



HAL
open science

Développement de tests rapides pour la détection des bêta-lactamases

Christian Moguet

► **To cite this version:**

Christian Moguet. Développement de tests rapides pour la détection des bêta-lactamases. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ005 . tel-04075525

HAL Id: tel-04075525

<https://theses.hal.science/tel-04075525v1>

Submitted on 20 Apr 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.

Développement de tests rapides pour la détection des bêta-lactamases

Development of rapid tests for beta-lactamases detection

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (IFTA)
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Santé et médicaments
Réfèrent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche Médicaments et Technologies pour la santé
(Université Paris-Saclay, CEA, INRAE) sous la direction du **Dr. Hervé Volland**

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 02 février 2023, par

Christian MOGUET

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Claire JANOIR-JOUVESHOMME Professeure, Université Paris-Saclay	Présidente et Examinatrice
Pierre BOGAERTS Professeur, Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Vincent CATTOIR Professeur, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes	Rapporteur et Examinateur
Nicole ORANGE Professeure, Université Rouen-Normandie	Examinatrice

Remerciements

Merci aux membres du jury,

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse (LERI), rattachée au Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) du CEA de Saclay. Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, M. le Professeur Pierre Bogaerts ainsi que M. le Professeur Vincent Cattoir pour le temps précieux que vous avez consacré pour la lecture et l'évaluation de ces travaux de thèse, et également Mme. la Professeure Nicole Orange ainsi que Mme. la Professeure Janoir-Jouvehommes Claire pour leur participation et leur évaluation. Je tiens également à remercier Monsieur le Docteur Hervé Volland de m'avoir guidé dans la réalisation de cette thèse et dans l'écriture du manuscrit.

Quelques années auparavant...

Qui aurait-dit qu'après un IUT, une licence 3, et une école d'ingénieur, je me serais lancé dans une thèse... Ce n'était pas réellement prévu au programme. Après une proposition de thèse entre la société NG Biotech et le LERI du CEA de Saclay, me voilà parti au CEA pour passer un entretien. Un des meilleurs entretiens que j'ai pu réaliser. Dès mon arrivée, il y avait un pot de bienvenue... Je me suis tout de suite senti bien et j'ai su que c'était la bonne décision, non pas à cause du pot de bienvenue, mais pour le sujet qui m'a été proposé. Même si peu de personnes y croyait, c'était un défi à relever !

Et me voilà parti pour trois ans de thèse. Le démarrage s'est fait sur les chapeaux de roue car tout se déroulait parfaitement bien jusqu'à la période du COVID. Une chance d'avoir été entouré de personnes conciliantes car la période fût compliquée pour un grand nombre d'entre nous. Ainsi, tout juste après quatre mois de thèse, j'ai pu commencer à rédiger mon introduction de thèse... Ceci explique peut-être la longueur de ce manuscrit ; j'avais du temps à tuer. Puis, le retour au laboratoire et de nombreux résultats qui s'en sont suivis. Certains étaient bons, d'autres moins bons, d'autres... à oublier ! Ces moments nous apprennent à devenir un chercheur, que tout n'est pas tracé, et qu'il est nécessaire

d'apprendre des expériences qui ne fonctionnent pas. J'ai eu la chance d'écrire des articles, des revues, un brevet, présenter le brevet en 180 secondes (merci à l'équipe de tournage *made in LERI*) et participer à des congrès internationaux. Tant d'expériences que je n'aurais imaginé réaliser au départ. Même si j'ai un sentiment d'inachèvement sur une partie des travaux de cette thèse, je compte sur Hervé pour développer le test. Je suis quasi-sûr (toujours les 0,0001% que ça ne puisse pas marcher...) que la nouvelle stratégie fonctionnera et parce que je veux que ce défi soit relevé. Il est temps maintenant des remerciements.

Merci aux équipes du Kremlin-Bicêtre,

Merci à M. Le docteur Thierry Naas pour son expertise dans le domaine de l'antibiorésistance, ses relectures et ses corrections de résumés, de posters et d'articles. Merci également à l'équipe du Kremlin Bicêtre pour leur accueil lors des validations de tests, et particulièrement à Camille qui m'a aidé dans ces travaux. Ces validations ne se sont pas toujours déroulées comme prévues mais c'était l'occasion de revenir au Kremlin Bicêtre. Je te remercie également pour la relecture de ce manuscrit.

Merci aux équipes de NG-Biotech,

Merci aux équipes de NG Biotech pour leur accueil chaleureux lors de mes déplacements dans l'entreprise. Ces moments me rappellent l'époque de mon stage de fin d'études et c'était un réel plaisir d'y revenir. Merci à Laura, Emeline, Léa, Maxime, Lucie, Arnaud, Audrey, Caro, Aurore, Milovan. Merci pour votre confiance.

Merci aux équipes du LERI,

Tout d'abord, je tiens tout particulièrement à remercier l'équipe des anticorps monoclonaux qui sont une part importante de ces travaux. Sans eux, rien de tout cela n'est possible. Merci à Marc de m'avoir montré les immunisations et d'avoir accepté tous les immunogènes que je lui donnais (sans réussite parfois). Merci à Stéphy pour sa gentillesse, son organisation et son travail sans qui les fameux anticorps anti-céfotaxime n'auraient pas vu le jour. Ce fut un plaisir de te rencontrer et de partager pendant ces trois années.

Je tiens à remercier mes ex-voisins de bureau qui m'ont supporté pendant ces trois années, avec mes moments de joie mais aussi de ras-le-bol. Merci à Elise, Julien, Blanche, Lucia, Anne (merci pour la relecture du manuscrit), Nathalie, et Boubou. Mon cher Boubou, au début de cette thèse, tu n'étais pas encore revenu au laboratoire et pourtant tu étais attendu comme le messie ! Et j'ai très vite compris pourquoi. Outre tes capacités de travail et tes connaissances, tu as été une oreille attentive et un ami. *PS* : Grâce à mon lexique, nous avons partagé de bons moments de rire avec les mots fléchés. Je te remercie également pour la relecture de ce manuscrit.

Domdom (#mademoiselle), nos discussions étaient un plaisir et je te souhaite que le meilleur pour la suite ! Garde ton sourire, c'est toujours de bons moments passés avec toi. Hervé Bernard, tes cris et tes frayeurs matinales étaient devenus une habitude. Ne perds pas cette bonne humeur, merci ! Merci également à toutes les personnes que j'ai côtoyées, et avec lesquelles j'ai échangé et parlé pendant ces trois années : Cécillette, Céline, Karla, Stéphane H., Marta, Mélanie, Audrey, Julie, Karine, Stéphane N., Maïkane, Elodie, Patricia, Gwen. Chacune de vos paroles a toujours été bienveillante. Merci à Alexandra pour ces moments de partage, ce fût un plaisir de croiser ton chemin.

Merci à Stéphanie, notre cheffe de service, et Christophe, notre chef de département, pour leur soutien et leurs encouragements ! Merci à Sandrine, Laurie et Florence pour leur soutien logistique et administratif dans notre vie de tous les jours.

Fanny, Justine, Nina, Capucine et Anne-So, merci à vous pour ces moments passés aux pauses cafés, pour nos discussions aux pauses déjeuners, et à votre bonne humeur, je ne garde que des bons souvenirs ! Loïs, merci pour ces moments de partage et de discussions, ce fût un plaisir de croiser ton chemin. Anaïs, merci de m'avoir aidé dans mes travaux quand j'en avais besoin, j'ai été ravi de partager ce chemin avec toi.

Lilas, *my partner in crime* ! En repensant à ces trois années, nous avons partagé de supers moments qui s'ajouteront à une longue liste. Comme il est dit, lorsque les sept ans d'amitié sont dépassés, cette amitié est susceptible de durer pendant très longtemps. Tu as encore quelques années à me supporter (courage !).

Mon cher Hervé... que dire mis à part que je n'en serais pas là sans ton savoir, ta patience et ta bonne humeur. Tu as cru en moi et tu m'as appris énormément de choses qui me seront utiles pour mon futur. J'espère qu'un jour je serais un aussi bon chercheur que toi ! Je te remercie pour la relecture de ce manuscrit et même si cette fin de thèse a été un peu stressante (les fameuses corrections), je n'aurais pas souhaité un autre directeur de thèse.

Merci également à tous ceux qui sont partis vers d'autres horizons pendant ces trois années de thèse : Vanina, Eléa, Elora, Marion, Anaïs D., Antoine, Victoria ; nos chemins se sont croisés et se fût un plaisir.

Merci à tous de m'avoir encouragé et suivi tout au long de mes défis sportifs de crossfit et de trail. Le plus réputé sur ces trois années est le fameux trail de 110 km. Tous vos messages m'ont fait chaud au cœur et m'ont motivé pour d'autres défis.

Merci aux équipes du SCBM,

Merci à Antoine pour ton aide, ton écoute et ton transfert de connaissances. Sans toi, aucun anticorps n'aurait pu être développé. Merci à M. le Docteur Frédérique Taran de nous avoir accueillis au sein de son laboratoire.

Merci à l'équipe de l'UMR 8601,

Merci à Mélanie, Emmanuelle et Laura pour leur aide dans la production du carbapénème.

Merci à ma famille et à mes amis,

Merci à mes parents pour leur soutien, quel que soit mes choix que j'ai pu réaliser ou les défis que j'ai relevés. Merci à vous d'être là. Merci également à mon frère qui a toujours été là pour moi quand j'en avais besoin.

Merci à ma compagne, Pauline, sans qui je n'en serais pas là également. Elle m'a toujours soutenu pour accomplir mes objectifs. Merci à toi d'être toujours présente pour moi, dans n'importe quelle circonstance. Tu m'écoutes, me remontes le moral et m'encourages quand j'en ai le plus besoin. Merci infiniment pour tout ! Merci également à Louis, Isabelle et Victor d'avoir été présents pendant cette thèse.

Enfin, je remercie tous mes amis pour leur soutien et leurs encouragements.

De nos jours...

Après neuf ans d'études, il est temps pour moi d'arrêter d'être un étudiant et de commencer ma vie de chercheur. Sans toutes les personnes que j'ai pu rencontrer, je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Merci, et j'espère que nos chemins se croiseront de nouveau car l'expérience n'en sera que plus belle !

Les défis que je souhaite relever sont encore nombreux et je compte bien les réussir sans jamais abandonner. Une des citations de M. Marc Lévy qui me tient particulièrement à cœur et qui définira mon futur, est : « Rien n'est impossible, seules les limites de nos esprits définissent certaines choses comme inconcevables ».

Table des matières

Sommaire

Table des matières	9
Sommaire.....	11
Liste des figures.....	17
Liste des tableaux	23
Liste des annexes.....	27
Liste des abréviations.....	29
Résumé.....	33
Liste des tampons	35
Introduction générale	39
Chapitre I : La bactérie, un être unicellulaire.....	41
I.1. Les procaryotes.....	41
I.2. La cellule bactérienne.....	42
I.2.1. Le matériel génétique et les protéines associées	43
I.2.2. Le cytoplasme.....	44
I.2.3. L'ADN extra-chromosomique.....	44
I.2.4. La membrane interne.....	47
I.2.5. La paroi cellulaire	47
I.2.6. Les structures inconstantes.....	53
I.3. Les principales bactéries.....	54
Chapitre II : Les antibiotiques	57
II.1. L'ère des antibiotiques.....	58
II.2. Des outils thérapeutiques puissants.....	59
II.2.1. Les inhibiteurs des acides nucléiques.....	61

II.2.2. Les inhibiteurs de la synthèse des protéines	62
II.2.3. Les inhibiteurs de la synthèse des folates	65
II.2.4. Les antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires.....	66
II.2.5. Les inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane	68
II.3. Le devenir des antibiotiques.....	75
Chapitre III : L'antibiorésistance chez les bactéries.....	79
III.1. La résistance aux antibiotiques	79
III.1.1. L'origine de l'antibiorésistance	81
III.1.2. Le concept « One Health »	81
III.2. Les bactéries multi-résistantes majeures	82
III.2.1. <i>Escherichia coli</i>	83
III.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	83
III.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
III.2.4. <i>Acinetobacter</i> spp.....	84
III.2.5. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	84
III.2.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	85
III.2.7. <i>Enterococci</i> spp.	85
III.3. Les mécanismes de résistance	86
III.3.1. L'imperméabilité aux antibiotiques	87
III.3.2. L'efflux des molécules d'antibiotiques	88
III.3.3. Les modifications de la cible thérapeutique	89
III.3.4. Les modifications de l'antibiotique	91
Chapitre IV : Les entérobactéries et les β -lactamases	93
IV.1. L'évolution de l'antibiorésistance chez les entérobactéries	93
IV.1.1. Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi	94

IV.1.2. Les entérobactéries productrices de carbapénémases.....	94
IV.2. Les principales variétés de β -lactamases.....	95
IV.2.1. Les β -lactamases à spectre étroit	97
IV.2.2. Les β -lactamases à spectre étendu	98
IV.2.3. Les carbapénémases	102
Chapitre V : La détection des bactéries multi-résistantes aux β -lactamases	107
V.1. Les notions de performances d'un test de diagnostic.....	107
V.1.1. Les performances intrinsèques	108
V.1.2. Les performances extrinsèques	109
V.2. Les méthodes génotypiques.....	110
V.2.1. L'amplification génique	111
V.2.2. Le séquençage	113
V.2.3. Les limitations	115
V.3. Les méthodes phénotypiques	115
V.3.1. Les tests de sensibilité aux antimicrobiens basés sur l'activité β -lactamase.....	116
V.3.2. Les tests immunochromatographiques.....	137
Projet de thèse	177
Déroulement du projet de thèse	181
Chapitre I : La stratégie générale	183
I.1. La production des anticorps monoclonaux.....	183
I.1.1. La production des immunogènes	183
I.1.2. L'immunisation des souris.....	184
I.1.3. Le suivi de la réponse immunitaire et la sélection des anticorps	185
I.2. Le développement d'un test rapide	186
I.2.1. Le test immunochromatographique à flux latéral.....	186

I.2.2. Le principe du test rapide	186
I.3. La validation du test rapide sur des colonies bactériennes.....	188
I.4. La validation du test rapide sur des échantillons biologiques	188
Chapitre II : Le test de détection de l'activité céphalosporinase	191
II.1. La production de l'immunogène.....	191
II.2. L'obtention des anticorps monoclonaux.....	193
II.2.1. La purification des deux formes d'antibiotique marquées et non marquées	193
II.2.2. Le suivi de la réponse immunitaire des souris.....	198
II.2.3. La sélection des hybridomes et la caractérisation des anticorps	204
II.2.4. La discussion.....	219
II.3. Le développement du test immunochromatographique à flux latéral	221
II.3.1. La préparation des bandelettes	221
II.3.2. Le procédé d'optimisation du test rapide.....	223
II.3.3. Le transfert industriel du test.....	237
II.3.4. La validation du test rapide sur un soucier d'antibiorésistance	237
II.4.1. Les tests phénotypiques	251
II.4.2. L'étude comparative.....	253
II.5. Le multiplexage de la détection de l'activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu et de la détection des CTX-M	265
II.5.1. Le développement du test immunochromatographique à flux latéral	265
II.5.2. La validation du test Rapid LFIA ESC.....	265
II.6. Les détections directes de l'activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu et des enzymes CTX-M dans les échantillons biologiques	279
II.6.1. Le SPID, un dispositif de détection en échantillon biologique.....	279
II.6.2. La détection en échantillon biologique à l'aide du SPID.....	279

II.6.3. Le « clip », un nouvel adaptateur SPID pour cassette	285
II.6.4. La discussion.....	287
Chapitre III : Le test de détection de l'activité carbapénémase	289
III.1. La production de l'immunogène	289
III.2. L'obtention des anticorps monoclonaux : première sélection.....	291
III.2.1. La purification des deux formes d'antibiotique marquées et non marquées.....	292
III.2.2. Le suivi de la réponse immunitaire sur les souris.....	297
III.2.3. La sélection des hybridomes et la caractérisation des anticorps	302
III.2.4. Le développement du test immunochromatographique par flux latéral.....	311
III.2.5. La discussion.....	313
III.3. L'obtention des anticorps monoclonaux : seconde sélection	315
III.3.1. La purification des deux formes d'antibiotiques marquées et non marquées...	316
III.3.2. Le suivi de la réponse immunitaire sur les souris.....	318
III.3.3. La caractérisation des saignées avec le nouveau marqueur	321
III.3.4. La sélection des hybridomes et caractérisation des anticorps	323
III.3.5. Le développement du test immunochromatographique à flux latéral	330
III.3.6. L'origine de la non-fixation des anticorps sur le carbapénème-BSA.....	332
III.3.7. La discussion.....	340
III.4. L'évaluation des réactions croisées des saignées avec la BSA.....	341
III.4.1. Les saignées anti-carbapénème-BSA	341
III.4.2. Les saignées anti-céfotaxime-BSA.....	343
III.4.3. La discussion.....	345
Discussion générale	347
Références bibliographiques	353
Annexes	381

Liste des figures

Figure 1 : La composition d'une cellule bactérienne.	42
Figure 2 : La structure du peptidoglycane.	48
Figure 3 : La synthèse du MurNAc-pentapeptide.	49
Figure 4 : La synthèse du GlcNAc-MurNAc-pentapeptide.	49
Figure 5 : La synthèse du peptidoglycane grâce aux différentes PLP.	50
Figure 6 : La différence de compositions pariétales entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.	51
Figure 7 : La composition du lipopolysaccharide.	52
Figure 8 : La chronologie des découvertes des classes d'antibiotiques.	59
Figure 9 : Les cibles thérapeutiques existantes selon les classes d'antibiotiques impliquées.	60
Figure 10 : Les cibles des inhibiteurs de la synthèse protéique.	63
Figure 11 : Les cibles des inhibiteurs de la synthèse des folates.	65
Figure 12 : Le mécanisme d'action des polymyxines sur les enveloppes membranaires bactériennes.	67
Figure 13 : Les structures des quatre sous-classes de β -lactamines.	69
Figure 14 : L'homologie structurale entre les pénicillines et le dipeptide d'alanine.	69
Figure 15 : Le mécanisme d'action des β -lactamines au niveau de la synthèse du peptidoglycane.	70
Figure 16 : La structure chimique de l'acide 6-aminopénicillanique.	71
Figure 17 : La structure chimique de l'acide 7-aminocéphalosporanique.	72
Figure 18 : La structure chimique de l'acide olivannique.	73
Figure 19 : La structure chimique de l'aztréonam.	74
Figure 20 : La structure chimique de l'acide clavulanique.	75
Figure 21 : Les taux de croissance bactérienne en fonction de la concentration en antibiotique.	77
Figure 22 : Les catégories cliniques des bactéries selon la CMI.	80
Figure 23 : La résistance aux antibiotiques au sein du concept « One Health ».	82

Figure 24 : Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez la bactérie. ...	87
Figure 25 : Les cinq grandes familles de pompes à efflux.	89
Figure 26 : Le remplacement de la cible des β -lactamines comme outil de résistance.	90
Figure 27 : La dégradation enzymatique de la pénicilline par une β -lactamase.	92
Figure 28 : Les quatre classes de β -lactamases de la classification de Ambler.	96
Figure 29 : La répartition des variants CTX-M en Europe.	100
Figure 30 : La répartition géographique des cinq principales carbapénémases dans le monde.	103
Figure 31 : Les catégories interprétatives selon le diamètre de la zone d'inhibition.	117
Figure 32 : L'interprétation du test CIM en présence ou en absence de carbapénémases.	118
Figure 33 : L'interprétation d'un Etest® pour la détermination de la CMI d'un antibiotique pour une souche donnée.	120
Figure 34 : L'interprétation d'un test par disques combinés pour la détection des carbapénémases.	122
Figure 35 : L'interprétation d'un test de double synergie pour la détection des BLSE.	123
Figure 36 : Les milieux chromogéniques pour identifier les espèces bactériennes.	124
Figure 37 : L'interprétation du test de Hodge modifié pour la détection de carbapénémases.	125
Figure 38 : Le principe du test Carba NP pour la détection des carbapénémases.	127
Figure 39 : Le principe du test β -Carba™ pour la détection des carbapénémases.	129
Figure 40 : L'analyse des spectres de masse du céfotaxime non-hydrolysé et du céfotaxime hydrolysé.	132
Figure 41 : L'analyse des spectres d'absorbance de l'imipénème non-hydrolysé et de l'imipénème hydrolysé.	134
Figure 42 : L'analyse de la conductivité du test BYG Carba pour la détection des carbapénémases.	136
Figure 43 : La composition d'un test rapide.	168
Figure 44 : Le déroulement d'un test LFIA avec un échantillon positif.	171
Figure 45 : Le format « Sandwich » et le signal résultant d'un test immunologique.	172
Figure 46 : Le format « Compétitif » et le signal résultant d'un test immunologique.	172

Figure 47 : L'échéancier des immunisations et des prélèvements sanguins sur les souris.	185
Figure 48 : Le principe du test rapide pour la détection de l'activité enzymatique des β -lactamases.	187
Figure 49 : Les différentes étapes du SPID associées à une détection en test rapide.	190
Figure 50 : La réaction chimique nécessaire pour obtenir le céfotaxime-chloroacétamide.	192
Figure 51 : La structure chimique du céfotaxime-BSA, utilisé comme immunogène.	193
Figure 52 : Les différentes structures utilisées pour la sélection et la caractérisation des anticorps anti-céfotaxime.	195
Figure 53 : Les profils d'élution du céfotaxime-biotine non-hydrolysé et du céfotaxime-biotine hydrolysé en chromatographie en phase inverse.	196
Figure 54 : Les profils d'élution du céfotaxime non-hydrolysé et du céfotaxime hydrolysé en chromatographie en phase inverse.	197
Figure 55 : Le dosage immuno-enzymatique pour suivre les anticorps spécifiques du céfotaxime non-hydrolysé.	199
Figure 56 : Les dosages immuno-enzymatiques pour suivre les anticorps spécifiques d'un antibiotique dans les prélèvements sanguins, pour la sélection des hybridomes et la caractérisation des anticorps.	200
Figure 57 : Exemple de courbe d'étalonnage pour un dosage par compétition.	201
Figure 58 : Le suivi des réponses immunitaires sur les saignées des souris immunisées avec du céfotaxime-BSA.	202
Figure 59 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime sur les saignées des souris immunisées avec du céfotaxime-BSA.	203
Figure 60 : Exemple de courbe d'étalonnage pour un dosage par compétition.	207
Figure 61 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime sur cinq anticorps.	208
Figure 62 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime sur trois anticorps.	209
Figure 63 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime sur deux anticorps.	210
Figure 64 : Le principe du test d'interférométrie pour évaluer l'affinité des anticorps.	212
Figure 65 : Les différentes étapes du test d'interférométrie pour évaluer l'affinité des anticorps pour l'antibiotique-biotine.	214

