVSLDKVQTDKKNVTVQEL 180  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*  
d\_5 DAQARRYLQKDLKLYNNDTLGGKIQRGKIEFDSSDGSKVSYDLFDVKGDFPEKQLRIYSD 240  
d\_3 DAQARRYLQKDLKLYNNDTLGGKIQRGKIEFDSSDESQVSYDLFDVKGDFPEKQLRIYSD 240  
d\_1 DAQARRYLQKDLKLYNNDTLGGKIQRGKIEFDSSDGSKVSYDLFDVKGDFPEKQLRIYSD 240  
d\_2 DAQARRYLQKDLKLYNNDTLGGKIQRGKIEFDSSDGSKVSYDLFDVKGDFPEKQLRIYSD 240  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
d\_5 NKTLSTEHLHIDIYLYEK 258  
d\_3 NKTLSTEHLHIDIYLYEK 258  
d\_1 NKTLSTEHLHIDIYLYEK 258  
d\_2 NKTLSTEHLHIDIYLYEK 258  
\*\*\*\*\*

**SEE**

e\_1 MKKTAFI LLLFIALTLTTSPLVNGSEKSEEINEKDLRKKSELQRNALS NLRQIYYNEKA 60  
e\_2 MKKTAFI LLLFIALTLTTSPLVNGSEKSEEINEKDLRKKSELQGIALS NLRQIYYNEKA 60  
e\_3 MKKTAFI LLLFIALTLTTSPLVNGSEKSEEINEKDLRKKSELQGTALS NLRQIYYNEKA 60  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
e\_1 ITENKESDDQFLENTLLFKGFFTGHWPYNDLLVDLGSKDATNKYKGGKVDLYGAYGYQC 120  
e\_2 ITENKESDDQFLENTLLFKDFFTGHWPYNDLLVDLGSKDATNKYKGGKVDLYGAYGYQC 120  
e\_3 ITENKESDDQFLENTLLFKDFFTGHWPYNDLLVDLGSKDATNKYKGGKVDLYGAYGYQC 120  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*  
e\_1 AGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEEKVPI NLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTQVELD 180  
e\_2 AGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEEKVPI NLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTQVELD 180  
e\_3 AGGTPNKTACMYGGVTLHDNNRLTEEKVPI NLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTQVELD 180  
\*\*\*\*\*  
e\_1 LQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQRGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQQQYPTLLRIYRDN 240  
e\_2 LQARHYLHEKFGLYNSDSFGGKVQRGLIVFHPSEGSTVSYDLFDAQQQYPTLLRIYRDN 240  
e\_3 LQARHYLHEKFGLYNSDSFGGKVQRGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQQQYPTLLRIYRDN 240  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
e\_1 KTINSENLHIDL YLYTT 257  
e\_2 KTINSENLHIDL YLYTT 257  
e\_3 KTINSENLHIDL YLYTT 257  
\*\*\*\*\*

**SEG**

g\_5 MRL-----F---YIA-----AIIITLLCLIXGNVMNLYTSPPVE 31  
g\_14 MKKLSTVIIILILEIVLNIKYANA QDPKLDL NKVSDYKINKGTMGNVMNLYMSPPVE 60  
g\_3 MKKLSTVIIILILEIVFHNMYVNA QDPKLDL NKVSDYKNNKGTMGVMNLYTSPPVE 60  
g\_7 MKKLSTVIIILILEIVFHNMYVNA QDPKLDL NKVSDYKNNKGTMGVMNLYTSPPVE 60  
g\_1 MKKLSTVIIILILEIVFHNINYANA LPDPKIDELNKVSDYKSNKGTMGVMNLYMSPPVE 60  
g\_2 MKKLSTVIIILILEIVFHNINYANA QDPKIDELNKVSDYKSNKGTMGVMNLYMSPPVE 60  
g\_4 MKKLSTVIIILILEIVFHNINYANS QDPKIDELNKVSDYKSNKGTMGVMNLYMSPPVE 60  
\* : . \* . . \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
g\_5 GRGVINSRQFLSHDLIFPIEYKSYNEVKTELENTLANNYKDKKVDIFGVPFYFTCIIPK 91  
g\_14 GRGVINSRQFLSHDLIFPIEYKSYNEVKTELKNTLANNYKDKKVDIFGVPFYFTCIIPK 120  
g\_3 GRGVINSRQFLSHDLIFPIEYKSYNEVKTELENTLANNYKDKKVDIFGVPFYFTCIIPK 120  
g\_7 GRGVINSRQFLSHDLIFPIEYKSYNEVKTELENTLANNYKDKKVDIFGVPFYFTCIIPK 120  
g\_1 GRGVINSRQFLSHDLIFPIEYKSYNEVKTELENTLANNYKDKKVDIFGVPFYFTCIIPK 120  
g\_2 GRGVINSRQFLSHDLIFPIEYKSYNEVKTELENTLANNYKDKKVDIFGVPFYFTCIIPK 120  
g\_4 GRGVINSRQFLSHDLIFPIEYKSYNEVKTELENTLANNYKDKKVDIFGVPFYFTCIIPK 120  
\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

g_5	SEPDINQNFGGCCMYGGLTFN-----VQVTIDNRQSLGFTITTNKNMVTIQELD	140
g_14	HEPDINQNFGGCCMYGGLTLNSSENERDKLITVQVTIDNRQSLGFTITTNKNMVTIQELD	180
g_3	SEPDINQNFGGCCMYGGLTFNSSENERDKLITVQVTIDNRQSLGFTITTNKNMVTIQELD	180
g_7	SEPDINQNFGDCCMYGGLTFNSSENERDKLITVQVTIDNRQSLGFTITTNKNMVTIQELD	180
g_1	SEPDINQNFGGCCMYGGLTFNSSENERDKLITVQVTIDNRQSLGFTITTNKNMVTIQELD	180
g_2	SEPDINQNFGGCCMYGGLTFNSSENERDKLITVQVTIDNRQSLGFTITTNKNMVTIQELD	180
g_4	SEPDINQNFGGCCMYGGLTFNSSENERDKLITVQVTIDNRQSLGFTITTNKNMVTIQELD	180

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\* \*\*\*\*\*

g_5	YKARHWLTKEKKLYEFDGSASFESGYIKFTEKNNTSFWFDFPKKELVPFVYPYKFLNIYGD	200
g_14	YKARHWLTKEKKLYEFDGSASFESGYIKFTEKNKASIWFDLFPKELVPFVYPYKFLNIYGD	240
g_3	YKARHWLTKEKKLYEFDGSASFESGYIKFTEKNNTSFWFDFPKKELVPFVYPYKFLNIYGD	240
g_7	YKARHWLTKEKKLYEFDGSASFESGYIKFTEKNNTSFWFDFPKKELVPFVYPYKFLNIYGD	240
g_1	YKARHWLTKEKKLYEFDGSASFESGYIKFTEKNNTSFWFDFPKKELVPFVYPYKFLNIYGD	240
g_2	YKARHWLTKEKKLYEFDGSASFESGYIKFTEKNNTSFWFDFPKKELVPFVYPYKFLNIYGD	240
g_4	YKARHWLTKEKKLYEFDGSASFESGYIKFTEKNNTSFWFDFPKKELVPFVYPYKFLNIYGD	240

\*\*\*\*\*:.\*:\*\*\*\*\*

g_5	NKVVDSKSIKXL--NTH	215
g_14	NKVVDSKSIKMEVFLNTH	258
g_3	NKVVDSKSIKMEVFLNTH	258
g_7	NKVVDSKSIKMEVFLNTH	258
g_1	NKVVDSKSIKMEVFLNTH	258
g_2	NKVVDSKSIKMEVFLNTH	258
g_4	NKVVDSKSIKMEVFLNTH	258

\*\*\*\*\* \*\*

## SEH

h_1	MINKIKILFSFLALLLSFTSYAKAEDLHDKSELTDLALANAYQYNHPFIKENIKSDEIS	60
h_4	MINKIKILFSFLALLLSFTSYAKAEDLHDKSELTDLALANAYQYNHPFIKENIKSDEIS	60
h_2	MINKIKILFSFLALLLSFTSYAKAEDLHDKSELTDLALANAYQYNHPFIKENIKSDEIS	60
h_3	MINKIKILFSFLALLLSFTSYAKAEDLHDKSELTDLALANAYQYNHPFIKENIKSDEIS	60

\*\*\*\*\*

h_1	GEKDLIFRNQGDGNDLRVKFATADLAQKFKNKSVDIYGASFYKCEKISENISECLYGG	120
h_4	GEKDLIFRNQGDGNDLRVKFATADLAQKFKNKSVDIYGASFYKCEKISENISECLYGG	120
h_2	GEKDLIFRNQGDGNDLRVKFATADLAQKFKNKSVDIYGASFYKCEKISENISECLYGG	120
h_3	GEKDLIFRNQGDGNDLRVKFATADLAQKFKNKSVDIYGASFYKCEKISENISECLYGG	120

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

h_1	TTLNSEKLAQERVIGANVWVDGIQKETELIRTNKKNVTLQELDIKIRKILSDKYKIYYKD	180
h_4	TTLNSEKLAQERVIGANVWVDGIQKETELIRTNKKNVTLQELDIKIRKILSDKYKIYYKD	180
h_2	TTLNSEKLAQERVIGANVWVDGIQKETELIRTNKKNVTLQELDIKIRKILSDKYKIYYKD	180
h_3	TTLNSEKLAQERAIGANVWVDGIQKETELIRTNKKNVTLQELDIKIRKILSDKYKIYYKD	180

\* \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

h_1	SEISKGLIEFDMKTPRDYSFDIYDLKGENDYEIDKIYEDNKTLKSDDISHIDVNLTYTKKS	240
h_4	SEISKGLIEFDMKTPRDYSFDIYDLKGENDYEIDKIYEDNKTLKSDDISHIDVNLTYTKK	240
h_2	SEISKGLIEFDMKTPRDYSFDIYDLKGENDYEIDKIYEDNKTLKSDDISHIDVNLTYTKK	240
h_3	SEISKGLIEFDMKTPRDYSFDIYDLKGENDYEIDKIYEDNKTLKSDDISHIDVNLTYTKK	240

\*\*\*\*\*.

h_1	IINENF	246
h_4	V-----	241
h_2	V-----	241
h_3	V-----	241

:

## SEI

i_2	MKKFKYSFIVVFILFFNVNDFSQAQGDI GVG NLRNFYTKHDYIDLKGLIDKNLPSANQLE	60
i_12	MKKFKYSFIVVFILFFNVNDFSQAQGDI GVG NLRNFYTKHDYIDLKGLIDKNLPSANQLE	60
i_6	MKKFKYSFILVFILLFNKDLTYA QGDI GVG NLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE	60
i_15	MKKFKYSFILVFILLFNKDLTYA QGDI GVG NLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE	60
i_3	MKKFKYSFILVFILLFNKDLTYA QGDI GVG NLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE	60
i_4	MKKFKYSFILVFILLFNKDLTYA QGDI GVG NLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLE	60
i_8	MKKFKYSFIVVFILFFNVYDLSYA QGDI GVG NLRNFYTKYDYIDLKGVTDKNLPTANQLE	60
i_11	MKKFKYSFIVVFILFFNVYDLSYA QGDI GVG NLRNFYTKYDYIDLKGVTDKNLPTANQLE	60
i_13	MKKFKYSFIVVFILFFNVNDFSQAQGDI GVG NLRNFYTKYDYIDLKGVTDKNLPIANQLE	60
i_17	MKKFKYSFIVVFILFFVDDLSYA QGDI GVG NLRNFYTKYDYIDLKGVTDKNLPIANQLE	60

i\_1 MKKIKYSFILVFILFFNIKDLSYA QGDIGVGNLRNFYTKYDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60  
i\_5 MKKIKYSFILVFILFFNIKDLSYA QGDIGVGNLRNFYTKYDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60  
i\_10 MKKIKYSFILFFILFFNIKDLSYA QGDIGVGNLRNFYTKYDYIDLKGVTDKNLPIANQLE 60  
\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

i\_2 FSTGINDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_12 FSTGINDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_6 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_15 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_3 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_4 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_8 FSTGPNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_11 FSTGPNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGAALSGQYLSARKIP 120  
i\_13 FSTATNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_17 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_1 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGVTLGQYLSARKIP 120  
i\_5 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKMDIFGIDYNGPCKTKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
i\_10 FSTGTNDLISESNNWDEISKFKGKKMDIFGIDYNGPCKTKYMYGGATLSGQYLSARKIP 120  
\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

i\_2 INLWVNGKHKHTISTDKISTNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_12 INLWVNGKHKHTISTDKISTNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_6 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 165  
i\_15 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_3 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_4 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_8 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_11 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_13 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_17 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_1 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNSTGKGKEYGYKSK 180  
i\_5 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNNNGKGKEYGYKSK 180  
i\_10 INLWVNGKHKHTISTDKIATNKKLVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNNNGKGKEYGYKSK 180  
\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

i\_2 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_12 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_6 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 198  
i\_15 FYSGFNNGKVLFHLNNEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_3 FYSGFNNGKVLFHLNNEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_4 FYSGFNNGKVLFHLNNEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_8 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_11 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_13 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_17 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_1 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_5 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
i\_10 FYSGFNKGKVLFHLNDEKSFSDYDLFYTGDPVPSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVD 240  
\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

i\_2 SNK 243  
i\_12 SNK 243  
i\_6 SN- 200  
i\_15 SN- 242  
i\_3 SN- 242  
i\_4 SN- 242  
i\_8 SN- 242  
i\_11 SN- 242  
i\_13 SN- 242  
i\_17 SN- 242  
i\_1 SN- 242  
i\_5 SN- 242  
i\_10 SN- 242  
\*\*

**SEJ**

sej\_4 MKKTIFFILIFSLTLTLLITPLVYSDSKNETIKEKNLHKKSELSSITLNNLRHIYFFNEKG 60  
sej\_2 MKKRIFILIFSLTLTLLITPLVYSDSKNETIKEKNLHKKSELSSITLNNLRHIYFFNEKG 60  
sej\_1 MKKTIFFILIFSLTLTLLITPLVYSDSKNETIKEKNLHKKSELSSITLNNLRHIYFFNEKG 60  
sej\_3 MKKTIFFILIFSLTLTLLITPLVYSDSKNETIKEKNLHKKSELSSITLNNLRHIYFFNEKG 60

\*\*\* \*\*\*\*\*

sej\_4 ISEKIMTEDQFLDYTLFFKSFFISHSQYNLLVQFDSKETVNFKFKGQVDLYGSYYGFQC 120
sej\_2 ISEKIMTEDQFLDYTLFFKSFFISHSQYNLLVQFDSKETVNFKFKGQVDLYGSYYGFQC 120
sej\_1 ISEKIMTEDQFLDYTLFFKSFFISHSQYNLLVQFDSKETVNFKFKGQVDLYGSYYGFQC 120
sej\_3 ISEKIMTEDQFLDYTLFFKSFFISHSQYNLLVQFDSKETVNFKFKGQVDLYGSYYGFQC 120
\*\*\*\*\*

sej\_4 SGGKSNKTACMYGGVTLHENNQLYDTKKIPINLWIDSIRTVVPLDIVKTNKKKVTIQEELD 180
sej\_2 SGGKSNKTACMYGGVTLHENNQLYDTKKIPINLWIDSIRTVVPLDIVKTNKKKVTIQEELD 180
sej\_1 SGGKSNKTACMYGGVTLHENNQLYDTKKIPINLWIDSIRTVVPLDIVKTNKKKVTIQEELD 180
sej\_3 SGGKSNKTACMYGGVTLHENNQLYDTKKIPINLWIDSIRTVVPLDIVKTNKKKVTIQEELD 180
\*\*\*\*\*

sej\_4 LQARYYLHKQYNLYNPSTFDGKIQKGLIVFHTSKEPLVSYDLFNVIGQYDPDKLLKIYQDN 240
sej\_2 LQARYYLHKQYNLYNPSTFDGKIQKGLIVFHTSKEPLVSYDLFNVIGQYDPDKLLKIYQDN 240
sej\_1 LQARYYLHKQYNLYNPSTFDGKIQKGLIVFHTSKEPLVSYDLFNVIGQYDPDKLLKIYQDN 240
sej\_3 LQARYYLHKQYNLYNPSTFDGKIQKGLIVFHTSKEPLVSYDLFNVIGQYDPDKLLKIYQDN 240
\*\*\*\*\*

sej\_4 KII ESENMHIDIYLYTSLIVLISLPLVL 268
sej\_2 KII ESENMHIDIYLYTSLIVLISLPLVL 268
sej\_1 KII ESENMHIDIYLYTSLIVLISLPLVL 268
sej\_3 KII ESENMHIDIYLYTSLIVLISLPLVL 268
\*\*\*\*\*

SEK

k\_2 MKKLISILLINI IILGVSNNASAQGDIGIDNLRNFYTKKDFINLKDVKDNDTPIANQLQF 60
k\_9 MKKLISILLINI IILGVSNNASAQGDIGIDNLRNFYTKKDFINLKDVKDNDTPIANQLQF 60
k\_7 MKKLIVIIILINIITLSVNSASASAQGDIGIDNLRNFYTKKDFVLDKDVKDNDTPIANQLQF 60
k\_4 MKKLISILLINI IILGVSNSASAQGDIGIDNLRNFYTKKDFIDLKDVKDNDTPIANQLQF 60
k\_1 MKKLISILLINI IILGVSNSASAQGDIGIDNLRNFYTKKDFVLDKDVKDNDTPIANQLQF 60
k\_3 MKKLISILLINI IILGVSNSASAQGDIGIDNLRNFYTKKDFVLDKDVKDNDTPIANQLQF 60
k\_5 MKKLISILLINI IILGVSNNASAQGDIGIDNLRNFYTKKDFVLDKDVKDNDTPIANQLQF 60
k\_8 MKKLISILLINI IILGVSNNASAQGDIGIDNLRNFYTKKDFVLDKDVKDNDTPIANQLQF 60
\*\*\*\*\* \*.:\*\*\*\*\* \*.\*\*\*.\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*

k\_2 SNESYDLISESKDFNKFNFKGGKLDVFGISYNGQCNTKYIYGGITATNEYLDKPRNIPI 120
k\_9 SNESYDLISESKDFNKFNFKGGKLDVFGISYNGQCNTKYIYGGITATNEYLDKPRNIPI 120
k\_7 SNESYDLISESKDFNKLNFKGGKLDVFGISYNGQCNTKYIYGGVTATNEYLDKPRNIPI 120
k\_4 SNESYDLISESKDFNKFNFKGGKLDVFGISYNGQCNTKYIYGGVTATNEYLDKSRNIPI 120
k\_1 SNESYDLISESKDFNKFNFKGGKLDVFGISYNGQCNTKYIYGGVTATNEYLDKSRNIPI 120
k\_3 SNESYDLISESKDFNKFNFKGGKLDVFGISYNGQCNTKYIYGGVTATNEYLDKSRNIPI 120
k\_5 SNESYDLISESKDFNKFNFKGGKLDVFGISYNGQCNTKYIYGGVTATNEYLDKSRNIPI 120
k\_8 SNESYDLISESKDFNKFNFKGGKLDVFGISYNGQCNTKYIYGGVTATNEYLDKSRNIPI 120
\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*

k\_2 NIWINGNHKTISTNKVSTNKKFVTAQEIDIKLRRYLQEEYNIYGHNGTKKGEEYGHKSKF 180
k\_9 NIWINGNHKTISTNKVSTNKKFVTAQEIDIKLRRYLQEEYNIYGHNGTKKGEEYGHKSKF 180
k\_7 NIWINGNHKTISTNKVSTNKKFVTAQEIDVCLRKYLQEEYNIYGHNGTKKGEEYGHKSKF 180
k\_4 NIWINGNHKTISTNKVSTNKKFVTAQEIDVCLRKYLQEEYNIYGHNGTKKGEEYGHKSKF 180
k\_1 NIWINGNHKTISTNKVSTNKKFVTAQEIDVCLRKYLQEEYNIYGHNGTKKGEEYGHKSKF 180
k\_3 NIWINGNHKTISTNKVSTNKKFVAAQEIDVCLRKYLQEEYNIYGHNGTKKGEEYGHKSKF 180
k\_5 NIWINGNHKTISTNKVSTNKKLVTAQEIDVCLRKYLQEEYNIYGHNGTKKGEEYGHKSKF 180
k\_8 NIWINGNHKTISTNKVSTNKKLVTAQEIDVCLRKYLQEEYNIYGHNGTKKGEEYGHKSKF 180
\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*.:\*\*\*\*\*

k\_2 YSGFNIGKVTFHLNNDTFSYDLFYTGDDGLPKSFLKIYEDNKTVESEKFHLDVDISYKE 240
k\_9 YSGFNIGKVTFHSNNNDTFSYDLFYTGDDGLPKSFLKIYEDNKTVESEKFHLDVDISYKE 240
k\_7 YSGFNIGKVTFHLNNDTFSYDLFYTGDDGLPKSFLKIYEDNKTVESEKFHLDVDISYKE 240
k\_4 YSGFNIGKVTFHLNNDTFSYDLFYTGDDGLPKSFLKIYEDNKTVESEKFHLDVDISYKE 240
k\_1 YSGFNIGKVTFHLNNDTFSYDLFYTGDDGLPKSFLKIYEDNKTVESEKFHLDVDISYKE 240
k\_3 YSGFNIGKVTFHLNNDTFSYDLFYTGDDGLPKSFLKIYEDNKTVESEKFHLDVDISYKE 240
k\_5 YSGFNIGKVTFHLNNDTFSYDLFYTGDDGLPKSFLKIYEDNKTVESEKFHLDVDISYKE 240
k\_8 YSGFNIGKVTFHLNNDTFSYGLFYTGDDGLPKSFLKIYEDNKTVESEKFHLDVDISYKE 240
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

k\_2 TK 242
k\_9 TK 242
k\_7 TI 242

k\_4 TI 242  
k\_1 TI 242  
k\_3 TI 242  
k\_5 TI 242  
k\_8 TI 242  
\*

**SEL**

l\_13 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGPGLNRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_12 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGPGLNRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_9 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGPGLNRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_8 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGPGLNRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_7 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGPGLNRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_6 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGPGLNRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_4 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGPGLNRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_1 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGPGLNRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_2 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGPGLNRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_5 MKKRLLFVIVITLFI FSSNHTVLSNGDVGTGNLRFYTKYEYVNLKNIKDKNSPESHRL 60  
l\_10 -----MNLKNIKDKNSPESHRL 18  
:\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

l\_13 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_12 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_9 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_8 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_7 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_6 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_4 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_1 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_2 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_5 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 120  
l\_10 YSYKNDTLAFAFDNEYITSDLKGNVDVFGISYKYGSNSRTIYGGVTKAENNKLDSPRII 78  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

l\_13 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_12 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_9 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_8 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_7 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_6 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_4 PINLIINGKHQTVTTKCVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_1 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_2 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_5 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 180  
l\_10 PINLIINGKHQTVTTKSVSTDKKMVTAEIDVKLRKYLQDEFNIYGHNDTGKGKEYGTSS 138  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

l\_13 KFYSGFDKGSVVFHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVDSTQFHL DVEISK 240  
l\_12 KFYSGFDKGSVVFHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVDSTQFHL DVEISK 240  
l\_9 KFYSGFDKGSVVFHINDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVDSTQFHL DVEISK 240  
l\_8 KFYSGFDKGSVVFHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVDSTQFHL DVEISK 240  
l\_7 KFYSGFDKGSVVLHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVDSTQFHL DVEISK 240  
l\_6 KFYSGFDKGSVVFHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVDSTQFHL DVEISK 240  
l\_4 KFYSGFDKGSVVFHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVDSTQFHL DVEISK 240  
l\_1 KFYSGFDKGSVVFHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVDSTQFHL DVEISK 240  
l\_2 KFYSGFDKGSVVFHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVDSTQFHL DVEISK 240  
l\_5 KFYSGFDKGSVVFHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVGSTQFHL DVEISK 240  
l\_10 KFYSGFDKGSVVFHMNDGSNFSYDLFYTGYPESFLKIYKDNKTVGSTQFHL DVEISK 198  
\*\*\*\*\*:\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

**SEM**

m\_3 MKRILIIVLLFCYSQNHAIATADVGLNLRNYYGSYPIEDHQ SINPENHL SHQLVFSMD 60  
m\_8 MKRILIIVLLFCYSQNHAIATADVGLNLRNYYGSYPIEDHQ SINPENHL SHQLVFSMD 60  
m\_15 MKRILIIVLLFCYSQNHAIATADVGLNLRNYYGSYPIEDHQ SINPENHL SHQLVFSMD 60  
m\_4 MKRILIIVLLFCYSQNHAIATADVGLNLRNYYGSYPIEDHQ SINPENHL SHQLVFSMD 60  
m\_6 MKRILIIVLLFCYSQNHAIATADVGLNLRNYYGSYPIEDHQ SINPENHL SHQLVFSMD 60  
m\_1 MKRILIIVLLFCYSQNHAIATADVGLNLRNYYGSYPIESHQINPDNNLSHQLVFSMD 60  
m\_5 MKRILIIVLLFCYSQNHAIATADVGLNLRNYYGSYPIEDHQINPDNNRLSHQLVFSMD 60  
m\_2 MKRILIIVLLFCYSQNHAIATADVGLNLRNYYGSYPIEDHQINPDNNRLSHQLVFSMD 60







\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*.\*\*\*\*\*

q\_3 YIDGKYTLYSQFHNEYEAKRLKDHKVDIFGISYSGLCNTKMYGGITLANQNLDPKRNIP 120
q\_5 YIDGKYTLYSQFHNEYEAKRLKDHKVDIFGISYSGLCNTKMYGGITLANQNLDPKRNIP 120
q\_2 YIDGKYTLYSQFHNEYEAKRLKDHKVDIFGISYSGLCNTKMYGGITLANQNLDPKRNIP 120
q\_1 YIDGKYTLYSQFHNEYEAKRLKDHKVDIFGISYSGLCNTKMYGGITLANQNLDPKRNIP 120
q\_4 YIDGKYTLYSQFHNEYEAKRLKDHKVDIFGISYSGLCNTKMYGGITLANQNLDPKRNIP 120
\*\*\*\*\*

q\_3 INLWVNGKQNTISTDKVSTQKKEVTAQEIDIKLRKYLQNEYNIYGFNKTKKGQYGYQSK 180
q\_5 INLWVNGKQNTISTDEVSTQKKEVTAQEIDIKLRKYLQNEYNIYGFNKTKKGQYGYQSK 180
q\_2 INLWVNGKQNTISTDKVSTQKKEVTAQEIDIKLRKYLQNEYNIYGFNKTKKGQYGYQSK 180
q\_1 INLWVNGKQNTISTDKVSTQKKEVTAQEIDIKLRKYLQNEYNIYGFNKTKKGQYGYQSK 180
q\_4 INLWVNGKQNTISTDKVSTQKKEVTAQEIDIKLRKYLQNEYNIYGFNKTKKGQYGYQSK 180
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*.\*\*\*\*\*

q\_3 FNSGFNKGKITFHLNNEPSFTYDLFYTGTAESFLKIYEDNKTVESEKFLDVEDISYE 240
q\_5 FNSGFNKGKITFHLNNETSFTYDLFYTGTAESFLKIYDNKTIDAENFHLDEISYEK 240
q\_2 FNSGFNKGKITFHLNNEPSFTYDLFYTGTAESFLKIYDNKTIDAENFHLDEISYEK 240
q\_1 FNSGFNKGKITFHLNNEPSFTYDLFYTGTAESFLKIYDNKTIDTENFHLDEISYEK 240
q\_4 FNSGFNKGKITFHLNNEPSFTYDLFYTGTAESFLKIYDNKTIDAENFHLDEISYEK 240
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*:\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*

q\_3 TI 242
q\_5 TE 242
q\_2 TE 242
q\_1 TE 242
q\_4 TE 242
\*

SER

r\_2 MLNKIILLLLSVTFMLLFFSLHVSVAKPDPRPGELNRVSDYKKNKGTMGNVESLYKDKAV 60
r\_5 MLNKIILLLLSVTFMLLFFSLHVSVAKPDPRPGELNRVSDYKKNKGTMGNVESLYKDKAV 60
r\_1 MLNKIILLLLSVTFMLLFFSLHVSVAKPDPRPGELNRVSDYKKNKGTMGNVESLYKDKAV 60
r\_4 MLNKIILLLLSVTFMLLFFSLHVSVAKPDPRPGELNRVSDYKKNKGTMGNVESLYKDKAV 60
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

r\_2 IAENVKNTRQFLGHDLIFPIPYSEYKEVKSEFINKKTADKFKDKRLDVFPIPYFYTCCLVP 120
r\_5 IAENVKNTRQFLGHDLIFPIPYSEYKEVKSEFINKKTADKFKDKRLDVFPIPYFYTCCLVP 120
r\_1 IAENVKNTRQFLGHDLIFPIPYSEYKEVKSEFINKKTADKFKDKRLDVFPIPYFYTCCLVP 120
r\_4 IAENVKNTRQFLGHDLIFPIYSEYKEVKSEFINKKTADKFKDKRLDVFPIPYFYTCCLVP 120
\*\*\*\*\*

r\_2 KNESREEFIFDGVCYIGGVTMHSTADSIKNIIVPVTVDNKQQFSFTISTNKKTVTVQEL 180
r\_5 KNESREEFIFDGVCYIGGVTMHSTADSIKNIIVPVTVDNKQQFSFTISTNKKTVTVQEL 180
r\_1 KNESREEFIFDGVCYIGGVTMHSTADSIKNIIVPVTVDNKQQFSFTISTNKKTVTVQEL 180
r\_4 KNESREEFIFDGVCYIGGVTMHSTADSIKNIIVPVTVDNKQQFSFTISTNKKTVTVQEL 180
\*\*\*\*\*

r\_2 DYKVRNWLTTNNKKLYEFDGSAYETGYIKFIEENKDSFWYDLFPKDLVPFIPYKFNVIY 240
r\_5 DYKVRNWLTTNNKKLYEFDGSSYETGYIKFIEENKDSFWYDLFPKDLVPFIPYKFNVIY 240
r\_1 DYKVRNWLTTNNKKLYEFDGSAYETGYIKFIEENKDSFWYDLFPKDLVPFIPYKFNVIY 240
r\_4 DYKVRNWLTTNNKKLYEFDGSAYETGYIKFIEENKDSFWYDLFPKDLVPFIPYKFNVIY 240
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

r\_2 DNKTIDASSVKIEVHLTTM 259
r\_5 DNKTIDASSVKIEVHLTTT 259
r\_1 DNKTIDASSVKIEVHLTTT 259
r\_4 DNKTIDASSVKIEVHLTTT 259
\*\*\*\*\*

SES

s\_3 MNYSKITVSLIIILLCTFSFEFSFNRFVQADESRPKIESLKKKSELDSTALYNIKTSYSQ 60
s\_1 MNYSKITVTLIIILLCTFSFEFSFNRFVQADESRPKIESLKKKSELDSTALYNIKTSYSQ 60
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*
s\_3 DNIILDIKNKTNSTQLLSNDLIFDDITLKEWNKNSLKTENFNSSEIANHFKGKVDIFGIY 120
s\_1 DNIILDIKNKTNSTQLLSNDLIFDDITLKEWNKNSLKTENFNSSEIANHFKGKVDIFGIY 120
\*\*\*\*\*

```

s_3      YGANCIGEVSKRTGCIYGGITLHEEEKIDQKNSIGVNVFKDGSQQKGFMITTDKKEPTIQ      180
s_1      YGANCIGEVSKRTGCIYGGITLHEEEKIDQKNSIGVNVFKDGSQQKGFMITTDKKEPTIQ      180
          *****

s_3      ELDLTKRKYIQNQYKIYNSETGNIQKGYMEFHSNSSSFYDLFNFKGKYSVDLFLKFYNDN      240
s_1      ELDLTKRKYIQNQYKIYNSETGNIQKGYMEFHSNSSSFYDLFNFKGKYSVDLFLKFYNDN      240
          *****

s_3      KTINSSNLHIDVYLYSQ      257
s_1      KTINSSNLHIDVYLYSQ      257
          *****

```

## SET

>\_1

```

MKKCILFIFSIILLVSISTLFLIPNAKSDSREGLKDFYSKKIDVYTNKKINEKDKYSVDIEVDNYVYRINTLDDKILNQFKVGD
YVDAWGHIINNPKIGKVIKFDYDGDISKHSPLDKPTNISYRINLFKEQKQTEVTPPEKELEIGNRYLTMKQIDYRIKSYLVKKQQ
LYTEFYNGKIEISMLDGGKHFIDLSTYYYDPSNFTLDYTKISHFDIYMEK

```

## SEU

```

u_11    MKLFAFLFICVKSCSLLFMLNDNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKAQE      60
u_18    MKLFAFLFICVKSCSLLFMLNDNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKAQE      60
u_6     MKLFAFIFICVKSCSLLFMLNGNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKSQE      60
u_4     MKLFAFIFICVKSCSLLFMLNGNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKSQE      60
u_5     MKLFAFIFICVKSCSLLFMLNGNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKSQE      60
u_1     MKLFAFIFICVKSCSLLFMLNGNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSEINIKAE      60
u_7     MKLFAFIFICVKSCSLLFMLNGNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKVQE      60
u_17    MKLFAFIFICVKSCSLLFMLNGNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKAQE      60
u_9     MKLFAFIFICVKSCSLLFMLNGNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKAQE      60
u_2     MKLFAFIFICVKSCSLLFMLNGNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKAQE      60
u_10    MKLFAFIFICVKSCSLLFMLNGNPKPEQLNKASEFTGLMDNMRYLYDDKHVSETNIKAQE      60
          *****:*****.**:*****:***** ** *

u_11    KFLQHDLLFKINR-----SKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCYFSSDNMEL      115
u_18    KFLQHDLLFKING-----SKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCYFSADNMEL      115
u_6     KFLQHDLLFEING-----SKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCYFSSDNMEL      115
u_4     KFLQHDLLFKING-----SKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCYFSLDNMEL      115
u_5     KFLQHDLLFKING-----SKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCYFSSDNMEL      115
u_1     KFLQHDLLFKINGSKIDGSKILKTEFNNKSLSDKYKNKNIDLFGTNYYNQCYFSADNMEL      120
u_7     KFLQHDLLFKINGSKIDGSKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCYFSADNMEL      120
u_17    KFLQHDLLFKINGSKIDGSKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCYFSADNMEL      120
u_9     KFLQHDLLFKINGSKIDGSKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCYFSADNMEL      120
u_2     KFLQHDLLFKINGSKIDGSKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCNFSADNMEL      120
u_10    KFLQHDLLFKINGSKIDGSKILKTEFNNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYYNQCYFSADNMEL      120
          *****:*          *****:*****:***** ** *

u_11    NDGILIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNSTDNSHNILIKVYENERNSLSFDIPTNKKNITA      175
u_18    NDGILIGKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNSTDNSHNILIKVYENERNSLSFDIPTNKKNITA      175
u_6     NDGRLIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNSTDNSHNILIKVYENERNSLSFDIPTNKKNITA      175
u_4     NDGRLIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNSTDNSHNILIKVYENERNSLSFDIPTNKKNITA      175
u_5     NDGRLIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNSTDNSHNILIKVYENERNSLSFDIPTNKKNITA      175
u_1     NDGRLIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNSTDNSHNILIKVFENERNSLSFDIPTNKKNITA      180
u_7     NDGRLIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNLTDNSHNILIKVYENERNTLSFDISTNMKNITA      180
u_17    NDGRLIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNLTDNSHNILIKVYENERNTLSFDISTNMKNITA      180
u_9     NDGRLIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNLTDNSHNILIKVYENERNTLSFDISTNKKNITA      180
u_2     NDGRLIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNLTDNSHNILIKVYENERNTLSFDISTNKKNITA      180
u_10    NDGRLIEKTCMYGGVTEHDGNQIDKNNLTDNSHNILIKVYENERNTLSFDISTNKKNITA      180
          *** ** *****:*****:***** ** *

u_11    QEIDYKVRNYLLKHKDLYEFNSSPYETGYIKFIEGNNGTFWYDMPESGEKIFYPTKYLLI      235
u_18    QEIDYKVRNYLLKHKDLYEFNSSPYETGYIKFIEGNNGTFWYDMPESGEKIFYPTKYLLI      235
u_6     QEIDYKVRNYLLKHKNLHYEFNSSPYETGYIKFIEGSGHSFWYDLMPESGKKIFYPTKYLLI      235
u_4     QEIDYKVRNYLLKHKNLHYEFNSSPYETGYIKFIEGSGHSFWYDLMPESGKKIFYPTKYLLI      235
u_5     QEIDYKVRNYLLKHKNLHYEFNSSPYETGYIKFIEGSGHSFWYDLMPESGKKIFYPTKYLLI      235
u_1     QEIDYKVRNYLLKHKNLHYEFNSSPYETGYIKFIEGNHGSFWYDMPESGEKIFYPTKYLLI      240
u_7     QEIDYKVRNYLLKHKNLHYEFNSSPYESGYIKFIEGNHGSFWYDMPESGEKIFYPTKYLLI      240
u_17    QEIDYKVRNYLLKHKNLHYEFNSSPYESGYIKFIEGNHGSFWYDMPESGEKIFYPTKYLLI      240
u_9     QEIDYKVRNYLLKHKNLHYEFNSSPYETGYIKFIEGNHGSFWYDMPESGEKIFYPTKYLLI      240

```

u\_2 QEIDYKVRNYLLKHKNLKFNSSPYETGYIKFIEGNHGSFWYDMMPESEKGFYPTKYLLI 240  
u\_10 QEIDYKVRNYLLKHKNLKFNSSPYETGYIKFIEGNHGSFWYDMMPESEKGFYPTKYLLI 240  
\*\*\*\*\*:\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:..:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*  
u\_11 YNDNKTVDSDQSVNVEVHLTKK 256  
u\_18 YNDNKTVDSDQSVNVEVHLTKK 256  
u\_6 YNDNKTVESK SINVEVHLTKK 256  
u\_4 YNDNKTVESK SINVEVHLTKK 256  
u\_5 YNDNKTVESK SINVEVHLTKK 256  
u\_1 YNDNKTVESK SINVEVHLTKK 261  
u\_7 YNDNKTVESK SINVEVHLTKK 261  
u\_17 YNDNKTVESK SINVEVHLTKK 261  
u\_9 YNDNKTVESK SINVEVHLTKK 261  
u\_2 YNDNKTVESK SINVEVHLTKK 261  
u\_10 YNDNKTVESK SINVEVHLTKK 261  
\*\*\*\*\*:\*:\*\*\*\*\*

**SEX**

x\_27 MFKKHHSKNSIVLKSILSLGIIYSGIFGINSKADASIQDSSSVHDKQLLKVEVPNNSEK 60  
x\_28 MFKKHHSKNSIVLKSILSLGIIYSGIFGINSKADASIQDSSSVHDKQLLKVEVPNNSEK 60  
x\_47 MFKKHHSKNSIVLKSILSLGIIYSGIFGINSKADASIQDSSSVHDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_10 MFKKHHSKNSILLKSILSLGIIYSGSFGIYSKANASTQNSSSVHDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_34 MFKKHHSKNSIVLKSILSLGIIYSGSFGIYSKANASTQNSSSVHDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_3 MFKKNSDKNSILLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSPSVQDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_16 MFKKNSDKNSILLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSPSVQDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_14 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_12 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_22 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_41 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_6 MFKKHHSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_36 MFKKNSDKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_4 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_7 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_17 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_15 MFKKHHSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQFQKVEVPNNSEK 60  
x\_45 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_5 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_9 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_25 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYSGSFGIYPKADASTQNSSSVQDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_1 MFKKYDSKNSILLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQLQKVEVPNNSEK 60  
x\_24 MFKKYDSKNSIVLKSILSLGIIYGGTFGIYPKADASTQNSSSVQDKQLQKVEVPNNSEK 60  
\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*.\* \*\*\* \*\*:\*. \*.\* \*\*:\*: \*\*:\*:\*\*\*\*\*  
x\_27 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_28 ALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_47 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_10 ALVKKLYDRYSKNTINGKSNKSRNWVYSERPLNGNQVRIHLEGTYRVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_34 ALVKKLYDRYSKNTINGKSNKSRNWVYSERPLNGNQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_3 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYRVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_16 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYRVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_14 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKARNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYRVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_12 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKARNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYRVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_22 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKARNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYRVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_41 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYRVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_6 ALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYRVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_36 ALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYRVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_4 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_7 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_17 ALVKKLYDRYSQNTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_15 ALVKKLYDRYSKNTINGKSNKSRNWVYSERPLNGNQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_45 ALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_5 ALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_9 ALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVADRVTTPKRNIITL 120  
x\_25 ALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_1 ALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
x\_24 ALVKKLYDRYSKDTINGKSNKSRNWVYSERPLNENQVRIHLEGTYTVAGRVTTPKRNIITL 120  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*.\* \*\*\*\*\*  
x\_27 NKEVVTLKELDHIIRFAHISYGLYMGEHLPGKNIVINTKNGGKYTLESHKELQKDRENVK 180



y\_5 SKVTNLSYRMNLFVNGHQTKVNPDSLLEVKNKQISLKETDFRIRKYLLEKEHLYSNYNSG 180  
y\_11 SKVTNLSYRMNLFVNGHQTKVNPDSLLEVKNKQISLKETDFRIRKYLLEKEHLYSNYNSG 180  
y\_2 SKVTNLSYRMNLFVNGHQTKVNPDSLLEVKNKQISLKETDFRIRKYLLEKEHLYSNYNSG 180  
y\_1 SKVTNLSYRMNLFVNGHQTKVNPDSLLEVKNKQISLKETDFRIRKYLLEKEHLYSNYNSG 180  
y\_7 SKVTNLSYRMNLFVNGHQTKVNPDSLLEVKNKQISLKETDFRIRKYLLEKEHLYSNYNSG 180  
y\_6 SKVTNLSYRMNLFVNGHQTKVNPDSLLEVKNKQISLKETDFRIRKYLLEKEHLYSNYNSG 180  
y\_3 SKVTNLSYRMNLFVNGHQTKVNPDSLLEVKNKQISLKETDFRIRKYLLEKEHLYSNYNSG 180  
y\_4 SKVTNLSYRMNLFVNGHQTKVNPDSLLEVKNKQISLKETDFRIRKYLLEKEHLYSNYNSG 180  
\*\*\*\*\*

y\_5 ELIEMKNGTRHKIDLGDILSDSQEKTDFDNISHIDIYMK 221  
y\_11 ELIEMKNGTRHKIDLGDILSDSQEKTDFDNISHIDIYMK 221  
y\_2 ELIEMKNGARHKIDLGDILSDSQEKTDFDNISHIDIYMK 221  
y\_1 ELIEMKNGARHKIDLGDILSDSQEKTDFDNISHIDIYMK 221  
y\_7 ELIEMKNGARHKIDLGDILSDSQEKTDFDNISHIDIYMK 221  
y\_6 ELIEMKNGARHKIDLGDILSDSQEKTDFDNISHIDIYMK 221  
y\_3 ELIEMKNGARHKIDLGDILSDSQEKTDFDNISHIDIYMK 221  
y\_4 ELIEMKNGARHKIDLGDILSDSQEKTDFDNISHIDIYMK 221  
\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

**SEZ**

z\_5 MRKVFILITLLFGYSSYSLLQAKAETQNDPNI SELNKSSQYTGSWHNIWYLYNSDPVNAK 60  
z\_3 MRKVFILITLLFGYSSYSLLQAKAETQNDPNI SELNKSSQYTGSWHNIWYLYNSDPVNAK 60  
z\_1 MRKIFILITLLFGYSSYSLLQAKAETQNDPNI SELNKSSQYTGSWHNIWYLYNSDPVNAK 60  
z\_2 MRKVFILITLLFGYSSYSLLQAKAETQNDPNI SELNKSSQYTGSWHNIWYLYNSDPVNAK 60  
\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

z\_5 KIKLSDKFLSHDFIVPINSPGHYDYVKTELKDMASSFDGKEVDIFGVNYFDQCYFSNE 120  
z\_3 KIKLSDKFLSHDFIVPINSPGHYDYVKTELKDMASSFDGKEVDIFGVNYFDQCYFSNE 120  
z\_1 KIKLSDKFLSHDFIVPINSPGHYDYVKTELKDMASSFDGKEVDIFGVNYFDQCYFSNE 120  
z\_2 KIKLSDKFLSHDFIVPINSPGHYDYVKTELKDMASSFDGKEVDIFGVNYFDQCYFSNE 120  
\*\*\*\*\*

z\_5 NIQCDSNQGAGSKKTCMYGGITLNNNTNRIQPIVVKVYENDSVTLSFDINIDKETVTI 180  
z\_3 NIQCDSNQGAGSKKTCMYGGITLNNNTNRIQPIVVKVYENDSVTLSFDINIDKETVTI 180  
z\_1 NIQCDSNQGGGSKKTCMYGGITLNNNTNRIQPIVVKVYENDSVTLSFDINIDKETVTI 180  
z\_2 NIQCDSNQGGGSKKTCMYGGITLNNNTNRIQPIVVKVYENDSVTLSFDINIDKETVTI 180  
\*\*\*\*\*

z\_5 QELDYKVRNKLISKINLYHLGGTSYETGYIKFIENGNRYWYDMMPPDGFQSKYLMYR 240  
z\_3 QELDYKVRNKLISKINLYHLGGTSYETGYIKFIENGNRYWYDMMPPDGFQSKYLMYR 240  
z\_1 QELDYKVRNKLISKINLYHLGGTSYETGYIKFIENGNRYWYDMMPPDGFQSKYLMYR 240  
z\_2 QELDYKVRNKLISKINLYHLGGTSYETGYIKFIENGNRYWYDMMPPDGFQSKYLMYR 240  
\*\*\*\*\*

z\_5 GNETVESAKTEIEVHLTKK 259  
z\_3 GNETVESAKTEIEVHLTKK 259  
z\_1 GNETVESAKTEIEVHLTKK 259  
z\_2 GNETVESAKTEIEVHLTKK 259  
\*\*\*\*\*

**TSST1**

TSST1\_6 MNKKLLMNFIVSPLLATIAATDFTPVPLSSNQI IKTAKASTNDNIKDLLDWYSSGSDTF 60  
TSST1\_1 MNKKLLMNFIVSPLLATIAATDFTPVPLSSNQI IKTAKASTNDNIKDLLDWYSSGSDTF 60  
TSST1\_3 MNKKLLMNFIVSPLLATIAATDFTPVPLSSNQI IKTAKASTNDNIKDLLDWYSSGSDTF 60  
TSST1\_5 MNKKLLMKFFIVSPLLATIAATGFTPVPLSSNQI IKTAKASTNDNIKDLLDWYSSGSDAF 60  
TSST1\_2 MNKKLLMKFFIVSPLLATIAATGFTPVPLSSNQI IKTAKASTNDNIKDLLDWYSSGSDAF 60  
TSST1\_4 MNKKLLMKFFIVSPLLATIAATGFTPVPLSSNQI IKTAKASTNDNIKDLLDWYSSGSDAF 60  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

TSST1\_6 TNSEVLDNSLGSMRIKNTDGSISLII FSPPYSPAF TKGKVDLNTKRTKKSQHTSEGTY 120  
TSST1\_1 TNSEVLDNSLGSMRIKNTDGSISLII FSPPYSPAF TKGKVDLNTKRTKKSQHTSEGTY 120  
TSST1\_3 TNSEVLDNSLGSMRIKNTDGSISLII FSPPYSPAF TKGKVDLNTKRTKKSQHTSEGTY 120  
TSST1\_5 TNSEVLDNSLGSMRIKNTDGSISLII FSPPYSPAF TKGKVDLNTKRTKKSQHTSEGTW 120  
TSST1\_2 TNSEVLDNSLGSMRIKNTDGSISLII FSPPYSPAF TKGKVDLNTKRIKKSQHTSEGTW 120  
TSST1\_4 TNSEVLDNSLGSMRIKNTDGSISLII FSPPYSPAF TKGKVDLNTKRIKKSQHTSEGTW 120  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

TSST1_6	IHFQISGVTNTEKLPTPIELPLKVKVHGKDSPLKYWPKFDKKQLAISTLDFEIRHQLTQI	180
TSST1_1	IHFQISGVTNTEKLPTPIELPLKVKVHGKDSPLKYWPKFDKKQLAISTLDFEIRHQLTQI	180
TSST1_3	IHFQISGVTNTEKLPTPIELPLKVKVHGKDSPLKYWPKFDKKQLAISTLDFEIRHQLTQI	180
TSST1_5	IHFQISGVTNTEKLPTPIELPLKVKVHGKDSPLKYWPKFDKKQLAISTLDFEIRHQLTQI	180
TSST1_2	IHFQISGVTNTEKLPTPIELPLKVKVHGKDSPLKYWPKFDKKQLAISTLDFKIRHQLTQT	180
TSST1_4	IHFQISGVTNTEKLPTPIELPLKVKVHGKNSPLKYWPKFDKKQLAISTLDFKIRHQLTQT	180

\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

TSST1_6	HGLYRSSDKTGGYWKITMNDGSTYQSDLSKKFEYNTEKPPINIDEIKTIEAEIN	234
TSST1_1	HGLYRSSDKTGGYWKITMNDGSTYQSDLSKKFEYNTEKPPINIDEIKTIEAEIN	234
TSST1_3	HGLYRSSDKTGGYWKITMNDGSTYQSDLSKKFEYNTEKPPINIDEIKTIEAEIN	234
TSST1_5	HGLYRSSDKTGGYWKITMNDGSTYQSDLSKKFEYNTEKPPINIDEIKTIEAEIN	234
TSST1_2	HGLYRSSDKTGGYWKITMNDGSTYQSDLSKKFEYNTEKPPINIDEIKTIEAEIN	234
TSST1_4	HGLYRSSDKTGGYWKITMNDGSTYQSDLSKKFEYNTEKPPINIDEIKTIEAEIN	234

\*\*\*\*\*

Peptide signal surligné en jaune pour les 8 ESs (SEA-SEI)

S2 : Data bases of optimization and identification of best peptides for each enterotoxins: Each peptide was identified by DDA analysis. Characterization by PRM mode for retention time (RT), charge (z) / mass (m/z), fragmentation energy (EC%), and fragment ion. WGS result for the representativeness of the peptide.