Figure 66 : Les graphiques obtenus en OCTET sur l'affinité du céfotaxime-biotine non-hydrolysé et du céfotaxime-biotine hydrolysé sur deux anticorps.....	215
Figure 67 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime non-hydrolysé de quatre anticorps.....	218
Figure 68 : Les structures chimiques des différentes β -lactamines utilisées dans les réactions croisées.....	220
Figure 69 : Les tests d'inhibition de signal avec le céfotaxime non-hydrolysé commercial et le céfotaxime hydrolysé sur cinq anticorps.....	227
Figure 70 : Le principe du test d'activité enzymatique des β -lactamases sur les céphalosporines à spectre étendu.....	238
Figure 71 : Les différentes étapes du SPID associées à une détection en test rapide.....	281
Figure 72 : La structure chimique du carbapénème-alcyne.....	289
Figure 73 : La comparaison des différentes structures de carbapénèmes commerciaux avec le carbapénème-R.....	290
Figure 74 : La structure chimique du carbapénème-BSA, utilisé comme immunogène.....	291
Figure 75 : La structure chimique du carbapénème-amine.....	292
Figure 76 : La comparaison de structure entre le carbapénème-BSA et le carbapénème-biotine non-hydrolysé.....	293
Figure 77 : Les différentes structures utilisées pour la sélection et la caractérisation des anticorps anti-carbapénème.....	294
Figure 78 : Les profils d'élution du carbapénème-biotine non-hydrolysé et du carbapénème-biotine hydrolysé en phase inverse.....	295
Figure 79 : Les profils d'élution du méropénème non-hydrolysé et du méropénème hydrolysé en phase inverse.....	296
Figure 80 : Le dosage immuno-enzymatique pour suivre les anticorps spécifiques du carbapénème.....	297
Figure 81 : Les dosages immuno-enzymatiques pour suivre les anticorps spécifiques d'un antibiotique dans les prélèvements sanguins, pour la sélection des hybridomes et la caractérisation des anticorps.....	298
Figure 82 : Exemple de courbe d'étalonnage pour un dosage par compétition.....	299

Figure 83 : Le suivi des réponses immunitaires sur les saignées des souris immunisées avec du carbapénème-BSA.....	300
Figure 84 : Les courbes de compétition avec le méropénème non-hydrolysé sur les saignées des souris immunisées avec du carbapénème-BSA.....	301
Figure 85 : Les courbes de compétition avec le méropénème sur quatre anticorps.....	305
Figure 86 : Les courbes de compétition avec le méropénème sur deux anticorps.....	306
Figure 87 : Les différentes étapes du test d'interférométrie pour évaluer l'affinité des anticorps pour l'antibiotique-biotine.....	308
Figure 88 : Le graphique obtenu en OCTET sur l'affinité du carbapénème-biotine non-hydrolysé sur l'anticorps 5.....	309
Figure 89 : L'évaluation de la capacité de fixation de cinq anticorps sur le carbapénème-BSA au cours du temps.....	311
Figure 90 : La structure commune entre le carbapénème-biotine et l'immunogène.....	315
Figure 91 : Les différentes structures utilisées pour la sélection et la caractérisation des anticorps anti-carbapénème.....	317
Figure 92 : Le profil d'élution du carbapénème-biotine non-hydrolysé en phase inverse.	318
Figure 93 : Le suivi des réponses immunitaires sur les saignées des souris immunisées avec du carbapénème-BSA avec le nouveau carbapénème-biotine non-hydrolysé.....	319
Figure 94 : La comparaison des réponses immunitaires sur les saignées des souris immunisées avec du carbapénème-BSA, avec l'ancien et le nouveau carbapénème-biotine non-hydrolysé.....	320
Figure 95 : La structure commune entre le nouveau marqueur et l'immunogène.....	321
Figure 96 : Les courbes de compétition avec le méropénème sur les saignées des souris immunisées avec du carbapénème-BSA.....	322
Figure 97 : Les courbes de compétition avec le méropénème sur quatre anticorps.....	325
Figure 98 : Le graphique obtenu en OCTET sur l'affinité du carbapénème-biotine non-hydrolysé sur un anticorps.....	327
Figure 99 : L'évaluation de la capacité de fixation de quatre anticorps sur le carbapénème-BSA au cours du temps.....	329

Figure 100 : Les courbes de compétition avec le méropénème non-hydrolysé et la BSA sur les saignées n°4 des souris immunisées avec du carbapénème-BSA.....	342
Figure 101 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime et la BSA sur les saignées des souris immunisées avec du céfotaxime-BSA.....	344
Figure 102 : La structure chimique du nouveau carbapénème utilisé comme futur immunogène.....	346

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différences de caractéristiques entre les bactéries, les archées et les eucaryotes.	41
Tableau 2 : La classification des genres bactériens selon la respiration, la forme des bactéries, et la coloration de Gram.	55
Tableau 3 : Le tableau de contingence pour définir la sensibilité et la spécificité d'un test.	108
Tableau 4 : Les masses moléculaires des β -lactamines en spectrométrie de masse avant et après hydrolyse par des β -lactamases.	133
Tableau 5 : Les avantages et les inconvénients d'un test immunochromatographique à flux latéral.	168
Tableau 6 : Les différents composants du SPID.	189
Tableau 7 : Les pourcentages de réactions croisées des dix-neuf anticorps obtenus entre les deux formes de céfotaxime ainsi que les concentrations B/B0 (50 %) du céfotaxime non-hydrolysé.	211
Tableau 8 : Les constantes d'association et de dissociation et d'affinité pour le céfotaxime-biotine non-hydrolysé et le céfotaxime-biotine hydrolysé sur huit anticorps.	216
Tableau 9 : Les pourcentages de réactions croisées de différentes β -lactamines sur quatre anticorps.	219
Tableau 10 : Les réactifs chimiques pouvant être impliqués dans le traitement chimique des composants d'un test immunochromatographique à flux latéral.	222
Tableau 11 : L'impact de la diminution de la $DO_{530\text{ nm}}$ de l'anticorps 3 sur l'intensité du signal sur la LT.	225
Tableau 12 : L'impact de la diminution de la concentration en céfotaxime-BSA sur la LT sur l'intensité du signal sur la LT.	226
Tableau 13 : Les tests d'inhibition de signal avec le céfotaxime non-hydrolysé commercial et le céfotaxime hydrolysé sur bandelette, avec cinq anticorps sélectionnés.	228
Tableau 14 : L'évaluation de l'activité enzymatique de CTX-M-2 sur le céfotaxime non-hydrolysé au cours du temps avec l'anticorps 3 (état liquide et migration verticale).	230

Tableau 15 : L'évaluation de l'activité enzymatique de CTX-M-2 sur le céfotaxime non-hydrolysé au cours du temps avec l'anticorps 3 (état séché et migration verticale).	231
Tableau 16 : L'évaluation de l'activité enzymatique de CTX-M-2 sur le céfotaxime non-hydrolysé au cours du temps, avec l'anticorps 3 (état séché et migration horizontale).....	232
Tableau 17 : L'optimisation de la DO _{530 nm} de l'anticorps 3 sur l'activité enzymatique de CTX-M-2 sur le céfotaxime non-hydrolysé au cours du temps, avec l'anticorps 3 (état séché et migration horizontale).	233
Tableau 18 : La détermination du temps d'incubation optimale entre le céfotaxime non-hydrolysé commercial et une colonie bactérienne pour obtenir un signal positif.	236
Tableau 19 : Les limites de détection de différentes souches sur le test d'activité enzymatique sur le céfotaxime et test de détection des CTX-M en urine avec le SPID.	282
Tableau 20 : Les limites de détection de différentes souches sur le test d'activité enzymatique sur le céfotaxime et test de détection des CTX-M en hémoculture avec le SPID.	283
Tableau 21 : Les limites de détection de différentes souches sur le test d'activité enzymatique sur le céfotaxime en milieu de transport d'écouvillon rectal avec le SPID.	284
Tableau 22 : Les détections de l'activité enzymatique sur le céfotaxime en urine et hémoculture de différentes souches avec le nouvel adaptateur SPID pour cassette.....	286
Tableau 23 : Les pourcentages de réactions croisées des dix-neuf anticorps obtenus entre les deux formes de méropénème ainsi que les concentrations B/B0 (50 %) du méropénème non-hydrolysé.....	307
Tableau 24 : L'évaluation de la capacité de fixation des anticorps sur le carbapénème-BSA présent en LT sur une bandelette (état liquide, migration verticale).....	313
Tableau 25 : Les pourcentages de réactions croisées des 19 anticorps obtenus entre les deux formes de méropénème ainsi que les concentrations B/B0 (50 %) du méropénème non-hydrolysé.....	326
Tableau 26 : L'évaluation de la capacité de fixation des anticorps monoclonaux sur le carbapénème-BSA présent en LT sur une bandelette (état liquide, migration verticale)....	331
Tableau 27 : La mise en contact directe entre quatre anticorps marqués et le carbapénème-BSA présent sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).....	332

Tableau 28 : L'étude de l'impact des différents constituants du tampon de migration sur la fixation de quatre anticorps marqués sur le carbapénème-BSA présent sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).	333
Tableau 29 : La comparaison de deux tampons de migration sur la fixation de quatre anticorps marqués sur le carbapénème-BSA présent sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).	334
Tableau 30 : L'évaluation de la fixation des anticorps marqués sur différents composants sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).	335
Tableau 31 : Les intensités des tests de compétitions entre le méropénème et la BSA de cinq anticorps marqués et le carbapénème-BSA présent sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).	337
Tableau 32 : Les déplacements obtenus avec le méropénème et la BSA sur les dix-neuf anticorps.....	339

Liste des annexes

Annexe 1 : Un tableau récapitulatif des méthodes génotypiques et phénotypiques de détection de la résistance aux β -lactamines.....	383
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Liste des abréviations

µm : Micromètre

ABC (ATP-Binding Cassette) : Famille des cassettes de liaison ATP

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

ARN : Acide ribonucléique

BCA : Dosage de l'acide bi-cinchoninique

BLSE : β-lactamases à spectre étendu

BMR : Bactéries multi-résistantes

C1G : Céphalosporine de première génération

C2G : Céphalosporine de seconde génération

C3G : Céphalosporine de troisième génération

C4G : Céphalosporine de quatrième génération

C5G : Céphalosporine de cinquième génération

c : Concentration critique basse

C : Concentration critique haute

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CIM (Carbapenem Inactivation Method) : Test d'inactivation des carbapénèmes

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) : Institut des normes cliniques et de laboratoire

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CNR : Centre national de référence

DMF : Diméthylformamide

DTNB : Acide 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)

E-BLSE : Entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre étendu

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

EGM : Élément génétique mobile

EPC : Entérobactéries productrices de carbapénémases

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) : Comité Européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens

FN : Faux négatif

FP : Faux positif

GlcNAc : N-acétylglucosamine

IMR : Intégron de multirésistance

KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) : Hémocyanine de crustacé

LB : Bouillon de lysogénie

LC : Ligne contrôle

LERI : Laboratoire d'étude et de recherche en immunoanalyse

LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay) : Immunochromatographie à flux latéral

LT : Ligne test

LPS : Lipopolysaccharides

MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) : Ionisation par désorption laser assistée par matrice – Temps de vol

MATE (Multidrug And Toxic compounds Extrusion) : Famille d'extrusion de composés toxiques et multidrogues

MbN : Membrane de nitrocellulose

mDap : Acide mésodiaminopimélique

MFS (Major Facilitator Superfamily) : Superfamille des facilitateurs

mm : Millimètre

MRSA (Methicillin-Resistant *S. aureus*) : *S. aureus* résistant à la méthicilline

MurNAc : N-acétylmuramique

NGS (Next-Generation sequencing) : Nouveau séquençage du génome

NHS : N-hydroxy-succinimide

NHS-LC-biotine : Acide N-hydroxy-succinimide biotinamidohexanoïque

nm : Nanomètre

PA : Papier absorbant

PC : Papier conjugué

PE : Papier échantillon

PEG : Polyéthylène glycol

PLP : Protéine de liaison à la pénicilline

RND (Resistance-Nodulation cell Division) : Famille résistance-nodulation-division

SI : Souche intermédiaire

SR : Souche résistante

SS : Souche sensible

SM : Spectrométrie de masse

SMR (Small Multidrug Resistance) : Famille de multirésistance aux médicaments

TBTA : Tris((1-benzyl-4-triazolyl)methyl)amine

UE : Unité enzymatique

UFC : Unité formante colonie

VN : Vrai négatif

VP : Vrai positif

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

WT : Sauvage

Résumé

Titre : Développement de tests rapides pour la détection des bêta-lactamases

La lutte contre les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) représente un des plus grands défis auxquels doivent faire face nos sociétés actuelles. Le nombre d'infections causées par des BMR étant en nette augmentation dans le monde entier, celles-ci représentent un enjeu crucial de santé publique.

L'un des principaux mécanismes de résistance mis en place par les bactéries est la production de bêta-lactamases, enzymes hydrolysant les antibiotiques de type bêta-lactamine. Pour lutter efficacement contre la dissémination de bactéries produisant ces enzymes et fournir un traitement approprié aux patients, il est essentiel de pouvoir détecter rapidement les bêta-lactamases.

Dans ce contexte, le projet de cette thèse est de développer deux nouveaux tests bandelettes permettant de détecter l'activité enzymatique de ces enzymes. Ils détecteront l'hydrolyse de deux classes de bêta-lactamines : les céphalosporines et les carbapénèmes.

Ces tests seront basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de ces deux classes d'antibiotiques. Ces travaux de thèse impliqueront la production, la sélection et la caractérisation de ces anticorps. Les tests développés seront transférés à un industriel et validés avec différentes souches bactériennes produisant différentes bêta-lactamases dans différents échantillons biologiques (hémocultures, urines, écouvillons rectaux).

Mots clés : Diagnostic, Antibiorésistance, Test immunochromatographique à flux latéral

Liste des tampons

Tampon de migration : Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 + NaCl 0,15 M + BSA 0,1 % + Tween 20 0,5 % + CHAPS 1,0 % + Azide de sodium 0,01 %

Tampon EIA-PVP : Phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, PVP 0,1 %, Azide de sodium 0,01 %

Tampon de lavage : Phosphate de potassium 10 mM pH 7,4 + Tween 20 0,05 %

Tampon OCTET : Phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 + NaCl 0,15 M + PVP 0,1 % + Tween 20 0,02 % + Azide de sodium 0,01 %

Tampon de lyse : Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 + NaCl 0,15 M + BSA 0,1 % + Tween 20 0,5 % + Brij-O10 0,6 % (dans CAPS 0,4 M pH = 11,7) + Azide de sodium 0,01 %

Tampon de migration modifié : Tris/HCl 0,1M pH 8,0 + NaCl 0,15 M + Caséine 0,1 % + Tween 20 0,5 % + CHAPS 1% + Azide de sodium 0,01 %

Tampon de lyophilisation : Phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 + NaCl 0,15 M + BSA 0,1 % + Azide de sodium 0,01 % + Sucrose 1 % + Tréhalose 1 %

Introduction générale

Chapitre I : La bactérie, un être unicellulaire

Entre 1674 et 1687, Anton Van Leeuwenhoek, grand amateur de loupes et instruments d'optique, découvre et décrit le monde microbien. Suite à de nombreux travaux, deux principales catégories ont été définies (1) :

- Les eucaryotes possèdent un noyau, des chromosomes, un appareil de mitose et une structure cellulaire complexe.
- Les procaryotes possèdent un chromosome unique sans noyau et une structure élémentaire.

I.1. Les procaryotes

Pendant de nombreuses années, les procaryotes ont été représentés uniquement par les bactéries. Avec le développement des méthodes de biologie moléculaire et l'étude du gène de la petite sous-unité 16S du ribosome, il a été possible de différencier au sein des procaryotes deux domaines : les archées et les bactéries (2). Malgré des ressemblances morphologiques, de nombreuses divergences ont été observées sur les mécanismes de transcription de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (hélicases, polymérases...) et de traduction de l'acide ribonucléique (ARN) (facteurs d'élongation...). Chacun de ces trois domaines sont donc distincts les uns des autres avec des caractéristiques propres décrites dans le Tableau 1 (3).

Caractéristiques	Bactéries	Archées	Eucaryotes
<i>Liaison carbone des lipides</i>	Ester	Ether	Ester
<i>Organisation tête phosphate des lipides</i>	Glycérol-3-phosphate	Glycérol-1-phosphate	Glycérol-3-phosphate
<i>Métabolisme</i>	Bactérien	Similaire aux bactéries	Eucaryote
<i>Noyau</i>	Non	Non	Oui
<i>Organites cellulaires</i>	Non	Non	Oui
<i>Réplication de l'ADN</i>	Bactérien	Similaire aux eucaryotes	Eucaryote
<i>Mécanisme de transcription de l'ADN</i>	Bactérien	Similaire aux eucaryotes	Eucaryote
<i>Traduction de l'ARN (facteurs d'élongation)</i>	Bactérien	Similaire aux eucaryotes	Eucaryote
<i>Forme du chromosome</i>	Principalement circulaire	Circulaire	Linéaire
<i>Pathogène</i>	Oui	Non	Oui

Tableau 1 : Les différences de caractéristiques entre les bactéries, les archées et les eucaryotes.

Adapté de Tan C. et al. (3).

Le sujet de cette thèse étant la détection de l'antibiorésistance chez les bactéries, seul le domaine des bactéries est abordé dans la suite de cette introduction.

1.2. La cellule bactérienne

Une bactérie est un micro-organisme unicellulaire procaryote, avec une taille variable de 1 à 10 micromètres (μm). Elle est donc uniquement observable au microscope (optique, électronique ou atomique) sous la forme d'une cellule unitaire, comme représenté en Figure 1 (4). Ce micro-organisme étant dépourvu de noyau, le matériel génétique est présent dans le cytoplasme sous forme d'un chromosome unique circulaire. Dans le cytoplasme, plusieurs éléments sont retrouvés tels que le matériel de transcription/traduction ainsi que des organites responsables du fonctionnement métabolique. Ces différents composants sont entourés d'une membrane interne, elle-même recouverte d'une paroi cellulaire permettant sa protection. D'autres éléments peuvent également être présents tels que la capsule bactérienne, les pili, les fimbriae ou encore le flagelle.

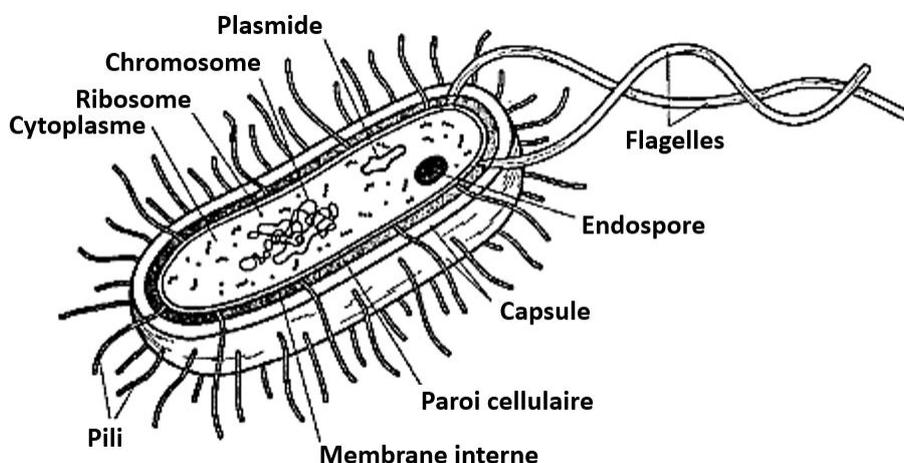


Figure 1 : La composition d'une cellule bactérienne.

Adapté de Hiremath P. et al. (5).

Les bactéries ont la capacité de se reproduire par scissiparité, c'est-à-dire que chaque division bactérienne donne naissance à deux bactéries filles identiques. Dans des conditions adéquates, leur multiplication est exponentielle. En effet, la division bactérienne est facilitée par le divisome, un assemblage multiprotéique situé dans la cellule ayant pour but de

synthétiser les différentes couches de l'enveloppe cellulaire (6). Ces micro-organismes sont retrouvés en grande quantité au sein d'organismes vivants tels que l'Homme ; il s'agit du microbiote humain. Bien que le microbiote intestinal reste l'un des plus importants dans le microbiote humain, d'autres microbiotes comme la peau, les voies respiratoires, les voies génito-urinaires, sont présents et jouent un rôle primordial sur la santé. Ces différents microbiotes semblent avoir la capacité d'interagir entre eux à l'aide de métabolites secondaires (7). Des changements au niveau du microbiote humain peuvent amener à un état pathologique par la multiplication anormale de bactéries dans un environnement inhabituel. Par exemple, une étude a montré que des perturbations dans l'interaction entre le microbiote intestinal et le microbiote pulmonaire sont à l'origine de maladies pulmonaires (asthme, allergie) ou peuvent favoriser leur développement (mucoviscidose) (8). Afin de mieux comprendre le fonctionnement d'une bactérie et les phénomènes de pathologie associés, la composition d'une cellule bactérienne est détaillée ci-dessous.

1.2.1. Le matériel génétique et les protéines associées

Les constituants internes d'une cellule bactérienne sont principalement composés d'ADN, d'ARN et de protéines impliqués dans la réplication et la transcription de l'ADN.

L'ADN bactérien est le support de l'information génétique et est représenté par un chromosome unique sous la forme d'une double hélice circulaire surenroulée. Lorsqu'une division bactérienne est réalisée, l'ADN est répliqué pour obtenir deux exemplaires identiques qui sont séparés dans deux cellules bactériennes distinctes. Ce support est indispensable à la vie de la bactérie, mais il peut subir des mutations au cours du temps en fonction de l'environnement dans lequel il évolue.

L'ARN bactérien est le support de l'expression du génome et est représenté par de courts fragments sous la forme de simples brins linéaires. Il peut s'agir principalement d'ARN messager (transcrit de l'ADN), d'ARN ribosomal et d'ARN de transfert (impliqués tout deux dans la traduction), et où la composition en ARN est modulée en fonction de la phase de croissance bactérienne (9).

Les protéines servent dans la réplication et la transcription de l'ADN. Parmi celles-ci, les topoisomérases et les histones permettent la formation des doubles hélices et de son surenroulement (10). Les ADN polymérases et les ARN polymérases sont utilisées respectivement pour répliquer et transcrire.

1.2.2. Le cytoplasme

Le cytoplasme bactérien est un gel colloïdal composé d'eau ainsi que de substances organiques et minérales. Contrairement au cytoplasme des cellules eucaryotes, la composition du cytoplasme bactérien est simplifiée. Il est particulièrement riche en ARN messagers, en ARN de transfert et en ARN ribosomiaux. Ces ribosomes sont constitués de protéines ribosomiales et d'ARN ribosomal (ARN 16S, ARN 23S et ARN 5S), et sont divisés en deux sous-unités : la sous-unité 50S contenant de l'ARN 23S et ARN 5S et la sous-unité 30S constituée d'ARN 16S. Ces ribosomes sont la machinerie pour la traduction des ARN messagers (11). Il est à noter que le cytoplasme est dépourvu d'organites complexes tels que les mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique... De ce fait, les mécanismes cellulaires se sont adaptés. Par exemple, les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire sont localisés directement dans la membrane interne (12).