Toxin	Peptide	m/z	z	RT (min)	EC%	Fragments	Variant present	Variant absent	Common SE	CV% ratio	Selected peptide	Heavy peptide
SEA	GLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQQSNTLLR	1109.893	3+	14.9	18	$\gamma_9^+$ , $\gamma_{10}^+$ , $\gamma_{12}^+$	2, 3	1, 4		18.28	x	
SEA	NVTVQELDLQAR	693.3728	2+	9.5	21	$\gamma_9^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_{10}^+$	1, 3, 4	2		9.65	x	x
SEA	QNTVPLETVK	564.8166	2+	7.3	18	$\gamma_6^+$ , $\gamma_6^{++}$ , $\gamma_8^+$	1, 2, 3, 4			0.00	x	x
SEA	SELQGTALGNLK	615.8381	2+	8.5	21	$\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$ , $\gamma_{10}^+$	3, 4	1, 2		3.46		
SEA	YNLYNSDVFDGK	717.8304	2+	10	18	$\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$ , $\gamma_{10}^+$	1, 3, 4	2		8.34	x	x
SEA	GFFTDHSWYNDLLVDFDSK	769.3515	3+	15.9	18	$\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$	3	1, 2, 4		0.00		
SEA	QIYYNEK	560.7691	2+	6	18	$\gamma_4^+$ , $\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$	1, 3, 4	2	SEE1, 2, 3	17.08		
SEA	SELQGAALGNLK	600.8328	2+	8.5	18	$\gamma_6^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$	1	2, 3, 4		0.00		
SEA	GLIVFHTSTEPSVNYDLFGAQQQSNTLLR	1093.5529	3+	14.4	18	$\gamma_9^+$ , $\gamma_{10}^+$ , $\gamma_{12}^+$	1, 4	2, 3		16.19		
SEA	GFFTNHSWYNDLLVDFDSK	769.0235	3+	15.4	18	$\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$	1, 4	2, 3		120.85		
SEA	EVTVQELDLQAR	700.8726	2+	9.8	18	$\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$	2	1, 3, 4	SEE1, 2, 3	0.00	x	
SEA	SELQGVALDNLR	657.8542	2+	10.1	18	$\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$ , $\gamma_8^+$	2	1, 3, 4		0.00		
SEB	ESQDPKPKDELHK	507.2511	3+	3.2	15	$\gamma_6^+$ , $\gamma_8^{++}$ , $\gamma_{10}^{++}$	1, 2, 3, 4			19.06		
SEB	FIENENFWYDMMPAPGDK	764.331	3+	14.3	18	$\gamma_4^+$ , $\gamma_6^+$ , $\gamma_{12}^+$	1	2, 3, 4		13.03		
SEB	FTGLMENMK	535.7541	2+	8.9	18	$\gamma_5^+$ , $\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$	1, 3, 4	2	SEC 1, 2, 7, 8, 13	1.01		
SEB	IEVYLTTK	483.779	2+	8.4	18	$\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$	1, 2, 3, 4			0.00	x	x
SEB	LGNYDNVR	475.7381	2+	4.1	21	$\gamma_4^+$ , $\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$	1, 2, 3, 4			7.17		
SEB	NLLSFDVQTNK	639.8381	2+	10.7	15	$\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$	1, 2, 3, 4			2.71		
SEB	SIDQFLYFDLIYSIK	932.9902	2+	18.1	18	$\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$ , $\gamma_{10}^+$	1, 2, 3, 4			17.40		
SEB	VLYDDNHVSAINVK	529.6106	3+	8.3	15	$\gamma_{11}^{++}$ , $\gamma_{12}^{++}$ , $\gamma_{13}^{++}$	1, 2, 3, 4			10.63	x	x
SEB	VTAQELDYLTR	654.8433	2+	9.7	21	$\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$	1, 2, 3, 4			1.04	x	x
SEB	YLMMYNDNK	596.2623	2+	8	18	$\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$	1, 2, 3, 4		SEC 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13	0.72		
SEB	LYEFNNSPYETGIK	919.4358	2+	10.8	21	$\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$ , $\gamma_{11}^+$	1, 2, 3, 4			0.01		
SEB	FTVLMENMK	556.7776	2+	10.4	18	$\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$	2	1, 3, 4		2.70		

SEC	ESQPDPTPDELHK	498.2353	3+	5.4	15	$\gamma_6^+$ , $\gamma_8^{++}$ , $\gamma_{10}^{++}$	1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 13	5		0.00	<b>x</b>	
SEC	FLAHDLIYNISDK	516.9401	3+	11.1	15	$\gamma_3^+$ , $\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13			13.67		
SEC	IEVHLTTK	314.1869	3+	6.2	18	$\gamma_5^{++}$ , $\gamma_6^{++}$ , $\gamma_7^{++}$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 13	10		10.80	<b>x</b>	
SEC	NLYEFNSSPYETGYIK	962.9518	2+	11.3	21	$\gamma_8^+$ , $\gamma_{11}^+$ , $\gamma_{12}^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13		SEIU 1, 4, 5, 6, 9	7.03	<b>x</b>	<b>x</b>
SEC	NTISFEVQTDK	641.3197	2+	8.4	18	$\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13			1.20		
SEC	SSEFTGTMGNMK	430.5215	3+	7.2	18	$\gamma_2^+$ , $\gamma_4^+$ , $\gamma_5^+$	3, 4, 5, 11	1, 2, 7, 8, 10, 13		15.25		
SEC	SVTAQELDIK	552.3008	2+	7.8	18	$\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13			3.01	<b>x</b>	
SEC	TELLNEDLAK	573.3061	2+	8.6	18	$\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$	2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13	1		18.15		
SEC	YLMMYNDNK	596.2623	2+	8	18	$\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13		SEB 1, 2, 3, 4	0.31		
SEC	YLYDDHYVSATK	492.2331	3+	7.3	15	$\gamma_9^{++}$ , $\gamma_{10}^{++}$ , $\gamma_{11}^{++}$	3, 4, 5, 11	1, 2, 7, 8, 10, 13		0.04		
SEC	FTGLMENMK	535.7541	2+	8.9	18	$\gamma_5^+$ , $\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$	1, 2, 7, 8, 13	3, 4, 5, 10, 11		4.72		
SEC	LQNVLIR	428.2742	2+	8	21	$\gamma_3^+$ , $\gamma_4^+$ , $\gamma_5^+$	1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 13	5	SEB 1, 3, 4	5.30		
SEC	VLYDDHYVSATK	470.9015	3+	6.9	18	$\gamma_9^{++}$ , $\gamma_{10}^{++}$ , $\gamma_{11}^{++}$	1	2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13		1.68		
SEC	TELLNEGLAK	544.3033	2+	8.3	18	$\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$	1	2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13		4.37		
SED	IPINLWINGVQK	697.9114	2+	13.2	21	$\gamma_7^+$ , $\gamma_9^+$ , $\gamma_{11}^{++}$	1, 2, 3, 5			13.16		
SED	LYNNDTLGGK	547.7775	2+	5.2	18	$\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$	1, 2, 3, 5			0.00	<b>x</b>	<b>x</b>
SED	NVDVYAIR	475.2587	2+	8	18	$\gamma_4^+$ , $\gamma_5^+$ , $\gamma_6^+$	1, 2, 3, 5			1.51		
SED	NVTVQELDAQAR	672.3493	2+	7.7	21	$\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_{10}^+$	1, 2, 3, 5			1.12	<b>x</b>	
SED	STGDQFLENTLLYK	814.912	2+	12.3	21	$\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$	1, 2, 3, 5			3.12		
SED	VSYDLFDVK	543.2793	2+	11.3	18	$\gamma_6^+$ , $\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$	1, 2, 3, 5			12.29	<b>x</b>	<b>x</b>
SED	NPIIGENK	442.7454	2+	4.2	18	$\gamma_4^+$ , $\gamma_5^+$ , $\gamma_7^{++}$	1, 2, 3, 5			10.26		
SED	IEFDSSDESK	578.7539	2+	5.3	21	$\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$	3	1, 2, 5		13.72		
SED	IEFDSSDGSK	542.7433	2+	5	18	$\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$	1, 2, 5	3		11.79		
SEE	ESDDQFLENTLLFK	849.9147	2+	14.2	18	$\gamma_7^+$ , $\gamma_8^+$ , $\gamma_9^+$	1, 2, 3			11.57		

SEE	EVTVQELDLQAR	700.8726	2+	9.8	21	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3		SEA 2	13.38	x	x
SEE	FGLYNDSDFGGK	646.3013	2+	9.7	21	$\gamma_7^+, \gamma_8^+, \gamma_9^+$	1, 2, 3			0.00	x	x
SEE	GFFTGHWPYNDLLVLDGSK	722.6933	3+	15.6	15	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_{17}^{++}$	1	2, 3		18.59		
SEE	GLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGQYPTLLR	1105.8771	3+	15.2	21	$\gamma_6^+, \gamma_9^+, \gamma_{12}^+$	1, 3	2		0.36		
SEE	QIYYNEK	560.7691	2+	6.1	18	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 2, 3		SEA 1, 3, 4	13.32	x	
SEE	QTTVPIDK	451.2531	2+	5	21	$\gamma_2^+, \gamma_4^+, \gamma_6^+$	1, 2, 3			15.40	x	x
SEE	SELQGIALSCLR	650.8646	2+	9.8	21	$\gamma_5^+, \gamma_6^+, \gamma_8^+$	2	1, 3		11.77		
SEG	ELVPFVPHYK	546.3104	2+	12.2	18	$\gamma_3^+, \gamma_6^+, \gamma_6^{++}$	1, 2, 3, 4, 5, 7			16.41	x	
SEG	FLNIYGDNDK	542.2771	2+	9.1	21	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_7^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7			13.29	x	x
SEG	NMVTIQELDYK	677.3396	2+	10.2	21	$\gamma_6^+, \gamma_8^+, \gamma_9^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7			3.78	x	
SEG	QFLSHDLIFPIEYK	583.9785	3+	13.7	18	$\gamma_5^+, \gamma_5^{++}, \gamma_6^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7			17.47	x	
SEG	QSLGFTITTNK	605.3273	2+	9.3	21	$\gamma_4^+, \gamma_6^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7			0.00	x	x
SEG	GTMGNVMNLYTSPPEGR	961.9586	2+	11.5	21	$\gamma_6^+, \gamma_9^+, \gamma_{12}^+$	3, 7	1, 2, 4, 5		6.47		
SEG	LYEFDGSAFESGYIK	863.404	2+	12.3	18	$\gamma_{11}^+, \gamma_{12}^+, \gamma_{13}^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7			14.82		
SEH	VIGANVWVDGIQK	699.8906	2+	11.2	21	$\gamma_7^+, \gamma_9^+, \gamma_{11}^+$	1, 2, 4	3		7.95		
SEH	DYSFDIYDLK	639.7981	2+	12.7	15	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4			2.25		
SEH	ETELIR	380.7136	2+	4.7	15	$\gamma_1^+, \gamma_2^+, \gamma_3^+$	1, 2, 3, 4			9.22		
SEH	FATADLAQK	482.7585	2+	6.5	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4			3.43	x	x
SEH	GLIEFDMK	476.7441	2+	11	15	$\gamma_2^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 2, 3, 4			15.76	x	
SEH	NVDIYGASFYYK	720.3457	2+	11	15	$\gamma_7^+, \gamma_8^+, \gamma_{10}^+$	2, 3, 4	1		81.21		
SEH	SVDIYGASFYYK	706.8403	2+	11.1	18	$\gamma_7^+, \gamma_8^+, \gamma_{10}^+$	1	2, 3, 4		46.56		
SEH	NVTLQELDIK	586.8297	2+	10.3	15	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4			27.18	x	x
SEH	SDDISHIDVNLTK	540.6019	3+	9.8	15	$\gamma_{10}^{++}, \gamma_{12}^{++}, \gamma_{13}^{++}$	1, 2, 3, 4			0.00	x	x
SEH	SELTLALANAYGQYNHPFIK	789.0656	3+	13	18	$\gamma_{15}^{++}, \gamma_{18}^{++}, \gamma_{19}^{++}$	1, 2, 3, 4			14.94		
SEI	LVTAEIDVK	558.319	2+	8	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15		SEK 5, 8	0.00	x	x
SEI	SFSYDLFYTGDLPLVSFLK	719.3577	3+	17.2	18	$\gamma_6^+, \gamma_6^{++}, \gamma_{10}^+$	1, 3, 4, 5, 10	2, 6, 8, 11, 12, 13, 15		15.85		
SEI	VLFHLNNEK	371.8732	3+	7.6	15	$\gamma_6^{++}, \gamma_7^{++}, \gamma_8^{++}$	3, 4, 15	1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13		19.46	x	
SEI	VLFHLNDEK	372.2012	3+	7.9	15	$\gamma_2^+, \gamma_7^{++}, \gamma_8^{++}$	1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13	3, 4, 15		10.72	x	

SEI	YLQEEYNIYGHNNTGK	648.3025	3+	7.6	18	$\gamma_8^+, \gamma_{14}^{++}, \gamma_{15}^{++}$	1, 3, 4, 6, 8, 11, 13, 15	2, 5, 10, 12	16.21	x	x
SEI	YLQEEYNIYGHNNNGK	653.9700	3+	7.4	15	$\gamma_{12}^{++}, \gamma_{13}^{++}, \gamma_{14}^{++}$	5, 10	1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 15	8.06		
SEI	HDYIDLK	452.2322	2+	6.7	21	$\gamma_2^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	2, 3, 4, 6, 12, 15	1, 5, 8, 10, 11, 13	11.31		
SEI	QGDIGVGNLR	514.7778	2+	7.1	21	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15		13.24	x	x
SEI	IPINLWVNGK	579.3436	2+	11.6	21	$\gamma_7^+, \gamma_8^+, \gamma_9^{++}$	1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 13, 15	5, 10, 12	11.75		
SEI	IPINLWINGK	586.3515	2+	12.4	21	$\gamma_7^+, \gamma_8^+, \gamma_9^{++}$	5, 10	1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 15	12.69		
SEIJ	FFISHSQYNDLLVQFDSK	759.0392	3+	14	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_7^{++}$	1, 2, 3, 4		25.71		
SEIJ	IMTEDQFLDYTLFLK	626.3182	3+	16.5	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4		2.08	x	
SEIJ	TVVPLDIVK	492.3104	2+	11.3	21	$\gamma_6^+, \gamma_6^{++}, \gamma_7^+$	1, 2, 3, 4		35.15		
SEIJ	QYNLYNPSTFGGK	744.8595	2+	9.6	18	$\gamma_8^+, \gamma_9^+, \gamma_{11}^+$	2, 3	1, 4	1.52	x	
SEIJ	SELSITLNNLR	673.8673	2+	10.8	18	$\gamma_4^+, \gamma_6^+, \gamma_9^+$	1, 2, 3, 4		0.00	x	
SEIJ	VTIQELDLQAR	643.3592	2+	10.1	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4		11.44	x	
SEK	DFVDLK	368.6974	2+	8.4	18	$\gamma_2^+, \gamma_3^+, \gamma_4^+$	1, 3, 5, 7, 8	2, 4, 9	1.81		
SEK	DNDTPIANQLQFSNESYDLISESK	910.091	3+	13.4	18	$\gamma_8^+, \gamma_{15}^{++}, \gamma_{20}^{++}$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9		15.76		
SEK	FYSGFNIGK	516.7611	2+	9.5	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9		0.00	x	
SEK	NIPINIWINGNHHK	766.9202	2+	11.6	21	$\gamma_7^+, \gamma_{11}^+, \gamma_{11}^{++}$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9		3.37	x	
SEK	QGDIGIDNLR	550.7884	2+	8.2	21	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9		7.52	x	
SEK	VTFHLNNNDTFSYDLFYTGDDGLPK	965.1154	3+	14.4	18	$\gamma_8^+, \gamma_9^+, \gamma_{10}^+$	1, 2, 3, 4, 5, 7	8, 9	14.11		
SEK	YLQEEYNIYGHNGTK	610.2882	3+	7.6	18	$\gamma_7^+, \gamma_{12}^{++}, \gamma_{13}^{++}$	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9		15.72		
SEK	FVTAQEIDVK	575.3111	2+	8.5	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 4, 7	2, 3, 5, 8, 9	3.31		
SEK	LVTAQEIDVK	558.319	2+	8	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	5, 8	1, 2, 3, 4, 7, 9	5.14	x	
SEK	FVTAQEIDIK	582.319	2+	9.4	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	2, 9	1, 3, 4, 5, 7, 8	24.52		
SEL	FYSGFDK	432.2003	2+	6.7	21	$\gamma_2^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13		1.51	x	
SEL	IIPINLIINGK	604.3923	2+	14	15	$\gamma_7^+, \gamma_9^+, \gamma_9^{++}$	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13		9.07	x	
SEL	MVTAQEIDVK	567.2972	2+	7.7	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13		12.32		

SEL	NVDVFGISYK	571.298	2+	11.1	15	$Y_6^+, Y_7^+, Y_8^+$	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13		15.18	x
SEL	YEYVNLK	464.7424	2+	7.4	18	$Y_4^+, Y_5^+, Y_6^+$	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13	10	0.00	x
SEL	YLQDEFNIYGHNDTGK	638.627	3+	9.4	15	$Y_8^+, Y_{13}^{++}, Y_{14}^{++}$	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13		18.91	
SEL	TIYGGVTK	419.7371	2+	4.7	15	$Y_5^+, Y_6^+, Y_7^+$	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13		1.74	
SEL	NVDIFGISYK	578.3059	2+	12.1	18	$Y_5^+, Y_6^+, Y_8^+$	8, 12	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13	5.34	
SEM	DVGVLNLR	443.2613	2+	9.8	18	$Y_3^+, Y_4^+, Y_6^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 15		0.00	x x
SEM	ILFHLDNGSSFSYDLFDTGTGQAESFLK	1037.1645	3+	16.2	18	$Y_8^+, Y_{12}^+, Y_{13}^+$	3, 4, 8, 15	1, 2, 5, 6, 9	18.46	
SEM	LVTAQEIDTK	559.3086	2+	6.5	18	$Y_6^+, Y_7^+, Y_8^+$	3, 4, 6, 8, 15	1, 2, 5, 9	2.98	x
SEM	IVTAQEIDTK	559.3086	2+	6.3	21	$Y_6^+, Y_7^+, Y_8^+$	1, 2, 5, 9	3, 4, 6, 8, 15	0.22	x
SEM	YLQEEYNIYGFNDTNK	1005.9576	2+	10.8	21	$Y_7^+, Y_8^+, Y_{12}^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 15		4.11	x
SEM	YIYGGVTLAGDYLEK	831.4247	2+	12.2	18	$Y_9^+, Y_{12}^+, Y_{13}^+$	3, 4, 6, 8, 15	1, 2, 5, 9	13.32	
SEM	YMYGGVTLAGDYLEK	840.4029	2+	11.9	18	$Y_9^+, Y_{12}^+, Y_{13}^+$	1, 2, 5, 9	3, 4, 6, 8, 15	23.85	
SEN	DGVQQEGFVIK	610.3195	2+	9	18	$Y_6^+, Y_7^+, Y_8^+$	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8	4, 9	8.70	
SEN	GSGVAEFFQFYSNDR	862.3892	2+	12.8	21	$Y_8^+, Y_9^+, Y_{10}^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	9	3.94	
SEN	ISTDQLLNNTIILK	793.4616	2+	13.3	18	$Y_7^+, Y_8^+, Y_9^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	9	25.87	
SEN	NIDISVLK	451.2713	2+	10.2	15	$Y_4^+, Y_5^+, Y_6^+$	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8	4, 9	3.79	x
SEN	NIDIYGLYFGNK	708.8615	2+	13.2	18	$Y_7^+, Y_8^+, Y_{10}^+$	3, 5, 7	1, 2, 4, 6, 8, 9	20.30	x
SEN	VTVQELDTK	516.7822	2+	6.4	18	$Y_6^+, Y_7^+, Y_8^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9		0.00	x x
SEO	FLDFDLLFK	579.3157	2+	16.7	18	$Y_6^+, Y_7^+, Y_8^+$	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 19, 21	4	128.25	x
SEO	GNLPDQYLQIYNDNK	598.9601	3+	11.05	18	$Y_5^+, Y_8^+, Y_{12}^{++}$	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 14, 19, 21	5, 8	3.52	
SEO	SSVDPIALHNINDDYINNR	724.0223	3+	10.4	21	$Y_5^+, Y_8^+, Y_{15}^{++}$	3, 6, 8, 21	1, 2, 4, 5, 7, 9, 14, 19	2.71	
SEO	TVDIYGVVYK	610.8135	2+	10	18	$Y_6^+, Y_7^+, Y_8^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 19, 21		0.00	x
SEO	VTAQELDIK	508.7848	2+	7.3	18	$Y_6^+, Y_8^+, Y_8^{++}$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 19, 21		42.96	x x
SEO	SINWLDGISAK	602.322	2+	11.8	18	$Y_7^+, Y_8^+, Y_9^+$	6, 21	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 14, 19	99.54	

SEO	SINWLDGISAEFK	740.3775	2+	14.7	21	$\gamma_8^+, \gamma_9^+, \gamma_{11}^+$	3, 8, 14	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 19, 21	90.40		
SEO	ESFYDDLFIK	744.3583	2+	14.8	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 14, 19, 21	8	141.42		
SEP	ESNDQFLK	490.7378	2+	5.4	18	$\gamma_2^+, \gamma_3^+, \gamma_6^+$	2, 3, 4		0.13		
SEP	EVTVQELDLQSR	708.8701	2+	9.4	21	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	2, 3	4	4.40	x	
SEP	GLIEFHPSSGDSVGYDLFGAQQQPDTQLR	1085.5178	3+	14	18	$\gamma_6^+, \gamma_9^+, \gamma_{12}^+$	2, 3, 4		0.55	x	
SEP	QNTVPLGTVK	528.806	2+	7	21	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	2, 3, 4		0.00	x	
SEP	SELQGTALSNLR	644.8464	2+	8.7	18	$\gamma_4^+, \gamma_8^+, \gamma_9^+$	2, 3, 4	SEE 3	7.47	x	x
SEQ	DVGVINLR	443.2613	2+	9.3	15	$\gamma_3^+, \gamma_4^+, \gamma_6^+$	1, 2, 3, 4, 5		2.74	x	
SEQ	EVTAEIDIK	573.3061	2+	7.7	18	$\gamma_5^+, \gamma_6^+, \gamma_8^+$	1, 2, 3, 4, 5		0.00	x	x
SEQ	FNSGFNK	407.1981	2+	3.6	18	$\gamma_2^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 2, 3, 4, 5		6.16		
SEQ	ITFHLNNETSFTYDLFYTGTAESFLK	1082.1873	3+	16.2	18	$\gamma_{10}^+, \gamma_{11}^+, \gamma_{20}^{++}$	5	1, 2, 3, 4	16.10		
SEQ	ITFHLNNEPSFTYDLFYTGTAESFLK	1080.8557	3+	16.2	18	$\gamma_{10}^+, \gamma_{11}^+, \gamma_{12}^+$	1, 2, 3, 4	5	18.50		
SEQ	NFYTNYQPETLQGVSSGNFSTSHQLEYIDGK	881.9115	4+	12.2	18	$\gamma_{17}^{++}, \gamma_{19}^{++}, \gamma_{20}^{++}$	5	1, 2, 3, 4	0.87		
SEQ	NIPINLWVNGK	634.3615	2+	12.5	15	$\gamma_7^+, \gamma_9^+, \gamma_9^{++}$	1, 2, 3, 4, 5		7.98	x	
SEQ	QNTISTDEVSTQK	725.8546	2+	5.2	21	$\gamma_8^+, \gamma_9^+, \gamma_{11}^+$	5	1, 2, 3, 4	0.04		
SEQ	YLQNEYNIYGFNK	833.399	2+	10.4	21	$\gamma_5^+, \gamma_8^+, \gamma_{10}^+$	1, 2, 3, 4, 5		3.47		
SEQ	YMYGGITLANQNLDKPR	651.9999	3+	9.9	15	$\gamma_{11}^{++}, \gamma_{14}^{++}, \gamma_{15}^{++}$	1, 2, 3, 4, 5		5.12		
SEQ	YTLYSQFHNEYEAK	896.9125	2+	8.6	21	$\gamma_8^+, \gamma_9^+, \gamma_{10}^+$	1, 2, 3, 4, 5		2.22		
SEQ	LQGVSSGNFSTSHQLEYIDGK	756.3695	3+	9.6	18	$\gamma_{16}^{++}, \gamma_{17}^{++}, \gamma_{19}^{++}$	1, 2, 3, 4	5	1.24		
SEQ	NFYANYQPEK	637.296	2+	7.2	18	$\gamma_3^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	2	1, 3, 4, 5	1.94		
SER	DLVFPFIPYK	546.3104	2+	13.6	18	$\gamma_3^+, \gamma_6^+, \gamma_6^{++}$	1, 2, 4, 5		4.10		
SER	FVNIYGDNK	535.2693	2+	7.7	18	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_7^+$	1, 2, 4, 5		1.96	x	x
SER	GTMGNVESLYK	599.7923	2+	8.3	18	$\gamma_5^+, \gamma_8^+, \gamma_9^+$	1, 2, 4, 5		141.42		
SER	NIIVPVTVDNK	606.3533	2+	10.1	15	$\gamma_7^+, \gamma_8^+, \gamma_9^+$	1, 2, 4, 5		8.19		
SER	QFLGHDLIPIPYSEYK	689.691	3+	14.47	18	$\gamma_6^+, \gamma_6^{++}, \gamma_8^+$	1, 2, 5	4	48.26		
SER	TVTQELDYK	598.3139	2+	8.1	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 4, 5		9.17	x	x
SER	QQFSFTISTNK	650.8302	2+	9.7	18	$\gamma_4^+, \gamma_6^+, \gamma_9^+$	1, 2, 4, 5		20.94		
SER	SEFINK	369.1951	2+	3.3	18	$\gamma_2^+, \gamma_3^+, \gamma_4^+$	1, 2, 4, 5		0.00		

SER	TIDASSVK	410.7242	2+	2.8	15	$\gamma_5^+, \gamma_6^+, \gamma_7^{++}$	1, 2, 4, 5		27.23		
SER	AVIAENVK	422.2504	2+	4.8	15	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 2, 4, 5		3.47		x
SER	NWLTNK	445.23	2+	5.9	18	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 2, 4, 5		2.73		
SES	EPTIQELDLK	593.3217	2+	9.8	18	$\gamma_3^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 3		16.79		
SES	GFMITTDK	456.7284	2+	7.9	18	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 3		11.35		
SES	NSIGVNVFK	489.2744	2+	9.1	18	$\gamma_2^+, \gamma_6^+, \gamma_7^+$	1, 3		0.19		x
SES	SELDSTALYNIK	677.3485	2+	9.9	18	$\gamma_8^+, \gamma_9^+, \gamma_{10}^+$	1, 3		0.00		x x
SES	TNSTQLLSNDLIFDDITLK	717.7108	3+	15.5	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 3		0.05		
SES	TSYSQDNIILDIK	755.3934	2+	11.3	21	$\gamma_5^+, \gamma_8^+, \gamma_{10}^+$	1, 3		4.69		x
SES	YSVDFLK	436.2316	2+	9.9	18	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 3		2.35		x
SET	EGLKDFYSK	362.8537	3+	7	15	$\gamma_1^+, \gamma_2^+, \gamma_3^+$	1		NR		
SET	FYDGDISK	472.7216	2+	6	18	$\gamma_5^+, \gamma_6^+, \gamma_7^+$	1		NR		x
SET	INTLDDKILNQFK	521.291	3+	10.9	15	$\gamma_9^{++}, \gamma_{11}^{++}, \gamma_{12}^{++}$	1		NR		
SET	ISHFDIYMEK	428.2094	3+	9	15	$\gamma_3^+, \gamma_4^+, \gamma_9^{++}$	1		NR		
SET	IDVYTNK	426.7267	2+	4.4	15	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1		NR		
SET	ELEIGNR	415.722	2+	5.1	18	$\gamma_3^+, \gamma_4^+, \gamma_6^{++}$	1		NR		
SET	INTLDDK	409.7163	2+	2.5	18	$\gamma_2^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1		NR		
SET	HSPLDKPTNISYR	509.9353	3+	6.7	18	$\gamma_5^+, \gamma_{11}^{++}, \gamma_{12}^{++}$	1		NR		x
SET	VG DYVDAWGHII NNKPIGK	699.369	3+	11.4	18	$\gamma_{14}^{++}, \gamma_{15}^{++}, \gamma_{18}^{++}$	1		NR		x
SEIU	ASEFTGLMDNMR	686.3052	2+	10.6	18	$\gamma_5^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11	7, 17	0.84		x
SEIU	FLQHDLLFK	387.5536	3+	10.3	18	$\gamma_1^+, \gamma_2^+, \gamma_8^+$	1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 17	6	9.01		x
SEIU	NITAEIDYK	597.8037	2+	7.3	18	$\gamma_6^+, \gamma_7^+, \gamma_8^+$	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 17		2.59		x
SEIU	YLLIYNDNK	578.3059	2+	9.4	18	$\gamma_5^+, \gamma_6^+, \gamma_7^+$	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 17		0.00		x
SEIX	GNIVINTK	429.7558	2+	5.4	18	$\gamma_4^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 22, 24, 25, 28, 34, 36, 41, 45		3.11		x
SEIX	NVTFELVK	475.2713	2+	9.8	18	$\gamma_2^+, \gamma_5^+, \gamma_6^+$	1, 4, 7, 12, 14, 17, 22, 24, 25, 28, 34, 36, 41	3, 5, 9, 10, 15, 16, 45	3.93		x

SEIX	INLEGTYR	483.2562	2+	7	18	$y_4^+, y_5^+, y_6^+$	3, 10, 16	1, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 15, 17, 22, 24, 25, 28, 34, 36, 41, 45	7.15	
SEIX	IHLEGTYTVAGR	439.5701	3+	7.6	18	$y_3^+, y_4^+, y_5^+$	1, 4, 5, 15, 24, 25, 28, 34, 45	3, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 17, 22, 36, 41	15.36	
SEIX	EVVTLK	344.7156	2+	5.2	18	$y_2^+, y_3^+, y_4^+$	1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 22, 24, 25, 28, 34, 36, 45	17, 41	1.86	
SEIX	NWVYSERPLNENQVR	635.3185	3+	8.5	18	$y_{11}^{++}, y_{12}^{++}, y_{13}^{++}$	1, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 17, 22, 24, 25, 28, 36, 41, 45	10, 34	2.57	x
SEIX	ELDHIIR	299.1714	3+	6.4	18	$y_3^+, y_4^{++}, y_5^{++}$	1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 22, 24, 25, 34, 36, 41, 45	28	2.73	x
SEIX	INTADIK	387.7214	2+	3.6	18	$y_2^+, y_5^+, y_6^+$	3, 5, 9, 10, 28, 45	1, 4, 7, 12, 14, 15, 16, 17, 22, 24, 25, 34, 36, 41	9.03	
SEIX	NITLNK	351.7109	2+	3.3	18	$y_2^+, y_3^+, y_4^+$	1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 22, 24, 25, 28, 34, 36, 41, 45		0.00	
SEY	TVLYNTDYLK	615.3243	2+	9.4	18	$y_6^+, y_7^+, y_8^+$	1, 2, 3, 4, 6, 7		4.99	x
SEY	VNPDSLLEVK	557.3111	2+	10.1	18	$y_8^+, y_8^{++}, y_9^{++}$	1, 2, 3, 4, 6, 7		2.03	x
SEY	EVTGVGENYIDVK	711.8592	2+	9.1	18	$y_7^+, y_8^+, y_{10}^+$	6	1, 2, 3, 4, 7	1.44	
SEY	YDPISK	361.6896	2+	3.4	21	$y_3^+, y_4^+, y_4^{++}$	1, 2, 3, 4, 6, 7		0.29	
SEY	VDTYNVR	433.722	2+	3.3	21	$y_3^+, y_5^+, y_6^+$	1, 2, 3, 4, 6, 7		0.00	x
SEY	MNLFVNGHQTK	430.2204	3+	7.2	18	$y_7^{++}, y_8^{++}, y_9^{++}$	1, 2, 3, 4, 6, 7		3.79	
SEY	TFDFDNISHIDIYMK	620.2942	3+	13.8	18	$y_{12}^{++}, y_{13}^{++}, y_{14}^{++}$	1, 2, 3, 4, 6, 7		19.21	
SEY	VTNLSYR	426.7323	2+	4.3	18	$y_3^+, y_5^+, y_6^+$	1, 2, 3, 4, 6, 7		2.16	x
SEIZ	SSQYTGSWHNIWYLYNSDPVNAK	910.7576	3+	12.9	18	$y_5^+, y_8^+, y_9^+$	1, 2, 3, 5		1.35	x
SEIZ	YLMIYR	429.7307	2+	9.1	15	$y_3^+, y_4^+, y_5^+$	1, 2, 3, 5		3.55	x
SEIZ	IQPIVVK	398.7682	2+	7.5	15	$y_2^+, y_3^+, y_4^+$	1, 2, 3, 5		0.00	x
SEIZ	INLYHLGGTSYETGYIK	643.6633	3+	10.9	18	$y_6^+, y_{15}^{++}, y_{16}^{++}$	1, 2, 3, 5		0.80	x
SEIZ	YYWYDMMPDPGFTQSK	1014.929	2+	14.1	18	$y_7^+, y_9^+, y_{10}^+$	1, 2, 3, 5		11.57	x
TSST1	HQLTQIHGLYR	455.9177	3+	8	18	$y_4^+, y_5^+, y_9^{++}$	1, 3, 5, 6	2, 4	6.05	

TSST1	LPTPIELPLK	560.8524	2+	13	21	$\gamma_7^+, \gamma_7^{++}, \gamma_9^{++}$	1, 2, 3, 4, 5, 6		18.63	x
TSST1	ITMNDGSTYQSDLSK	830.3802	2+	7.6	21	$\gamma_{10}^+, \gamma_{11}^+, \gamma_{12}^+$	1, 2, 3, 4, 5, 6		0.00	x
TSST1	NTDGSISLIIFSPYSPAFTK	1209.615	2+	16.5	18	$\gamma_5^+, \gamma_{11}^+, \gamma_{12}^+$	1, 3, 6	2, 4, 5	6.79	
TSST1	QLAISTLDFEIR	703.3879	2+	13.7	18	$\gamma_8^+, \gamma_9^+, \gamma_{10}^+$	1, 3, 5, 6	2, 4	10.82	x
TSST1	QLAISTLDFK	568.3215	2+	11.6	18	$\gamma_5^+, \gamma_6^+, \gamma_7^+$	2, 4	1, 3, 5, 6	4.72	x
TSST1	DLLDWYSSGSDAFTNSEVLDNSLGS MR	993.7819	3+	16.6	18	$\gamma_8^+, \gamma_9^+, \gamma_{10}^+$	2, 4, 5	1, 3, 6	8.31	
TSST1	FEYNTEKPPINIDEIK	650.6667	3+	10.96	18	$\gamma_9^+, \gamma_{13}^{++}, \gamma_{14}^{++}$	1, 2, 3, 4, 5, 6		6.51	
TSST1	HQLTQTHGLYR	451.9056	3+	4.2	18	$\gamma_4^+, \gamma_9^{++}, \gamma_{10}^{++}$	2, 4	1, 3, 5, 6	8.13	

S3: Table origin of 49 strains of *S. aureus*

Strain	Accession no.	Sample origin	Bacteria count (cfu/g)	Related publication	SE detected in food (official method)	Date of isolation	Geographical location	Strain origin
05CEB51		Rice	No food sample	/	No food sample	2005	France	SFPO
05CEB52	ERS4338875	unknown	No food sample	Merda et al, 2020	No food sample	2005	France	SFPO
05CEB53		unknown	No food sample	/	No food sample	2005	France	SFPO
06CEB196		Coconut beads	NR	/	Vidas: positive	2006	France	SFPO
06CEB83		Cheese	NR	/	Vidas: positive	2006	France	Own Check
08CEB393		Wrap salmon	NR	/	Vidas: positive	2008	France	SFPO
08CEB402		Blood sausage	NR	/	Vidas: positive	2008	France	SFPO
09CEB231		Fruit tart on pastry cream	NR	/	Vidas: positive	2009	France	SFPO
09CEB303	ERS4338887	unknown	NR	Merda et al, 2020	NR	2009	Japan	SFPO
09CEB314	ERS4338888	Cheese	NR	Merda et al, 2020	Vidas: positive	2009	France	SFPO
10CEB282		Steak	NR	/	Vidas: positive	2010	France	SFPO
10CEB401		Chicken	NR	/	Vidas: positive	2010	France	SFPO
11CEB110		Merguez	NR	/	Vidas: positive	2011	France	SFPO
12CEB137		Sheep's cheese	NR	/	Vidas: positive	2012	France	SFPO
12CEB368		Semi-cooked foie gras	NR	/	Vidas: positive	2012	France	SFPO
12CEB496		Chicken Sandwich	NR	/	Vidas: positive	2012	France	SFPO
12CEB512		Cottage cheese	NR	/	Ridascreen: negative	2012	France	SFPO
13CEB193	ERS4338917	Matured cheese	NR	Merda et al, 2020	Vidas: positive	2013	France	SFPO
13CEB437		Sausage Sandwich	NR	/	Ridascreen: negative	2013	France	SFPO
14A / FRI361	ERS4338950	Meat	NR	Merda et al, 2020	NR	1962	United Kingdom	Reference Strain
14SBCL1004		Ham	NR	/	Vidas: positive	2014	France	SFPO
14SBCL770		Pork stir-fry	NR	/	Ridascreen: negative	2014	France	SFPO
15SBCL1151		Cream puff	1.80E+08	/	Vidas: positive	2015	France	SFPO
15SBCL1428	ERS4338968	Cheese	6.40E+05	Merda et al, 2020	NR	2015	France	SFPO
15SBCL1438	ERS4338971	Cheese	1.00E+06	Merda et al, 2020	NR	2015	France	SFPO

15SBCL452		Paëlla	1.60E+06	/	Vidas: positive	2015	France	SFPO
16SBCL1028		Coriander Turkey	No food sample	/	No food sample	2016	France	SFPO
16SBCL1204		Chicken - rice	1.00E+04	/	Ridascreen: negative	2016	France	SFPO
16SBCL1368		Beef Bourguignon	No food sample	/	No food sample	2016	France	SFPO
16SBCL246		Marinated salmon	1.10E+03	/	NR	2016	France	SFPO
16SBCL259		Kitchen tool	No food sample	/	No food sample	2016	France	SFPO
16SBCL899		Semolina couscous	NR	/	Vidas: positive	2016	France	SFPO
17SBCL25		Chicken	3.30E+05	/	Vidas: negative Ridascreen: negative	2017	France	SFPO
17SBCL330		vegetable	No food sample	/	NR	2017	France	SFPO
17SBCL693		Cream cake	1.50E+08	/	Vidas: positive	2017	France	SFPO
18SBCL601		Paella with meat	1.10E+09	/	Vidas: positive	2018	France	SFPO
18SBCL855		sandwich	< 400	/	Vidas: negative	2018	France	SFPO
19SBCL1059		Raw sheep milk	1.00E+07	/	Vidas: positive	2019	France	Own Check
19SBCL591		Ham	1.40E+08	/	Vidas : positive	2019	France	SFPO
20SBCL08		Raw milk cheese	1.00E+06	/	Vidas : positive	2020	France	Own Check
337E		Pasteurized milk cheese	NR	Letertre et al 2003b	NR	unknown	unknown	SFPO
349E		ribs	NR	Letertre et al 2003a	NR	unknown	unknown	SFPO
352E		fresh cheese	NR	Letertre et al 2003a	NR	unknown	unknown	SFPO
356E		cheese	NR	Letertre et al 2003a	NR	unknown	unknown	SFPO
42A / FRIS6	ERS4339010	unknown	NR	Merda et al, 2020	NR	2001	unknown	Reference Strain
43A / FRI137	ERS4339011	Abscess	NR	Merda et al, 2020	NR	2001	unknown	Reference Strain
44A / FRI1230	ERS4339012	Breast milk	NR	Merda et al, 2020	NR	2001	unknown	Reference Strain
45A / FRI1151M	ERS4339013	unknown	NR	Merda et al, 2020	NR	2001	unknown	Reference Strain
46A / FRI326	ERS4339014	Chicken tetrazzini	NR	Merda et al, 2020	NR	2001	unknown	Reference Strain

# Annexe 4

Cinétique de production des ESs par les souches de *S. aureus*.