1.2.3. L'ADN extra-chromosomique

A la différence de l'ADN chromosomique bactérien, l'ADN extra-chromosomique n'est pas indispensable à la vie de la bactérie. Il est caractérisé par des éléments génétiques mobiles (EGM) de petite taille. Ces éléments peuvent conférer à la bactérie de nouvelles propriétés (réplication, expression, mobilité...), et leur acquisition se fait via trois mécanismes (13) :

- La conjugaison : un transfert d'ADN d'une bactérie à l'autre par contact direct ;
- La transduction : un transfert d'ADN d'une bactérie à l'autre par l'intermédiaire d'un vecteur viral de type bactériophage ;
- La transformation : une intégration naturelle d'un fragment d'ADN étranger libre au sein de la cellule bactérienne.

La conjugaison est l'un des mécanismes les plus efficaces pour propager les EGM parmi les bactéries (14). Trois principaux EGM peuvent être décrits : les transposons, les intégrons et les plasmides.

1.2.3.1. Les transposons

Les transposons sont des EGM capables de se déplacer et de réarranger l'ADN chromosomique dans la cellule bactérienne. Ils codent pour des protéines (transposases) qui facilitent leur propre transfert et dans certains cas, le transfert d'autres EGM. Ils ont joué un rôle important dans l'évolution de nombreux génômes. En effet, l'insertion d'un transposon dans l'ADN peut entraîner l'inactivation du gène dans lequel il s'insère (15). Les séquences d'insertion sont les éléments transposables les plus simples (< 2500 paires de bases) et sont bordées par des séquences répétées inversées de 20 à 40 paires de bases reconnues par les transposases. Les séquences d'insertion portent uniquement les gènes nécessaires à la transposition. D'autres transposons existent et contiennent un ou plusieurs gènes accessoires conférant à la cellule bactérienne un avantage sélectif tels qu'une résistance aux antibiotiques, des facteurs de virulences ou des voies métaboliques supplémentaires (16).

1.2.3.2. Les intégrons

Les intégrons sont composés d'un gène codant pour une enzyme, l'intégrase. Les intégrases sont capables d'assembler plusieurs gènes au niveau d'un site spécifique présent sur les intégrons, et de les exprimer à l'aide d'un promoteur. Ainsi, ils permettent de capturer, stocker et réorganiser de nouvelles fonctions portées par les gènes intégrés (EGM).

L'expression des gènes et de l'intégrase est fortement contrôlée par l'hôte dans lequel se trouve la cellule bactérienne et la réponse au stress bactérien (réponse SOS). Ces interactions font que les intégrons sont composés d'EGM stables et efficaces, et confèrent aux bactéries une capacité d'adaptation rapide et à faible coût dans des environnements changeants (17).

Deux grands types d'intégrons peuvent être distingués (18) :

- Les intégrons de multirésistance (IMR) portés généralement par des plasmides, sont impliqués par exemple dans la résistance aux antibiotiques.
- Les super-intégrons, présents sur le chromosome bactérien, contiennent une plus grande quantité de cassettes de codage de gènes par rapport aux IMR et sont impliqués dans diverses fonctions : métabolisme, processus cellulaires...

Ainsi, les intégrons possèdent une capacité illimitée à échanger et à stocker des cassettes de codage de gènes, et cette flexibilité permet aux bactéries d'acquérir de nouvelles fonctions sous la pression de sélection de leur environnement. Par exemple, les IMR sont très souvent impliqués dans la résistance aux antibiotiques. De même, grâce à cette flexibilité, les remaniements peuvent conduire à la suppression de gènes non essentiels (18).

1.2.3.3. Les plasmides

Les plasmides sont des EGM retrouvés au sein du cytoplasme sous la forme circulaire double brin capable de se répliquer de manière autonome. Par définition, les plasmides ne portent pas de gènes nécessaires aux fonctions cellulaires essentielles. Les plasmides possèdent également des mécanismes contrôlant leur nombre de copies et assurant une transmission stable lors de la division cellulaire notamment par conjugaison (19). Ils codent pour des gènes impliqués dans de nombreux aspects de la biologie microbienne, notamment la résistance aux antibiotiques (20). Ces éléments permettent ainsi le transfert de l'information génétique entre les bactéries pour favoriser leur évolution et leur adaptation à divers environnements (21).

1.2.4. La membrane interne

La membrane interne, appelée également membrane cytoplasmique, sépare le cytoplasme de la paroi cellulaire. Elle est constituée d'une bicouche lipidique à 65 % et de protéines à 35 %. Les propriétés des groupements lipidiques offrent la possibilité de réguler la fluidité de la membrane, ce qui permet des échanges de composés entre les milieux intra- et extra-cellulaires. Par exemple, chez *Escherichia coli*, les principaux phospholipides sont le phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylglycérol. Les protéines, quant à elle, sont impliquées dans différents processus tels que le transport de composés, la production d'énergie, la biosynthèse des lipides ou encore la synthèse du peptidoglycane (22). Ainsi, les fonctions relatives à cette membrane sont nombreuses :

- Une perméabilité sélective et un transport des substances solubles à l'intérieur de la bactérie ;
- Une fonction respiratoire par transport d'électrons et de phosphorylation oxydative ;
- Un support de transporteurs et d'enzymes impliqués dans la biosynthèse de l'ADN, de la paroi cellulaire et des lipides membranaires.

1.2.5. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire est un élément présent chez toutes les bactéries, à l'exception de rares cas tels que les mycoplasmes. Elle se différencie en épaisseur, en structure et en composition chimique d'une bactérie à l'autre. La substance de base pour sa formation est la muréine, appelée également peptidoglycane. De part ces caractéristiques, cette structure rigide est composée essentiellement de polymères pour (23) :

- Conditionner la forme de la bactérie ;
- Protéger la cellule contre la lyse osmotique ;
- Jouer un rôle dans la spécificité antigénique des bactéries ;
- Être un support pour l'action de certaines molécules ;
- Permettre l'ancrage de d'autres composants tels que des protéines et des acides téichoïques.

Sans paroi, les bactéries peuvent survivre et même se multiplier à condition d'être placées dans un milieu dont la pression osmotique est identique à celle qui règne à l'intérieur de la bactérie. Dans l'environnement naturel des bactéries, cette condition est rarement observée (22).

1.2.5.1. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est le principal composant de la paroi cellulaire d'une bactérie et sa synthèse est l'une des voies de biogénèse les plus importantes des bactéries. Comme montré sur la Figure 2, cette structure est composée de polysaccharides correspondant à une alternance de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc). Cinq acides aminés (pentapeptide) sont attachés au groupe MurNAc, de séquence L-Ala-D-Glu-X-D-Ala-D-Ala. L'acide aminé X correspond à la L-Lys pour les bactéries à Gram positif et au mDap (Acide mesodiaminopimélique) pour les bactéries à Gram négatif. Certaines bactéries à Gram positif peuvent avoir du mDap en acide aminé X. Ces chaînes peptidiques peuvent être réticulées les unes avec les autres (23).

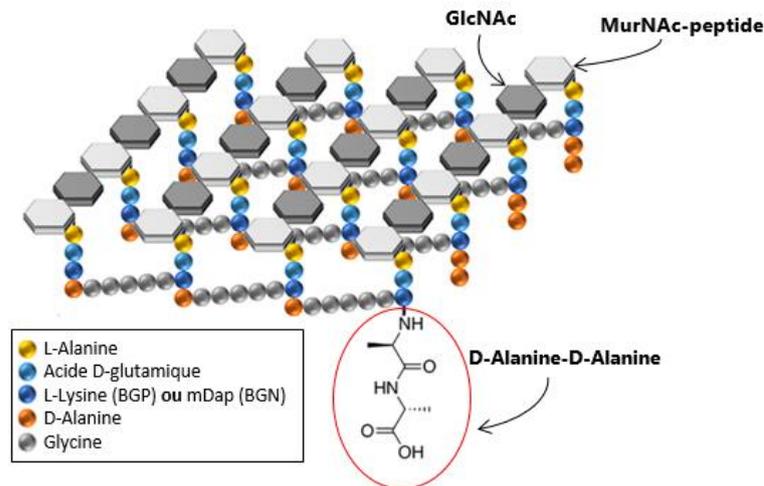


Figure 2 : La structure du peptidoglycane.

Adapté de Matthew F. L. P. et al. (24). Descriptif : Le peptidoglycane est composé de polysaccharides correspondant à une alternance de GlcNAc et de MurNAc. Cinq acides aminés (pentapeptide) sont attachés au groupe MurNAc ; (GlcNAc : N-acétylglucosamine ; MurNAc : acide N-acétylmuramique ; mDap : Acide mésodiaminopimélique ; BGN : Bactérie à Gram négatif ; BGP : Bactérie à Gram positif).

La synthèse du peptidoglycane se découpe en trois localisations : le cytoplasme, la membrane interne et le milieu périplasmique (situé entre la membrane interne et la paroi cellulaire).

La première étape se déroule dans le cytoplasme et permet la synthèse de l'UDP-MurNAc-pentapeptide sous l'action des enzymes de la famille Mur à partir de l'UDP-GlcNAc (Figure 3). Ce précurseur est ensuite acheminé à la membrane interne (25).

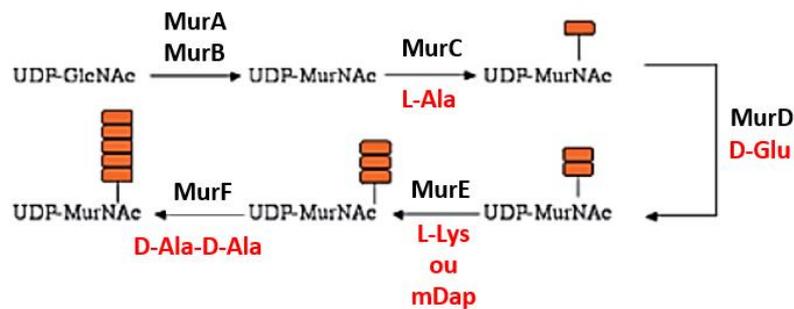


Figure 3 : La synthèse du MurNAc-pentapeptide.

Adapté de Macheboeuf P. et al. (25). Descriptif : Le MurNAc-pentapeptide est synthétisé par les enzymes Mur jusqu'à la membrane interne ; (GlcNAc : N-acétylglucosamine ; MurNAc : N-acétylmuramique).

La seconde étape du processus a lieu à la membrane interne. L'UDP-MurNAc-pentapeptide est associé à la membrane grâce à la protéine MraY pour donner le lipide I, puis la protéine MurG ajoute un groupement GlcNAc pour former le lipide II. Ce dimère de type saccharidique est transloqué vers le milieu périplasmique, lieu de stockage d'enzymes et de nutriments, grâce à la flippase MurJ présente sur la membrane interne (Figure 4) (25).

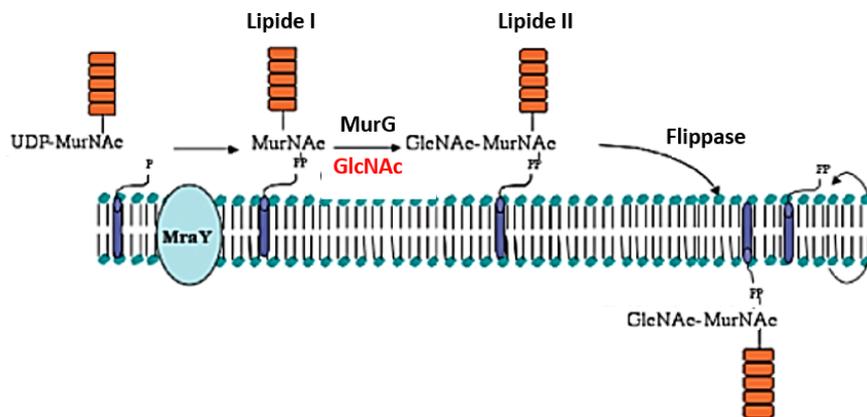


Figure 4 : La synthèse du GlcNAc-MurNAc-pentapeptide.

Adapté de Macheboeuf P. et al. (25). Descriptif : Le GlcNAc-MurNAc-pentapeptide est produit à l'aide des enzymes MraY et MurG), puis son transfert vers le milieu périplasmique se fait à l'aide d'une flippase ; (GlcNAc : N-acétylglucosamine ; MurNAc : N-acétylmuramique).

La troisième étape s'exécute dans le milieu périplasmique par l'intermédiaire de protéines liant les pénicillines (PLP) ayant plusieurs activités enzymatiques. En effet, ces PLP sont à l'origine des réactions de polymérisation des disaccharides par transglycosylation, de formation des liaisons entre les chaînes peptidiques par transpeptidation, et de libération du dernier D-alanine par D-D carboxypeptidation (Figure 5) (25).

La transglycosylation permet la formation de la liaison β -1,4 entre les saccharides MurNAc et GlcNAc grâce à une glycosyltransférase. L'accumulation de ces liaisons forme de longues chaînes de saccharides. La transpeptidation permet la formation de liaisons entre les chaînes d'acides aminés. Pour cela, une transpeptidase se lie à une chaîne pentapeptidique, ce qui permet la libération du D-Ala en position 5. Cette même chaîne réagit ensuite avec un groupement amine primaire présent en position 3 d'une chaîne voisine, et permet ainsi la formation d'une liaison amide 4-3 et la libération de l'enzyme.

L'activité conjuguée des transpeptidases et des glycosyltransférases aboutit à la formation d'un réseau plus ou moins serré dans le peptidoglycane. Également, des D-D carboxypeptidases sont présentes et sont impliquées dans la régulation du niveau de réticulation du peptidoglycane où le dernier D-alanine est libéré pour empêcher l'action de la transpeptidase (25).

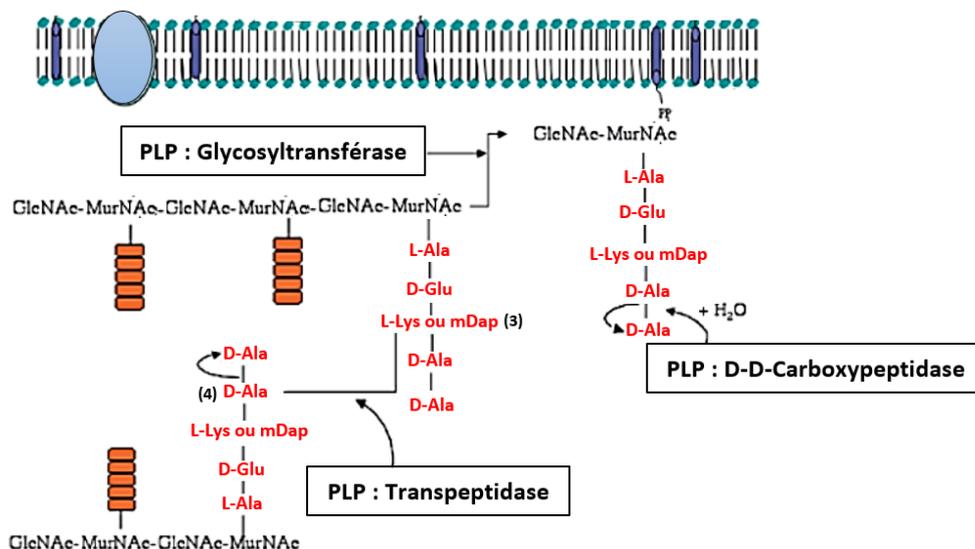


Figure 5 : La synthèse du peptidoglycane grâce aux différentes PLP.

Adapté de Macheboeuf P. et al. (25). Descriptif : Les glycosyltransférases permettent la formation de la liaison entre les saccharides MurNAc et GlcNAc. Les transpeptidases permettent la formation de liaisons entre les chaînes d'acides aminés (position 3 et position 4). Les D-D-carboxypeptidases sont impliquées dans la régulation du niveau de réticulation du peptidoglycane où le dernier D-alanine est libéré pour empêcher l'action de la transpeptidase ; (GlcNAc : N-acétylglucosamine ; MurNAc : N-acétylmuramique ; PLP : Protéines liant les pénicillines).

1.2.5.2. Différence de compositions pariétales

Deux grandes classes de bactéries se distinguent par la composition de leur paroi. La coloration de Gram est l'un des outils qui permet de différencier les bactéries et de les classer selon l'épaisseur du peptidoglycane (26). Si le peptidoglycane est épais et riche en sucres, il s'agit d'une bactérie à Gram positif, c'est-à-dire qu'elle a la capacité à capturer les pigments utilisés dans la coloration de Gram. *A contrario*, une paroi fine et riche en lipides est caractéristique d'une bactérie à Gram négatif, c'est-à-dire qu'elle ne retient aucun de ces pigments colorés Figure 6 (22).

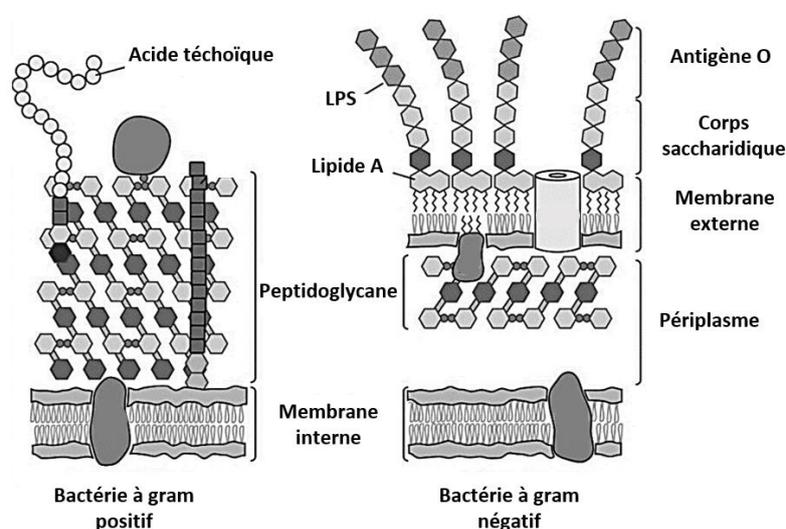


Figure 6 : La différence de compositions pariétales entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

Adapté de Silhavy T. J. et al. (22). Descriptif : Les bactéries à Gram positif sont composées d'une membrane interne et de peptidoglycane sur lequel est attaché des acides téichoïques. Les bactéries à Gram négatif sont composées d'une membrane interne, de peptidoglycane et d'une membrane externe sur laquelle des LPS sont présents ; (LPS : Lipopolysaccharide).

1.2.5.2.1. Paroi des bactéries à Gram positif

Les bactéries à Gram positif possèdent une structure qui peut se décomposer en trois parties, en partant de l'intérieur vers l'extérieur : la membrane interne ; l'espace périplasmique ; la couche de peptidoglycane. Les bactéries à Gram positif possèdent une couche de peptidoglycane très épaisse, qui peut atteindre une taille comprise entre 30 et 100 nanomètres (nm). Cette couche de peptidoglycane est principalement formée des

polymères GlcNAc et MurNAc (27). D'autres chaînes polymériques sont également présentes. Il s'agit des acides téichoïques composés de phosphates associés au glycérol ou au ribitol, responsables de la stabilité et de l'attachement de la paroi cellulaire à la membrane interne. La paroi des bactéries à Gram positif est relativement perméable aux antibiotiques du fait de certaines caractéristiques (solubilité et taille de la molécule, charge électrique de la paroi). En effet, les chaînes polymériques présentes à la surface de la paroi ont des charges hautement négatives en raison des multiples groupes phosphates dans la structure ; les charges positives sont peu présentes en raison du positionnement des résidus d'alanine (27).

1.2.5.2.2. Paroi des bactéries à Gram négatif

Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane supplémentaire par rapport aux bactéries à Gram positif. Leur paroi est constituée de cinq parties, en partant de l'intérieur vers l'extérieur : la membrane interne ; l'espace périplasmique ; la couche de peptidoglycane ; l'espace périplasmique ; la membrane externe. Ces bactéries possèdent une couche de peptidoglycane fine de quelques nm. Les principaux constituants sont retrouvés sur la membrane externe, composée d'une bicouche lipidique (le feuillet interne contient des phospholipides ; le feuillet externe contient des glycolipides), de protéines de transport et de lipopolysaccharides (LPS) (22). Le LPS est composé de trois éléments : le lipide A ; le core ; l'antigène (Ag) O (28), comme montré en Figure 7.

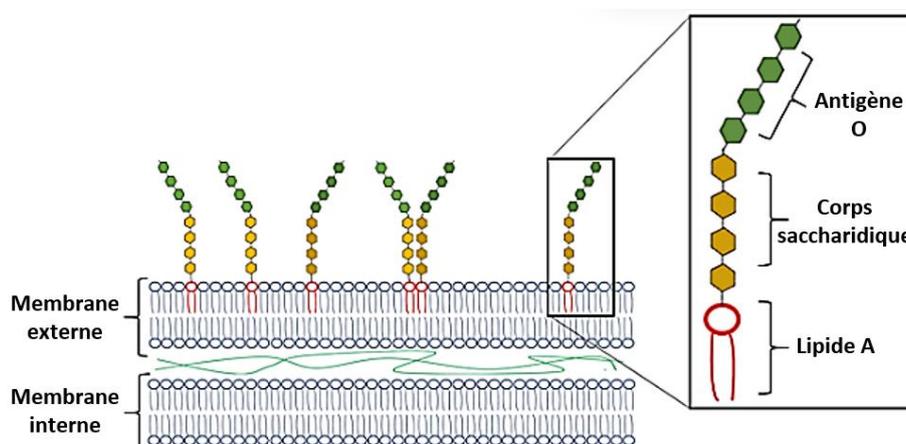


Figure 7 : La composition du lipopolysaccharide.

Adapté de Bidne K. L. et al. (29). Descriptif : Le LPS est retrouvé chez les bactéries à Gram négatif. Il est composé du lipide A, du corps saccharidique, et de l'antigène O ; (LPS : Lipopolysaccharide).

Le lipide A est le plus conservé de la structure du LPS. Il est constitué d'acide gras et est ancré dans la membrane externe de la bactérie. Ce lipide, également appelé endotoxine, est responsable des effets toxiques sur l'hôte après avoir été libéré par des bactéries lysées. La dissémination d'endotoxines provoque des symptômes divers allant d'une fièvre jusqu'à un choc endotoxique, appelé choc septique (28).

Le core contient un oligosaccharide (base de β -glucosamine-(1-6)-glucosamine-1-phosphate), et permet la jonction entre le lipide A et l'Ag O. Il est généralement composé de sucres tels que l'heptose ou l'acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (28).