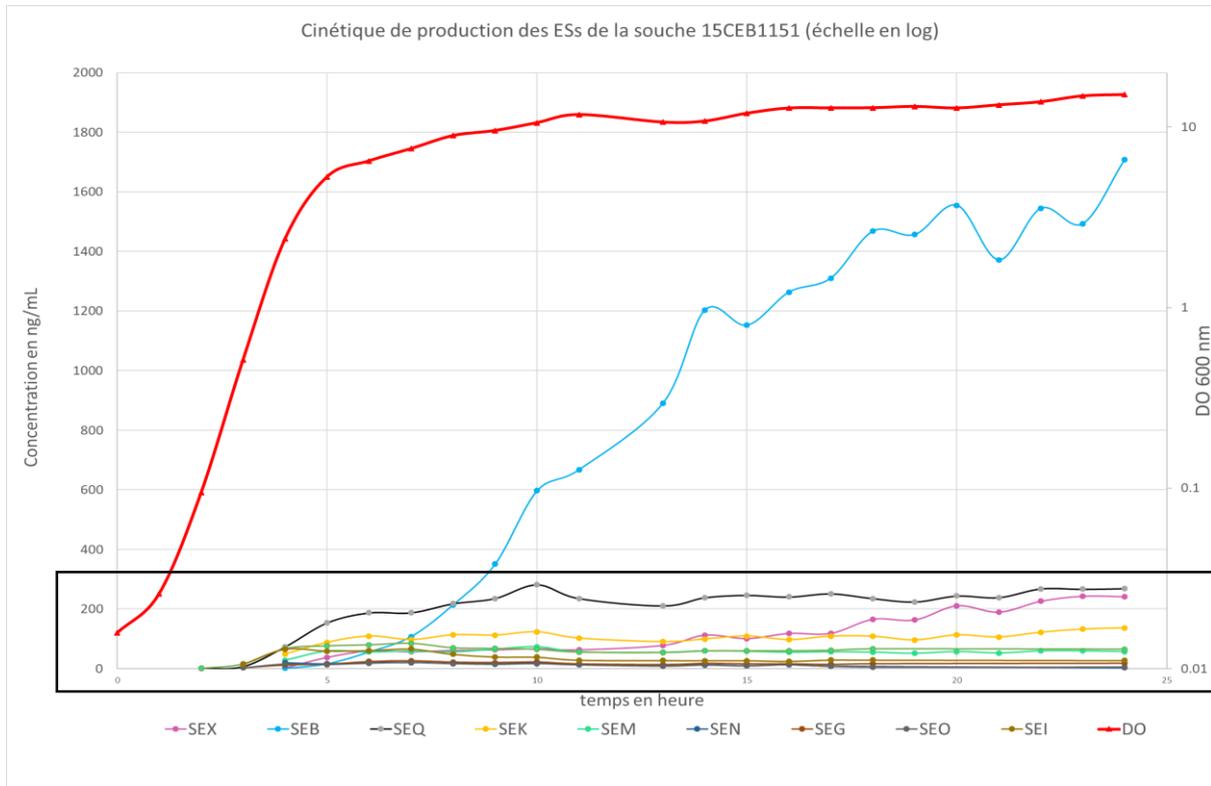


Figure 70 Cinétique de production des ESs par la souche 15SBCL1151

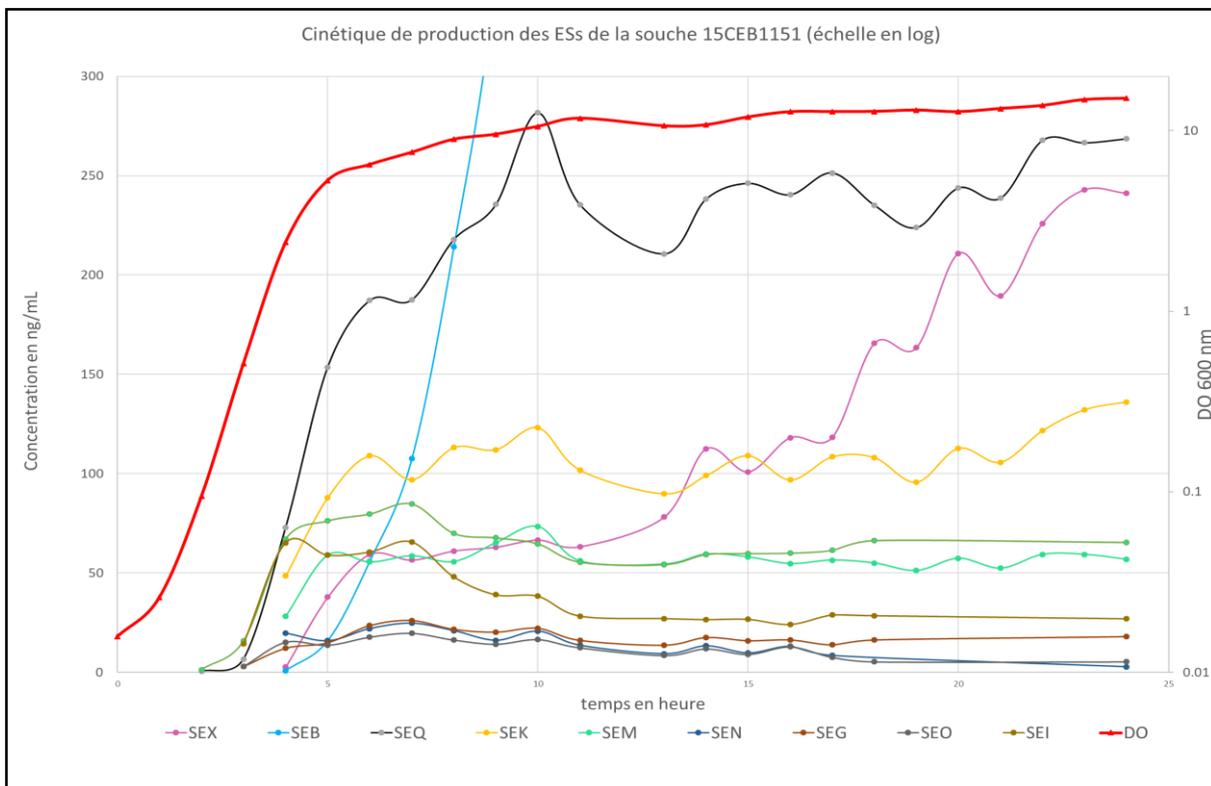


Figure 71 Zoom Cinétique de production des ESs par la souche 15SBCL1151

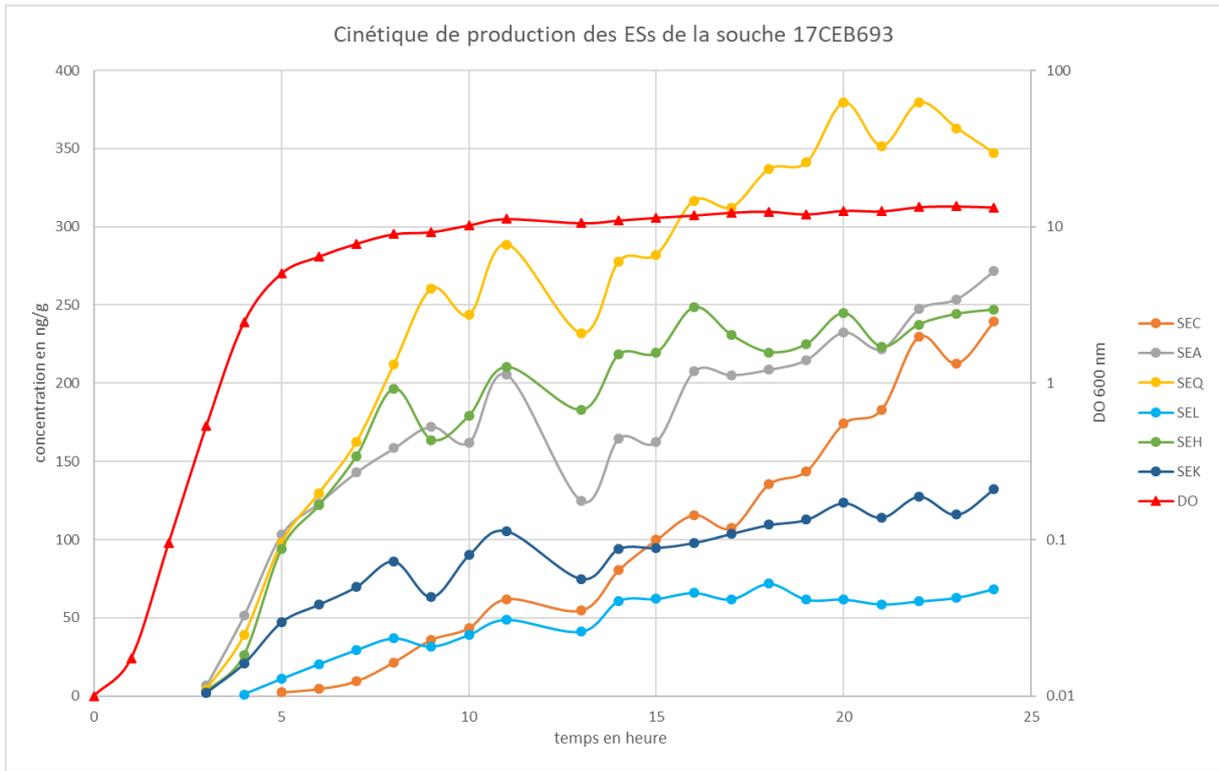


Figure 72 Cinétique de production des ESs par la souche 17SBCL693

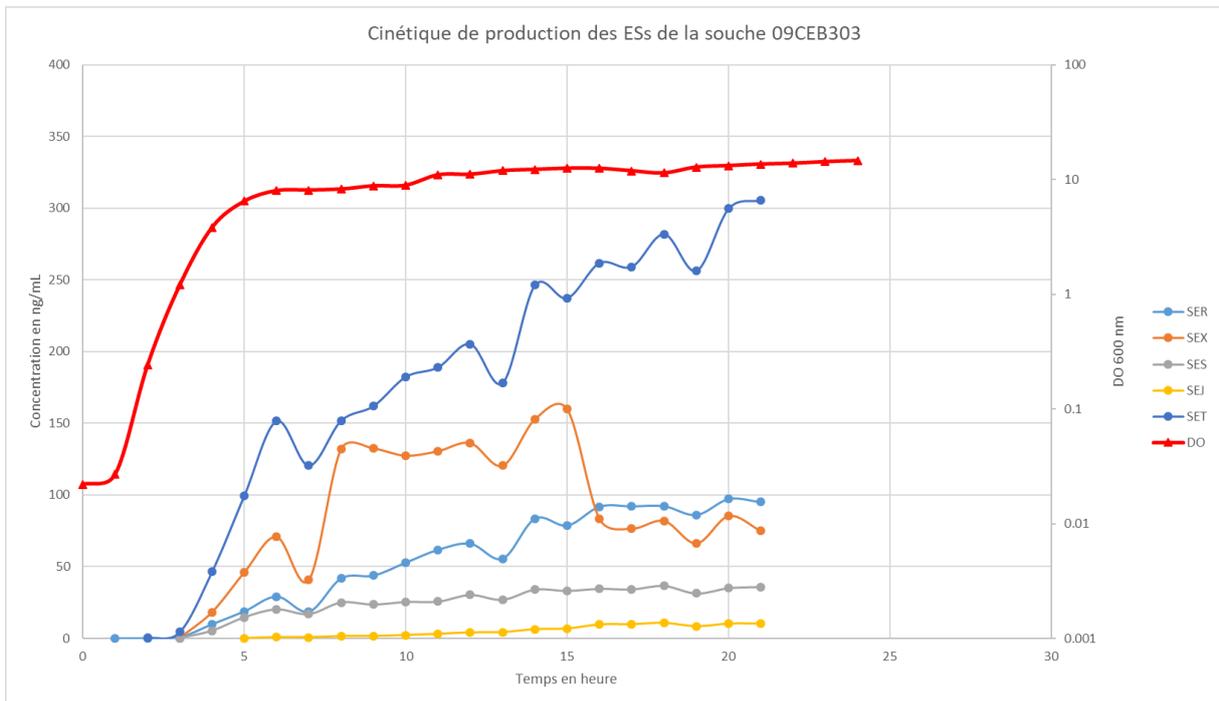


Figure 73 Cinétique de production des ESs par la souche 09CEB303

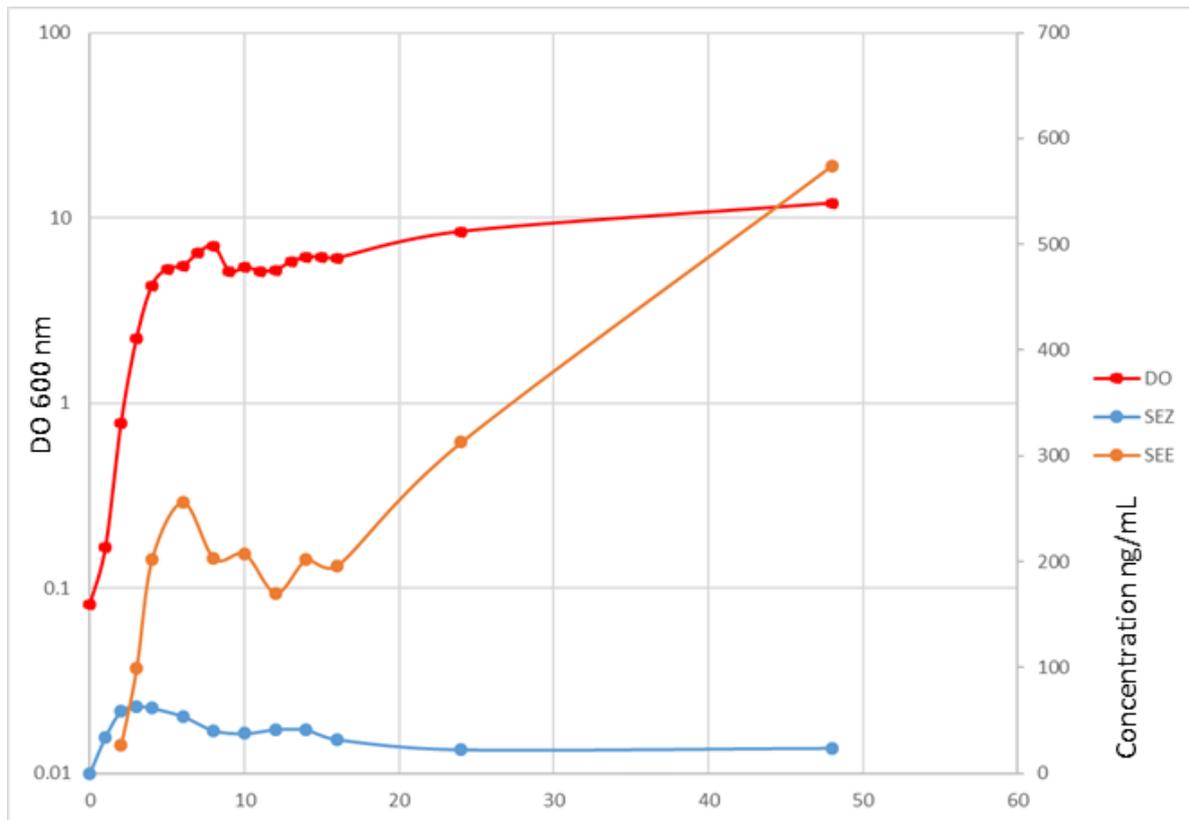


Figure 74 Cinétique de production des ESs par la souche 46A

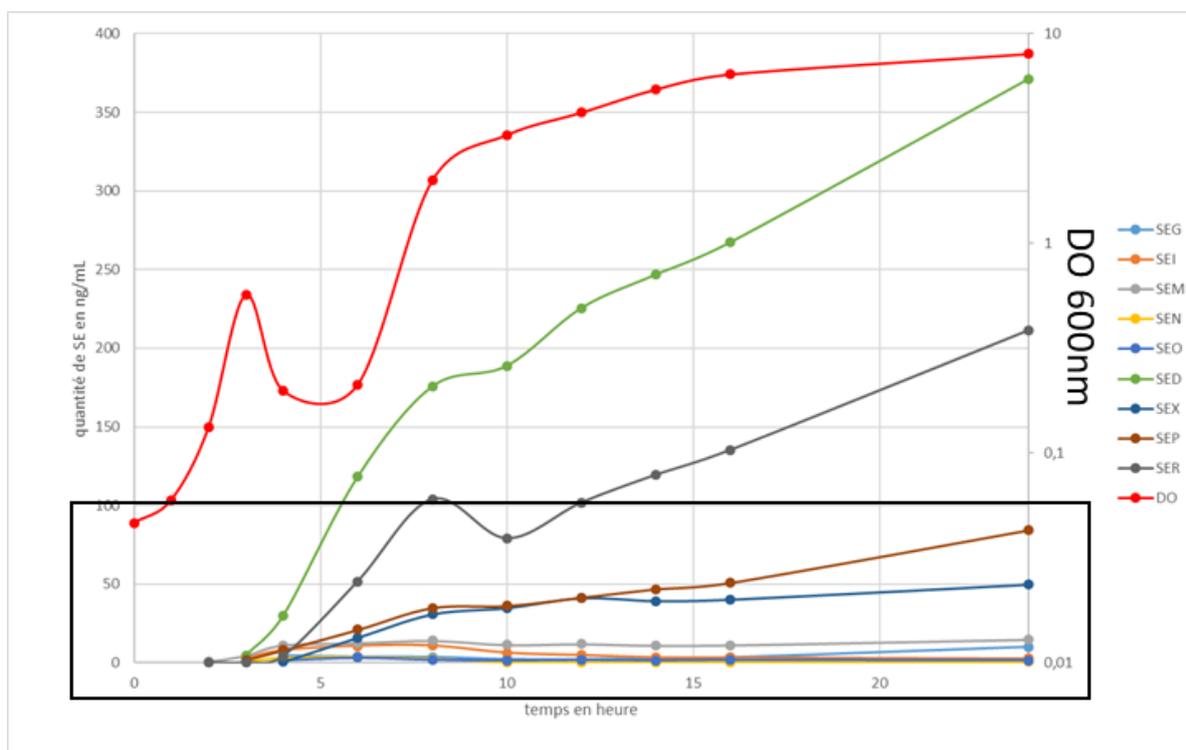


Figure 75 Cinétique de production des ESs par la souche 18SBCL855

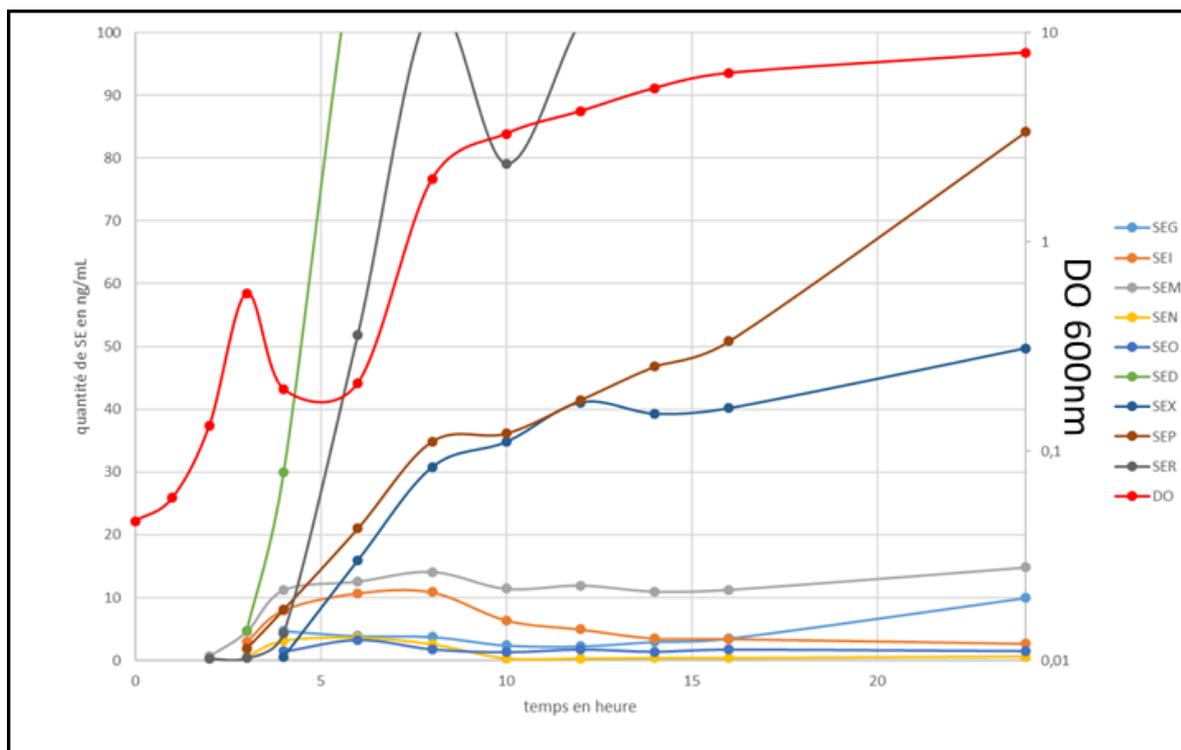


Figure 76 Zoom cinétique de production des ESs par la souche 18SBCL855

# Références

- (1) Dack, G. M. Food Poisoning. pp. 109–116. *University of Chicago Press, Chicago, IL.* 1956.
- (2) Barber, M. A. Milk Poisoning Due to a Type of Staphylococcus Albus Occurring in the Udder of a Healthy Cow. *Philippine J. Sci., Sect. B. (Trop. Med.)* 9, 515–519. 1914.
- (3) Baerthlein, K. Ueber: Uogcdehnte Wurstvergiftungen, Bedingt Durch Bacillus Proteus Vulgaris. *Munch Med Wochenschr*69: 155–156. 1922.
- (4) Dack, G. M.; Gary, W. E.; Woolpert, O.; Wiggers, H. An Outbreak of Food Poisoning Proved to Be Due to a Yellow Hemolytic Staphylococcus. *J. Prev. Med.* **1930**, 4, 167–175.
- (5) Casman, E. P. CULTURE MEDIUM FOR THE PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A. *Journal of Bacteriology.* 1963.
- (6) Bergdoll, M. S.; Borja, C. R.; Avena, R. M. Identification of a New Enterotoxin as Enterotoxin C. *J. Bacteriol.* **1965**, 90 (5), 1481–1485. <https://doi.org/10.1128/jb.90.5.1481-1485.1965>.
- (7) Casman, E. P.; Bennett, R. W.; Dorsey, A. E.; Issa, J. A. Identification of a Fourth Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin D. *J. Bacteriol.* **1967**, 94 (6), 1875–1882. <https://doi.org/10.1128/jb.94.6.1875-1882.1967>.
- (8) Bergdoll, M. S.; Borja, C. R.; Robbins, R. N.; Weiss, K. F. Identification of Enterotoxin E. *Infect. Immun.* **1971**, 4 (5), 593–595. <https://doi.org/10.1128/iai.4.5.593-595.1971>.
- (9) Munson, S. H.; Tremaine, M. T.; Betley, M. J.; Welch, R. A. Identification and Characterization of Staphylococcal Enterotoxin Types G and I from Staphylococcus Aureus. *Infect. Immun.* **1998**, 66 (7), 3337–3348.
- (10) Ren, K.; Bannan, J. D.; Pancholi, V.; Cheung, A. L.; Robbins, J. C.; Fischetti, V. A.; Zabriskie, J. B. Characterization and Biological Properties of a New Staphylococcal Exotoxin. *J. Exp. Med.* **1994**, 180 (5), 1675–1683. <https://doi.org/10.1084/jem.180.5.1675>.
- (11) Su, Y.-C.; Lee Wong, A. C. Detection of Staphylococcal Enterotoxin H by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Food Prot.* **1996**, 59 (3), 327–330. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.3.327>.
- (12) Zhang, S.; Iandolo, J. J.; Stewart, G. C. The Enterotoxin D Plasmid of Staphylococcus Aureus Encodes a Second Enterotoxin Determinant (Sej). *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, 168 (2), 227–233. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13278.x>.
- (13) Jarraud, S.; Peyrat, M. A.; Lim, A.; Tristan, A.; Bes, M.; Mougel, C.; Etienne, J.; Vandenesch, F.; Bonneville, M.; Lina, G. Egc, A Highly Prevalent Operon of Enterotoxin Gene, Forms a Putative Nursery of Superantigens in Staphylococcus Aureus. *J. Immunol.* **2001**, 166 (1), 669–677. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.669>.
- (14) Orwin, P. M.; Leung, D. Y. M.; Donahue, H. L.; Novick, R. P.; Schlievert, P. M. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. *Infect. Immun.* **2001**, 69 (1), 360–366. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.360-366.2001>.
- (15) Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.; Nagai, Y.; Lian, J.; Ito, T.; Kanamori, M.; Matsumaru, H.; Maruyama, A.; Murakami, H.; Hosoyama, A.; Mizutani-Ui, Y.; Takahashi, N. K.; Sawano, T.; Inoue, R.; Kaito, C.; Sekimizu, K.; Hirakawa, H.; Kuhara, S.; Goto, S.; Yabuzaki, J.; Kanehisa, M.; Yamashita, A.; Oshima, K.; Furuya, K.; Yoshino, C.; Shiba, T.; Hattori, M.; Ogasawara, N.; Hayashi, H.; Hiramatsu, K. Whole Genome Sequencing of Meticillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *The Lancet* **2001**, 357 (9264), 1225–1240. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04403-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04403-2).
- (16) Jarraud, S.; Mougel, C.; Thioulouse, J.; Lina, G.; Meugnier, H.; Forey, F.; Nesme, X.; Etienne, J.; Vandenesch, F. Relationships between Staphylococcus Aureus Genetic Background, Virulence Factors, Agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect. Immun.* **2002**, 70 (2), 631–641. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.631-641.2002>.
- (17) Omoe, K.; Hu, D.-L.; Takahashi-Omoe, H.; Nakane, A.; Shinagawa, K. Identification and Characterization of a New Staphylococcal Enterotoxin-Related Putative Toxin Encoded

- by Two Kinds of Plasmids. *Infect. Immun.* **2003**, *71* (10), 6088–6094.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.6088-6094.2003>.
- (18) Ono, H. K.; Omoe, K.; Imanishi, K.; Iwakabe, Y.; Hu, D.-L.; Kato, H.; Saito, N.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K. Identification and Characterization of Two Novel Staphylococcal Enterotoxins, Types S and T. *Infect. Immun.* **2008**, *76* (11), 4999–5005.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00045-08>.
- (19) Letertre, C.; Perelle, S.; Dilasser, F.; Fach, P. Identification of a New Putative Enterotoxin SEU Encoded by the Egc Cluster of Staphylococcus Aureus. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95* (1), 38–43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01957.x>.
- (20) Thomas, D. Y.; Jarraud, S.; Lemercier, B.; Cozon, G.; Echasserieau, K.; Etienne, J.; Gougeon, M.-L.; Lina, G.; Vandenesch, F. Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins U2 and V, Two New Staphylococcal Superantigens Arising from Recombination within the Enterotoxin Gene Cluster. *Infect. Immun.* **2006**, *74* (8), 4724–4734.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00132-06>.
- (21) Argudín, M. Á.; Mendoza, M. C.; Rodicio, M. R. Food Poisoning and Staphylococcus Aureus Enterotoxins. *Toxins* **2010**, *2* (7), 1751–1773. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>.
- (22) Wilson, G. J.; Seo, K. S.; Cartwright, R. A.; Connelley, T.; Chuang-Smith, O. N.; Merriman, J. A.; Guinane, C. M.; Park, J. Y.; Bohach, G. A.; Schlievert, P. M.; Morrison, W. I.; Fitzgerald, J. R. A Novel Core Genome-Encoded Superantigen Contributes to Lethality of Community-Associated MRSA Necrotizing Pneumonia. *PLOS Pathog.* **2011**, *7* (10), e1002271. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002271>.
- (23) Ono, H. K.; Sato'o, Y.; Narita, K.; Naito, I.; Hirose, S.; Hisatsune, J.; Asano, K.; Hu, D.-L.; Omoe, K.; Sugai, M.; Nakane, A. Identification and Characterization of a Novel Staphylococcal Emetic Toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (20), 7034–7040.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01873-15>.
- (24) Spoor, L. E.; Richardson, E.; Richards, A. C.; Wilson, G. J.; Mendonca, C.; Gupta, R. Kr.; McAdam, P. R.; Nutbeam-Tuffs, S.; Black, N. S.; O'Gara, J. P.; Lee, C. Y.; Corander, J.; Ross Fitzgerald, J. Recombination-Mediated Remodelling of Host–Pathogen Interactions during Staphylococcus Aureus Niche Adaptation. *Microb. Genomics* **2015**, *1* (4), e000036.  
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000036>.
- (25) Hisatsune, J.; Hagiya, H.; Shiota, S.; Sugai, M. Complete Genome Sequence of Systemically Disseminated Sequence Type 8 Staphylococcal Cassette Chromosome Mec Type IVI Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Genome Announc.* **2017**, *5* (35), e00852-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00852-17>.
- (26) Zhang, D.-F.; Yang, X.-Y.; Zhang, J.; Qin, X.; Huang, X.; Cui, Y.; Zhou, M.; Shi, C.; French, N. P.; Shi, X. Identification and Characterization of Two Novel Superantigens among Staphylococcus Aureus Complex. *Int. J. Med. Microbiol.* **2018**, *308* (4), 438–446.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.03.002>.
- (27) Suzuki, Y.; Ono, H. K.; Shimojima, Y.; Kubota, H.; Kato, R.; Kakuda, T.; Hirose, S.; Hu, D.-L.; Nakane, A.; Takai, S.; Sadamasu, K. A Novel Staphylococcal Enterotoxin SE02 Involved in a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak That Occurred in Tokyo in 2004. *Food Microbiol.* **2020**, *92*, 103588. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103588>.
- (28) Dicks, J.; Turnbull, J. D.; Russell, J.; Parkhill, J.; Alexander, S. Genome Sequencing of a Historic Staphylococcus Aureus Collection Reveals New Enterotoxin Genes and Sheds Light on the Evolution and Genomic Organization of This Key Virulence Gene Family. *J. Bacteriol.* **2021**, *203* (10), e00587-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00587-20>.
- (29) Bergdoll, Merlin S.; Reiser, Raoul F.; Crass, Barbara A.; Robbins, Ruth N.; Davis, Jeffrey P. A NEW STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN, ENTEROTOXIN F, ASSOCIATED WITH TOXIC-SHOCK-SYNDROME STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATES. *The Lancet* **1981**, *317* (8228), 1017–1021. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)92186-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)92186-3).
- (30) Collery, M. M.; Smyth, C. J. Y. 2007. Rapid Differentiation of Staphylococcus Aureus

- Isolates Harbouring Egg Loci with Pseudogenes  $\Psi$ ent1 and  $\Psi$ ent2 and the Selu or Seluv Gene Using PCR-RFLP. *J. Med. Microbiol.* **2007**, *56* (2), 208–216.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.46948-0>.
- (31) Greenfield, R. A.; Slater, L. N.; Bronze, M. S.; Brown, B. R.; Jackson, R.; Iandolo, J. J.; Hutchins, J. B. Microbiological, Biological, and Chemical Weapons of Warfare and Terrorism. *Am. J. Med. Sci.* **2002**, *323* (6), 326–340. <https://doi.org/10.1097/00000441-200206000-00005>.
- (32) *Article L. 5139-1 Du Code de La Santé Publique.*
- (33) Asao, T.; Kumeda, Y.; Kawai, T.; Shibata, T.; Oda, H.; Haruki, K.; Nakazawa, H.; Kozaki, S. An Extensive Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Due to Low-Fat Milk in Japan: Estimation of Enterotoxin A in the Incriminated Milk and Powdered Skim Milk. *Epidemiol. Infect.* **2003**, *130* (1), 33. <https://doi.org/10.1017/s0950268802007951>.
- (34) Evenson, M. L.; Ward Hinds, M.; Bernstein, R. S.; Bergdoll, M. S. Estimation of Human Dose of Staphylococcal Enterotoxin A from a Large Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Involving Chocolate Milk. *Int. J. Food Microbiol.* **1988**, *7* (4), 311–316. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90057-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90057-8).
- (35) Ostyn, A.; Buysier, M. L. D.; Guillier, F.; Groult, J.; Félix, B.; Salah, S.; Delmas, G.; Hennekinne, J. A. First Evidence of a Food Poisoning Outbreak Due to Staphylococcal Enterotoxin Type E, France, 2009. *Eurosurveillance* **2010**, *15* (13), 19528. <https://doi.org/10.2807/es.e15.13.19528-en>.
- (36) Merda, D.; Felten, A.; Vingadassalon, N.; Denayer, S.; Titouche, Y.; Decastelli, L.; Hickey, B.; Kourtis, C.; Daskalov, H.; Mistou, M.-Y.; Hennekinne, J.-A. NAuRA: Genomic Tool to Identify Staphylococcal Enterotoxins in Staphylococcus Aureus Strains Responsible for FoodBorne Outbreaks. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01483>.
- (37) Rasooly, R.; Do, P.; He, X.; Hernlem, B. Human Leukemia T-Cell Lines as Alternatives to Animal Use for Detecting Biologically Active Staphylococcal Enterotoxin Type B. *Toxins* **2021**, *13* (5), 300. <https://doi.org/10.3390/toxins13050300>.
- (38) Hou, F.; Peng, L.; Jiang, J.; Chen, T.; Xu, D.; Huang, Q.; Ye, C.; Peng, Y.; Hu, D.-L.; Fang, R. ATP Facilitates Staphylococcal Enterotoxin O Induced Neutrophil IL-1 $\beta$  Secretion via NLRP3 Inflammasome Dependent Pathways. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 1640. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.649235>.
- (39) Bergdoll, M. S. [45] Monkey Feeding Test for Staphylococcal Enterotoxin. In *Methods in Enzymology*; Microbial Toxins: Tools in Enzymology; Academic Press, 1988; Vol. 165, pp 324–333. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(88\)65048-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(88)65048-8).
- (40) Ono, H. K.; Hirose, S.; Naito, I.; Sato'o, Y.; Asano, K.; Hu, D.-L.; Omoe, K.; Nakane, A. The Emetic Activity of Staphylococcal Enterotoxins, SEK, SEL, SEM, SEN and SEO in a Small Emetic Animal Model, the House Musk Shrew. *Microbiol. Immunol.* **2017**, *61* (1), 12–16. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12460>.
- (41) Omoe, K.; Hu, D.-L.; Ono, H. K.; Shimizu, S.; Takahashi-Omoe, H.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K.; Imanishi, K. Emetic Potentials of Newly Identified Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins. *Infect. Immun.* **2013**, *81* (10), 3627–3631. <https://doi.org/10.1128/IAI.00550-13>.
- (42) Ono, H. K.; Hirose, S.; Narita, K.; Sugiyama, M.; Asano, K.; Hu, D.-L.; Nakane, A. Histamine Release from Intestinal Mast Cells Induced by Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) Evokes Vomiting Reflex in Common Marmoset. *PLOS Pathog.* **2019**, *15* (5), e1007803. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007803>.
- (43) Sugiyama, H.; Hayama, T. Comparative Resistance of Vagotomized Monkeys to Intravenous vs. Intra-gastric Staphylococcal Enterotoxin Challenges. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1964**, *115* (1), 243–246. <https://doi.org/10.3181/00379727-115-28881>.
- (44) Sugiyama, H.; Hayama, T. Abdominal Viscera as Site of Emetic Action for Staphylococcal Enterotoxin in the Monkey. *J. Infect. Dis.* **1965**, *115* (4), 330–336.

- (45) Chieffi, D.; Fanelli, F.; Cho, G.-S.; Schubert, J.; Blaiotta, G.; Franz, C. M. A. P.; Bania, J.; Fusco, V. Novel Insights into the Enterotoxigenic Potential and Genomic Background of *Staphylococcus Aureus* Isolated from Raw Milk. *Food Microbiol.* **2020**, *90*, 103482. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103482>.
- (46) Rasetti-Escargueil, C.; Lemichez, E.; Popoff, M. R. Variability of Botulinum Toxins: Challenges and Opportunities for the Future. *Toxins* **2018**, *10* (9), 374. <https://doi.org/10.3390/toxins10090374>.
- (47) Raphael, B. H.; Bradshaw, M.; Kalb, S. R.; Joseph, L. A.; Lúquez, C.; Barr, J. R.; Johnson, E. A.; Maslanka, S. E. Clostridium Botulinum Strains Producing BoNT/F4 or BoNT/F5. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80* (10), 3250–3257. <https://doi.org/10.1128/AEM.00284-14>.
- (48) Kozaki, S.; Dufrenne, J.; Hagenaaars, A. M.; Notermans, S. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa) for Detection of Clostridium Botulinum Type B Toxin. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **1979**, *32* (4), 199–205. <https://doi.org/10.7883/yoken1952.32.199>.
- (49) Thomas, R. Detection of Clostridium Botulinum Types C and D Toxin by ELISA. *Aust. Vet. J.* **1991**, *68* (3), 111–113. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1991.tb00769.x>.
- (50) Fitzgerald, J. R.; Reid, S. D.; Ruotsalainen, E.; Tripp, T. J.; Liu, M.; Cole, R.; Kuusela, P.; Schlievert, P. M.; Järvinen, A.; Musser, J. M. Genome Diversification in *Staphylococcus Aureus*: Molecular Evolution of a Highly Variable Chromosomal Region Encoding the Staphylococcal Exotoxin-Like Family of Proteins. *Infect. Immun.* **2003**, *71* (5), 2827–2838. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2827-2838.2003>.
- (51) Spaulding, A. R.; Salgado-Pabón, W.; Kohler, P. L.; Horswill, A. R.; Leung, D. Y. M.; Schlievert, P. M. Staphylococcal and Streptococcal Superantigen Exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26* (3), 422–447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-12>.
- (52) Hovde, C. J.; Marr, J. C.; Hoffmann, M. L.; Hackett, S. P.; Chi, Y.; Crum, K. K.; Stevens, D. L.; Stauffacher, C. V.; Bohach, G. A. Investigation of the Role of the Disulphide Bond in the Activity and Structure of Staphylococcal Enterotoxin C1. *Mol. Microbiol.* **1994**, *13* (5), 897–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00481.x>.
- (53) Günther, S.; Varma, A. K.; Moza, B.; Kasper, K. J.; Wyatt, A. W.; Zhu, P.; Rahman, A. K. M. N.; Li, Y.; Mariuzza, R. A.; McCormick, J. K.; Sundberg, E. J. A Novel Loop Domain in Superantigens Extends Their T Cell Receptor Recognition Site. *J. Mol. Biol.* **2007**, *371* (1), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.038>.
- (54) Orwin, P. M.; Leung, D. Y. M.; Tripp, T. J.; Bohach, G. A.; Earhart, C. A.; Ohlendorf, D. H.; Schlievert, P. M. Characterization of a Novel Staphylococcal Enterotoxin-like Superantigen, a Member of the Group V Subfamily of Pyrogenic Toxins. *Biochemistry* **2002**, *41* (47), 14033–14040. <https://doi.org/10.1021/bi025977q>.
- (55) Orwin, P. M.; Fitzgerald, J. R.; Leung, D. Y. M.; Gutierrez, J. A.; Bohach, G. A.; Schlievert, P. M. Characterization of *Staphylococcus Aureus* Enterotoxin L. *Infect. Immun.* **2003**, *71* (5), 2916–2919. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2916-2919.2003>.
- (56) Hu, D.-L.; Li, S.; Fang, R.; Ono, H. K. Update on Molecular Diversity and Multipathogenicity of Staphylococcal Superantigen Toxins. *Anim. Dis.* **2021**, *1* (1), 7. <https://doi.org/10.1186/s44149-021-00007-7>.
- (57) Tatini, S. R. Thermal Stability of Enterotoxins in Food. *J. Milk Food Technol.* **1976**, *39* (6), 432–438. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-39.6.432>.
- (58) Schad, E. M. Crystal Structure of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin Type A. *EMBO J.* **1995**, *14* (14), 3292–3301. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07336.x>.
- (59) Papageorgiou, A. C.; Tranter, H. S.; Acharya, K. R. Crystal Structure of Microbial Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B at 1.5 Å Resolution: Implications for Superantigen Recognition by MHC Class II Molecules and T-Cell Receptors 1 Edited by R. Huber. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277* (1), 61–79. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1577>.
- (60) Swaminathan, S.; Furey, W.; Pletcher, J.; Sax, M. Preliminary X-Ray Studies on Two New Crystal Forms of Staphylococcal Enterotoxin C2. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*

- 1995, 51 (6), 1080–1081. <https://doi.org/10.1107/S09074444995003180>.
- (61) Chi, Y.-I.; Sadler, I.; Jablonski, L. M.; Callantine, S. D.; Deobald, C. F.; Stauffacher, C. V.; Bohach, G. A. Zinc-Mediated Dimerization and Its Effect on Activity and Conformation of Staphylococcal Enterotoxin Type C \*. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (25), 22839–22846. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201932200>.
- (62) Fernández, M. M.; Cho, S.; Marzi, M. C. D.; Kerzic, M. C.; Robinson, H.; Mariuzza, R. A.; Malchiodi, E. L. Crystal Structure of Staphylococcal Enterotoxin G (SEG) in Complex with a Mouse T-Cell Receptor  $\beta$  Chain \*. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (2), 1189–1195. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.142471>.
- (63) Håkansson, M.; Petersson, K.; Nilsson, H.; Forsberg, G.; Björk, P.; Antonsson, P.; Svensson, L. A. The Crystal Structure of Staphylococcal Enterotoxin H: Implications for Binding Properties to MHC Class II and TcR Molecules 11 Edited by I. Wilson. *J. Mol. Biol.* **2000**, 302 (3), 527–537. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4093>.
- (64) Fernández, M. M.; Guan, R.; Swaminathan, C. P.; Malchiodi, E. L.; Mariuzza, R. A. Crystal Structure of Staphylococcal Enterotoxin I (SEI) in Complex with a Human Major Histocompatibility Complex Class II Molecule \*. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (35), 25356–25364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603969200>.
- (65) Hennekinne, J.-A.; De Buyser, M.-L.; Dragacci, S. Staphylococcus Aureus and Its Food Poisoning Toxins: Characterization and Outbreak Investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, 36 (4), 815–836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>.
- (66) Betley, M. J.; Mekalanos, J. J. Staphylococcal Enterotoxin A Is Encoded by Phage. *Science* **1985**, 229 (4709), 185–187. <https://doi.org/10.1126/science.3160112>.
- (67) Borst, D. W.; Betley, M. J. Phage-Associated Differences in Staphylococcal Enterotoxin A Gene (Sea) Expression Correlate with Sea Allele Class. *Infect. Immun.* **1994**, 62 (1), 113–118. <https://doi.org/10.1128/iai.62.1.113-118.1994>.
- (68) Jones, C. L.; Khan, S. A. Nucleotide Sequence of the Enterotoxin B Gene from Staphylococcus Aureus. *J. Bacteriol.* **1986**, 166 (1), 29–33. <https://doi.org/10.1128/jb.166.1.29-33.1986>.
- (69) Shafer, W. M.; Iandolo, J. J. Chromosomal Locus for Staphylococcal Enterotoxin B. *Infect. Immun.* **1978**, 20 (1), 273–278. <https://doi.org/10.1128/iai.20.1.273-278.1978>.
- (70) Shalita, Z.; Hertman, I.; Sarid, S. Isolation and Characterization of a Plasmid Involved with Enterotoxin B Production in Staphylococcus Aureus. *J. Bacteriol.* **1977**, 129 (1), 317–325. <https://doi.org/10.1128/jb.129.1.317-325.1977>.
- (71) Altboum, Z.; Hertman, I.; Sarid, S. Penicillinase Plasmid-Linked Genetic Determinants for Enterotoxins B and C1 Production in Staphylococcus Aureus. *Infect. Immun.* **1985**, 47 (2), 514–521. <https://doi.org/10.1128/iai.47.2.514-521.1985>.
- (72) Bohach, G. A.; Schlievert, P. M. Nucleotide Sequence of the Staphylococcal Enterotoxin C1 Gene and Relatedness to Other Pyrogenic Toxins. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1987**, 209 (1), 15–20. <https://doi.org/10.1007/BF00329830>.
- (73) Hovde, C. J.; Hackett, S. P.; Bohach, G. A. Nucleotide Sequence of the Staphylococcal Enterotoxin C3 Gene Sequence Comparison of All Three Type C Staphylococcal Enterotoxins. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1990**, 220 (2), 329–333. <https://doi.org/10.1007/BF00260504>.
- (74) Fitzgerald, J. R.; Monday, S. R.; Foster, T. J.; Bohach, G. A.; Hartigan, P. J.; Meaney, W. J.; Smyth, C. J. Characterization of a Putative Pathogenicity Island from Bovine Staphylococcus Aureus Encoding Multiple Superantigens. *J. Bacteriol.* **2001**, 183 (1), 63–70. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.63-70.2001>.
- (75) Chang, H.-C.; Bergdoll, M. S. Purification and Some Physicochemical Properties of Staphylococcal Enterotoxin D. *Biochemistry* **1979**, 18 (10), 1937–1942. <https://doi.org/10.1021/bi00577a013>.
- (76) Bayles, K. W.; Iandolo, J. J. Genetic and Molecular Analyses of the Gene Encoding Staphylococcal Enterotoxin D. *J. Bacteriol.* **1989**, 171 (9), 4799–4806.

- <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.4799-4806.1989>.
- (77) Couch, J. L.; Soltis, M. T.; Betley, M. J. Cloning and Nucleotide Sequence of the Type E Staphylococcal Enterotoxin Gene. *J. Bacteriol.* **1988**, *170* (7), 2954–2960. <https://doi.org/10.1128/jb.170.7.2954-2960.1988>.
- (78) Noto, M. J.; Archer, G. L. A Subset of Staphylococcus Aureus Strains Harboring Staphylococcal Cassette Chromosome Mec (SCCmec) Type IV Is Deficient in CcrAB-Mediated SCCmec Excision. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50* (8), 2782–2788. <https://doi.org/10.1128/AAC.00032-06>.
- (79) Omoe, K.; Imanishi, K.; Hu, D.-L.; Kato, H.; Fugane, Y.; Abe, Y.; Hamaoka, S.; Watanabe, Y.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K. Characterization of Novel Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxin Type P. *Infect. Immun.* **2005**, *73* (9), 5540–5546. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5540-5546.2005>.
- (80) Diep, B. A.; Gill, S. R.; Chang, R. F.; Phan, T. H.; Chen, J. H.; Davidson, M. G.; Lin, F.; Lin, J.; Carleton, H. A.; Mongodin, E. F.; Sensabaugh, G. F.; Perdreau-Remington, F. Complete Genome Sequence of USA300, an Epidemic Clone of Community-Acquired Meticillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *The Lancet* **2006**, *367* (9512), 731–739. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68231-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68231-7).
- (81) Haag, A. F.; Bagnoli, F. The Role of Two-Component Signal Transduction Systems in Staphylococcus Aureus Virulence Regulation. In *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*; Bagnoli, F., Rappuoli, R., Grandi, G., Eds.; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 145–198. [https://doi.org/10.1007/82\\_2015\\_5019](https://doi.org/10.1007/82_2015_5019).
- (82) Fisher, E. L.; Otto, M.; Cheung, G. Y. C. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 436. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00436>.
- (83) Cao, R.; Zeaki, N.; Wallin-Carlquist, N.; Skandamis, P. N.; Schelin, J.; Rådström, P. Elevated Enterotoxin A Expression and Formation in Staphylococcus Aureus and Its Association with Prophage Induction. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78* (14), 4942–4948. <https://doi.org/10.1128/AEM.00803-12>.
- (84) Zeaki, N.; Budi Susilo, Y.; Pregiel, A.; Rådström, P.; Schelin, J. Prophage-Encoded Staphylococcal Enterotoxin A: Regulation of Production in Staphylococcus Aureus Strains Representing Different Sea Regions. *Toxins* **2015**, *7* (12), 5359–5376. <https://doi.org/10.3390/toxins7124889>.
- (85) Goerke, C.; Pantucek, R.; Holtfreter, S.; Schulte, B.; Zink, M.; Grumann, D.; Bröker, B. M.; Doskar, J.; Wolz, C. Diversity of Prophages in Dominant Staphylococcus Aureus Clonal Lineages. *J. Bacteriol.* **2009**, *191* (11), 3462–3468. <https://doi.org/10.1128/JB.01804-08>.
- (86) KORNBLUM, J. Agr : A Polycistronic Locus Regulating Exoprotein Synthesis in Staphylococcus Aureus. *Mol. Biol. Staphylococci* **1990**, 373–402.
- (87) Cheung, A. L.; Koomey, J. M.; Butler, C. A.; Projan, S. J.; Fischetti, V. A. Regulation of Exoprotein Expression in Staphylococcus Aureus by a Locus (Sar) Distinct from Agr. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (14), 6462–6466. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6462>.
- (88) Novick, R. P.; Schlievert, P.; Ruzin, A. Pathogenicity and Resistance Islands of Staphylococci. *Microbes Infect.* **2001**, *3* (7), 585–594. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01414-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01414-9).
- (89) Tremaine, M. T.; Brockman, D. K.; Betley, M. J. Staphylococcal Enterotoxin A Gene (Sea) Expression Is Not Affected by the Accessory Gene Regulator (Agr). *Infect. Immun.* **1993**, *61* (1), 356–359. <https://doi.org/10.1128/iai.61.1.356-359.1993>.
- (90) Vojtov, N.; Ross, H. F.; Novick, R. P. Global Repression of Exotoxin Synthesis by Staphylococcal Superantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (15), 10102–10107. <https://doi.org/10.1073/pnas.152152499>.
- (91) Kusch, K.; Hanke, K.; Holtfreter, S.; Schmutte, M.; Kohler, C.; Erck, C.; Wehland,

- J.; Hecker, M.; Ohlsen, K.; Bröker, B.; Engelmann, S. The Influence of SaeRS and  $\Sigma$ B on the Expression of Superantigens in Different Staphylococcus Aureus Isolates. *Int. J. Med. Microbiol.* **2011**, *301* (6), 488–499. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.01.003>.
- (92) Sato'o, Y.; Hisatsune, J.; Nagasako, Y.; Ono, H. K.; Omoe, K.; Sugai, M. Positive Regulation of Staphylococcal Enterotoxin H by Rot (Repressor of Toxin) Protein and Its Importance in Clonal Complex 81 Subtype 1 Lineage-Related Food Poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (22), 7782–7790. <https://doi.org/10.1128/AEM.01936-15>.
- (93) Langley, R. J.; Ting, Y. T.; Clow, F.; Young, P. G.; Radcliff, F. J.; Choi, J. M.; Sequeira, R. P.; Holtfreter, S.; Baker, H.; Fraser, J. D. Staphylococcal Enterotoxin-like X (SEIX) Is a Unique Superantigen with Functional Features of Two Major Families of Staphylococcal Virulence Factors. *PLOS Pathog.* **2017**, *13* (9), e1006549. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006549>.
- (94) Grispoldi, L.; Karama, M.; Armani, A.; Hadjicharalambous, C.; Cenci-Goga, B. T. Staphylococcus Aureus Enterotoxin in Food of Animal Origin and Staphylococcal Food Poisoning Risk Assessment from Farm to Table. *Ital. J. Anim. Sci.* **2021**, *20* (1), 677–690. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1871428>.
- (95) Derzelle, S.; Dilasser, F.; Duquenne, M.; Deperrois, V. Differential Temporal Expression of the Staphylococcal Enterotoxins Genes during Cell Growth. *Food Microbiol.* **2009**, *26* (8), 896–904. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.06.007>.
- (96) Lin, L.; Chen, M.; Ou, J.; Yan, W. Kinetics of Staphylococcus Aureus Growth and Enterotoxin A Production in Milk under Shaking and Static Conditions. *Food Res. Int.* **2021**, *143*, 110298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110298>.
- (97) Hu, D.-L.; Omoe, K.; Shimoda, Y.; Nakane, A.; Shinagawa, K. Induction of Emetic Response to Staphylococcal Enterotoxins in the House Musk Shrew (*Suncus Murinus*). *Infect. Immun.* **2003**, *71* (1), 567–570. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.567-570.2003>.
- (98) Danielsen, E. M.; Hansen, G. H.; Karlsdóttir, E. Staphylococcus Aureus Enterotoxins A– and B: Binding to the Enterocyte Brush Border and Uptake by Perturbation of the Apical Endocytic Membrane Traffic. *Histochem. Cell Biol.* **2013**, *139* (4), 513–524. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1055-8>.
- (99) Fields, B. A.; Malchiodi, E. L.; Li, H.; Ysern, X.; Stauffacher, C. V.; Schlievert, P. M.; Karjalainen, K.; Mariuzza, R. A. Crystal Structure of a T-Cell Receptor  $\beta$ -Chain Complexed with a Superantigen. *Nature* **1996**, *384* (6605), 188–192. <https://doi.org/10.1038/384188a0>.
- (100) Jardetzky, T. S.; Brown, J. H.; Gorga, J. C.; Stern, L. J.; Urban, R. G.; Chi, Y.; Stauffacher, C.; Strominger, J. L.; Wiley, D. C. Three-Dimensional Structure of a Human Class II Histocompatibility Molecule Complexed with Superantigen. *Nature* **1994**, *368* (6473), 711–718. <https://doi.org/10.1038/368711a0>.
- (101) Seth, A.; Stern, L. J.; Ottenhoff, T. H. M.; Engel, I.; Owen, M. J.; Lamb, J. R.; Klausner, R. D.; Wiley, D. C. Binary and Ternary Complexes between T-Cell Receptor, Class II MHC and Superantigen in Vitro. *Nature* **1994**, *369* (6478), 324–327. <https://doi.org/10.1038/369324a0>.
- (102) Swaminathan, S.; Furey, W.; Pletcher, J.; Sax, M. Crystal Structure of Staphylococcal Enterotoxin B, a Superantigen. *Nature* **1992**, *359* (6398), 801–806. <https://doi.org/10.1038/359801a0>.
- (103) Fink, P. J.; Matis, L. A.; McElligott, D. L.; Bookman, M.; Hedrick, S. M. Correlations between T-Cell Specificity and the Structure of the Antigen Receptor. *Nature* **1986**, *321* (6067), 219–226. <https://doi.org/10.1038/321219a0>.
- (104) Tatini, S. R. INFLUENCE OF FOOD ENVIRONMENTS ON GROWTH OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND PRODUCTION OF VARIOUS ENTEROTOXINS1. *J. Milk Food Technol.* **1973**, *36* (11), 559–563. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-36.11.559>.
- (105) Le Loir, Y.; Baron, F.; Gautier, M. [I]Staphylococcus Aureus[i] and Food Poisoning. *Genet. Mol. Res. GMR* **2003**, *2* (1), 63–76.
- (106) Genigeorgis, C. A. Present State of Knowledge on Staphylococcal Intoxication. *Int. J.*

- Food Microbiol.* **1989**, 9 (4), 327–360. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90100-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90100-1).
- (107) Authority, E. F. S.; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2021**, 19 (2), e06406. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.
- (108) De Buyser, M.-L.; Dufour, B.; Maire, M.; Lafarge, V. Implication of Milk and Milk Products in Food-Borne Diseases in France and in Different Industrialised Countries. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, 67 (1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00443-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00443-3).
- (109) Balaban, N.; Rasooly, A. Staphylococcal Enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, 61 (1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00377-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00377-9).
- (110) Santé publique France. SURVEILLANCE DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES (TIAC). DONNÉES DE LA DÉCLARATION OBLIGATOIRE, 2019. Données de la déclaration obligatoire, 2019 / Mars 2021 / 2021.
- (111) ANGOUJARD, P. ENQUÊTE SUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DES MAMMITES DE LA VACHE LAITIÈRE PAR LES VÉTÉRINAIRES DE TERRAIN EN FRANCE EN 2015, ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT, ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT, 2015.
- (112) Bennett, S. D.; Walsh, K. A.; Gould, L. H. Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus Cereus*, *Clostridium Perfringens*, and *Staphylococcus Aureus*—United States, 1998–2008. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, 57 (3), 425–433. <https://doi.org/10.1093/cid/cit244>.
- (113) SCHARFF, R. L. Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States. *J. Food Prot.* **2012**, 75 (1), 123–131. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-058>.
- (114) Mangen, M.-J. J.; Bouwknegt, M.; Friesema, I. H. M.; Haagsma, J. A.; Kortbeek, L. M.; Tariq, L.; Wilson, M.; van Pelt, W.; Havelaar, A. H. Cost-of-Illness and Disease Burden of Food-Related Pathogens in the Netherlands, 2011. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, 196, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.022>.
- (115) Nakao, M. Mass Food Poisoning Caused by Snow Brand Dairy Products. **2000**, 9.
- (116) Böhme, K.; Morandi, S.; Cremonesi, P.; Fernández No, I. C.; Barros-Velázquez, J.; Castiglioni, B.; Brasca, M.; Cañas, B.; Calo-Mata, P. Characterization of *Staphylococcus Aureus* Strains Isolated from Italian Dairy Products by MALDI-TOF Mass Fingerprinting. *ELECTROPHORESIS* **2012**, 33 (15), 2355–2364. <https://doi.org/10.1002/elps.201100480>.
- (117) Bannerman, T. L.; Hancock, G. A.; Tenover, F. C.; Miller, J. M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a Replacement for Bacteriophage Typing of *Staphylococcus Aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, 33 (3), 551–555. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.3.551-555.1995>.
- (118) Ikeda, T.; Tamate, N.; Yamaguchi, K.; Makino, S. -i. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71 (5), 2793–2795. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2793-2795.2005>.
- (119) Vahidnia, A.; van Empel, P. J.; Costa, S.; Oud, R. T. N.; van der Straaten, T.; Blikendaal, H.; Spaargaren, J. A Misleading False-Negative Result Using *Neisseria Gonorrhoeae* Opa MGB Multiplex PCR Assay in Patient's Rectal Sample Due to Partial Mutations of the Opa Gene. *New Microbiol.* **2015**, 38 (3), 431–434.
- (120) Aung, M. S.; Urushibara, N.; Kawaguchiya, M.; Ito, M.; Habadera, S.; Kobayashi, N. Prevalence and Genetic Diversity of Staphylococcal Enterotoxin (-Like) Genes *Sel*, *Selw*, *Selx*, *Selz*, *Sel26* and *Sel27* in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Toxins* **2020**, 12 (5), 347. <https://doi.org/10.3390/toxins12050347>.
- (121) Even, S.; Charlier, C.; Nouaille, S.; Ben Zakour, N. L.; Cretenet, M.; Cousin, F. J.; Gautier, M.; Coccain-Bousquet, M.; Loubière, P.; Le Loir, Y. *Staphylococcus Aureus* Virulence Expression Is Impaired by *Lactococcus Lactis* in Mixed Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75 (13), 4459–4472. <https://doi.org/10.1128/AEM.02388-08>.
- (122) Cretenet, M.; Nouaille, S.; Thouin, J.; Rault, L.; Stenz, L.; François, P.; Hennekinne, J.-A.; Piot, M.; Maillard, M. B.; Fauquant, J.; Loubière, P.; Le Loir, Y.; Even, S.

- Staphylococcus Aureus Virulence and Metabolism Are Dramatically Affected by Lactococcus Lactis in Cheese Matrix. *Environ. Microbiol. Rep.* **2011**, 3 (3), 340–351.  
<https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00230.x>.
- (123) Hennekinne, J.-A.; Guillier, F.; Perelle, S.; Buyser, M.-L. D.; Dragacci, S.; Krys, S.; Lombard, B. Intralaboratory Validation According to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 Detection Kit for Use in Official Controls of Staphylococcal Enterotoxins in Milk Products. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, 102 (5), 1261–1272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03183.x>.
- (124) Park, C. E.; Akhtar, M.; Rayman, M. K. Evaluation of a Commercial Enzyme Immunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, D, and E in Foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60 (2), 677–681.  
<https://doi.org/10.1128/aem.60.2.677-681.1994>.
- (125) Nia, Y.; Lombard, B.; Gentil, S.; Neveux, L.; Mutel, I.; Guillier, F.; Messio, S.; Pairaud, S.; Herbin, S.; Guillier, L.; Auvray, F.; Hennekinne, J. A. Development and Validation of the Standard Method EN ISO 19020 - Microbiology of the Food Chain — Horizontal Method for the Immunoenzymatic Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foodstuffs. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, 354, 109319.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109319>.
- (126) Afshar, A.; Thomas, F. C.; Wright, P. F.; Shapiro, J. L.; Anderson, J. Comparison of Competitive ELISA, Indirect ELISA and Standard AGID Tests for Detecting Blue-Tongue Virus Antibodies in Cattle and Sheep. *Vet. Rec.* **1989**, 124 (6), 136–141.  
<https://doi.org/10.1136/vr.124.6.136>.
- (127) Hutchings, G. H.; Ferris, N. P. Indirect Sandwich ELISA for Antigen Detection of African Swine Fever Virus: Comparison of Polyclonal and Monoclonal Antibodies. *J. Virol. Methods* **2006**, 131 (2), 213–217. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.009>.
- (128) Ono, H.; Hachiya, N.; Suzuki, Y.; Naito, I.; Hirose, S.; Asano, K.; Omoe, K.; Nakane, A.; Hu, D.-L. Development of an Immunoassay for Detection of Staphylococcal Enterotoxin-Like J, A Non-Characterized Toxin. *Toxins* **2018**, 10 (11), 458.  
<https://doi.org/10.3390/toxins10110458>.
- (129) Aguilar, J. L.; Varshney, A. K.; Pechuan, X.; Dutta, K.; Nosanchuk, J. D.; Fries, B. C. Monoclonal Antibodies Protect from Staphylococcal Enterotoxin K (SEK) Induced Toxic Shock and Sepsis by USA300 Staphylococcus Aureus. *Virulence* **2017**, 8 (6), 741–750.  
<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1231295>.
- (130) Zhao, Y.; Zhu, A.; Tang, J.; Tang, C.; Chen, J. Identification and Measurement of Staphylococcal Enterotoxin M from *Staphylococcus Aureus* Isolate Associated with Staphylococcal Food Poisoning. *Lett. Appl. Microbiol.* **2017**, 65 (1), 27–34.  
<https://doi.org/10.1111/lam.12751>.
- (131) Hu, D.-L.; Ono, H. k.; Isayama, S.; Okada, R.; Okamura, M.; Lei, L. c.; Liu, Z. s.; Zhang, X.-C.; Liu, M. y.; Cui, J. c.; Nakane, A. Biological Characteristics of Staphylococcal Enterotoxin Q and Its Potential Risk for Food Poisoning. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, 122 (6), 1672–1679. <https://doi.org/10.1111/jam.13462>.
- (132) Schubert, J.; Podkowik, M.; Bystroń, J.; Bania, J. Production of Staphylococcal Enterotoxins D and R in Milk and Meat Juice by Staphylococcus Aureus Strains. *Foodborne Pathog. Dis.* **2017**, 14 (4), 223–230. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2210>.
- (133) Aziz, F.; Hisatsune, J.; Yu, L.; Kajimura, J.; Sato'o, Y.; Ono, H. K.; Masuda, K.; Yamaoka, M.; Salasia, S. I. O.; Nakane, A.; Ohge, H.; Kusunoki, Y.; Sugai, M. Staphylococcus Aureus Isolated from Skin from Atopic-Dermatitis Patients Produces Staphylococcal Enterotoxin Y, Which Predominantly Induces T-Cell Receptor V $\alpha$ -Specific Expansion of T Cells. *Infect. Immun.* **2020**, 88 (2), e00360-19.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00360-19>.
- (134) Féraudet Tarrisse, C.; Goulard-Huet, C.; Nia, Y.; Devilliers, K.; Marcé, D.; Dambrune, C.; Lefebvre, D.; Hennekinne, J.-A.; Simon, S. Highly Sensitive and Specific Detection of

- Staphylococcal Enterotoxins SEA, SEG, SEH, and SEI by Immunoassay. *Toxins* **2021**, *13* (2), 130. <https://doi.org/10.3390/toxins13020130>.
- (135) Alefantis, T.; Grewal, P.; Ashton, J.; Khan, A. S.; Valdes, J. J.; Del Vecchio, V. G. A Rapid and Sensitive Magnetic Bead-Based Immunoassay for the Detection of Staphylococcal Enterotoxin B for High-through Put Screening. *Mol. Cell. Probes* **2004**, *18* (6), 379–382. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.06.003>.
- (136) Rong-Hwa, S.; Shiao-Shek, T.; Der-Jiang, C.; Yao-Wen, H. Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Assay for Detection of Staphylococcal Enterotoxin B. *Food Chem.* **2010**, *118* (2), 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.106>.
- (137) Park, C. E.; Szabo, R. Evaluation of the Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) Test Kits for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, and D in Foods. *Can. J. Microbiol.* **1986**, *32* (9), 723–727. <https://doi.org/10.1139/m86-131>.
- (138) Ben Haddada, M.; Hu, D.; Salmain, M.; Zhang, L.; Peng, C.; Wang, Y.; Liedberg, B.; Boujday, S. Gold Nanoparticle-Based Localized Surface Plasmon Immunosensor for Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (26), 6227–6234. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0563-8>.
- (139) Rasooly, A.; Rasooly, R. S. Detection and Analysis of Staphylococcal Enterotoxin A in Food by Western Immunoblotting. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *41* (3), 205–212. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00050-6).
- (140) Shepelyakovskaya, A.; Rudenko, N.; Karatovskaya, A.; Shchannikova, M.; Shulcheva, I.; Fursova, K.; Zamyatina, A.; Boziev, K.; Oleinikov, V.; Brovko, F. Development of a Bead-Based Multiplex Assay for the Simultaneous Quantification of Three Staphylococcal Enterotoxins in Food by Flow Cytometry. *Food Anal. Methods* **2020**, *13*. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01736-0>.
- (141) Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Fan, C.; Zhao, J. Aptamer-Based Biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27* (2), 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.004>.
- (142) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.
- (143) Purschke, W. G.; Radtke, F.; Kleinjung, F.; Klussmann, S. A DNA Spiegelmer to Staphylococcal Enterotoxin B. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (12), 3027–3032. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg413>.
- (144) Mudili, V.; Makam, S. S.; Sundararaj, N.; Siddaiah, C.; Gupta, V. K.; Rao, P. V. L. A Novel IgY-Aptamer Hybrid System for Cost-Effective Detection of SEB and Its Evaluation on Food and Clinical Samples. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 15151. <https://doi.org/10.1038/srep15151>.
- (145) Kumari, S.; Tiwari, M.; Das, P. Multi Format Compatible Visual and Fluorometric Detection of SEB Toxin in Nanogram Range by Carbon Dot-DNA and Acriflavine Nano-Assembly. *Sens. Actuators B Chem.* **2019**, *279*, 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.110>.
- (146) Fulton, F. Staphylococcal Enterotoxin—with Special Reference to the Kitten Test. *Br. J. Exp. Pathol.* **1943**, *24* (2), 65–72.
- (147) Scheuber, P. H.; Mossmann, H.; Beck, G.; Hammer, D. K. Direct Skin Test in Highly Sensitized Guinea Pigs for Rapid and Sensitive Determination of Staphylococcal Enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *46* (6), 1351–1356. <https://doi.org/10.1128/aem.46.6.1351-1356.1983>.
- (148) Carbonnelle, É.; Nassif, X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences* **2011**, *27* (10), 882–888. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112710017>.
- (149) Ho, C.; Lam, C.; Chan, M.; Cheung, R.; Law, L.; Lit, L.; Ng, K.; Suen, M.; Tai, H. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin. Biochem. Rev.* **2003**, *24* (1), 3–12.