L'Ag O est la partie la plus variable du LPS et est exposé à la surface de la membrane externe dans l'environnement extracellulaire. Il peut contenir 100 ou plus unités d'oligosaccharidiques composées de 3 à 4 monosaccharides (pentoses, hexoses, acides uroniques...). Du fait de l'hétérogénéité des structures, cette partie est variable à la fois au sein d'une même espèce et entre espèces (28).

A contrario de la paroi des bactéries à Gram positif, il est plus difficile pour un antibiotique de pénétrer jusqu'à la membrane interne en raison de la membrane externe qui est de nature lipidique. En effet, cette membrane sert principalement de barrière de perméabilité pour empêcher l'entrée de composés nocifs et en même temps permettre l'afflux de molécules nutritives à l'aide de porines (30).

1.2.6. Les structures inconstantes

Certaines structures n'existent pas chez toutes les bactéries et s'expriment en fonction de l'environnement dans lequel elles évoluent.

La capsule est la structure la plus externe de la cellule bactérienne. Elle est composée d'acides polysaccharidiques, de hauts poids moléculaires et chargés négativement, et est liée de manière covalente à la surface de la cellule. Elle sert de protection et possède des propriétés immunogéniques. Sa composition permet de donner un revêtement soit lisse, soit rugueux à la cellule bactérienne (31).

Les flagelles sont composés essentiellement de protéines et sont attachés dans le cytoplasme bactérien par une structure complexe d'au moins trois parties : le corps basal

(moteur réversible), le crochet (joint universel) et le filament (hélice hélicoïdale). Cette structure permet le déplacement de la bactérie dans son milieu et constitue un facteur de virulence fort (32). Les flagelles peuvent être disposés de diverses manières sur la bactérie : monotriche (un seul flagelle à une extrémité), lophotriche (une accumulation de flagelles à une extrémité) ou péritriche (une répartition sur toute la surface de la bactérie).

Les pili ou fimbriae sont principalement retrouvés chez les bactéries à Gram négatif et sont disposés régulièrement à la surface de la bactérie. Ce sont des facteurs de virulence importants pour plusieurs maladies (infections des voies urinaires, génitales et gastro-intestinales). Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions telles que la liaison des phages, le transfert d'ADN (les EGM par conjugaison), la formation de biofilms, l'agrégation de cellules ou encore la motilité (33).

Les spores ne sont présentes que lorsque les conditions environnementales sont extrêmes (absence d'aliments, températures très élevées ou très basses...) et ne permettent pas la croissance bactérienne. Elles présentent une résistance considérablement accrue à un grand nombre d'agents, notamment la dessiccation, la congélation, le dégel, les températures élevées, aux états humides ou secs, les rayons UV, les hautes pressions et un grand nombre de produits chimiques toxiques (agents oxydants, agents alkylants, les aldéhydes, les halogènes, les acides et les bases) (34).

1.3. Les principales bactéries

Chaque espèce bactérienne se distingue par des caractéristiques morphologiques et métaboliques, ce qui a permis d'établir des classifications en fonction de :

- La morphologie en microscopie (forme, taille)
- La coloration de Gram
- Le besoin respiratoire (aérobie, anaérobie...)
- La motilité
- La température de croissance en laboratoire
- La formation de spores
- Le besoin nutritionnel (source énergétique, source de carbone...)

L'une des classifications des genres bactériens fréquemment utilisée, est basée sur le besoin en oxygène, la forme de la bactérie et la coloration de Gram (35). Elle est retrouvée dans le Tableau 2.

Respiration	Forme	Gram	Genre	
Aérobie	Coccus	Positif	<i>Staphylococcus</i>	
		Négatif	<i>Neisseria</i>	
	Bacille	Positif	<i>Listeria</i> <i>Erysipelothryx</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Bacillus</i> <i>Nocardia</i>	
		Négatif	Enterobacteriaceae : <i>Escherichia ; Klebsiella ;</i> <i>Citrobacter ; Enterobacter ;</i> <i>Proteus ; Serratia ; Providencia ;</i> <i>Morganella ; Salmonella ;</i> <i>Shigella ; Yersinia</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Acinetobacter ; Vibrio</i> <i>Campylobacter</i> <i>Helicobacter</i>
Anaérobie	Coccus	Positif	<i>Peptostreptococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>	
		Négatif	<i>Veillonella</i>	
	Bacille	Positif	<i>Clostridium</i> <i>Actinomyces</i> <i>Peptococcus</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Eubacterium</i>	
		Négatif	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Porphyromonas</i>	

Tableau 2 : La classification des genres bactériens selon la respiration, la forme des bactéries, et la coloration de Gram.

Adapté de Meddour R. et al. (35).

D'autres bactéries existent également telles que les spirochètes (genres *Borrelia*, *Leptospira*, *Treponema*), les mycobactéries, les bactéries intracellulaires (genre *Chlamydia*) et les mollicutes (genres *Mycoplasma*, *Ureaplasma*), qui ont des formes différentes des cocci et bacilles, et qui ne présentent pas de coloration de Gram (35). Chacun de ces genres recèle de bactéries qui peuvent être à l'origine d'infections diverses et variées : infections respiratoires, infections cutanées, toxi-infections (choc septique), infections de l'appareil uro-génital, infections abdomino-pelviennes... Pour traiter les infections causées par ces bactéries, des outils ont été développés : les antibiotiques.

Chapitre II : Les antibiotiques

Le terme antibiotique fut introduit en 1941 par Selman Waksman pour définir toute substance chimique produite par des micro-organismes qui, à l'état de solution diluée, a le pouvoir d'interférer avec la croissance d'un autre organisme (36). Puis, cette définition a été modernisée pour définir un antibiotique « idéal » comme tout composé naturel (d'origine microbienne, animale ou végétale), de synthèse ou de semi-synthèse, qui tue ou inhibe la croissance d'un micro-organisme nuisible chez un hôte, quel que soit le site de l'infection, sans affecter les microbiotes ni causer de toxicité excessive chez l'hôte (37). Les antibiotiques ont deux modes d'actions permettant ainsi d'interférer avec la croissance d'un micro-organisme : soit une action bactériostatique où le micro-organisme ne meurt pas mais ne peut plus se développer ni se multiplier, soit une action bactéricide où la structure du micro-organisme est déstabilisée entraînant sa mort (38).

Pour évaluer l'activité *in vitro* des antibiotiques, la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la référence pour déterminer la sensibilité du micro-organisme pour l'agent anti-microbien. Ainsi, les CMI sont définies comme la plus faible concentration (généralement en µg/mL) d'un antibiotique qui inhibe la croissance d'un micro-organisme après une incubation d'une nuit. La méthode la plus populaire pour déterminer la CMI dans les laboratoires cliniques est le test par dilution en milieu liquide. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien au contact de concentrations croissantes de l'antibiotique. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C, la CMI correspond à la concentration pour laquelle le milieu de l'inoculum bactérien est limpide à l'œil nu (39).

II.1. L'ère des antibiotiques

La découverte du premier antibiotique a lieu en 1928 par Alexander Fleming. Cette molécule a été mise en évidence par l'absence de développement de staphylocoques autour de moisissures, qui la sécrétait. Cette dernière a été découverte chez *Penicillium notatum* et a été ainsi nommée la pénicilline. Cet antibiotique a révolutionné le traitement des maladies infectieuses (40). Puis, une succession de nouvelles découvertes a vu le jour au cours du XX^{ème} siècle, décrit comme l'âge d'or des antibiotiques (Figure 8). Pendant cette période, un large spectre d'antibiotiques a été découvert et ainsi presque toutes les infections bactériennes pouvaient être traitées. Cette période s'est étendue des années 1940, avec la production de la pénicilline, jusqu'aux années 1990, avec la découverte des antibiotiques de type semi-synthétique et synthétique (41). Les antibiotiques semi-synthétiques sont des variantes d'antibiotiques naturels modifiés chimiquement afin de : **1-** Augmenter leur efficacité ; **2-** Réduire ou annuler leurs effets secondaires ; **3-** Modifier le spectre d'activité anti-microbien de la molécule. Depuis les années 1990, aucune nouvelle classe d'antibiotique n'a été identifiée (42).

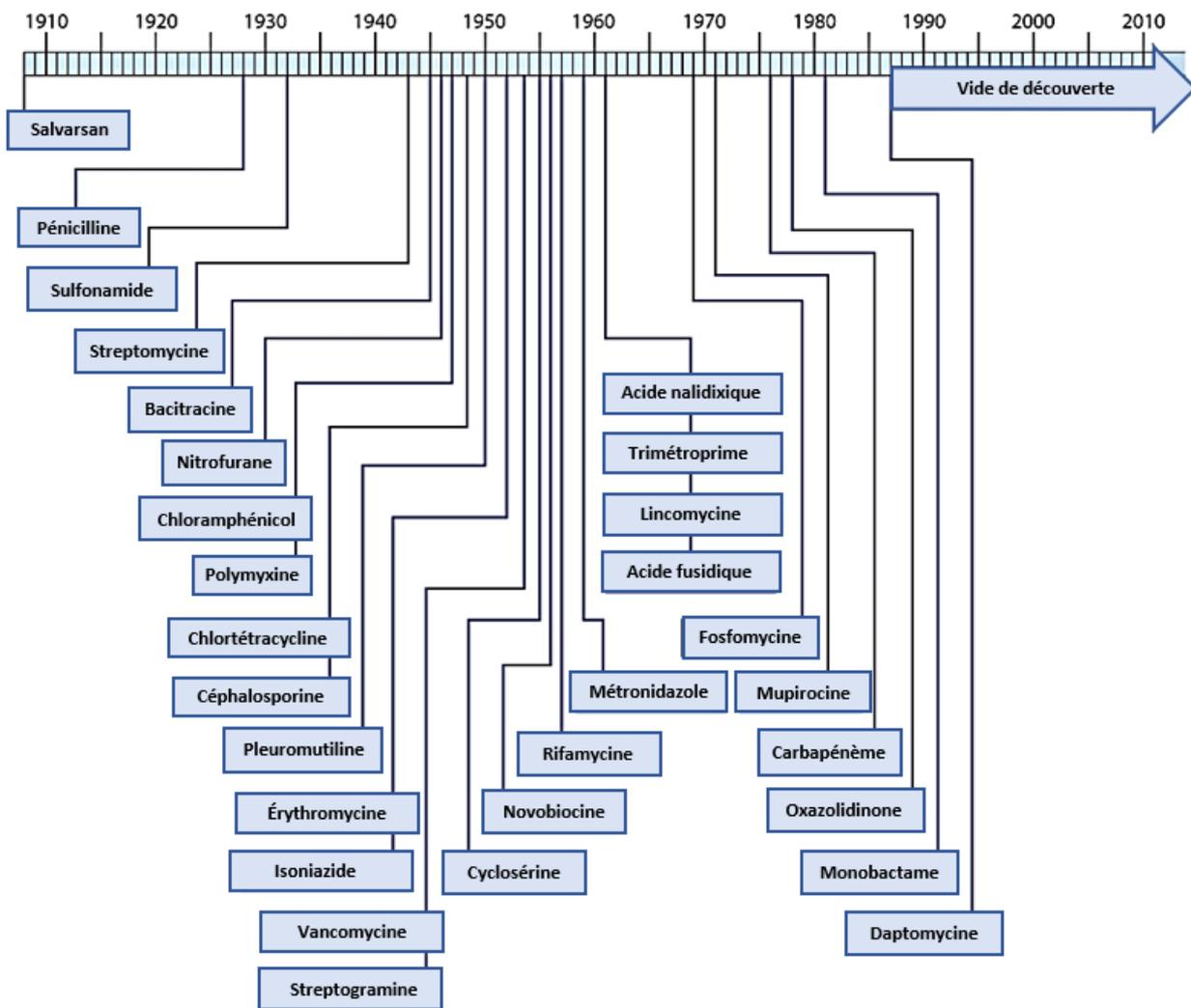


Figure 8 : La chronologie des découvertes des classes d'antibiotiques.

Adapté de Silver L. L. et al. (43).

Les mêmes classes d'antibiotiques au cours des dernières décennies ont été utilisées, avec environ 7 000 antibiotiques recensés. Seulement une centaine d'entre eux sont utilisés chez l'Homme car certains sont toxiques, peu efficaces ou encore instables chimiquement (42). Chacun d'eux a un mécanisme d'action propre à ses propriétés.

II.2. Des outils thérapeutiques puissants

Parmi l'ensemble des constituants conservés chez les bactéries, seul un nombre restreint est ciblé par les antibiotiques. Ainsi, les antibiotiques sont classés dans cinq catégories en fonction de leur cible, comme indiqué en Figure 9 (41) :

- Les inhibiteurs des acides nucléiques ;
- Les inhibiteurs de la synthèse des protéines ;
- Les inhibiteurs de la synthèse des folates ;
- Les antibiotiques actifs sur l'enveloppe membranaire ;
- Les inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane.

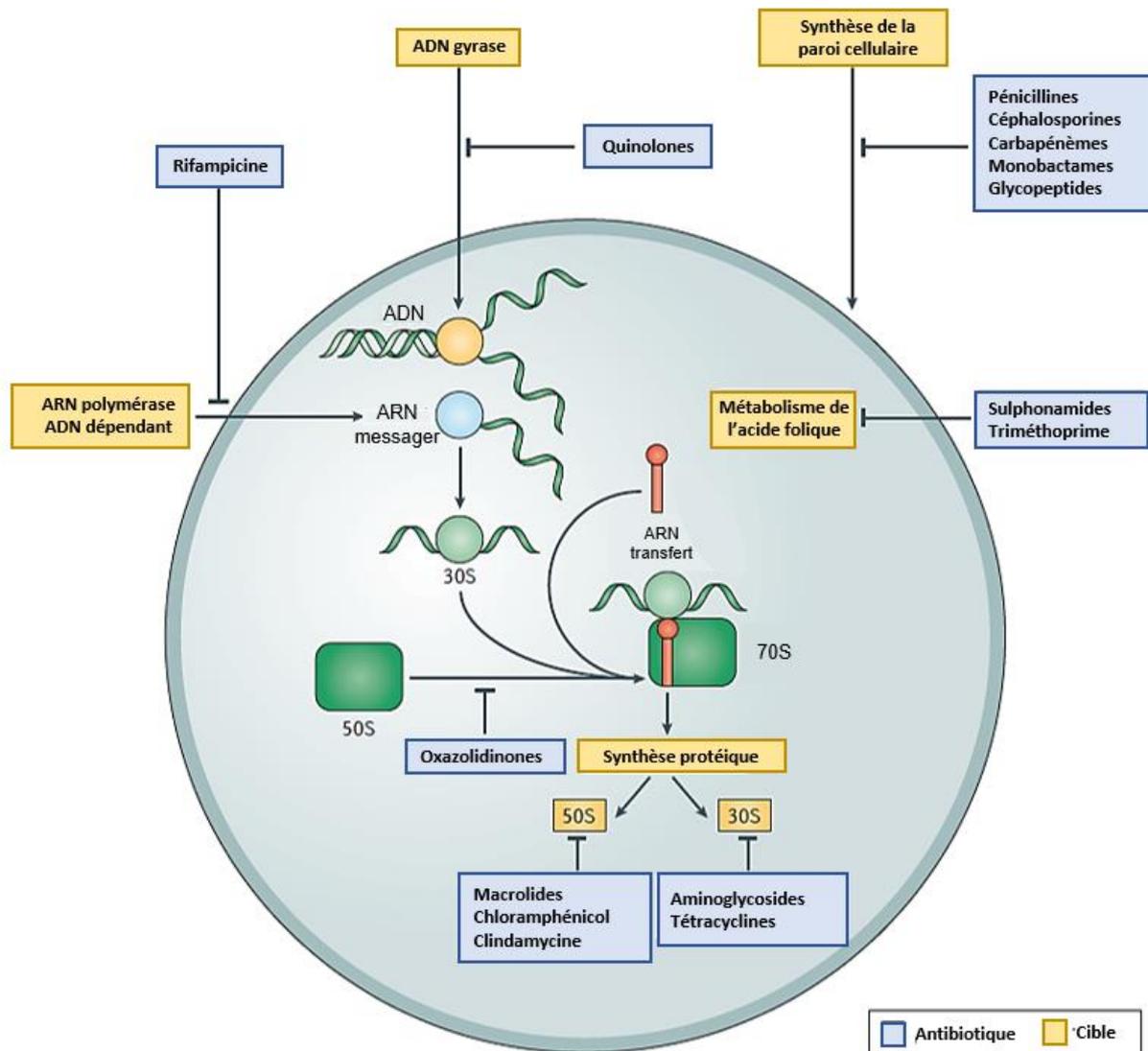


Figure 9 : Les cibles thérapeutiques existantes selon les classes d'antibiotiques impliquées.

Adapté de Lewis K. (41). Descriptif : Les principales cibles sont : **1-** Les inhibiteurs des acides nucléiques ; **2-** Les inhibiteurs de la synthèse des protéines ; **3-** Les inhibiteurs de la synthèse des folates ; **4-** Les antibiotiques actifs sur l'enveloppe membranaire ; **5-** Les inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane.

A ce jour, les antibiotiques utilisés pour traiter des infections ont été découverts pendant l'âge d'or des antibiotiques. Les cinq catégories sont détaillées par la suite.

II.2.1. Les inhibiteurs des acides nucléiques

La voie des inhibiteurs des acides nucléiques repose sur le blocage de la réplication et de la transcription de l'ADN bactérien, avec comme principales cibles l'ADN gyrase et l'ARN polymérase ADN dépendante. L'ADN gyrase est une protéine spécifique des bactéries qui favorise le déroulement local de la double hélice permettant ainsi la transcription et la réplication par les ARN polymérases/ADN polymérases (44). L'ARN polymérase ADN dépendante est à l'origine de la transcription de l'ADN en ARN. De nos jours, les quinolones et les ansamycines sont les deux principales classes qui permettent l'inhibition de la réplication ainsi que la transcription de l'ADN et donc la mort cellulaire *in fine*.

II.2.1.1. Les fluoroquinolones

Les quinolones ont été mises en évidence en 1962 avec la découverte de l'acide nalidixique, et qui a été introduit en 1967 en utilisation clinique. Ces antibiotiques possèdent un spectre d'activité élargi de type bactéricide. Dans les années 1970-1980, de nouvelles quinolones sont apparues : les fluoroquinolones dont le spectre d'activité et la pharmacocinétique ont été améliorés. Toutefois, l'utilisation de ces antibiotiques est contrôlée car ils peuvent induire des effets indésirables pouvant être graves et parfois irréversibles. En effet, ils peuvent toucher le tractus gastro-intestinal, le système nerveux central (insomnie, dépression, fatigue...) (45).

Les fluoroquinolones possèdent un atome de fluor supplémentaire présent en position C₆ (46). De nos jours, les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine, la lévofloxacine, la moxifloxacine, la norfloxacine, et l'ofloxacine sont utilisées fréquemment dans la médecine humaine (47).

II.2.1.2. Les ansamycines

Les ansamycines ont été découvertes en 1957, avec la rifamycine B. Cette molécule doit être oxydée en un composé actif, la rifamycine S afin d'acquérir les propriétés antibactériennes. Cette classe d'antibiotique possède un spectre d'activité de type bactéricide contre les bactéries à Gram positif et certaines bactéries à Gram négatif (48).

Les ansamycines sont constituées de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne aliphatique dont les groupements fonctionnels peuvent varier. Des dérivés semi-synthétiques ont été développés tels que la rifampicine afin d'améliorer sa biodisponibilité et son efficacité antibactérienne. Ces antibiotiques bloquent, par liaison irréversible, l'ARN polymérase ADN dépendante inhibant ainsi la transcription au niveau de l'initiation (49). D'un point de vue clinique, les rifamycines se sont révélées être une classe d'antibiotiques très utile, notamment pour le traitement de la tuberculose (48).

II.2.2. Les inhibiteurs de la synthèse des protéines

L'action des inhibiteurs de la synthèse des protéines repose sur l'altération des différentes interactions que peut avoir le ribosome. Ce dernier joue un rôle central dans la synthèse protéique. A titre indicatif, chez *Escherichia coli*, chaque bactérie contient environ 30 000 ribosomes et un ribosome peut en moyenne synthétiser un polypeptide de 100 acides aminés en 5 secondes à 37 °C. Cette structure a été relativement conservée au cours de l'évolution. Les ribosomes bactériens contiennent deux sous-unités, chacune composée d'un assemblage complexe de protéines et d'ARN. La petite sous-unité 30S est constituée de l'ARN ribosomique 16S ainsi que de 21 protéines, et elle assure la bonne traduction des acides nucléiques en acides aminés. La grande sous-unité 50S, composée de deux ARN ribosomiques (ARN 5S et ARN 23S) et de 33 protéines, permet la formation des liaisons peptiques entre les acides aminés (50).

A ce jour, les aminoglycosides, les tétracyclines ainsi que les macrolides et apparentés sont les trois grandes classes d'antibiotiques permettant d'inhiber la synthèse des protéines au niveau du ribosome (Figure 10).

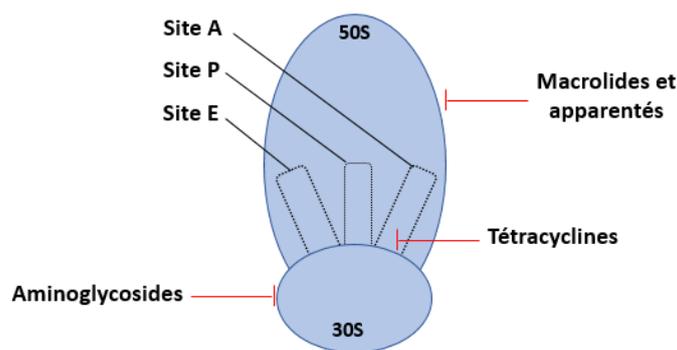


Figure 10 : Les cibles des inhibiteurs de la synthèse protéique.

Descriptif : Les macrolides et apparentés agissent sur l'ARN 23S présent dans la sous-unité d'ARN 50S. Les aminoglycosides agissent sur l'ARN 16S présent dans la sous-unité d'ARN 30S. Les tétracyclines empêchent l'entrée des ARN de transfert et donc la traduction des ARN messagers en protéines ; (ARN : Acide ribonucléique).

II.2.2.1. Les aminoglycosides

Les aminoglycosides ont été parmi les premiers antibiotiques découverts, avec la streptomycine en 1943. Ils présentent une activité à large spectre de type bactéricide avec une efficacité particulière contre les bactéries à Gram négatif (51). Avec l'utilisation de ces antibiotiques à l'échelle large, des résistances aux aminoglycosides sont apparues ainsi que certaines toxicités telles qu'une néphrotoxicité (52).

Les aminoglycosides sont constitués d'au moins un sucre aminé relié à un dérivé d'inositol. Un certain nombre de groupements hydroxyles et au moins deux groupements amines sont présents sur l'ensemble de la structure. Ces derniers ont la capacité d'interagir avec la sous-unité 30S du ribosome bactérien interférant avec la synthèse protéique (51). Toutefois, les connaissances sur le mode d'action des aminoglycosides sont encore loin d'être complètes. En effet, la gentamicine, un des aminoglycosides, semble également impliquée dans la désorganisation de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, entraînant une fuite du contenu cellulaire et donc un effet bactéricide rapide (53). Ces deux effets conjugués font des aminoglycosides des antibiotiques particulièrement efficaces pour la lutte contre certains agents pathogènes résistants à certaines classes d'antibiotiques. La gentamicine, la tobramycine, la nétilmicine et l'amikacine sont les principaux aminoglycosides actuellement utilisés pour les septicémies majeures, tandis que la streptomycine est utilisée en toute dernière ligne dans le traitement de la tuberculose (toxicité élevée) (54).

II.2.2.2. Les tétracyclines

Les tétracyclines ont été découvertes dans les années 1940 et ont montré une activité à large spectre, de type bactériostatique, sur une large variété de bactéries à Gram positif et de bactéries à Gram négatif ainsi que des parasites intracellulaires. Elles présentent très peu d'effets secondaires. Ainsi, ces antibiotiques ont été utilisés en médecine humaine et animale à large échelle (55).

Les tétracyclines sont composées d'une succession de quatre cycles auxquels sont fixés des groupements fonctionnels. Les tétracyclines ont la capacité d'inhiber la synthèse des protéines en empêchant la fixation de l'ARN de transfert sur le site accepteur (A) des ribosomes bactériens. Les principales tétracyclines naturelles sont la tétracycline, la chlortétracycline, la déméthylchlortétracycline, et les tétracyclines semi-synthétiques sont la doxycycline, la minocycline, la méthacycline (55). Plus récemment développée, la tigécycline est un dérivé semi-synthétique de la minocycline où un groupement N,N-diméthylglycylamido a été ajouté en position 9. Cet ajout a permis d'augmenter l'affinité de la tigécycline pour la cible ribosomale jusqu'à cinq fois par rapport à la minocycline permettant d'élargir le spectre d'activité (56).

II.2.2.3. Les macrolides et apparentés

Les macrolides ont été mis en évidence dans les années 1950 et ont montré une activité bactériostatique efficace contre les bactéries à Gram positif, avec peu d'effets secondaires (57). Les bactéries à Gram négatif ont montré une résistance contre les macrolides, comme par exemple avec l'érythromycine, principalement dûe à l'imperméabilité partielle de la membrane externe et à l'hydrophobicité de ces molécules (58).

Les macrolides sont constitués d'un noyau lactonique et sont classés en fonction de la taille de ce cycle sur lequel est fixé, par une liaison glycosylique, un sucre aminé et/ou un sucre neutre (57). Les macrolides se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens, au niveau du canal de sortie du peptide néo-synthétisé (59). L'un des macrolides le plus connu

est l'érythromycine. Il existe des classes d'antibiotiques apparentées aux macrolides : les kétolides, les lincosamides, et les streptoGramines. Elles présentent des spectres d'activité comparables, des sites de liaisons communs à la sous-unité 50S du ribosome, et des mécanismes d'action identiques aux macrolides. Elles diffèrent généralement par leur structure chimique (59,60). Toutefois, certains macrolides et apparentés, et plus spécifiquement les kétolides, présentent des effets indésirables tels que des intolérances digestives et une hépatotoxicité (57).

II.2.3. Les inhibiteurs de la synthèse des folates

Le tétrahydrofolate est un cofacteur essentiel dans presque toutes les formes de vie car il intervient dans la synthèse des bases nucléiques, les purines et les pyrimidines entre autres (61). Ainsi, la voie des inhibiteurs de la synthèse des folates consiste à déréguler le métabolisme bactérien à travers la perturbation de ces réactions chimiques. Ces inhibiteurs sont soit des analogues structuraux de l'acide aminobenzoïque et rentrent ainsi en compétition lors de la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, soit des agents bloquants d'oxydoréduction (Figure 11) (62). Les sulfonamides et les diaminopyrimidines sont généralement utilisés simultanément afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique. Par exemple, le couple sulfaméthoxazole (sulfonamide) + triméthoprime (diaminopyrimidine) est le plus efficace connu à ce jour pour traiter des infections respiratoires et urinaires (63).

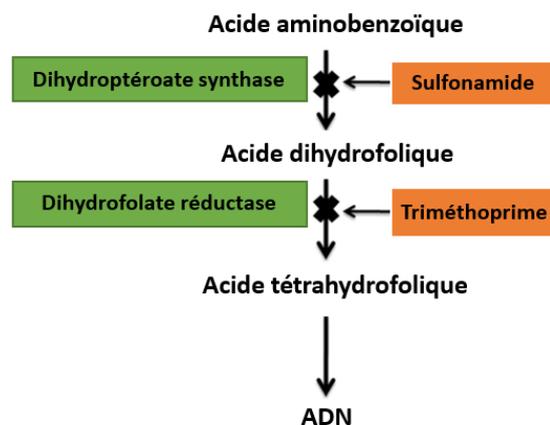


Figure 11 : Les cibles des inhibiteurs de la synthèse des folates.

Adapté de Masters P. A. et al. (62). Descriptif : Les sulfonamides inhibent la dihydroptéroate synthase alors que le triméthoprime inactive la dihydrofolate réductase. Dans les deux cas, l'objectif est d'inhiber la synthèse de l'acide tétrahydrofolique impliqué dans la synthèse de l'ADN ; (ADN : Acide désoxyribonucléique).

II.2.3.1. Les sulfonamides

Les sulfonamides ont été utilisés comme des agents anti-microbiens dans les années 1930, avec le sulphanilamide et ont montré un spectre d'activité large de type bactériostatique pour la plupart des bactéries à l'exception de certaines bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia* spp.) (64).

Les sulfonamides sont formés d'une chaîne organique, d'un groupe sulfonyle et d'un groupe amine. Du fait de l'analogie avec l'acide aminobenzoïque, ces molécules sont des substrats compétitifs pour la dihydroptéroate synthase qui est impliquée dans la formation de l'acide tétrahydrofolique. De nos jours, les principaux sulfonamides utilisés sont le sulfaméthoxazole, le sulfisoxazole et le sulfacétamide (64).

II.2.3.2. Les diaminopyrimidines

Les diaminopyrimidines ont été découvertes en 1961 avec le triméthoprim, et ont montré un spectre d'activité large de type bactériostatique quasiment identique aux sulfonamides. Ils empêchent, notamment, l'activité enzymatique de la dihydrofolique réductase qui intervient dans la synthèse de l'acide folique. Ces antibiotiques présentent des réactions indésirables fréquentes telles qu'une intolérance gastro-intestinale et des éruptions cutanées (65).

Les diaminopyrimidines sont composées de noyaux cycliques et de groupements fonctionnels amines et alcools associés et le triméthoprim est le principal représentant de cette classe d'antibiotiques (65).

II.2.4. Les antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires

Les antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires ont pour fonction de déstabiliser les bicouches lipidiques, via la formation de pores conduisant à des échanges anormaux provoquant ainsi un dérèglement cellulaire.

Les polymyxines sont la principale classe d'antibiotique qui permet la déstabilisation des membranes lipidiques des bactéries. Les polymyxines ont été mises en évidence dans les années 1940 et ont montré un spectre d'activité de type bactéricide principalement dirigé vers les bactéries à Gram négatif (66).

Les polymyxines sont constituées d'un cycle heptapeptidique, d'une queue exocyclique à trois acides aminés, d'une coiffe d'acides gras et de six résidus d'acides 2,3-diaminobutyrique. Parmi les cinq polymyxines existantes, seules la polymyxine B et la polymyxine E (colistine) ont été utilisées en clinique. La polymyxine B diffère de la polymyxine E par un seul changement d'acide aminé (66). Dans les premières années d'utilisation de ces antibiotiques, des effets indésirables ont été observés tels qu'une néphrotoxicité et une neurotoxicité avec la polymyxine B (67). Malgré cela, du fait de leur potentiel face aux bactéries résistantes et après quelques modifications de leur structure, leur utilisation s'est accrue ces dernières années (68). Comme montré dans la Figure 12, ces molécules ont la capacité de se fixer au lipide A du LPS via l'attraction électrostatique des cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}), qui stabilisent la membrane externe aboutissant à la perméabilisation de la membrane externe bactérienne. Ceci permet à une partie des polymyxines d'accéder par la suite à la membrane interne pour la déstabiliser et induire la mort cellulaire (66).

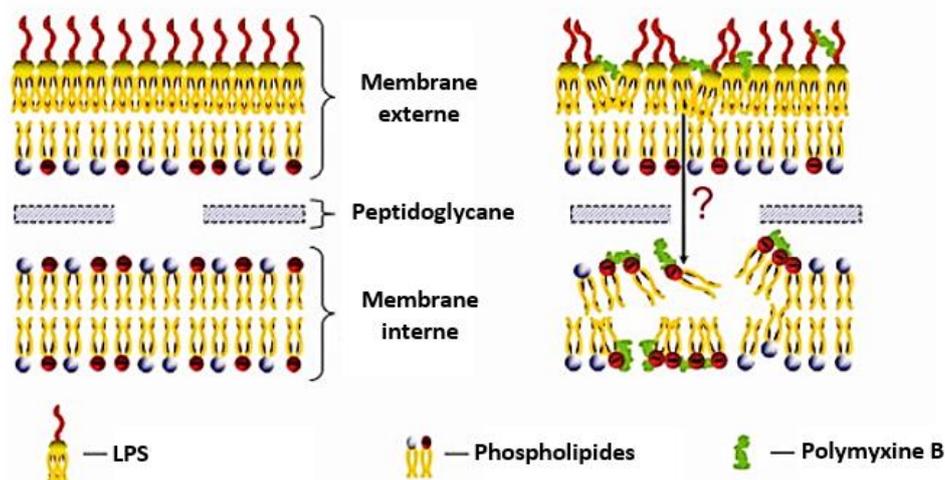


Figure 12 : Le mécanisme d'action des polymyxines sur les enveloppes membranaires bactériennes.

Adapté de Domingues M. et al. (69). Descriptif : Les polymyxines se fixent au lipide A du LPS via l'attraction électrostatique des cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) qui stabilisent la membrane externe, aboutissant à la perméabilisation de la membrane externe bactérienne. Ceci permet à une partie des polymyxines d'accéder par la suite à la membrane interne pour la déstabiliser et induire la mort cellulaire ; (LPS : Lipopolysaccharide).

II.2.5. Les inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

L'action des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane impacte principalement l'assemblage du réseau de la paroi cellulaire. Selon l'antibiotique, trois mécanismes d'inhibition sont possibles : **1-** Blocage de la synthèse de précurseurs du peptidoglycane au sein de la cellule bactérienne ; **2-** Encombrement stérique entre les dipeptides d'alanine (composant de la chaîne d'acides aminés du MurNAc) et les PLP ; **3-** Inactivation des PLP, et en particulier les transpeptidases. *In fine*, il en résulte une déstructuration du peptidoglycane amenant ainsi à la mort cellulaire. A ce jour, deux principales catégories d'antibiotiques sont utilisées : les glycopeptides et les β -lactamines.

II.2.5.1. Les glycopeptides

Les glycopeptides ont été mis en évidence dans les années 1950, et de nos jours, deux d'entre eux sont utilisés en clinique : la vancomycine et la teicoplanine. Ils ont un spectre d'activité de type bactéricide essentiellement dirigé vers les bactéries à Gram positif telles que les *Staphylococcus*, *Enterococcus*..., qui sont résistantes à d'autres antibiotiques comme par exemple les β -lactamines (70).

Les glycopeptides naturels sont composés d'un noyau peptidique cyclique comprenant des résidus acides aminés auxquels sont liés deux osamines. Ces antibiotiques se lient à l'extrémité terminale D-Ala-D-Ala des précurseurs du peptidoglycane par des liaisons hydrogènes. Ainsi, ils sont à l'origine d'un encombrement stérique entre les acides aminés et la PLP, empêchant ainsi la formation de liaisons (70). Toutefois, quelques effets secondaires sont présents tels qu'une néphrotoxicité (71).

II.2.5.2. Les β -lactamines

Les β -lactamines possèdent un large spectre d'activité (bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif), de type bactéricide, avec très peu d'effets secondaires (72). Du fait de leur facilité d'obtention et de leur faible coût de production, cette classe d'antibiotique est la plus fréquemment utilisée en antibiothérapie. Quatre sous-classes d'antibiotiques sont

apparues avec des différences au niveau de leur cycle et de leur chaîne latérale : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (Figure 13). L'élément structural commun à cette classe d'antibiotiques est le noyau β -lactame (72).

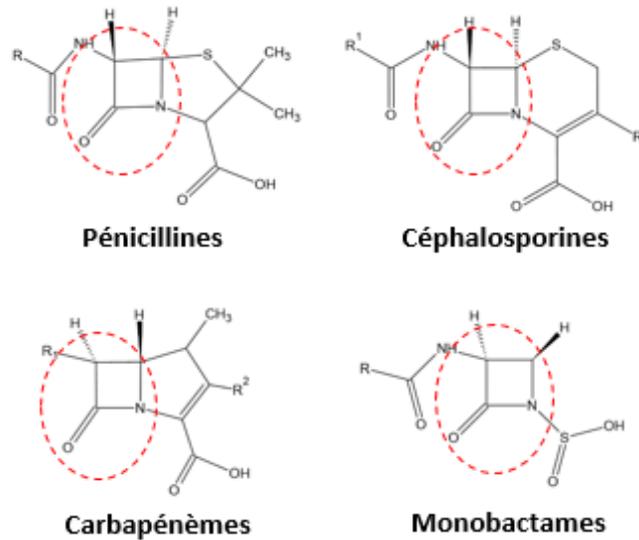


Figure 13 : Les structures des quatre sous-classes de β -lactamines.

Descriptif : Le noyau β -lactame, entouré en rouge, est la structure commune à ces quatre sous-classes d'antibiotiques.

Chacune de ces sous-classes montre des variations dans leur biodisponibilité et dans leur spectre d'activité. Les β -lactamines possèdent une forte homologie structurale avec le dipeptide d'alanine, composant du pentapeptide du groupe MurAc comme montré en Figure 14.

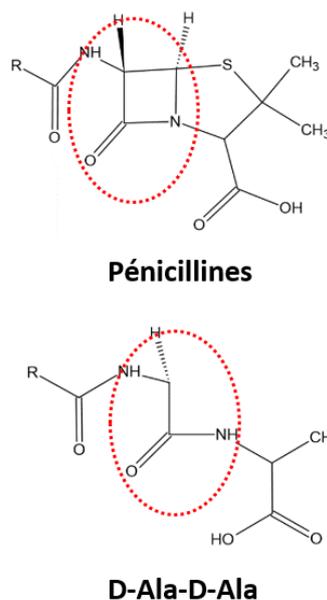


Figure 14 : L'homologie structurale entre les pénicillines et le dipeptide d'alanine.

Descriptif : Cette homologie structurale est retrouvée pour toutes les sous-classes de β -lactamines.

Les β -lactamines sont capables de fixer irrévérablement les PLP, les rendant inactives (73). De ce fait, une compétition s'opère entre l'antibiotique β -lactame et le dipeptide d'alanine pour la PLP. La fixation irrévversible de l'antibiotique sur la PLP empêche la formation de liaison entre les acides aminés. Ceci amène ainsi à la déstabilisation du réseau du peptidoglycane et à la fragilisation de la paroi cellulaire. L'exemple du mécanisme d'action des β -lactamines est montré en Figure 15.

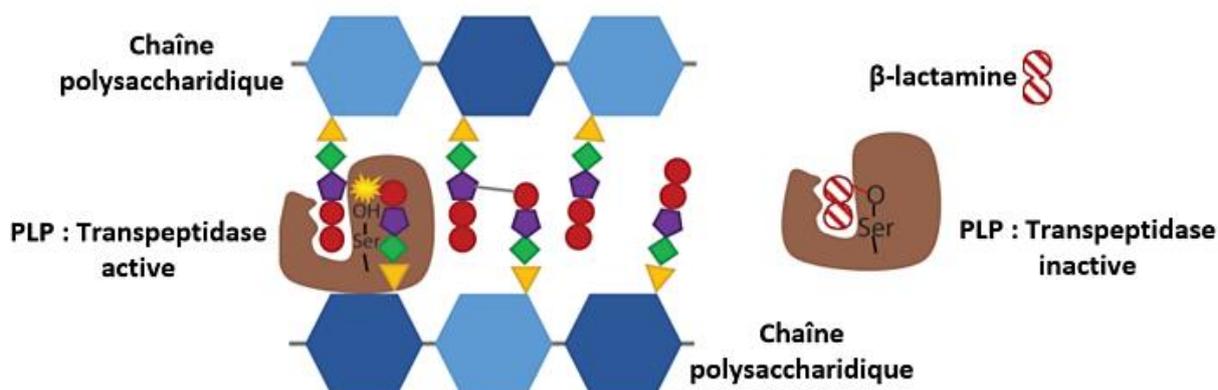


Figure 15 : Le mécanisme d'action des β -lactamines au niveau de la synthèse du peptidoglycane

Adapté de Lobanovska M. et al. (74). Descriptif : L'insertion d'une β -lactamine au niveau du site actif des transpeptidases rend les PLP inactives et ne sont donc plus capables de former le peptidoglycane ; (PLP : Protéine liant les pénicillines).

En plus de ces sous-classes, il existe des inhibiteurs d'enzymes qui n'ont pas d'activité antibiotique mais qui peuvent être coadministrés avec certaines β -lactamines afin d'en maximiser les effets (75). En effet, ces enzymes, appelées β -lactamases, ont la capacité d'inactiver les antibiotiques β -lactames. Trois groupes de β -lactamases se distinguent : les β -lactamases à spectre étroit (pénicillinases et céphalosporinases à spectre étroit), les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et les carbapénémases. Les principales β -lactamases composant ces groupes sont décrites ultérieurement.

II.2.5.2.1. Les pénicillines

Les pénicillines ont été découvertes en 1928 par Alexander Fleming avec la benzylpénicilline, appelée la pénicilline G, et ont été parmi les premiers antibiotiques à être

produit de manière industrielle. En 1957, l'acide 6-aminopénicillanique (Figure 16) a été isolé permettant la conception de nombreuses pénicillines semi-synthétiques (76).

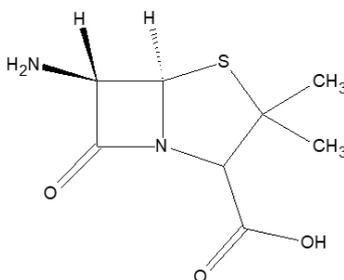


Figure 16 : La structure chimique de l'acide 6-aminopénicillanique.

L'acide 6-aminopénicillanique représente la structure de base des pénicillines qui sont formées d'un cycle β -lactame et d'un cycle thiazolidine. Une substitution par acylation avec diverses chaînes latérales peut donner des dérivés qui se distinguent par leur pharmacocinétique, leur stabilité, le spectre antibiotique et la résistance aux β -lactamases (76). Il existe différentes classes de pénicillines (77) :

- Les pénicillines du groupe G (benzylpénicilline) et V (phénoxy-pénicilline), d'origine naturelle, sont utilisées contre les cocci à Gram positif et Gram négatif ainsi que sur quelques bacilles à Gram positif. Ces molécules sont inactivées notamment par les pénicillinases de *Staphylococcus* ;
- Les pénicillines du groupe M telles que la méticilline, l'oxacilline et la cloxacilline qui sont d'origine semi-synthétique, possèdent le même spectre d'activité que le groupe G et V mais ne sont pas inactivées par les pénicillinases de *Staphylococcus* ;
- Les pénicillines du groupe A, appelées également aminopénicilline, telles que l'ampicilline et l'amoxicilline qui sont d'origine semi-synthétique, ont un spectre d'activité élargi avec une activité supplémentaire pour les bacilles à Gram négatif tels que les entérobactéries. Elles sont inactivées par les pénicillinases de *Pseudomonas* et *Staphylococcus* ;
- Les carboxypénicillines et les uréidopénicillines (respectivement la ticarcilline et la pipéracilline) qui sont d'origine semi-synthétique, ont le même spectre que les pénicillines du groupe A et sont également actives sur les *Pseudomonas*. Cependant, elles sont inactivées par les pénicillinases.

II.2.5.2.2. Les céphalosporines

Les céphalosporines ont été mises en évidence en 1948 avec la céphalosporine C. Cette sous-classe se distingue chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine. La structure de base des céphalosporines est composée de l'acide 7-aminocéphalosporanique (Figure 17) (76).

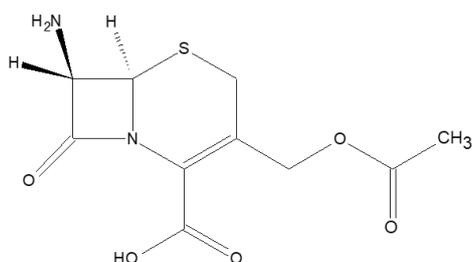


Figure 17 : La structure chimique de l'acide 7-aminocéphalosporanique.

Dès les années 1960, les modifications des chaînes par acylation ont permis d'obtenir de nombreux antibiotiques semi-synthétiques avec des spectres d'activité plus larges, de meilleures propriétés pharmacocinétiques et des résistances à certaines β -lactamases (76). Cinq générations de céphalosporines ont été développées au cours des dernières décennies (72) :

- Les céphalosporines de première génération (C1G) telles que le céfadroxil et le céfazoline ont une activité contre les cocci et les bacilles à Gram positif ainsi que contre certains bacilles à Gram négatif tels que les entérobactéries. Elles sont relativement résistantes aux pénicillinases mais sont détruites par les céphalosporinases à spectre étroit ;
- Les céphalosporines de seconde génération (C2G) telles que la céfoxitine et le céfotétan possèdent un spectre d'activité similaire aux C1G avec un gain d'activité sur certaines bactéries à Gram négatif. Elles sont résistantes à certaines céphalosporinases à spectre étroit et BLSE ;

- Les céphalosporines de troisième génération (C3G) telles que la céftriaxone, le céfotaxime, et la céftazidime sont pourvues d'un spectre d'activité accru pour les bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*...), en plus des coques et bacilles à Gram positif. Elles montrent une bonne résistance à l'inactivation par les céphalosporinases à spectre étroit mais sont inactivées par les BLSE ;
- Les céphalosporines de quatrième génération (C4G) telles que la céfépime et le céfpirome ont une activité identique aux C3G. Elles ont une résistance accrue à l'inactivation par les céphalosporinases à spectre étroit et aux BLSE ;
- Les céphalosporines de cinquième génération (C5G) telles que le céftobiprole et la céftaroline possèdent un spectre d'activité identique aux C3G. Elles sont une catégorie d'antibiotique dédiée à quelques souches spécifiques qui résistent aux pénicillines et/ou céphalosporines (par exemple, avec les souches résistantes à la méticilline), et contre qui les C3G et C4G n'ont pas d'action.