- (150) Junot, C.; Fenaille, F.; Colsch, B.; Bécher, F. High Resolution Mass Spectrometry Based Techniques at the Crossroads of Metabolic Pathways. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33* (6), 471–500. <https://doi.org/10.1002/mas.21401>.
- (151) Makarov, A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (6), 1156–1162. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>.
- (152) Zubarev, R. A.; Makarov, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (11), 5288–5296. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>.
- (153) Yu, Q.; Paulo, J. A.; Naverrete-Perea, J.; McAlister, G. C.; Canterbury, J. D.; Bailey, D. J.; Robitaille, A. M.; Huguet, R.; Zabrouskov, V.; Gygi, S. P.; Schweppe, D. K. Benchmarking the Orbitrap Tribid Eclipse for Next Generation Multiplexed Proteomics. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (9), 6478–6485. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05685>.
- (154) Medhe, S. Mass Spectrometry: Detectors Review. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2018**, *3*, 51–58. <https://doi.org/10.11648/j.cbe.20180304.11>.
- (155) Roepstorff, P.; Fohlman, J. Letter to the Editors. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11* (11), 601–601. <https://doi.org/10.1002/bms.1200111109>.
- (156) Michalski, A.; Neuhauser, N.; Cox, J.; Mann, M. A Systematic Investigation into the Nature of Tryptic HCD Spectra. *J. Proteome Res.* **2012**, *11* (11), 5479–5491. <https://doi.org/10.1021/pr3007045>.
- (157) Sobott, F.; Watt, S. J.; Smith, J.; Edelman, M. J.; Kramer, H. B.; Kessler, B. M. Comparison of CID versus ETD Based MS/MS Fragmentation for the Analysis of Protein Ubiquitination. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20* (9), 1652–1659. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.04.023>.
- (158) Maitre, P.; Scuderi, D.; Corinti, D.; Chiavarino, B.; Crestoni, M. E.; Fornarini, S. Applications of Infrared Multiple Photon Dissociation (IRMPD) to the Detection of Posttranslational Modifications. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (7), 3261–3295. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00395>.
- (159) Michalski, A.; Damoc, E.; Hauschild, J.-P.; Lange, O.; Wieghaus, A.; Makarov, A.; Nagaraj, N.; Cox, J.; Mann, M.; Horning, S. Mass Spectrometry-Based Proteomics Using Q Exactive, a High-Performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer \*. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (9). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011015>.
- (160) Barthélemy, N. R.; Bateman, R. J.; Hirtz, C.; Marin, P.; Becher, F.; Sato, C.; Gabelle, A.; Lehmann, S. Cerebrospinal Fluid Phospho-Tau T217 Outperforms T181 as a Biomarker for the Differential Diagnosis of Alzheimer’s Disease and PET Amyloid-Positive Patient Identification. *Alzheimers Res. Ther.* **2020**, *12* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00596-4>.
- (161) Landureau, M.; Redeker, V.; Bellande, T.; Eyquem, S.; Melki, R. The Differential Solvent Exposure of N-Terminal Residues Provides “Fingerprints” of Alpha-Synuclein Fibrillar Polymorphs. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100737>.
- (162) Beveridge, R.; Kessler, D.; Rumpel, K.; Etmayer, P.; Meinhart, A.; Clausen, T. Native Mass Spectrometry Can Effectively Predict PROTAC Efficacy. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6* (7), 1223–1230. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00049>.
- (163) Becher, F.; Duriez, E.; Volland, H.; Tabet, J. C.; Ezan, E. Detection of Functional Ricin by Immunoaffinity and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (2), 659–665. <https://doi.org/10.1021/ac061498b>.
- (164) Kalb, S. R.; Schieltz, D. M.; Becher, F.; Astot, C.; Fredriksson, S.-Å.; Barr, J. R. Recommended Mass Spectrometry-Based Strategies to Identify Ricin-Containing Samples. *Toxins* **2015**, *7* (12), 4881–4894. <https://doi.org/10.3390/toxins7124854>.
- (165) Dupré, M.; Gilquin, B.; Fenaille, F.; Feraudet-Tarisse, C.; Dano, J.; Ferro, M.; Simon, S.; Junot, C.; Brun, V.; Becher, F. Multiplex Quantification of Protein Toxins in Human Biofluids and Food Matrices Using Immunoextraction and High-Resolution Targeted Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (16), 8473–8480.

- <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01900>.
- (166) Abdelmegid, S.; Murugaiyan, J.; Abo-Ismael, M.; Caswell, J. L.; Kelton, D.; Kirby, G. M. Identification of Host Defense-Related Proteins Using Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of Milk Whey from Cows with Staphylococcus Aureus Subclinical Mastitis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (1), 78. <https://doi.org/10.3390/ijms19010078>.
- (167) Wang, D.; Baudys, J.; Rees, J.; Marshall, K. M.; Kalb, S. R.; Parks, B. A.; Nowaczyk, L.; Pirkle, J. L.; Barr, J. R. Subtyping Botulinum Neurotoxins by Sequential Multiple Endoproteases In-Gel Digestion Coupled with Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (11), 4652–4658. <https://doi.org/10.1021/ac3006439>.
- (168) Bastos, V. A.; Gomes-Neto, F.; Rocha, S. L. G.; Teixeira-Ferreira, A.; Perales, J.; Neves-Ferreira, A. G. C.; Valente, R. H. The Interaction between the Natural Metalloendopeptidase Inhibitor BJ46a and Its Target Toxin Jararhagin Analyzed by Structural Mass Spectrometry and Molecular Modeling. *J. Proteomics* **2020**, *221*, 103761. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103761>.
- (169) Moradian, A.; Kalli, A.; Sweredoski, M. J.; Hess, S. The Top-down, Middle-down, and Bottom-up Mass Spectrometry Approaches for Characterization of Histone Variants and Their Post-Translational Modifications. *PROTEOMICS* **2014**, *14* (4–5), 489–497. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300256>.
- (170) Kelleher, N. L.; Lin, H. Y.; Valaskovic, G. A.; Aaserud, D. J.; Fridriksson, E. K.; McLafferty, F. W. Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (4), 806–812. <https://doi.org/10.1021/ja973655h>.
- (171) Brosch, M.; Yu, L.; Hubbard, T.; Choudhary, J. Accurate and Sensitive Peptide Identification with Mascot Percolator. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (6), 3176–3181. <https://doi.org/10.1021/pr800982s>.
- (172) Burgess, R. R. Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. In *Methods in Enzymology*; Burgess, R. R., Deutscher, M. P., Eds.; Guide to Protein Purification, 2nd Edition; Academic Press, 2009; Vol. 463, pp 331–342. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63020-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63020-2).
- (173) Murphy, E. L.; Joy, A. P.; Ouellette, R. J.; Barnett, D. A. Optimization of Cysteine Residue Alkylation Using an On-Line LC-MS Strategy: Benefits of Using a Cocktail of Haloacetamide Reagents. *Anal. Biochem.* **2021**, *619*, 114137. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114137>.
- (174) Fremout, W. Tryptic Cleavage of Proteinaceous Paint : A High--performance Protein Binder Analytical Technique. dissertation, Ghent University, 2014.
- (175) Olsen, J. V.; Schwartz, J. C.; Griep-Raming, J.; Nielsen, M. L.; Damoc, E.; Denisov, E.; Lange, O.; Remes, P.; Taylor, D.; Splendore, M.; Wouters, E. R.; Senko, M.; Makarov, A.; Mann, M.; Horning, S. A Dual Pressure Linear Ion Trap Orbitrap Instrument with Very High Sequencing Speed \*. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8* (12), 2759–2769. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900375-MCP200>.
- (176) Wu, C.; Tran, J. C.; Zamdborg, L.; Durbin, K. R.; Li, M.; Ahlf, D. R.; Early, B. P.; Thomas, P. M.; Sweedler, J. V.; Kelleher, N. L. A Protease for “middle-down” Proteomics. *Nat. Methods* **2012**, *9* (8), 822–824. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2074>.
- (177) Rodriguez, J.; Gupta, N.; Smith, R. D.; Pevzner, P. A. Does Trypsin Cut Before Proline? *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (1), 300–305. <https://doi.org/10.1021/pr0705035>.
- (178) Marty, M. T. A Universal Score for Deconvolution of Intact Protein and Native Electrospray Mass Spectra. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (6), 4395–4401. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05272>.
- (179) LeDuc, R. D.; Taylor, G. K.; Kim, Y.-B.; Januszyk, T. E.; Bynum, L. H.; Sola, J. V.; Garavelli, J. S.; Kelleher, N. L. ProSight PTM: An Integrated Environment for Protein Identification and Characterization by Top-down Mass Spectrometry. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (suppl\_2), W340–W345. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh447>.

- (180) Wongkongkathep, P.; Li, H.; Zhang, X.; Ogorzalek Loo, R. R.; Julian, R. R.; Loo, J. A. Enhancing Protein Disulfide Bond Cleavage by UV Excitation and Electron Capture Dissociation for Top-down Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *390*, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.07.008>.
- (181) Manconi, B.; Liori, B.; Cabras, T.; Vincenzoni, F.; Iavarone, F.; Castagnola, M.; Messina, I.; Olianias, A. Salivary Cystatins: Exploring New Post-Translational Modifications and Polymorphisms by Top-Down High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2017**, *16* (11), 4196–4207. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00567>.
- (182) Ntai, I.; Fornelli, L.; DeHart, C. J.; Hutton, J. E.; Doubleday, P. F.; LeDuc, R. D.; Nispen, A. J. van; Fellers, R. T.; Whiteley, G.; Boja, E. S.; Rodriguez, H.; Kelleher, N. L. Precise Characterization of KRAS4b Proteoforms in Human Colorectal Cells and Tumors Reveals Mutation/Modification Cross-Talk. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (16), 4140–4145. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716122115>.
- (183) Cupp-Sutton, K. A.; Wu, S. High-Throughput Quantitative Top-down Proteomics. *Mol. Omics* **2020**, *16* (2), 91–99. <https://doi.org/10.1039/C9MO00154A>.
- (184) Toby, T. K.; Fornelli, L.; Kelleher, N. L. Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *9* (1), 499–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041550>.
- (185) Campuzano, I.; Giles, K. High Definition Mass Spectrometry as a Tool for Structural Investigation of High m/z Ion Species. **2008**, *8*.
- (186) Lodge, J. M.; Schauer, K. L.; Brademan, D. R.; Riley, N. M.; Shishkova, E.; Westphall, M. S.; Coon, J. J. Top-Down Characterization of an Intact Monoclonal Antibody Using Activated Ion Electron Transfer Dissociation. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (15), 10246–10251. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00705>.
- (187) VanAernum, Z. L.; Gilbert, J. D.; Belov, M. E.; Makarov, A. A.; Horning, S. R.; Wysocki, V. H. Surface-Induced Dissociation of Noncovalent Protein Complexes in an Extended Mass Range Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (5), 3611–3618. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05605>.
- (188) Huguet, R.; Mullen, C.; Srzentić, K.; Greer, J. B.; Fellers, R. T.; Zabrouskov, V.; Syka, J. E. P.; Kelleher, N. L.; Fornelli, L. Proton Transfer Charge Reduction Enables High-Throughput Top-Down Analysis of Large Proteoforms. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (24), 15732–15739. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03925>.
- (189) Rose, R. J.; Damoc, E.; Denisov, E.; Makarov, A.; Heck, A. J. R. High-Sensitivity Orbitrap Mass Analysis of Intact Macromolecular Assemblies. *Nat. Methods* **2012**, *9* (11), 1084–1086. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2208>.
- (190) Greisch, J.-F.; Tamara, S.; A. Scheltema, R.; R. Maxwell, H. W.; D. Fagerlund, R.; C. Fineran, P.; Tetter, S.; Hilvert, D.; R. Heck, A. J. Expanding the Mass Range for UVPD-Based Native Top-down Mass Spectrometry. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (30), 7163–7171. <https://doi.org/10.1039/C9SC01857C>.
- (191) Santos Seckler, H. dos; Park, H.-M.; Lloyd-Jones, C. M.; Melani, R. D.; Camarillo, J. M.; Wilkins, J. T.; Compton, P. D.; Kelleher, N. L. New Interface for Faster Proteoform Analysis: Immunoprecipitation Coupled with SampleStream-Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2021**. <https://doi.org/10.1021/jasms.1c00026>.
- (192) Marx, V. Targeted Proteomics. *Nat. Methods* **2013**, *10* (1), 19–22. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2285>.
- (193) Doerr, A. Mass Spectrometry-Based Targeted Proteomics. *Nat. Methods* **2013**, *10* (1), 23–23. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2286>.
- (194) E. Angel, T.; K. Aryal, U.; M. Hengel, S.; S. Baker, E.; T. Kelly, R.; W. Robinson, E.; D. Smith, R. Mass Spectrometry-Based Proteomics: Existing Capabilities and Future Directions. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (10), 3912–3928. <https://doi.org/10.1039/C2CS15331A>.
- (195) Burnum-Johnson, K. E.; Nie, S.; Casey, C. P.; Monroe, M. E.; Orton, D. J.; Ibrahim, Y. M.; Gritsenko, M. A.; Clauss, T. R. W.; Shukla, A. K.; Moore, R. J.; Purvine, S. O.; Shi,

- T.; Qian, W.; Liu, T.; Baker, E. S.; Smith, R. D. Simultaneous Proteomic Discovery and Targeted Monitoring Using Liquid Chromatography, Ion Mobility Spectrometry, and Mass Spectrometry \*. *Mol. Cell. Proteomics* **2016**, *15* (12), 3694–3705.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.M116.061143>.
- (196) Schieltz, D. M.; McWilliams, L. G.; Kuklenyik, Z.; Prezioso, S. M.; Carter, A. J.; Williamson, Y. M.; McGrath, S. C.; Morse, S. A.; Barr, J. R. Quantification of Ricin, RCA and Comparison of Enzymatic Activity in 18 Ricinus Communis Cultivars by Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Toxicon* **2015**, *95*, 72–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.01.003>.
- (197) Gallien, S.; Duriez, E.; Demeure, K.; Domon, B. Selectivity of LC-MS/MS Analysis: Implication for Proteomics Experiments. *J. Proteomics* **2013**, *81*, 148–158.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.11.005>.
- (198) Prakash, A.; Tomazela, D. M.; Frewen, B.; MacLean, B.; Merrihew, G.; Peterman, S.; MacCoss, M. J. Expediting the Development of Targeted SRM Assays: Using Data from Shotgun Proteomics to Automate Method Development. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (6), 2733–2739. <https://doi.org/10.1021/pr801028b>.
- (199) Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring for Quantitative Proteomics: A Tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4* (1), 222.  
<https://doi.org/10.1038/msb.2008.61>.
- (200) MacLean, B.; Tomazela, D. M.; Shulman, N.; Chambers, M.; Finney, G. L.; Frewen, B.; Kern, R.; Tabb, D. L.; Liebler, D. C.; MacCoss, M. J. Skyline: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. *Bioinformatics* **2010**, *26* (7), 966–968. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>.
- (201) 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>.
- (202) Rougemont, B.; Bontemps Gallo, S.; Ayciriex, S.; Carrière, R.; Hondermarck, H.; Lacroix, J. M.; Le Blanc, J. C. Y.; Lemoine, J. Scout-MRM: Multiplexed Targeted Mass Spectrometry-Based Assay without Retention Time Scheduling Exemplified by Dickeya Dadantii Proteomic Analysis during Plant Infection. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (3), 1421–1426.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03201>.
- (203) Peterson, A. C.; Russell, J. D.; Bailey, D. J.; Westphall, M. S.; Coon, J. J. Parallel Reaction Monitoring for High Resolution and High Mass Accuracy Quantitative, Targeted Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (11), 1475–1488.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.O112.020131>.
- (204) Zhang, W. Progress in Mass Spectrometry Acquisition Approach for Quantitative Proteomics. *Chin. J. Anal. Chem.* **2014**, *42* (12), 1859–1868. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(14\)60788-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(14)60788-X).
- (205) Zhang, Z.; Yan, Y.; Wang, S.; Li, N. Development of a Chromatography-Free Method for High-Throughput MS-Based Bioanalysis of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Bioanalysis* **2021**, *13* (9), 725–735. <https://doi.org/10.4155/bio-2021-0021>.
- (206) Gallien, S.; Bourmaud, A.; Kim, S. Y.; Domon, B. Technical Considerations for Large-Scale Parallel Reaction Monitoring Analysis. *J. Proteomics* **2014**, *100*, 147–159.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.029>.
- (207) Aebersold, R.; Mann, M. Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Nature* **2003**, *422* (6928), 198–207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>.
- (208) Lemeer, S.; Hahne, H.; Pachi, F.; Kuster, B. Software Tools for MS-Based Quantitative Proteomics: A Brief Overview. In *Quantitative Methods in Proteomics*; Marcus, K., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; pp 489–499.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-885-6\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-885-6_29).
- (209) Langella, O.; Valot, B.; Balliau, T.; Blein-Nicolas, M.; Bonhomme, L.; Zivy, M.

- X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification. *J. Proteome Res.* **2017**, *16* (2), 494–503. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00632>.
- (210) Tabb, D. L.; Eng, J. K.; Yates, J. R. Protein Identification by SEQUEST. In *Proteome Research: Mass Spectrometry*; James, P., Ed.; Principles and Practice; Springer: Berlin, Heidelberg, 2001; pp 125–142. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56895-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56895-4_7).
- (211) Cox, J.; Neuhauser, N.; Michalski, A.; Scheltema, R. A.; Olsen, J. V.; Mann, M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (4), 1794–1805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>.
- (212) Purvine, S.; Eppel\*, J.-T.; Yi, E. C.; Goodlett, D. R. Shotgun Collision-Induced Dissociation of Peptides Using a Time of Flight Mass Analyzer. *PROTEOMICS* **2003**, *3* (6), 847–850. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300362>.
- (213) Midha, M. K.; Kusebauch, U.; Shteynberg, D.; Kapil, C.; Bader, S. L.; Reddy, P. J.; Campbell, D. S.; Baliga, N. S.; Moritz, R. L. A Comprehensive Spectral Assay Library to Quantify the Escherichia Coli Proteome by DIA/SWATH-MS. *Sci. Data* **2020**, *7* (1), 389. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00724-7>.
- (214) Yang, Y.; Liu, X.; Shen, C.; Lin, Y.; Yang, P.; Qiao, L. In Silico Spectral Libraries by Deep Learning Facilitate Data-Independent Acquisition Proteomics. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 146. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13866-z>.
- (215) Meyer, J. G.; Schilling, B. Clinical Applications of Quantitative Proteomics Using Targeted and Untargeted Data-Independent Acquisition Techniques. *Expert Rev. Proteomics* **2017**, *14* (5), 419–429. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1322904>.
- (216) Egertson, J. D.; MacLean, B.; Johnson, R.; Xuan, Y.; MacCoss, M. J. Multiplexed Peptide Analysis Using Data-Independent Acquisition and Skyline. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (6), 887–903. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.055>.
- (217) Midha, M. K.; Campbell, D. S.; Kapil, C.; Kusebauch, U.; Hoopmann, M. R.; Bader, S. L.; Moritz, R. L. DIALib-QC an Assessment Tool for Spectral Libraries in Data-Independent Acquisition Proteomics. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 5251. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18901-y>.
- (218) Desfontaine, V.; Capetti, F.; Nicoli, R.; Kuuranne, T.; Veuthey, J.-L.; Guillarme, D. Systematic Evaluation of Matrix Effects in Supercritical Fluid Chromatography versus Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry for Biological Samples. *J. Chromatogr. B* **2018**, *1079*, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.037>.
- (219) Zhou, W.; Yang, S.; Wang, P. G. Matrix Effects and Application of Matrix Effect Factor. *Bioanalysis* **2017**, *9* (23), 1839–1844. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0214>.
- (220) Monaci, L.; De Angelis, E.; Montemurro, N.; Pilolli, R. Comprehensive Overview and Recent Advances in Proteomics MS Based Methods for Food Allergens Analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *106*, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.016>.
- (221) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- (222) Jelińska, A.; Zagożdżon, A.; Górecki, M.; Wisniewska, A.; Frelek, J.; Holyst, R. Denaturation of Proteins by Surfactants Studied by the Taylor Dispersion Analysis. *PLOS ONE* **2017**, *12* (4), e0175838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175838>.
- (223) Stadler, J. Absence of Sugars in Electrophoretically Purified Cytochrome B5 Demonstrated by Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Cell Biol.* **1981**, *89* (3), 615–620. <https://doi.org/10.1083/jcb.89.3.615>.
- (224) Busche, T.; Hillion, M.; Loi, V. V.; Berg, D.; Walther, B.; Semmler, T.; Strommenger, B.; Witte, W.; Cuny, C.; Mellmann, A.; Holmes, M. A.; Kalinowski, J.; Adrian, L.; Bernhardt, J.; Antelmann, H. Comparative Secretome Analyses of Human and Zoonotic Staphylococcus Aureus Isolates CC8, CC22, and CC398 \*. *Mol. Cell. Proteomics* **2018**, *17* (12), 2412–2433. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001036>.
- (225) Barthélemy, N. R.; Fenaille, F.; Hirtz, C.; Sergeant, N.; Schraen-Maschke, S.;

- Vialaret, J.; Buée, L.; Gabelle, A.; Junot, C.; Lehmann, S.; Becher, F. Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity. *J. Proteome Res.* **2016**, *15* (2), 667–676. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01001>.
- (226) Nickerson, J. L.; Doucette, A. A. Rapid and Quantitative Protein Precipitation for Proteome Analysis by Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2020**, *19* (5), 2035–2042. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00867>.
- (227) Peterson, R. A. The Production of Culture: A Prolegomenon. *Am. Behav. Sci.* **1976**, *19* (6), 669–684. <https://doi.org/10.1177/000276427601900601>.
- (228) Klatt, S.; Roberts, A.; Lothian, A.; Masters, C. L.; Cappai, R.; Fowler, C.; Roberts, B. R. Optimizing Red Blood Cell Protein Extraction for Biomarker Quantitation with Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412* (8), 1879–1892. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02439-5>.
- (229) Koike, H.; Kanda, M.; Hayashi, H.; Matsushima, Y.; Ohba, Y.; Nakagawa, Y.; Nagano, C.; Sekimura, K.; Hirai, A.; Shindo, T.; Otsuka, K.; Kamiie, J.; Sasamoto, T.; Hashimoto, T. Quantification of Staphylococcal Enterotoxin Type A in Cow Milk by Using a Stable Isotope-Labelled Peptide via Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A* **2019**, *36* (7), 1098–1108. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1615641>.
- (230) Tonacini, J.; Stephan, D.; Vogel, G.; Avondet, M.-A.; Kalman, F.; Crovadore, J.; Lefort, F.; Schnyder, B. Intact Staphylococcus Enterotoxin SEB from Culture Supernatant Detected by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Toxins* **2019**, *11* (2), 101. <https://doi.org/10.3390/toxins11020101>.
- (231) Enany, S.; Yoshida, Y.; Magdeldin, S.; Zhang, Y.; Bo, X.; Yamamoto, T. Extensive Proteomic Profiling of the Secretome of European Community Acquired Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Clone. *Peptides* **2012**, *37* (1), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.06.011>.
- (232) Wiśniewski, J. R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M. Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis. *Nat. Methods* **2009**, *6* (5), 359–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1322>.
- (233) Erde, J.; Loo, R. R. O.; Loo, J. A. Enhanced FASP (EFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (4), 1885–1895. <https://doi.org/10.1021/pr4010019>.
- (234) Hughes, C. S.; Foehr, S.; Garfield, D. A.; Furlong, E. E.; Steinmetz, L. M.; Krijgsveld, J. Ultrasensitive Proteome Analysis Using Paramagnetic Bead Technology. *Mol. Syst. Biol.* **2014**, *10*, 757. <https://doi.org/10.15252/msb.20145625>.
- (235) Hughes, C. S.; Sorensen, P. H.; Morin, G. B. A Standardized and Reproducible Proteomics Protocol for Bottom-Up Quantitative Analysis of Protein Samples Using SP3 and Mass Spectrometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2019**, *1959*, 65–87. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9164-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9164-8_5).
- (236) Andjelkovic, M.; Tsilia, V.; Rajkovic, A.; De Cremer, K.; Van Loco, J. Application of LC-MS/MS MRM to Determine Staphylococcal Enterotoxins (SEB and SEA) in Milk. *Toxins* **2016**, *8* (4), 118. <https://doi.org/10.3390/toxins8040118>.
- (237) Shi, T.; Fillmore, T. L.; Sun, X.; Zhao, R.; Schepmoes, A. A.; Hossain, M.; Xie, F.; Wu, S.; Kim, J.-S.; Jones, N.; Moore, R. J.; Paša-Tolić, L.; Kagan, J.; Rodland, K. D.; Liu, T.; Tang, K.; Camp, D. G.; Smith, R. D.; Qian, W.-J. Antibody-Free, Targeted Mass-Spectrometric Approach for Quantification of Proteins at Low Picogram per Milliliter Levels in Human Plasma/Serum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (38), 15395–15400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204366109>.
- (238) Ippoliti, P. J.; Kuhn, E.; Mani, D. R.; Fagbami, L.; Keshishian, H.; Burgess, M. W.; Jaffe, J. D.; Carr, S. A. Automated Microchromatography Enables Multiplexing of Immunoaffinity Enrichment of Peptides to Greater than 150 for Targeted MS-Based Assays.

- Anal. Chem.* **2016**, *88* (15), 7548–7555. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00946>.
- (239) Li, Y.; Chen, A.; Mao, X.; Sun, M.; Yang, S.; Li, J.; You, Y.; Wu, Y.; Jiang, G. Multiple Antibodies Based Immunoaffinity Columns Preparation for the Simultaneous Analysis of Deoxynivalenol and T-2 Toxin in Cereals by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2021**, *337*, 127802. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127802>.
- (240) Seyer, A.; Fenaille, F.; Féraudet-Tarisse, C.; Volland, H.; Popoff, M. R.; Tabet, J.-C.; Junot, C.; Becher, F. Rapid Quantification of Clostridial Epsilon Toxin in Complex Food and Biological Matrixes by Immunopurification and Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (11), 5103–5109. <https://doi.org/10.1021/ac300880x>.
- (241) Adrait, A.; Lebert, D.; Trauchessec, M.; Dupuis, A.; Louwagie, M.; Masselon, C.; Jaquinod, M.; Chevalier, B.; Vandenesch, F.; Garin, J.; Bruley, C.; Brun, V. Development of a Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ<sup>TM</sup>) Assay for the Quantification of Staphylococcus Aureus Enterotoxin A in Serum. *J. Proteomics* **2012**, *75* (10), 3041–3049. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.031>.
- (242) Dupuis, A.; Hennekinne, J.-A.; Garin, J.; Brun, V. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for Improved Investigation of Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks. *PROTEOMICS* **2008**, *8* (22), 4633–4636. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800326>.
- (243) Hennekinne, J.-A.; Brun, V.; De Buyser, M.-L.; Dupuis, A.; Ostyn, A.; Dragacci, S. Innovative Application of Mass Spectrometry for the Characterization of Staphylococcal Enterotoxins Involved in Food Poisoning Outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (3), 882–884. <https://doi.org/10.1128/AEM.01924-08>.
- (244) Picard, G.; Lebert, D.; Louwagie, M.; Adrait, A.; Huillet, C.; Vandenesch, F.; Bruley, C.; Garin, J.; Jaquinod, M.; Brun, V. PSAQ<sup>TM</sup> Standards for Accurate MS-Based Quantification of Proteins: From the Concept to Biomedical Applications: PSAQ Standards for Accurate Protein Quantification. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47* (10), 1353–1363. <https://doi.org/10.1002/jms.3106>.
- (245) Ray, J.; Kruse, A.; Ozer, A.; Kajitani, T.; Johnson, R.; MacCoss, M.; Heck, M.; Lis, J. T. RNA Aptamer Capture of Macromolecular Complexes for Mass Spectrometry Analysis. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (15), e90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa542>.
- (246) Zhang, X.; Khan, I. M.; Ji, H.; Wang, Z.; Tian, H.; Cao, W.; Mi, W. A Label-Free Fluorescent Aptasensor for Detection of Staphylococcal Enterotoxin A Based on Aptamer-Functionalized Silver Nanoclusters. *Polymers* **2020**, *12* (1), 152. <https://doi.org/10.3390/polym12010152>.
- (247) Chen, X.; Liu, Y.; Lu, Y.; Xiong, X.; Li, Y.; Liu, Y.; Xiong, X. Chronocoulometric Aptamer Based Assay for Staphylococcal Enterotoxin B by Target-Triggered Assembly of Nanostructured Dendritic Nucleic Acids on a Gold Electrode. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (2), 109. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3236-9>.
- (248) Parker, B. W.; Goncz, E. J.; Krist, D. T.; Statsyuk, A. V.; Nesvizhskii, A. I.; Weiss, E. L. Mapping Low-Affinity/High-Specificity Peptide-Protein Interactions Using Ligand-Footprinting Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (42), 21001–21011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819533116>.
- (249) Anderson, N. L.; Anderson, N. G.; Haines, L. R.; Hardie, D. B.; Olafson, R. W.; Pearson, T. W. Mass Spectrometric Quantitation of Peptides and Proteins Using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (2), 235–244. <https://doi.org/10.1021/pr034086h>.
- (250) Liu, C.-C.; Lin, C.-C.; Hsiao, Y.-C.; Wang, P.-J.; Yu, J.-S. Proteomic Characterization of Six Taiwanese Snake Venoms: Identification of Species-Specific Proteins and Development of a SISCAPA-MRM Assay for Cobra Venom Factors. *J. Proteomics* **2018**, *187*, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.003>.