II.2.5.2.3. Les carbapénèmes

Les carbapénèmes ont été découverts dans les années 1970 avec la thiénamycine, qui a servi de composé modèle pour tous les autres carbapénèmes. La structure chimique des carbapénèmes se distingue des pénicillines (au niveau du cycle thiazolidine) par la présence d'une double liaison en C₂-C₃ et la substitution de l'atome de soufre par un atome de carbone. De ce fait, sa structure de base est l'acide olivanique (Figure 18) (78).

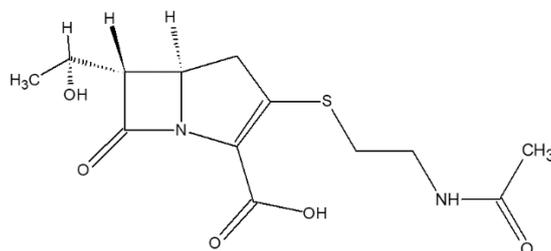


Figure 18 : La structure chimique de l'acide olivanique.

Les carbapénèmes font partie des antibiotiques utilisés en dernier recours pour traiter des infections impliquant des organismes résistants car ils proposent le spectre d'activité le

plus large englobant les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif, et montrent une grande stabilité envers la quasi-totalité des β -lactamases (β -lactamases à spectre étroit, BLSE), à l'exception des carbapénémases (79).

De nouveaux carbapénèmes ont été mis au point (ertapénème, doripénème, méropénème, tébipénème, biapénème...) avec des modifications chimiques après l'atome de soufre. Les groupements fonctionnels ajoutés ont permis de modifier le spectre d'activité et la stabilité des produits. L'imipénème et le méropénème restent les plus populaires car ils ont le plus large spectre d'activité antibactérienne de toutes les β -lactamines. Les carbapénèmes jouent un rôle très important dans le traitement des infections nosocomiales dues à des bactéries à Gram négatif (80).

II.2.5.2.4. Les monobactames

Les monobactames ont été mis en évidence au début des années 1980. Les monobactames sont caractérisés par la présence d'un composé acide 2-oxoazétidine-1-sulfonique avec diverses chaînes latérales. Il s'agit des seuls antibiotiques β -lactames monocycliques. L'un des seuls monobactames utilisé en clinique est l'aztréonam (Figure 19). Il est essentiellement actif contre les bactéries à Gram négatif, avec un spectre d'activité comparable aux C3G. L'aztréonam résiste à l'activité des β -lactamases à spectre étroit (pénicillinases et céphalosporinases à spectre étroit) et à certaines carbapénémases (métallo- β -lactamases) mais est inactivé par les BLSE (81).

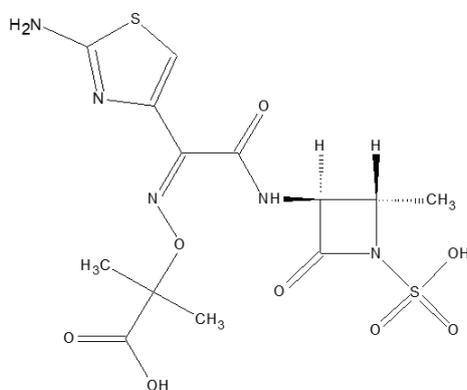


Figure 19 : La structure chimique de l'aztréonam.

II.2.5.2.5. Les inhibiteurs des β -lactamases

L'acide clavulanique est le premier inhibiteur de β -lactamase introduit dans les années 1970 en médecine clinique. Il ne possède pas d'activité antibactérienne propre et est, de fait, toujours associé à une autre β -lactamine possédant cette activité. Les inhibiteurs inactivent les β -lactamases produites par la bactérie en s'y fixant de façon irréversible permettant ainsi de conserver l'activité de l'antibiotique co-administré (82). Les inhibiteurs des β -lactamases sont des dérivés de l'acide clavulanique (Figure 20). Ils sont composés d'un cycle β -lactame et d'un cycle de thiazolidine pouvant avoir une substitution de l'atome de soufre par un atome d'oxygène ainsi que de groupements fonctionnels. A leur introduction, les inhibiteurs des β -lactamases ont été développés pour lutter contre les résistances impliquant des β -lactamases à spectre étroit. Puis, d'autres inhibiteurs sont apparus pour lutter contre les BLSE, et les carbapénémases. Chaque inhibiteur agit principalement sur une classe de β -lactamases, décrites ultérieurement. L'un des objectifs des prochaines années est de concevoir un inhibiteur « universel » capable d'agir sur l'ensemble des β -lactamases (83).

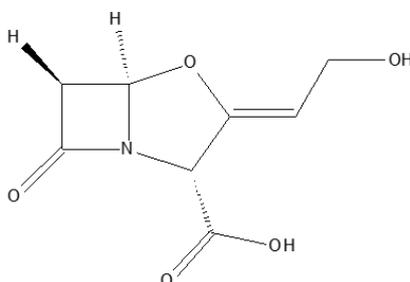


Figure 20 : La structure chimique de l'acide clavulanique.

A ce jour, les plus utilisés sont l'acide clavulanique, le tazobactam ainsi que le sulbactam, et plus récemment l'avibactam (75).

II.3. Le devenir des antibiotiques

Des voies thérapeutiques alternatives à l'antibiothérapie existent mais elles sont peu utilisées car elles nécessitent davantage de recherche et d'études cliniques : **1-** La

phagothérapie ; **2-** L'apithérapie ; **3-** Les peptides antimicrobiens ; **4-** Le transfert du microbiote.

La phagothérapie consiste à utiliser des bactériophages de type lytique qui sont capables d'infecter et de détruire les bactéries. En effet, à la fin de leur cycle de multiplication à l'intérieur de la bactérie, ils lysent la paroi de celle-ci afin de se retrouver dans le milieu extérieur et infecter d'autres bactéries. Du fait de la spécificité des phages, il faut pour chaque infection bactérienne, chercher et identifier le phage efficace (84).

L'apithérapie repose sur les propriétés anti-infectieuses du miel d'abeille. Il a été montré qu'en cas de lésion cutanée, le miel est capable d'agir sur la phase inflammatoire, la phase de prolifération bactérienne, et sur la phase de remaniement des cellules cutanées. Ses propriétés seraient dues à la présence de peroxyde d'hydrogène, de méthylglyoxal et de défensine-1 dans le miel d'abeille (85).

Les peptides anti-microbiens sont de petites molécules cationiques retrouvées chez les mammifères tels que les défensines, la cathélicidine, l'histatine ou encore l'indolicidine, qui interagissent avec la membrane bactérienne provoquant la lyse de la bactérie. Ils peuvent être utilisés lors d'infections pulmonaires, cutanées ou digestives (86).

Le transfert du microbiote consiste à transférer le microbiote d'une personne saine vers une personne malade afin de restaurer un microbiote normal non pathogène. En effet, les traitements divers inculqués à un patient engendrent une sélection de bactéries au niveau des microbiotes, parfois néfastes, ce qui provoquent des maladies et des infections (87).

L'antibiothérapie reste aujourd'hui très répandue dans le monde malgré l'absence de découverte de nouveaux antibiotiques depuis les années 1990. Elle est l'une des principales voies pour traiter les infections bactériennes. En 2014, une étude a estimé que la résistance antimicrobienne pourrait causer 10 millions de décès par an d'ici 2050, contre 700 000 de décès par an actuellement (88). En effet, l'utilisation massive d'antibiotiques dans les domaines de la médecine humaine et animale engendre de nombreux rejets dans l'environnement. Ces concentrations sub-létales d'antibiotiques sont à l'origine d'une pression de sélection sur les bactéries favorisant l'émergence de bactéries multi-résistantes (BMR) aux antibiotiques, comme démontré dans la Figure 21 (89).

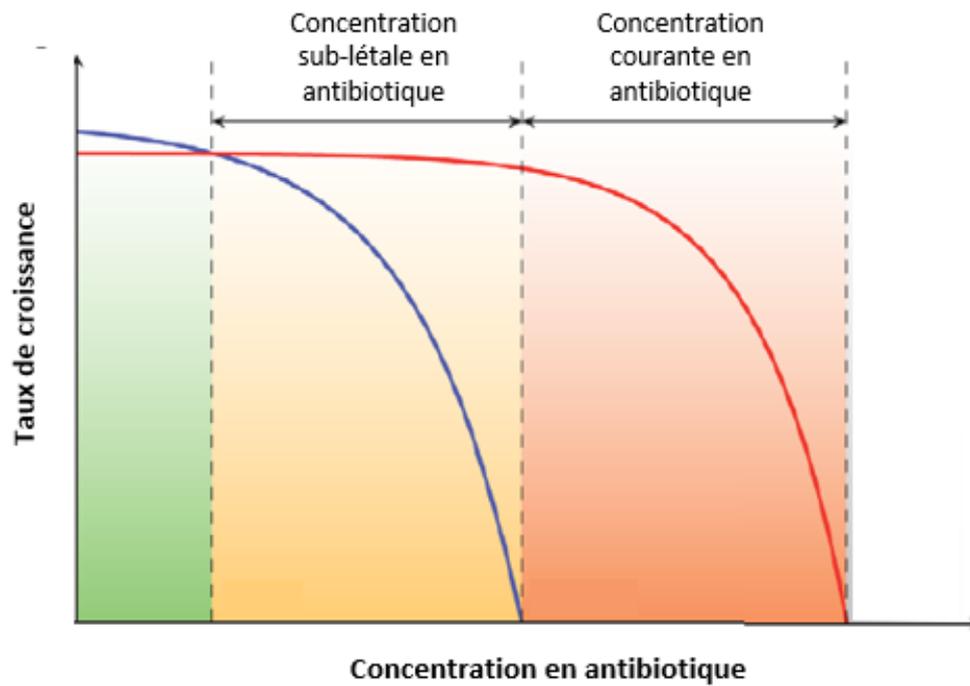


Figure 21 : Les taux de croissance bactérienne en fonction de la concentration en antibiotique.

Adapté de Gullberg E. et al. (89). Descriptif : La courbe en bleue correspond à la bactérie sensible. La courbe en rouge correspond à la bactérie résistante à l'antibiotique. La plage de concentration d'antibiotiques dans la fenêtre en jaune (concentration d'antibiotiques sub-létale) indique que la pousse de la bactérie sensible est réduite mais pas nulle. Ces concentrations permettent l'émergence de bactéries résistantes à l'antibiotique pouvant atteindre la fenêtre orange où de très fortes concentrations d'antibiotique sont nécessaires pour lutter contre les BMR ; (BMR : Bactérie multi-résistante).

Ces bactéries ont ainsi développé un ou plusieurs mécanisme(s) de résistance face aux antibiotiques ce qui rend de plus en plus difficile la lutte contre ces dernières. Le choix thérapeutique devient restreint du fait de l'absence de nouveaux antibiotiques contre les BMR (90). Ce phénomène est devenu l'un des principaux risques pour la santé au niveau mondial.

Chapitre III : L'antibiorésistance chez les bactéries

Les antibiotiques ont permis de lutter efficacement contre de nombreuses infections bactériennes auxquelles pouvaient être confrontés l'être humain. Néanmoins, l'utilisation massive de ces composés a également favorisé l'apparition de mécanismes de défenses bactériens à l'origine de la résistance aux antibiotiques. En effet, il a été montré que des concentrations sub-létales d'antibiotiques stimulent l'émergence de BMR. L'antibiorésistance est due à des gènes qui constituent le « résistome ». Plus la pression de sélection est présente, et plus le risque d'augmenter la diversité du « résistome » est important. De ce fait, la compréhension de l'histoire de la résistance aux antibiotiques est primordiale pour prédire son évolution future et adapter au mieux l'antibiothérapie (91).

III.1. La résistance aux antibiotiques

La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique peut être intrinsèque ou extrinsèque. La résistance intrinsèque est propre à l'ensemble des souches d'une même espèce, et est portée par le chromosome qui est transmis verticalement de génération en génération. Une résistance extrinsèque est présente dans une proportion variable des souches d'une même espèce. Elle dérive généralement d'une modification génétique due soit à une mutation spontanée (processus naturel) ou médiée (concentration en antibiotique sub-létale), soit à l'acquisition de matériels génétiques (transposons, intégrons, plasmides). Dans ce dernier cas, elle est transmissible horizontalement d'une souche à une autre (92).

La CMI est l'un des paramètres qui permet de caractériser un couple antibiotique/bactérie. Elle varie en fonction du niveau de résistance de la bactérie envers la molécule testée. Plusieurs méthodes existent pour déterminer cette CMI (méthodes décrites précédemment : test de diffusion sur disque, test de microdilution en milieu liquide), et des méthodes de substitutions disponibles dans le commerce telles que les tests de dilution en milieu solide et les méthodes semi-automatiques, qui doivent répondre à des recommandations issues d'organismes agréés. Ainsi, pour une souche donnée, une CMI de

référence ainsi que des concentrations critiques sont définies, basées sur des référentiels de microbiologie tels que :

- Le comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST : European committee on antimicrobial susceptibility testing), pour l'Europe
- L'institut des normes cliniques et de laboratoire (CLSI : Clinical and laboratory standards institute), pour les États-Unis.

Pour prédire l'issue thérapeutique d'un traitement antibiotique, la CMI obtenue d'un couple antibiotique/bactérie est comparée aux concentrations critiques fournies par les référentiels de microbiologie, que sont la concentration critique basse (c) et la concentration critique haute (C). La c est la concentration sérique obtenue pour une posologie d'usage. La C correspond à la posologie maximale tolérée. Il est à noter que plus la CMI est élevée, plus elle s'approche de la C , et plus le risque d'échec thérapeutique est important. Cette comparaison permet ainsi de classer la souche dans une des catégories cliniques suivantes (Figure 22) (93) :

- Souche sensible (SS) : la CMI est inférieure à la c , avec une forte probabilité de succès thérapeutique
- Souche résistante (SR) : la CMI est supérieure à la C , avec une forte probabilité d'échec thérapeutique
- Souche intermédiaire (SI) : la CMI se situe entre la c et la C , avec une probabilité de succès thérapeutique imprévisible dépendant des incertitudes techniques et biologiques.

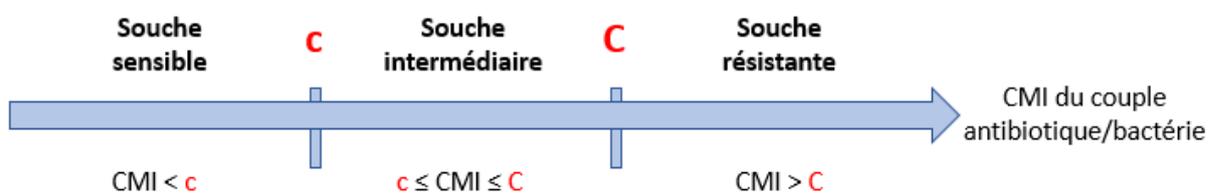


Figure 22 : Les catégories cliniques des bactéries selon la CMI.

Descriptif : Une souche sensible a une CMI inférieure à c . Une souche intermédiaire a une CMI comprise entre c et C . Une souche résistante a une CMI supérieure à C ; ($<$: inférieur ; $>$: supérieur ; CMI : Concentration minimale inhibitrice ; c : Concentration critique basse ; C : Concentration critique haute).

III.1.1. L'origine de l'antibiorésistance

Suite à la découverte de la pénicilline en 1928, son utilisation n'a fait que croître permettant de réduire considérablement la mortalité due à des maladies infectieuses bactériennes. Dès 1940, la première résistance diminuant l'efficacité de la pénicilline contre certaines bactéries a été identifiée (94). En effet, avec l'utilisation massive des antibiotiques, les résistances à ces derniers surviennent généralement quelques années après leur utilisation en médecine clinique. Il est à noter que les antibiotiques, dépendant de leur spectre d'activité, ciblent l'ensemble de la flore microbienne. De ce fait, toutes les bactéries sont susceptibles d'acquérir de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques en complément de ceux que certaines d'entre elles possèdent. De plus, la plupart des agents antimicrobiens utilisés dans la pratique clinique sont (ou dérivent) des molécules présentes naturellement dans l'environnement ou produites naturellement par un micro-organisme. Ainsi, la dissémination dans l'environnement et l'acquisition de gènes de résistance sont davantage favorisées amenant à des échecs thérapeutiques (92), avec une estimation de 10 millions de décès par an d'ici 2050 si la résistance aux antibiotiques n'est pas endiguée (88).

III.1.2. Le concept « One Health »

De plus en plus d'études montrent l'interconnection entre les différents réservoirs que sont l'homme, la faune, la flore et l'environnement dans différents domaines de la santé. Cette constatation a débouché sur la notion de « One Health » qui reflète la nécessité d'avoir une approche globale pour résoudre certaines problématiques de santé (95).

Depuis des décennies, les antibiotiques constituent la solution thérapeutique face aux infections bactériennes pour la médecine humaine et vétérinaire. Leur utilisation massive à l'échelle planétaire a favorisé leur dissémination, ce qui a favorisé la sélection de bactéries résistantes dans les différents réservoirs. En outre, l'antibiorésistance est présente à l'interface de trois domaines : la médecine humaine, la médecine animale et la santé environnementale (Figure 23) (96).

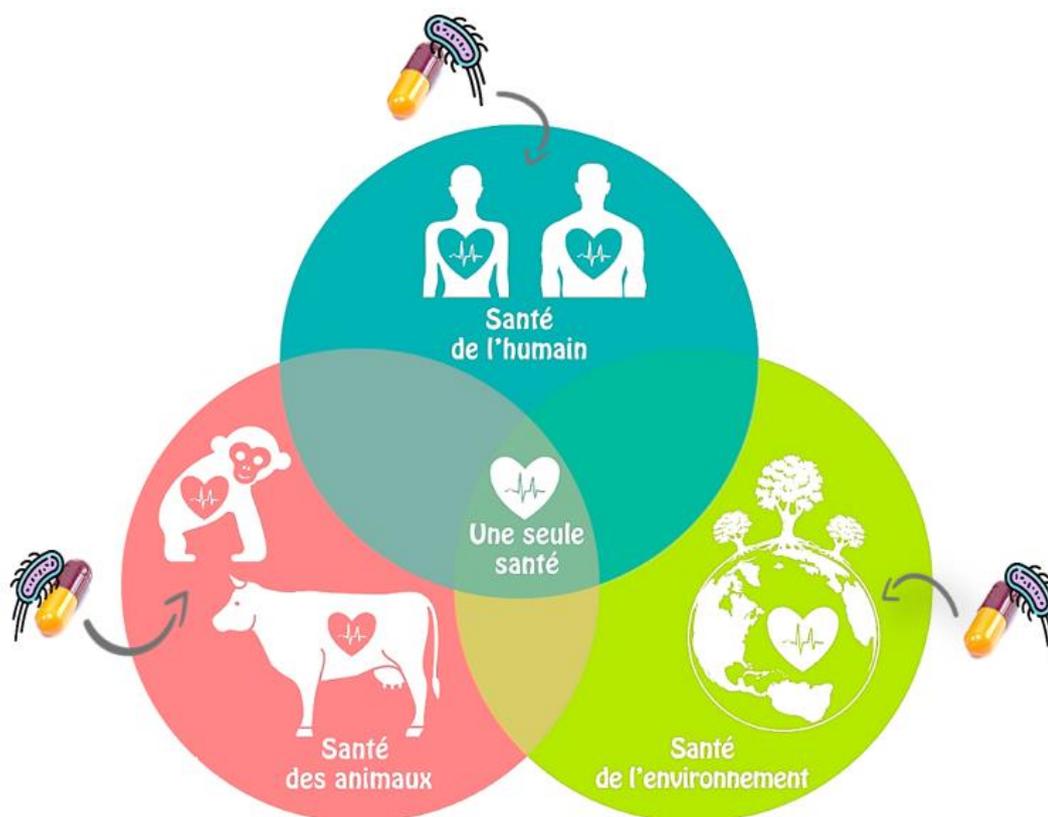


Figure 23 : La résistance aux antibiotiques au sein du concept « One Health ».

Adapté de Inrae.fr, *One health - une seule santé* (97). Descriptif : Les trois piliers du concept « One Health » sont la médecine humaine, la médecine animale, et la santé de l'environnement.

Depuis quelques années, des actions (partenariats des différents secteurs, communications...) regroupant différents acteurs au niveau national (98), européen (99) et international (100), ont été initiées afin de lutter efficacement contre l'antibiorésistance en prenant en compte les différents réservoirs et en adoptant une approche globale.

III.2. Les bactéries multi-résistantes majeures

Les infections dues aux BMR constituent un problème majeur de santé publique partout dans le monde car elles ont la capacité de résister à au moins une famille d'antibiotiques. Des impasses thérapeutiques apparaissent, et les professionnels de santé se retrouvent dans l'incapacité de soigner un patient. Ainsi, le coût humain et économique des infections à BMR ne cesse de croître (88).

En Europe, sept BMR sont omniprésentes et sont la cause principale de mortalité liée à l'antibiorésistance.

III.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif et est constitutive du microbiote intestinal chez l'Homme. Elle est à l'origine d'infection intra-abdominales, du sang, des voies urinaires, et provoque également des méningites néonatales. La résistance chez *Escherichia coli* s'acquiert soit par des mutations, soit par l'acquisition d'EGM codant pour des mécanismes de résistance tels que la production de BLSE ou de carbapénémases. D'autres mécanismes de résistance tels que des pompes à efflux ou une imperméabilité de la membrane s'ajoutent causant une multirésistance aux antibiotiques. En 2018, à l'échelle européenne, 58,3 % des isolats d'*E.coli* étaient résistants à au moins un des groupes d'antibiotiques, à hauteur de 57,4 % pour les aminopénicillines, 25,3 % pour les quinolones, 15,1 % pour les C3G, 11,1 % pour les aminoglycosides et <1 % pour les carbapénèmes (101).

III.2.2. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est un bacille à Gram négatif et est retrouvée dans le tractus gastro-intestinal, la peau et les voies respiratoires de l'Homme. La majorité des infections causées par *Klebsiella pneumoniae* sont d'origine nosocomiale. A l'instar d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* peut également être résistante à de multiples agents antimicrobiens par le biais des EGM. De plus, intrinsèquement, *Klebsiella pneumoniae* possède le gène de résistance aux aminopénicillines. En 2018, à l'échelle européenne, 37,2% des isolats de *Klebsiella pneumoniae* étaient résistants à au moins un des groupes antimicrobiens, à l'exception des aminopénicillines, à hauteur de 31,7 % pour les C3G, 31,7 % pour les quinolones, 22,7 % pour les aminoglycosides, et 7,5 % pour les carbapénèmes (101).

III.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif, ubiquitaire, retrouvé dans les sols et les milieux humides. Il est l'une des causes majeures d'infections chez les patients hospitalisés avec une déficience immunitaire. Il est à l'origine de pneumonies, d'infections

du sang et des voies urinaires. Intrinsèquement, *P. aeruginosa* peut être résistant à la majorité des agents antimicrobiens en raison de son imperméabilité membranaire relativement élevée. Toutefois, certains quinolones et β -lactamines ou certains aminoglycosides, sont encore actifs sur ces bactéries. D'autres mécanismes de résistance peuvent être acquis par le biais d'EGM. En 2018, à l'échelle européenne, 32,1 % des isolats d'*P. aeruginosa* étaient résistants à au moins un des groupes antimicrobiens, à hauteur de 19,7 % pour les quinolones, 18,3 % pour les uréidopénicillines + inhibiteurs des β -lactamases, 17,2 % pour les carbapénèmes, 14,1 % pour les C3G, et 11,8 % pour les aminoglycosides (101).

III.2.4. *Acinetobacter* spp.

Les espèces d'*Acinetobacter* (*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*...) sont des bacilles à Gram négatif et sont largement répandues dans les sols et les milieux humides. Elles sont largement associées aux infections nosocomiales et peuvent être impliquées dans des pneumonies, les infections du sang, des voies urinaires et de plaies. A l'instar de *P. aeruginosa*, les espèces d'*Acinetobacter* possèdent également une résistance intrinsèque à la plupart des agents antimicrobiens en raison de leur imperméabilité membranaire relativement élevée. Certaines quinolones, certains aminoglycosides et carbapénèmes, et les polymyxines sont encore efficaces sur ces espèces. La résistance acquise de ces bactéries apparaît soit par mutations dans le chromosome bactérien, soit par l'acquisition d'EGM. En 2018, à l'échelle européenne, 56,4 % des isolats d'*Acinetobacter* spp. étaient résistants à au moins un des groupes antimicrobiens, à hauteur de 36,2 % pour les quinolones, 31,9 % pour les aminoglycosides, et 31,9 % pour les carbapénèmes (101).

III.2.5. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae est un coccus à Gram positif et est présent au niveau des voies respiratoires chez l'Homme. Cette bactérie peut provoquer une pneumonie, une bronchite, des infections de l'oreille et du sang ainsi qu'une méningite. *S. pneumoniae* possède divers mécanismes de résistances acquis tels que la résistance à la pénicilline qui

consiste en une altération des PLP ; la résistance aux macrolides due à des mutations ribosomiques ; l'efflux de l'antibiotique en dehors de la cellule. En 2018, à l'échelle française, les isolats de *S. pneumoniae* résistants à la pénicilline étaient de 29,1 % et ceux résistants aux macrolides de 23,9 %. Les souches présentant les deux résistances représentaient 20,4 % des isolats (101).

III.2.6. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un coccus à Gram positif, et est retrouvé fréquemment sur la peau et dans les narines humaines. Cette bactérie est impliquée dans les infections d'origine communautaire et sanitaire telles que les infections de la peau, des tissus mous, et du sang. *S. aureus* a acquis des gènes de résistance à certains β -lactamines et glycopeptides par l'expression de variants de PLP avec une affinité réduite pour ces antibiotiques. Cliniquement, plusieurs groupes de bactéries résistantes se distinguent tels que les *S. aureus* résistants à la pénicilline, les *S. aureus* résistants à la vancomycine, les *S. aureus* résistants à la méticilline (MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Le groupe MRSA est le plus répandu et représenté par *S. aureus*. En 2018, à l'échelle européenne, 19,3 % des isolats d' *S. aureus* étaient résistants à au moins un des groupes antimicrobiens, à hauteur de 16,4 % pour les MRSA (101).

III.2.7. *Enterococci* spp.

Les espèces *Enterococci* sont des cocci à Gram positif et sont ubiquitaires dans le microbiote normal du tractus gastro-intestinal de l'Homme. Elles ont la capacité de provoquer diverses infections telles que des infections urinaires et sanguines, des endocardites, des péritonites ou encore des abcès intra-abdominaux. Les deux espèces les plus représentatives des infections cliniques chez l'Homme sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Intrinsèquement, les espèces d'*Enterococci* sont résistantes à une large gamme d'agents antimicrobiens tels que certaines β -lactamines, sulfonamides et certains aminoglycosides. Par nature, ils sont peu sensibles aux β -lactamines en raison de la faible

affinité de leurs PLP pour ces antibiotiques. L'acquisition d'EGM a renforcé cette résistance. En conséquence, deux grands groupes de bactéries résistantes sont apparus : les *Enterococci* résistants à la vancomycine et les *Enterococci* résistants aux glycopeptides. En 2018, à l'échelle européenne, *E. faecalis* est principalement résistant à la gentamicine (aminoglycoside) et *E. faecium* résistant à la vancomycine, respectivement à hauteur de 27,1 % et 17,3 % (101).

III.3. Les mécanismes de résistance

Les antibiotiques ont pour but d'arrêter ou de perturber les fonctions cellulaires essentielles des bactéries. Néanmoins, ces micro-organismes ont développé des mécanismes de résistance qui exploitent toutes les stratégies possibles pour empêcher l'action de ces molécules. Les principaux types de résistance sont représentés en Figure 24 (92) :

- L'imperméabilité face aux antibiotiques ;
- L'efflux des molécules d'antibiotiques en dehors de la cellule bactérienne ;
- Les modifications de la cible thérapeutique ;
- Les modifications de l'antibiotique.

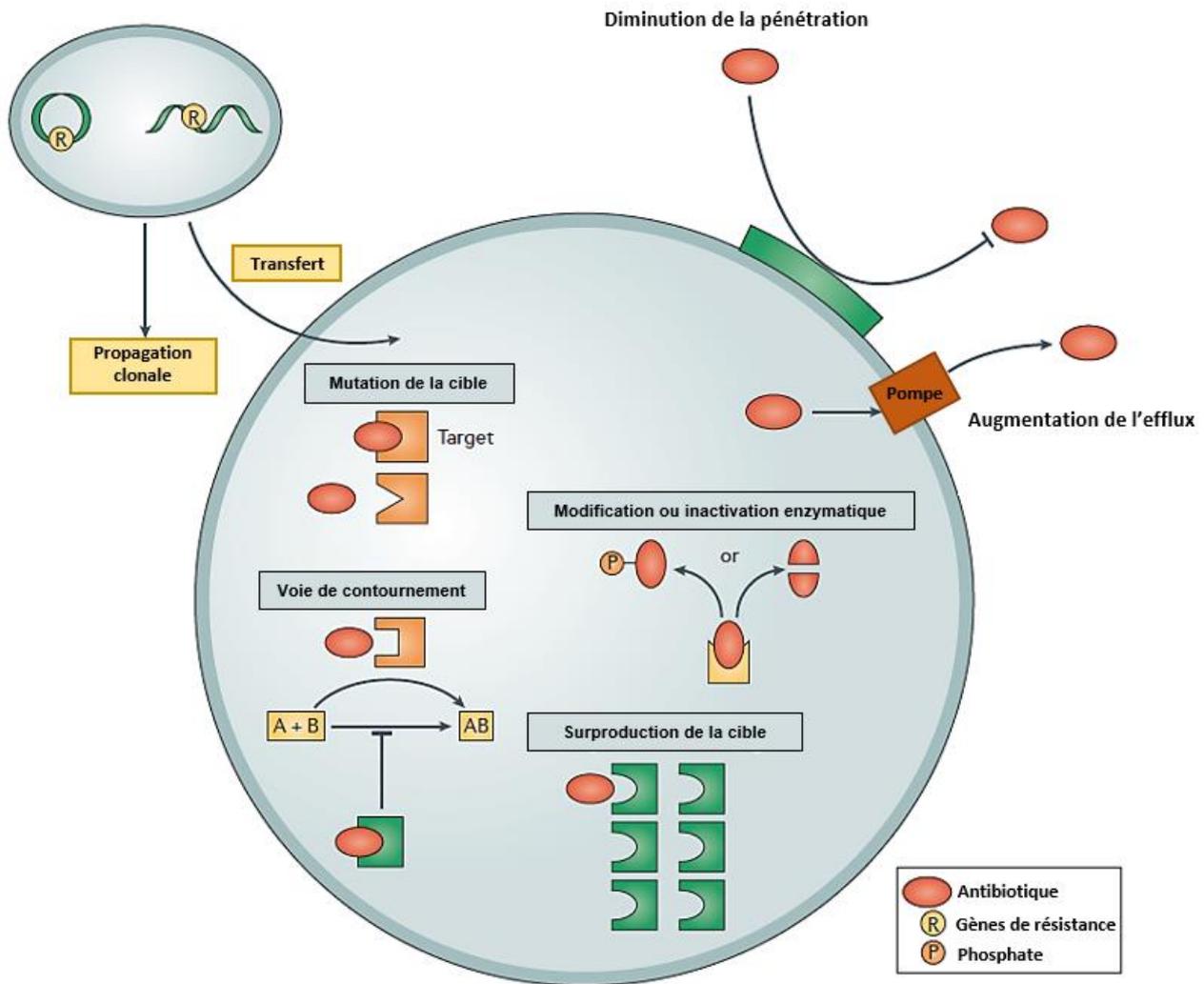


Figure 24 : Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez la bactérie.

Adapté de Lewis K. (41). Descriptif : Les principales résistances sont : **1-** L'imperméabilité face aux antibiotiques ; **2-** L'efflux des molécules d'antibiotiques en dehors de la cellule bactérienne ; **3-** Les modifications de la cible thérapeutique (mutation ou surproduction) ; **4-** Les modifications ou l'inactivation enzymatique de l'antibiotique.

III.3.1. L'imperméabilité aux antibiotiques

Les cibles d'une grande partie des antibiotiques sont intracellulaires ce qui implique que la molécule doit traverser la paroi cellulaire ainsi que la membrane interne pour exercer ses propriétés antimicrobiennes. Chez les bactéries à Gram négatif, ce passage est davantage réduit à cause de la membrane externe et s'effectue via des porines (92). Ces porines sont les principales actrices de la perméabilité membranaire. Différentes altérations de ces structures peuvent être à l'origine d'une résistance aux antibiotiques (92) :

- Un changement du type de porines exprimées ;
- Une modification dans le niveau d'expression des porines ;
- Une mutation modifiant la spécificité de la porine.

Une étude a recensé l'ensemble des porines existantes et leurs potentielles implications dans la résistance aux antibiotiques (30).

III.3.2. L'efflux des molécules d'antibiotiques

Les bactéries possèdent des systèmes de machinerie complexes permettant l'élimination des déchets du métabolisme hors de la cellule bactérienne : les pompes à efflux. Ces pompes sont à l'origine de la résistance antimicrobienne via deux mécanismes : **1-** Une surexpression des pompes d'efflux, **2-** L'efficacité des pompes d'efflux est augmentée par des substitutions d'acides aminées dans leurs séquences. L'objectif est de limiter l'accumulation de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie. Il existe cinq grandes familles de pompes à efflux (Figure 25) (102) :

- La superfamille des facilitateurs (MFS : Major Facilitator Superfamily) ;
- La famille de multirésistance aux médicaments (SMR : Small Multidrug Resistance) ;
- La famille d'extrusion de composés toxiques et multidrogues (MATE : Multidrug And Toxic compounds Extrusion) ;
- La famille résistance-nodulation-division (RND : Resistance-Nodulation cell Division) ;
- La famille des cassettes de liaison ATP (ABC : ATP-binding cassette).

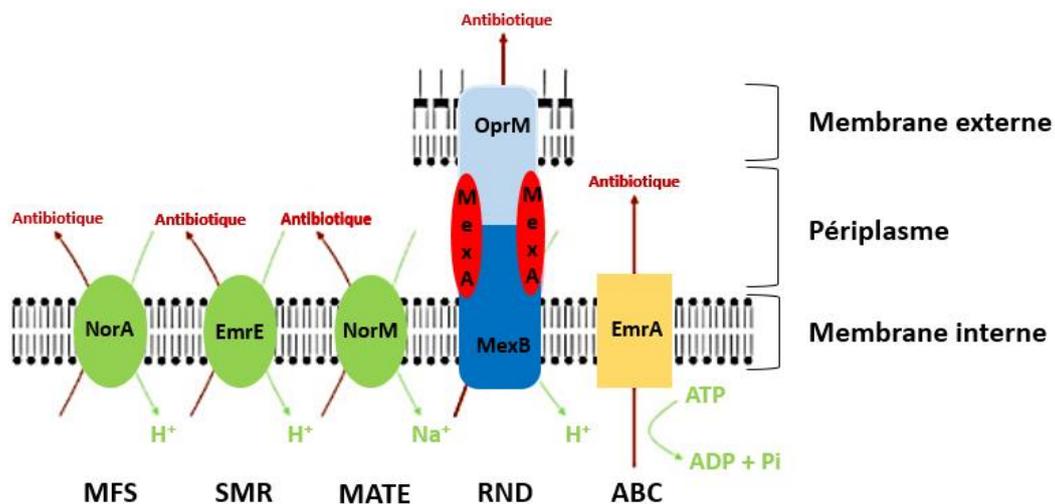


Figure 25 : Les cinq grandes familles de pompes à efflux.

Adapté de Cattoir V. (103). Descriptif : Les cinq grandes familles de pompes à efflux sont : **1-** MFS (Major Facilitator Superfamily) : la superfamille des facilitateurs ; **2-** SMR (Small Multidrug Resistance) : la famille de multirésistance aux médicaments ; **3-** MATE (Multidrug And Toxic compounds Extrusion) : la famille d'extrusion de composés toxiques et multidrogués ; **4-** RND (Resistance-Nodulation cell Division) : la famille résistance-nodulation-division ; **5-** ABC : ATP-binding cassette) : la famille des cassettes de liaison ATP).

Selon l'espèce bactérienne, ces familles diffèrent en termes de conformation structurelle, de source d'énergie et de spécificité du substrat. La résistance aux antibiotiques est médiée par l'efficacité d'efflux des pompes et par leur surexpression, abaissant la concentration intracellulaire de l'antibiotique afin que le micro-organisme devienne moins sensible à l'agent antimicrobien (102).

III.3.3. Les modifications de la cible thérapeutique

Un autre levier pour développer une résistance aux antibiotiques est la cible thérapeutique. Pour ce faire, différentes stratégies sont utilisées par les bactéries :

- Les mutations de la cible ;
- Les altérations enzymatiques de la cible ;
- Le remplacement de la cible ;
- La surproduction de la cible.

III.3.3.1. Les mutations de la cible

Les mutations de la cible résultent de mutations spontanées de certaines bases au sein de gènes les codant. Cette modification permet dans certains cas de diminuer l'affinité de l'antibiotique pour sa cible sans impacter l'activité de cette dernière. L'un des exemples de résistance est le développement de la résistance à la rifampicine (ansamycine) qui inhibe la transcription au niveau de l'initiation (104).

III.3.3.2. Les altérations chimiques de la cible

Les altérations enzymatiques sur la cible correspondent à l'ajout de groupements de méthylation, d'acétylation et/ou de phosphorylation. Ces groupements permettent de réduire l'affinité que possède l'antibiotique pour sa cible. L'un des exemples le mieux caractérisé est la méthylation d'un résidu d'adénine du domaine V de l'ARN 23S de la sous-unité ribosomique 50S par une enzyme Erm qui altère la liaison des macrolides (105).

III.3.3.3. Le remplacement de la cible

La cible initiale peut également être remplacée par une autre structure possédant les mêmes fonctions biochimiques mais qui n'est pas inhibée par l'antibiotique. Un des exemples est l'acquisition par *Staphylococcus aureus* d'une PLP exogène (PLP2a) portée par le gène *mecA*. Cette PLP a une faible affinité pour les β -lactamines rendant la plupart des β -lactamines inefficaces contre cet agent (Figure 26) (106).

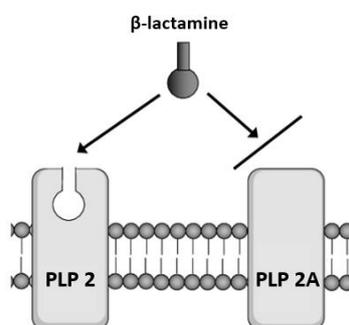


Figure 26 : Le remplacement de la cible des β -lactamines comme outil de résistance.

Adapté de Murphy J. et al. (107).

III.3.3.4. La surproduction de la cible

La bactérie peut également induire une hyperproduction de la cible. Ainsi, même en présence d'antibiotique à la concentration thérapeutique, le micro-organisme devient moins sensible à l'agent antimicrobien. L'un des exemples est le développement de la résistance au couple triméthoprim-sulfaméthoxazole où la surproduction des enzymes impliquées dans la synthèse du folate (mutations dans la région promotrice de l'ADN codant pour ces enzymes) permet la survie bactérienne même en présence de ces antibiotiques (108).

III.3.4. Les modifications de l'antibiotique

L'une des stratégies bactériennes la plus efficace pour faire face aux antibiotiques consiste à produire des enzymes qui inactivent l'antibiotique, soit par l'ajout de fonctions chimiques, soit par l'hydrolyse de l'antibiotique. Dans les deux cas, l'antibiotique devient incapable d'interagir avec sa cible.

III.3.4.1. Les altérations chimiques de l'antibiotique

Les altérations chimiques induites sur l'antibiotique correspondent à l'ajout de groupements adényl, acétyl et/ou de phosphoryl, tant chez les bactéries à Gram négatif que les bactéries à Gram positif. Ces ajouts induisent une baisse de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, et sont généralement impliqués dans la résistance aux antibiotiques inhibant la synthèse des protéines au niveau des ribosomes (aminoglycosides, macrolides et apparentés) (105,109).

III.3.4.2. La dégradation enzymatique de l'antibiotique

Certaines bactéries sont capables de synthétiser des enzymes qui ont la capacité d'hydrolyser des antibiotiques. Cette hydrolyse provoque une modification de la structure de l'antibiotique qui ne peut plus interagir avec sa cible. Ce mode d'action est l'un des

principaux mécanismes utilisés par les bactéries pour être résistantes aux β -lactamines. Cette résistance est basée sur la production de β -lactamases qui hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame comme illustré en Figure 27 (92).

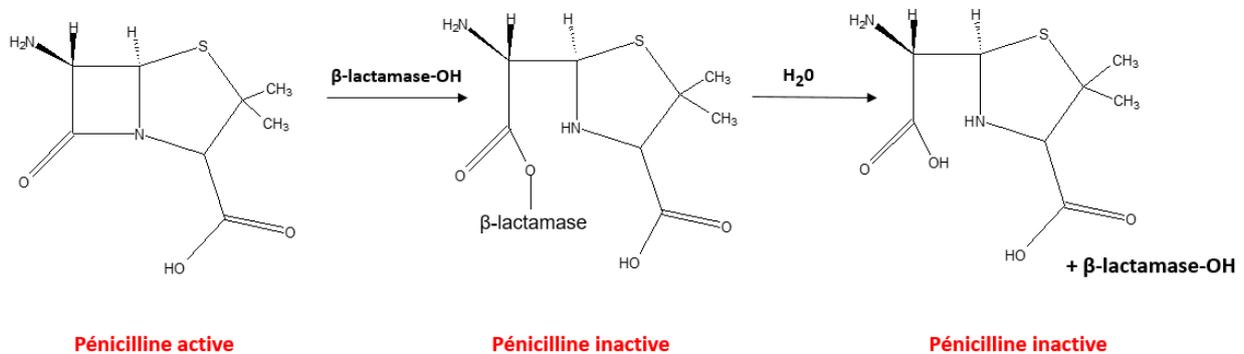


Figure 27 : La dégradation enzymatique de la pénicilline par une β -lactamase.

Descriptif : L'exemple des pénicillines est représenté où la β -lactamase se fixe au niveau du noyau β -lactame pour permettre son ouverture. Puis, l'enzyme est relarguée grâce à l'ajout d'une molécule d'eau (H_2O). Dès l'ouverture du cycle β -lactame, l'antibiotique est inactif. Le même mécanisme de dégradation enzymatique est employé pour toutes les β -lactamines.

Chez les bactéries à Gram négatif et plus particulièrement, les entérobactéries, la production de β -lactamases est le principal moyen de résistance aux antibiotiques. Les premières β -lactamases ont été décrites au début des années 1940 (94) et à ce jour, de nombreuses études répertorient les découvertes des différentes β -lactamases, compilées sous une base de données (<http://bldb.eu/>) pour la comparaison de leurs structures, de leurs fonctions, et de leurs spécificités (110). Dans cette base de données, les β -lactamases sont regroupées en quatre classes (Classes A, B, C et D), en fonction de leurs homologies structurales : il s'agit de la classification de Ambler (111–113).

Chapitre IV : Les entérobactéries et les β -lactamases

Pendant de nombreuses années, les quinolones et les céphalosporines constituaient une ligne de défense efficace contre les nombreuses infections dues aux entérobactéries. Néanmoins, la capacité de ces bactéries à s'adapter à l'environnement et à se transférer des EGM ont favorisé l'apparition des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Cette évolution est en grande partie due à l'apparition et à la dissémination de β -lactamases dont le spectre d'activité s'est élargi pour couvrir non seulement les pénicillines (pénicillinases), mais également les céphalosporines (céphalosporinases à spectre étroit et BLSE) et les carbapénèmes (carbapénémases) (114). Toutefois, malgré le nombre important de β -lactamases, les β -lactamines restent la meilleure approche pour lutter contre les infections liées aux entérobactéries grâce à l'identification de synergies entre les β -lactamines existantes et d'autres classes d'antibiotiques, ainsi qu'à l'introduction de nouvelles β -lactamines (115).

IV.1. L'évolution de l'antibiorésistance chez les entérobactéries

La famille des *Enterobacteriaceae* est composée de plusieurs genres bactériens (*Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp...), définis comme des bacilles à Gram négatif. Ces bactéries représentent une part importante du microbiote intestinal de l'Homme et des animaux à l'origine de leur dénomination. En outre, *Escherichia coli* correspond à 80 % de la flore aérobie. Une transmission est possible entre l'Homme et l'animal de certaines espèces. Néanmoins, bien qu'elle ne provoque habituellement pas de maladie, certaines entérobactéries sont des pathogènes opportunistes et occupent une place non négligeable en pathologie infectieuse (116). Elles sont à l'origine d'infections urinaires, pulmonaires, de plaies et de septicémies dans la communauté ainsi que dans les hôpitaux.

Les entérobactéries, du fait de l'apparition et la dissémination de β -lactamases, deviennent un problème sanitaire majeur car les traitements pour lutter contre ces agents pathogènes deviennent de plus en plus restreints (117). A partir des années 1990, deux grands groupes de BMR sont apparus successivement et sont devenus l'une des préoccupations majeures dans le traitement des infections communautaires et nosocomiales. Ce sont les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (E-BLSE) (118) et les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) (117).