- (251) Ankney, J. A.; Muneer, A.; Chen, X. Relative and Absolute Quantitation in Mass Spectrometry–Based Proteomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2018**, *11* (1), 49–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061516-045357>.
- (252) 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>.
- (253) Cozzolino, F.; Landolfi, A.; Iacobucci, I.; Monaco, V.; Caterino, M.; Celentano, S.; Zuccato, C.; Cattaneo, E.; Monti, M. New Label-Free Methods for Protein Relative Quantification Applied to the Investigation of an Animal Model of Huntington Disease. *PLoS One* **2020**, *15* (9), e0238037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238037>.
- (254) Chen, E. I.; Yates, J. R. Cancer Proteomics by Quantitative Shotgun Proteomics. *Mol. Oncol.* **2007**, *1* (2), 144–159. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.05.001>.
- (255) Veenstra, T. D. Global and Targeted Quantitative Proteomics for Biomarker Discovery. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2007**, *847* (1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.004>.
- (256) Phanstiel, D.; Unwin, R.; McAlister, G. C.; Coon, J. J. Peptide Quantification Using 8-Plex Isobaric Tags and Electron Transfer Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (4), 1693–1698. <https://doi.org/10.1021/ac8019202>.
- (257) Li, J.; Van Vranken, J. G.; Pontano Vaiteas, L.; Schweppe, D. K.; Huttlin, E. L.; Etienne, C.; Nandhikonda, P.; Viner, R.; Robitaille, A. M.; Thompson, A. H.; Kuhn, K.; Pike, I.; Bomgardner, R. D.; Rogers, J. C.; Gygi, S. P.; Paulo, J. A. TMTpro Reagents: A Set of Isobaric Labeling Mass Tags Enables Simultaneous Proteome-Wide Measurements across 16 Samples. *Nat. Methods* **2020**, *17* (4), 399–404. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0781-4>.
- (258) Li, J.; Cai, Z.; Bomgardner, R. D.; Pike, I.; Kuhn, K.; Rogers, J. C.; Roberts, T. M.; Gygi, S. P.; Paulo, J. A. TMTpro-18plex: The Expanded and Complete Set of TMTpro Reagents for Sample Multiplexing. *J. Proteome Res.* **2021**, *20* (5), 2964–2972. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00168>.
- (259) Louwagie, M.; Kieffer-Jaquinod, S.; Dupierris, V.; Couté, Y.; Bruley, C.; Garin, J.; Dupuis, A.; Jaquinod, M.; Brun, V. Introducing AAA-MS, a Rapid and Sensitive Method for Amino Acid Analysis Using Isotope Dilution and High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2012**, *11* (7), 3929–3936. <https://doi.org/10.1021/pr3003326>.
- (260) Shuford, C. M.; Walters, J. J.; Holland, P. M.; Sreenivasan, U.; Askari, N.; Ray, K.; Grant, R. P. Absolute Protein Quantification by Mass Spectrometry: Not as Simple as Advertised. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (14), 7406–7415. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00858>.
- (261) Pritchard, C.; Groves, K. J.; Biesenbruch, S.; O’Connor, G.; Ashcroft, A. E.; Arsene, C.; Schulze, D.; Quaglia, M. Quantification of Human Growth Hormone in Serum with a Labeled Protein as an Internal Standard: Essential Considerations. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (13), 6525–6532. <https://doi.org/10.1021/ac501032q>.
- (262) Brun, V.; Masselon, C.; Garin, J.; Dupuis, A. Isotope Dilution Strategies for Absolute Quantitative Proteomics. *J. Proteomics* **2009**, *72* (5), 740–749. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.03.007>.
- (263) Zeiler, M.; Straube, W. L.; Lundberg, E.; Uhlen, M.; Mann, M. A Protein Epitope Signature Tag (PrEST) Library Allows SILAC-Based Absolute Quantification and Multiplexed Determination of Protein Copy Numbers in Cell Lines. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2012**, *11* (3), O111.009613. <https://doi.org/10.1074/mcp.O111.009613>.
- (264) Beynon, R. J.; Doherty, M. K.; Pratt, J. M.; Gaskell, S. J. Multiplexed Absolute Quantification in Proteomics Using Artificial QCAT Proteins of Concatenated Signature Peptides. *Nat. Methods* **2005**, *2* (8), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth774>.
- (265) 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.* **2003**, *100* (12), 6940–6945. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832254100>.

- (266) Barr, J. R.; Maggio, V. L.; Patterson, D. G., Jr; Cooper, G. R.; Henderson, L. O.; Turner, W. E.; Smith, S. J.; Hannon, W. H.; Needham, L. L.; Sampson, E. J. Isotope Dilution-Mass Spectrometric Quantification of Specific Proteins: Model Application with Apolipoprotein A-I. *Clin. Chem.* **1996**, *42* (10), 1676–1682. <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.10.1676>.
- (267) Bronsema, K. J.; Bischoff, R.; van de Merbel, N. C. Internal Standards in the Quantitative Determination of Protein Biopharmaceuticals Using Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2012**, *893–894*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.021>.
- (268) Oeckl, P.; Steinacker, P.; Otto, M. Comparison of Internal Standard Approaches for SRM Analysis of Alpha-Synuclein in Cerebrospinal Fluid. *J. Proteome Res.* **2018**, *17* (1), 516–523. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00660>.
- (269) Worboys, J. D.; Sinclair, J.; Yuan, Y.; Jørgensen, C. Systematic Evaluation of Quantotypic Peptides for Targeted Analysis of the Human Kinome. *Nat. Methods* **2014**, *11* (10), 1041–1044. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3072>.
- (270) Calderón-Celis, F.; Encinar, J. R.; Sanz-Medel, A. Standardization Approaches in Absolute Quantitative Proteomics with Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2018**, *37* (6), 715–737. <https://doi.org/10.1002/mas.21542>.
- (271) 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>.
- (272) Simon, R.; Girod, M.; Fonbonne, C.; Salvador, A.; Clément, Y.; Lantéri, P.; Amouyel, P.; Lambert, J. C.; Lemoine, J. Total ApoE and ApoE4 Isoform Assays in an Alzheimer’s Disease Case-Control Study by Targeted Mass Spectrometry (N=669): A Pilot Assay for Methionine-Containing Proteotypic Peptides. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2012**, *11* (11), 1389–1403. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.018861>.
- (273) Brun, V.; Dupuis, A.; Adrait, A.; Marcellin, M.; Thomas, D.; Court, M.; Vandenesch, F.; Garin, J. Isotope-Labeled Protein Standards: Toward Absolute Quantitative Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6* (12), 2139–2149. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700163-MCP200>.
- (274) Hanke, S.; Besir, H.; Oesterhelt, D.; Mann, M. Absolute SILAC for Accurate Quantitation of Proteins in Complex Mixtures Down to the Attomole Level. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (3), 1118–1130. <https://doi.org/10.1021/pr7007175>.
- (275) Lanshoeft, C.; Cianféroni, S.; Heudi, O. Generic Hybrid Ligand Binding Assay Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry-Based Workflow for Multiplexed Human Immunoglobulin G1 Quantification at the Intact Protein Level: Application to Preclinical Pharmacokinetic Studies. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (4), 2628–2635. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04997>.
- (276) Calderón-Celis, F.; Sugiyama, N.; Yamanaka, M.; Sakai, T.; Diez-Fernández, S.; Calvete, J. J.; Sanz-Medel, A.; Encinar, J. R. Enhanced Universal Quantification of Biomolecules Using Element MS and Generic Standards: Application to Intact Protein and Phosphoprotein Determination. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (1), 1105–1112. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04731>.
- (277) Voyksner, R. D.; Lee, H. Investigating the Use of an Octupole Ion Guide for Ion Storage and High-Pass Mass Filtering to Improve the Quantitative Performance of Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **1999**, *13* (14), 1427–1437. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19990730\)13:14<1427::AID-RCM662>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19990730)13:14<1427::AID-RCM662>3.0.CO;2-5).
- (278) Chelius, D.; Bondarenko, P. V. Quantitative Profiling of Proteins in Complex Mixtures Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2002**, *1* (4), 317–323. <https://doi.org/10.1021/pr025517j>.
- (279) Bondarenko, P. V.; Chelius, D.; Shaler, T. A. Identification and Relative Quantitation

- of Protein Mixtures by Enzymatic Digestion Followed by Capillary Reversed-Phase Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (18), 4741–4749. <https://doi.org/10.1021/ac0256991>.
- (280) Silva, J. C.; Gorenstein, M. V.; Li, G.-Z.; Vissers, J. P. C.; Geromanos, S. J. Absolute Quantification of Proteins by LCMSE: A Virtue of Parallel Ms Acquisition \*S. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5* (1), 144–156. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500230-MCP200>.
- (281) Kriegeskorte, A.; König, S.; Sander, G.; Pirkl, A.; Mahabir, E.; Proctor, R. A.; von Eiff, C.; Peters, G.; Becker, K. Small Colony Variants of Staphylococcus Aureus Reveal Distinct Protein Profiles. *PROTEOMICS* **2011**, *11* (12), 2476–2490. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000796>.
- (282) Muntel, J.; Fromion, V.; Goelzer, A.; Maaß, S.; Mäder, U.; Büttner, K.; Hecker, M.; Becher, D. Comprehensive Absolute Quantification of the Cytosolic Proteome of Bacillus Subtilis by Data Independent, Parallel Fragmentation in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MSE) \*. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (4), 1008–1019. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.032631>.
- (283) Rappsilber, J.; Ryder, U.; Lamond, A. I.; Mann, M. Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome. *Genome Res.* **2002**, *12* (8), 1231–1245. <https://doi.org/10.1101/gr.473902>.
- (284) Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; Mann, M. Exponentially Modified Protein Abundance Index (EmPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein\*S. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4* (9), 1265–1272. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>.
- (285) Grant, R. P.; Hoofnagle, A. N. From Lost in Translation to Paradise Found: Enabling Protein Biomarker Method Transfer by Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2014**, *60* (7), 941–944. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.224840>.
- (286) Jenkins, R.; Duggan, J. X.; Aubry, A.-F.; Zeng, J.; Lee, J. W.; Cojocar, L.; Dufield, D.; Garofolo, F.; Kaur, S.; Schultz, G. A.; Xu, K.; Yang, Z.; Yu, J.; Zhang, Y. J.; Vazvaei, F. Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics. *AAPS J.* **2015**, *17* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9685-5>.
- (287) Kientz, C. E.; Hulst, A. G.; Wils, E. R. J. Determination of Staphylococcal Enterotoxin B by On-Line (Micro) Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1997**, *757* (1), 51–64. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00661-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00661-9).
- (288) Kawano, Y.; Ito, Y.; Yamakawa, Y.; Yamashino, T.; Horii, T.; Hasegawa, T.; Ohta, M. Rapid Isolation and Identification of Staphylococcal Exoproteins by Reverse Phase Capillary High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *189* (1), 103–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09214.x>.
- (289) Bernardo, K.; Pakulat, N.; Macht, M.; Krut, O.; Seifert, H.; Flier, S.; Hüniger, F.; Krönke, M. Identification and Discrimination of Staphylococcus Aureus Strains Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *PROTEOMICS* **2002**, *2* (6), 747–753. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200206\)2:6<747::AID-PROT747>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200206)2:6<747::AID-PROT747>3.0.CO;2-V).
- (290) Nakano, M.; Kawano, Y.; Kawagishi, M.; Hasegawa, T.; Iinuma, Y.; Ohta, M. Two-Dimensional Analysis of Exoproteins of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) for Possible Epidemiological Applications. *Microbiol. Immunol.* **2002**, *46* (1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02671.x>.
- (291) Burlak, C.; Hammer, C. H.; Robinson, M.-A.; Whitney, A. R.; McGavin, M. J.; Kreiswirth, B. N.; DeLeo, F. R. Global Analysis of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Exoproteins Reveals Molecules Produced in Vitro and during Infection. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9* (5), 1172–1190. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00858.x>.
- (292) Pocsfalvi, G.; Cacace, G.; Cuccurullo, M.; Serluca, G.; Sorrentino, A.; Schlosser, G.;

- Blaiotta, G.; Malorni, A. Proteomic Analysis of Exoproteins Expressed by Enterotoxigenic Staphylococcus Aureus Strains. *PROTEOMICS* **2008**, *8* (12), 2462–2476. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700965>.
- (293) Ravipaty, S.; Reilly, J. P. Comprehensive Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Subsp. Aureus COL Secretome by Two-Dimensional Liquid Chromatography and Mass Spectrometry \*. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9* (9), 1898–1919. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900494-MCP200>.
- (294) Wolf, C.; Kusch, H.; Monecke, S.; Albrecht, D.; Holtfreter, S.; von Eiff, C.; Petzl, W.; Rainard, P.; Bröker, B. M.; Engelmann, S. Genomic and Proteomic Characterization of Staphylococcus Aureus Mastitis Isolates of Bovine Origin. *PROTEOMICS* **2011**, *11* (12), 2491–2502. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000698>.
- (295) Enany, S.; Yoshida, Y.; Magdeldin, S.; Bo, X.; Zhang, Y.; Enany, M.; Yamamoto, T. Two Dimensional Electrophoresis of the Exo-Proteome Produced from Community Acquired Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Belonging to Clonal Complex 80. *Microbiol. Res.* **2013**, *168* (8), 504–511. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.03.004>.
- (296) Nedelkov, D.; Rasooly, A.; Nelson, R. W. Multitoxin Biosensor–Mass Spectrometry Analysis: A New Approach for Rapid, Real-Time, Sensitive Analysis of Staphylococcal Toxins in Food. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *60* (1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00328-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00328-7).
- (297) Gilquin, B.; Jaquinod, M.; Louwagie, M.; Kieffer-Jaquinod, S.; Kraut, A.; Ferro, M.; Becher, F.; Brun, V. A Proteomics Assay to Detect Eight CBRN-Relevant Toxins in Food. *PROTEOMICS* **2017**, *17* (1–2), 1600357. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600357>.
- (298) Muratovic, A. Z.; Hagström, T.; Rosén, J.; Granelli, K.; Hellenäs, K.-E. Quantitative Analysis of Staphylococcal Enterotoxins A and B in Food Matrices Using Ultra High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Toxins* **2015**, *7* (9), 3637–3656. <https://doi.org/10.3390/toxins7093637>.
- (299) Nedelkov, D.; Nelson, R. W. Detection of Staphylococcal Enterotoxin B via Biomolecular Interaction Analysis Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69* (9), 5212–5215. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5212-5215.2003>.
- (300) Callahan, J. H.; Shefcheck, K. J.; Williams, T. L.; Musser, S. M. Detection, Confirmation, and Quantification of Staphylococcal Enterotoxin B in Food Matrixes Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (6), 1789–1800. <https://doi.org/10.1021/ac051292v>.
- (301) Kull, S.; Pauly, D.; Störmann, B.; Kirchner, S.; Stämmler, M.; Dorner, M. B.; Lasch, P.; Naumann, D.; Dorner, B. G. Multiplex Detection of Microbial and Plant Toxins by Immunoaffinity Enrichment and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (7), 2916–2924. <https://doi.org/10.1021/ac902909r>.
- (302) Sospedra, I.; Soler, C.; Mañes, J.; Soriano, J. M. Analysis of Staphylococcal Enterotoxin A in Milk by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400* (5), 1525–1531. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4906-6>.
- (303) Bao, K. D.; Letellier, A.; Beaudry, F. Analysis of Staphylococcus Enterotoxin B Using Differential Isotopic Tags and Liquid Chromatography Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26* (9), 1049–1057. <https://doi.org/10.1002/bmc.1742>.
- (304) Sospedra, I.; Soler, C.; Mañes, J.; Soriano, J. M. Rapid Whole Protein Quantitation of Staphylococcal Enterotoxins A and B by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1238*, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.022>.
- (305) Lefebvre, D.; Blanco-Valle, K.; Feraudet-Tarisse, C.; Merda, D.; Simon, S.; Fenaille, F.; Hennekinne, J.-A.; Nia, Y.; Becher, F. Quantitative Determination of Staphylococcus Aureus Enterotoxins Types A to I and Variants in Dairy Food Products by Multiplex Immuno-LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (8), 2603–2610.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07545>.

(306) Hennekinne, J.-A.; Ostyn, A.; Guillier, F.; Herbin, S.; Pruffer, A.-L.; Dragacci, S. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized? *Toxins* **2010**, *2* (8), 2106–2116. <https://doi.org/10.3390/toxins2082106>.

(307) Opuni, K. F. M.; Al-Majdoub, M.; Yefremova, Y.; El-Kased, R. F.; Koy, C.; Glocker, M. O. Mass Spectrometric Epitope Mapping. *Mass Spectrom. Rev.* **2018**, *37* (2), 229–241. <https://doi.org/10.1002/mas.21516>.

(308) Peck, M. W.; Smith, T. J.; Anniballi, F.; Austin, J. W.; Bano, L.; Bradshaw, M.; Cuervo, P.; Cheng, L. W.; Derman, Y.; Dorner, B. G.; Fisher, A.; Hill, K. K.; Kalb, S. R.; Korkeala, H.; Lindström, M.; Lista, F.; Lúquez, C.; Mazuet, C.; Pirazzini, M.; Popoff, M. R.; Rossetto, O.; Rummel, A.; Sesardic, D.; Singh, B. R.; Stringer, S. C. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins* **2017**, *9* (1), 38. <https://doi.org/10.3390/toxins9010038>.

(309) Smith, T. J.; Lou, J.; Geren, I. N.; Forsyth, C. M.; Tsai, R.; LaPorte, S. L.; Tepp, W. H.; Bradshaw, M.; Johnson, E. A.; Smith, L. A.; Marks, J. D. Sequence Variation within Botulinum Neurotoxin Serotypes Impacts Antibody Binding and Neutralization. *Infect. Immun.* **2005**, *73* (9), 5450–5457. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5450-5457.2005>.

(310) Kozaki, S.; Kamata, Y.; Nagai, T.; Ogasawara, J.; Sakaguchi, G. The Use of Monoclonal Antibodies to Analyze the Structure of Clostridium Botulinum Type E Derivative Toxin. *Infect. Immun.* **1986**, *52* (3), 786–791. <https://doi.org/10.1128/iai.52.3.786-791.1986>.

(311) Gibson, A. M.; Modi, N. k.; Roberts, T. a.; Hambleton, P.; Melling, J. Evaluation of a Monoclonal Antibody-Based Immunoassay for Detecting Type B Clostridium Botulinum Toxin Produced in Pure Culture and an Inoculated Model Cured Meat System. *J. Appl. Bacteriol.* **1988**, *64* (4), 285–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb01873.x>.

(312) Ronsein, G. E.; Pamir, N.; von Haller, P. D.; Kim, D. S.; Oda, M. N.; Jarvik, G. P.; Vaisar, T.; Heinecke, J. W. Parallel Reaction Monitoring (PRM) and Selected Reaction Monitoring (SRM) Exhibit Comparable Linearity, Dynamic Range and Precision for Targeted Quantitative HDL Proteomics. *J. Proteomics* **2015**, *113*, 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.10.017>.

(313) Millet, A.; Khoudour, N.; Bros, P.; Lebert, D.; Picard, G.; Machon, C.; Goldwasser, F.; Blanchet, B.; Guitton, J. Quantification of Nivolumab in Human Plasma by LC-MS/HRMS and LC-MS/MS, Comparison with ELISA. *Talanta* **2021**, *224*, 121889. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121889>.

(314) Olkowicz, M.; Rybakowska, I.; Chlopicki, S.; Smolenski, R. T. Development and Analytical Comparison of Microflow and Nanoflow Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Procedures for Quantification of Cardiac Troponin T in Mouse Hearts. *Talanta* **2015**, *131*, 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.029>.

(315) Artesi, M.; Bontems, S.; Göbbels, P.; Franckh, M.; Maes, P.; Boreux, R.; Meex, C.; Melin, P.; Hayette, M.-P.; Bours, V.; Durkin, K. A Recurrent Mutation at Position 26340 of SARS-CoV-2 Is Associated with Failure of the E Gene Quantitative Reverse Transcription-PCR Utilized in a Commercial Dual-Target Diagnostic Assay. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58* (10), e01598-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01598-20>.

(316) Ercan-Herbst, E.; Ehrig, J.; Schöndorf, D. C.; Behrendt, A.; Klaus, B.; Gomez Ramos, B.; Prat Oriol, N.; Weber, C.; Ehrnhoefer, D. E. A Post-Translational Modification Signature Defines Changes in Soluble Tau Correlating with Oligomerization in Early Stage Alzheimer's Disease Brain. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7* (1), 192. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0823-2>.

(317) Witze, E. S.; Old, W. M.; Resing, K. A.; Ahn, N. G. Mapping Protein Post-Translational Modifications with Mass Spectrometry. *Nat. Methods* **2007**, *4* (10), 798–806. <https://doi.org/10.1038/nmeth1100>.

(318) Schaffer, L. V.; Millikin, R. J.; Shortreed, M. R.; Scalf, M.; Smith, L. M. Improving Proteoform Identifications in Complex Systems Through Integration of Bottom-Up and Top-

- Down Data. *J. Proteome Res.* **2020**, *19* (8), 3510–3517.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00332>.
- (319) Hogan, J. M.; Pitteri, S. J.; Chrisman, P. A.; McLuckey, S. A. Complementary Structural Information from a Tryptic N-Linked Glycopeptide via Electron Transfer Ion/Ion Reactions and Collision-Induced Dissociation. *J. Proteome Res.* **2005**, *4* (2), 628–632.  
<https://doi.org/10.1021/pr049770q>.
- (320) Shaw, J. B.; Madsen, J. A.; Xu, H.; Brodbelt, J. S. Systematic Comparison of Ultraviolet Photodissociation and Electron Transfer Dissociation for Peptide Anion Characterization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (10), 1707–1715.  
<https://doi.org/10.1007/s13361-012-0424-9>.
- (321) Mohr, J.; Swart, R.; Samonig, M.; Böhm, G.; Huber, C. G. High-Efficiency Nano- and Micro-HPLC – High-Resolution Orbitrap-MS Platform for Top-down Proteomics. *PROTEOMICS* **2010**, *10* (20), 3598–3609. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000341>.
- (322) Nielsen, H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. In *Protein Function Prediction: Methods and Protocols*; Kihara, D., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, 2017; pp 59–73. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5_6).
- (323) Schuchard, M. D.; Mehig, R. J.; Cockrill, S. L.; Lipscomb, G. T.; Stephan, J. D.; Wildsmith, J.; Valdes-Camin, R.; Kappel, W. K.; Rai, A. J.; Scott, G. B. I. Artifactual Isoform Profile Modification Following Treatment of Human Plasma or Serum with Protease Inhibitor, Monitored by 2-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. *BioTechniques* **2005**, *39* (2), 239–247. <https://doi.org/10.2144/05392RR01>.
- (324) Ives, A. N.; Su, T.; Durbin, K. R.; Early, B. P.; dos Santos Seckler, H.; Fellers, R. T.; LeDuc, R. D.; Schachner, L. F.; Patrie, S. M.; Kelleher, N. L. Using 10,000 Fragment Ions to Inform Scoring in Native Top-down Proteomics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, *31* (7), 1398–1409. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00026>.
- (325) Elahi, S.; Tsuchiaka, S.; Mizutani, T.; Fujikawa, H. Characteristics of Staphylococcal Enterotoxin A Production and Growth of *Staphylococcus Aureus* in Shaking and Stationary Cultures. *Biocontrol Sci.* **2018**, *23* (4), 207–214. <https://doi.org/10.4265/bio.23.207>.
- (326) Schwendimann, L.; Merda, D.; Berger, T.; Denayer, S.; Feraudet Tarisse, C.; Kläui, A. J.; Messio, S.; Mistou, M. Y.; Nia, Y.; Hennekinne, J. A.; Graber, H. U. Staphylococcal Enterotoxin Gene Cluster: Prediction of Enterotoxin (SEG and SEI) Production and of the Source of Food Poisoning Based on VSA $\beta$  Typing. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, AEM.02662-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02662-20>.
- (327) Mun, S.-H.; Kim, S.-B.; Kong, R.; Choi, J.-G.; Kim, Y.-C.; Shin, D.-W.; Kang, O.-H.; Kwon, D.-Y. Curcumin Reverse Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*. *Mol. Basel Switz.* **2014**, *19* (11), 18283–18295. <https://doi.org/10.3390/molecules191118283>.
- (328) Joung, D.-K.; Mun, S.-H.; Choi, S.-H.; Kang, O.-H.; Kim, S.-B.; Lee, Y.-S.; Zhou, T.; Kong, R.; Choi, J.-G.; Shin, D.-W.; Kim, Y.-C.; Lee, D.-S.; Kwon, D.-Y. Antibacterial Activity of Oxyresveratrol against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* and Its Mechanism. *Exp. Ther. Med.* **2016**, *12* (3), 1579–1584.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2016.3486>.
- (329) Umeda, K.; Ono, H. K.; Wada, T.; Motooka, D.; Nakamura, S.; Nakamura, H.; Hu, D.-L. High Production of Egc2-Related Staphylococcal Enterotoxins Caused a Food Poisoning Outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *357*, 109366.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109366>.