IV.1.1. Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi

Au début des années 1980, le développement des C3G a permis de lutter contre les infections liées aux β -lactamases à spectre étroit (pénicillinases et céphalosporinases à spectre étroit). Toutefois, dès 1983, un premier cas de résistance chez *Klebsiella pneumoniae* a été observé en Europe, avec l'apparition de BLSE capable d'hydrolyser les C3G. Dans les années 1990, de nouvelles BLSE ont émergé et sont devenues rapidement les β -lactamases les plus répandues dans les isolats cliniques, principalement chez *Escherichia coli*. De ce fait, afin de lutter efficacement contre les E-BLSE, l'utilisation de carbapénèmes ou de certains inhibiteurs de β -lactamases est préconisée car la possibilité que les BLSE hydrolysent ces molécules, est réduite (118).

IV.1.2. Les entérobactéries productrices de carbapénémases

Depuis les années 2000, et à cause de la large diffusion des E-BLSE, il a été nécessaire d'utiliser les carbapénèmes de plus en plus souvent comme traitement de lutte contre ces BMR (118). A l'origine, les carbapénèmes étaient utilisés pour prévenir et traiter les infections nosocomiales car elles sont souvent associées aux techniques développées par la médecine moderne telles que la transplantation, les soins intensifs, les chirurgies... L'accroissement de leur utilisation a favorisé l'apparition de carbapénémases, en particulier chez *Klebsiella pneumoniae* (119). Ces EPC sont aujourd'hui retrouvées dans le monde entier et peuvent déboucher sur des échecs thérapeutiques du fait de l'inefficacité de la quasi-totalité des β -

lactamines. Toutefois, certaines résistances aux carbapénèmes ne sont pas directement corrélées avec la présence d'une carbapénémase. En effet, la synergie entre deux mécanismes de résistances telles qu'une BLSE associée à une diminution de la perméabilité ou à une augmentation de l'activité des pompes à efflux, favorise l'inefficacité thérapeutique des carbapénèmes. De même, en cas de faibles concentrations en carbapénèmes, les BLSE peuvent être capable de les hydrolyser. Ainsi, l'interprétation du mécanisme de certaines résistances peut être erronée amenant à des traitements non appropriés (120).

IV.2. Les principales variétés de β -lactamases

Les β -lactamases sont issues de gènes de résistance, appelés *bla*, qui peuvent être présents soit sur le chromosome bactérien, soit sur un plasmide. Ces enzymes peuvent être classées en fonction de leurs substrats et de leurs inhibiteurs (par exemple avec la classification Bush-Jacoby-Medeiros ; Groupes 1 à 4), ou en fonction de leur homologie de séquence en acides aminés (par exemple avec la classification de Ambler ; Classes A à D). La classification de Ambler est la plus utilisée et est divisée en quatre classes, illustrées par la Figure 28 (111–113). Les β -lactamases des classes A, C et D ont une sérine dans le site actif, alors que les β -lactamases de la classe B, également appelées métallo β -lactamases, ont un ion zinc dans le site catalytique (121). Il est à noter qu'à chaque classe est/sont associé(s) un ou plusieurs inhibiteur(s) de β -lactamases permettant d'inhiber l'activité de ces dernières (83,122) :

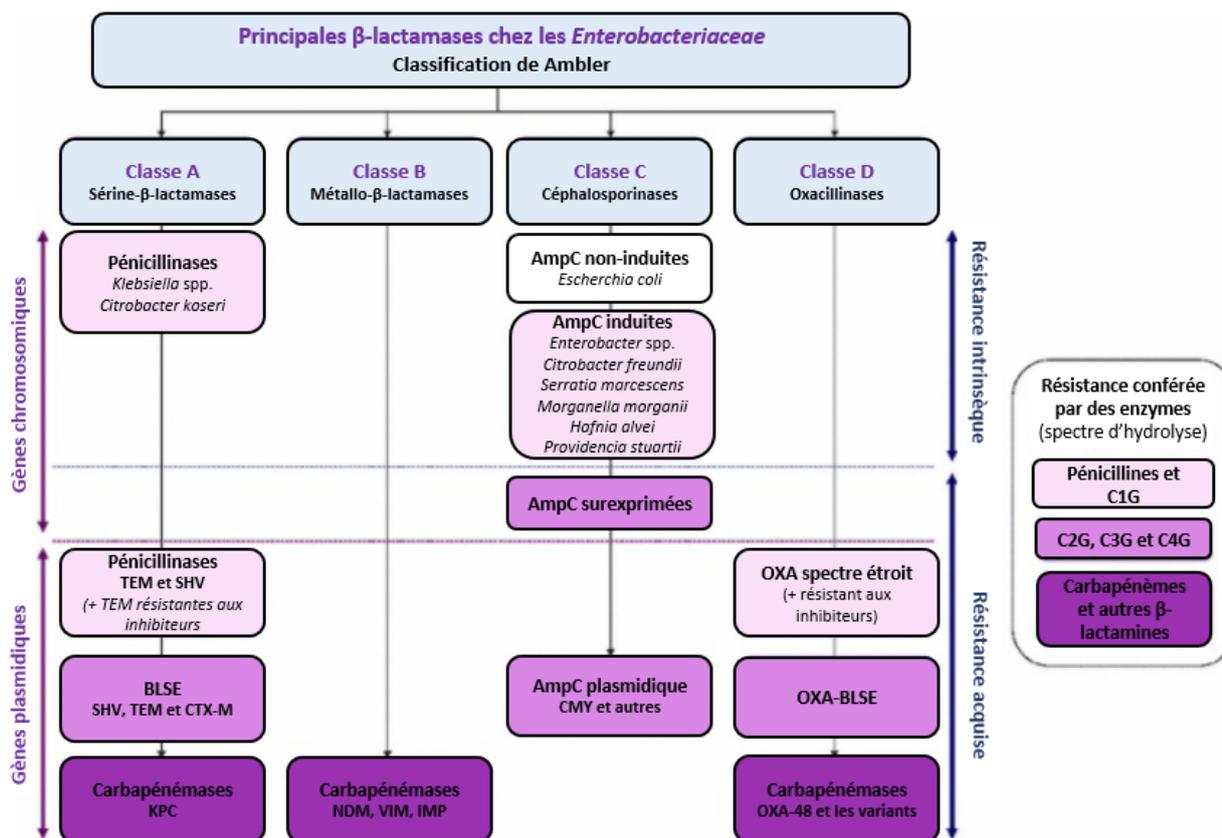


Figure 28 : Les quatre classes de β -lactamases de la classification de Ambler.

Adapté de Ruppé E. et al. (123). Descriptif : La classe A est composée de sérine- β -lactamases, la classe B de métallo- β -lactamases, la classe C de céphalosporinases et la classe D d'oxacillines ; (C1G : Céphalosporines de première génération ; C2G : Céphalosporines de deuxième génération ; C3G : Céphalosporines de troisième génération ; C4G : Céphalosporines de quatrième génération).

- Classe A : Les sérines β -lactamases composées de pénicillinases chromosomiques et plasmidiques, de BLSE et également de carbapénémases. Les inhibiteurs associés sont l'acide clavulanique, le tazobactam, l'avibactam et l'acide borique.
- Classe B : Les métallo- β -lactamases constituées essentiellement de carbapénémases. Les inhibiteurs associés sont : l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et l'acide dipicolinique.
- Classe C : Les céphalosporinases à spectre étroit composées des AmpC chromosomiques surexprimées et des AmpC plasmidiques. Les inhibiteurs associés sont l'avibactam et la cloxacilline.
- Classe D : Les oxacillines définies par les enzymes de type OXA pouvant être des pénicillinases, des BLSE ou des carbapénémases. Les inhibiteurs (action avérée selon l'OXA impliquée) associés sont l'acide borique, l'acide clavulanique, le tazobactam et l'avibactam.

Pour la description des différentes β -lactamases dans la suite de cette introduction, trois groupes de β -lactamases sont identifiés et regroupés en fonction de leurs substrats : les β -lactamases à spectre étroit (pénicillinases et céphalosporinases à spectre étroit), les BLSE et les carbapénémases.

IV.2.1. Les β -lactamases à spectre étroit

Les β -lactamases à spectre étroit sont les premières β -lactamases mises en évidence en 1940 chez *Escherichia coli* avec pour substrat, les pénicillines (94). L'utilisation massive des pénicillines puis des C1G/C2G dans le domaine de la médecine, a engendré une pression de sélection sur les bactéries favorisant l'émergence de bactéries résistantes. L'efficacité thérapeutique de ces β -lactamines s'est donc rapidement atténuée avec l'émergence de ces premières β -lactamases (77), que sont les enzymes TEM, les enzymes SHV et les AmpC.

IV.2.1.1. Les β -lactamases à spectre étroit de type TEM

Les β -lactamases à spectre étroit de type TEM sont classées dans le groupe A de la classification de Ambler. TEM-1 a été mise en évidence pour la première fois en 1965 chez *Escherichia coli* provenant d'un patient d'Athènes, en Grèce (124). La majorité des TEM retrouvées à ce jour sont des BLSE et dérivent de TEM-1 ou TEM-2 par mutations ponctuelles. TEM-1, TEM-2 et TEM-13 sont des β -lactamases à spectre étroit et sont seulement capables d'hydrolyser les pénicillines (125). Également, certaines TEM ont une affinité réduite pour les inhibiteurs de β -lactamases et sont appelées TEM résistantes aux inhibiteurs. Ces dernières ont une activité négligeable contre les céphalosporines à spectre étendu (C3G, C4G et C5G) et ne sont pas considérées comme des BLSE (126).

IV.2.1.2. Les β -lactamases à spectre étroit de type SHV

Les β -lactamases à spectre étroit de type SHV sont classées dans le groupe A de la classification de Ambler. La SHV-1 a été décrite chez *Klebsiella pneumoniae* avec une activité

hydrolytique contre les pénicillines (127). La majorité des SHV retrouvées à ce jour sont des BLSE et dérivent de SHV-1 (pénicillinase) ou SHV-2 (BLSE) (125).

IV.2.1.3. Les β -lactamases à spectre étroit de type AmpC

Les AmpC sont retrouvées dans le groupe C de la classification de Ambler. Elles sont généralement codées sur le chromosome de nombreuses bactéries à Gram négatif, dont *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. et *Enterobacter* spp., et où l'expression de ces AmpC est généralement inductible et confère une résistance à la plupart des pénicillines, aux inhibiteurs de β -lactamases et certaines céphalosporines (C1G, C2G) (128). Chez *Escherichia coli*, qui exprime faiblement les AmpC d'origine chromosomique, sa production peut augmenter en dupliquant le gène *AmpC* ou par mutation du promoteur (129).

Les AmpC peuvent être également portées par des plasmides chez des espèces bactériennes dépourvues des gènes chromosomiques AmpC comme chez *Klebsiella* spp. (125). Parmi les AmpC plasmidiques, les deux AmpC plasmidiques avec une forte prévalence sont DHA et CMY. DHA-1 a été découverte au début des années 1990 chez *Salmonella enteritidis* et CMY-1 a été retrouvée dans la fin des années 1980 chez *Klebsiella pneumoniae* (130). Par exemple, dans les milieux cliniques portugais et parmi les AmpC plasmidiques, DHA-1 a une prévalence de 94 % (131). D'autres AmpC à très faibles prévalences sont retrouvées telles que les enzymes ACC, ACT, FOX, MOX... (130). Souvent, les producteurs d'AmpC sont porteurs d'autres résistances telles que les BLSE et/ou carbapénémases (128).

IV.2.2. Les β -lactamases à spectre étendu

Avec l'utilisation massive des C3G dans les années 1980, les BLSE se sont développées rapidement. Puis, au cours de ces dernières années, de nombreux groupes de BLSE sont apparus et sont de plus en plus répandus dans le monde : les enzymes TEM, les enzymes SHV, les enzymes CTX-M, les enzymes GES, les enzymes PER, les enzymes OXA, et les BLSE mineures telles que les enzymes VEB, SFO, BES... Ces BLSE possèdent une activité hydrolytique sur les pénicillines, les céphalosporines (C1G à C5G) et l'aztréonam. Elles sont

retrouvées chez plusieurs espèces bactériennes comme les entérobactéries, *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp. (132).

IV.2.2.1. Les BLSE de type SHV

Les BLSE de type SHV sont classées dans le groupe A de la classification de Ambler. La majorité des dérivés de SHV-1 ont un phénotype de BLSE. SHV-2 est la première des BLSE à être découverte chez *Klebsiella pneumoniae* en 1983 (133). De nos jours, SHV-5 et SHV-12 sont les plus fréquentes en Europe. Elles sont répandues chez plusieurs entérobactéries mais également chez *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp. (132). Plus de 240 variants de SHV existent et sont répertoriés dans une base de données (<http://bldb.eu/>) (110).

IV.2.2.2. Les BLSE de type TEM

Les BLSE de type TEM sont classées dans le groupe A de la classification de Ambler. De nombreux dérivés de TEM-1 et TEM-2 ont un phénotype de BLSE. En Europe, les plus représentées sont : TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *Klebsiella pneumoniae* et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Elles sont principalement répandues chez les entérobactéries mais aussi chez *Pseudomonas aeruginosa* (132). A ce jour, plus de 250 variants de TEM existent et sont répertoriés dans une base de données (<http://bldb.eu/>) (110). Il existe au sein des TEM, deux sous-groupes de variants issus de mutations de TEM-1 et TEM-2 : TEM résistants aux inhibiteurs décrits précédemment dans les β -lactamases à spectre étroit et les mutants complexes TEM. Les mutants complexes TEM ont une activité hydrolytique caractéristique d'une BLSE pour les céphalosporines (C1G à C5G) par rapport aux TEM résistants aux inhibiteurs, et résistent mieux aux inhibiteurs de β -lactamases (134).

IV.2.2.3. Les BLSE de type CTX-M

Les BLSE de type CTX-M sont issues du groupe A de la classification de Ambler. La première enzyme CTX-M a été découverte en 1989 dans un isolat d'*Escherichia coli*. Sa

dénomination CTX-M fait référence à son activité hydrolytique forte contre le céfotaxime retrouvée chez un patient à Munich. Les CTX-M ont la capacité d'hydrolyser les pénicillines et la plupart des céphalosporines (C1G à C5G). Par exemple, la céftazidime est l'une des C3G qui garde une activité antimicrobienne même en présence de CTX-M (135). Il est à noter que CTX-M-93 possède une forte activité enzymatique sur la céftazidime et une activité réduite sur le céfotaxime et les pénicillines (136). A ce jour, plus de 250 variants CTX-M ont été répertoriés dans une base de données (<http://bldb.eu/>) (110) et classés selon leur homologie de séquence en cinq groupes phylogénétiques : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25 (137). Récemment, un nouveau groupe phylogénétique a été proposé : CTX-M-151 (138). En Europe, la répartition des CTX-M est variable et montrée dans la Figure 29. Les CTX-M sont exprimées principalement chez les entérobactéries, *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp. (139). La dissémination de ces enzymes dans le monde n'a fait que croître et, pour certaines, est considérée comme la « pandémie CTX-M » (140,141).

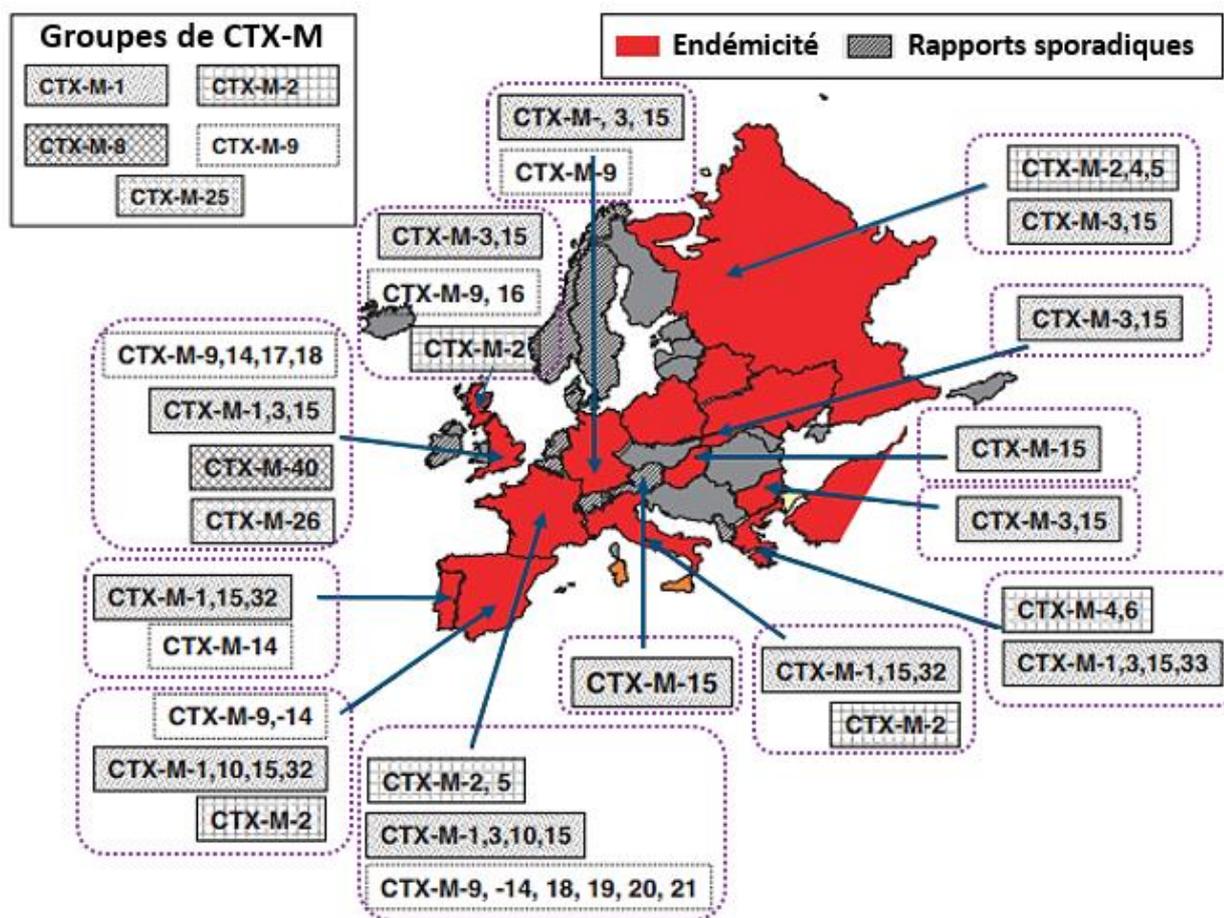


Figure 29 : La répartition des variants CTX-M en Europe.

Adapté de Cantón R. et al. (139).

Il est à noter que des co-résistances apparaissent de plus en plus où les variants CTX-M peuvent être associés avec une ou plusieurs carbapénémase(s) rendant difficile le traitement du patient.

IV.2.2.4. Les BLSE de type GES

Les BLSE de type GES appartiennent au groupe A de la classification de Ambler. GES-1 a été décrite pour la première fois en 1998 chez *Klebsiella pneumoniae* en France (142). Il existe à ce jour plus de 50 variants avec des activités hydrolytiques différentes, soit BLSE, soit carbapénémase, répertoriés dans une base de données (<http://bldb.eu/>) (110). Les variants GES ayant une activité BLSE se sont répandus à travers le monde principalement chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, avec GES-2 en Afrique du sud, GES-5 à GES-8 en Grèce, GES-3/GES-4 au Japon, GES-5 en Corée du Sud, Chine et Brésil et GES-9 en France (143–145).

IV.2.2.5. Les BLSE de type PER

Les BLSE de type PER sont constitutives du groupe A de la classification de Ambler. PER-1 a été identifiée en 1993 chez *Pseudomonas aeruginosa* en Turquie (146). Plus de 15 variants PER ont été répertoriés avec une activité enzymatique de type BLSE, dans une base de données (<http://bldb.eu/>) (110). PER-1 est principalement retrouvée en Turquie et en Corée du sud, et PER-2 n'est présente qu'en Amérique du Sud. Ces variants sont généralement trouvés chez *Pseudomonas aeruginosa* et chez des entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Salmonella typhimurium*) (147).

IV.2.2.6. Les BLSE de type OXA

Les BLSE de type OXA sont retrouvées dans le groupe D de la classification de Ambler. Elles ont été découvertes en 1991 dans des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* en Turquie, résistants à la céftazidime (148). Initialement, la plupart des β -lactamases de type OXA hydrolyse uniquement les carbapénèmes mais pas les céphalosporines à spectre étendu

(C3G). Néanmoins, du fait des évolutions par mutations ponctuelles, le spectre d'activité s'est élargi vers les céphalosporines. La première OXA capable d'hydrolyser les céphalosporines à spectre étendu a été l'OXA-11 (148). A ce jour, plus de 1100 enzymes OXA sont répertoriées dans une base de données (<http://bldb.eu/>), avec une faible quantité de BLSE de type OXA (10-15 %) (110). Elles sont trouvées principalement chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et chez quelques entérobactéries (149). Il existe peu de données épidémiologiques sur la propagation géographique des BLSE de type OXA (132).

IV.2.2.7. Les BLSE minoritaires

Il existe d'autres BLSE considérées comme minoritaires car elles sont, soit très peu répandues, soit identifiées une seule fois. Elles sont classées dans le groupe A de la classification de Ambler. Parmi celles-ci, il est possible de citer, les enzymes VEB observées en 1996 chez *Escherichia coli* et dérivées sous 4 variants à ce jour (150), les enzymes SFO détectées une seule fois chez *Enterobacter cloacae* en 1988 au Japon (151), les enzymes BES identifiées une fois chez *Serratia marcescens* en 1996 (152), les enzymes BEL trouvées chez *Pseudomonas aeruginosa* en 2004 (153) et les enzymes TLA décrites une fois chez *Escherichia coli* en 1993 au Mexique (154).

IV.2.3. Les carbapénèmes

Les carbapénèmes sont considérés comme les médicaments de choix pour le traitement des infections graves causées par les BLSE. Historiquement, la première carbapénémase, l'enzyme NmcA, a été décrite chez une entérobactérie en 1993 (155). Puis, une large variété de carbapénémases a été identifiée et leur nombre ainsi que leur prévalence n'ont cessé de croître au cours de ces vingt dernières années. Il s'agit d'une famille vaste et diversifiée d'enzymes, regroupées dans les classes A, B et D de la classification de Ambler qui hydrolysent les carbapénèmes mais également les autres β -lactamines telles que les pénicillines, monobactames et céphalosporines. Cinq principaux groupes de carbapénémases se distinguent du fait de leur prévalence à travers le monde (Figure 30) : les enzymes KPC, les enzymes NDM, les enzymes IMP, les enzymes VIM, et les

enzymes OXA-48. D'autres carbapénémases mineures sont apparues également. De plus, ces enzymes sont souvent associées à d'autres mécanismes de résistance (156).

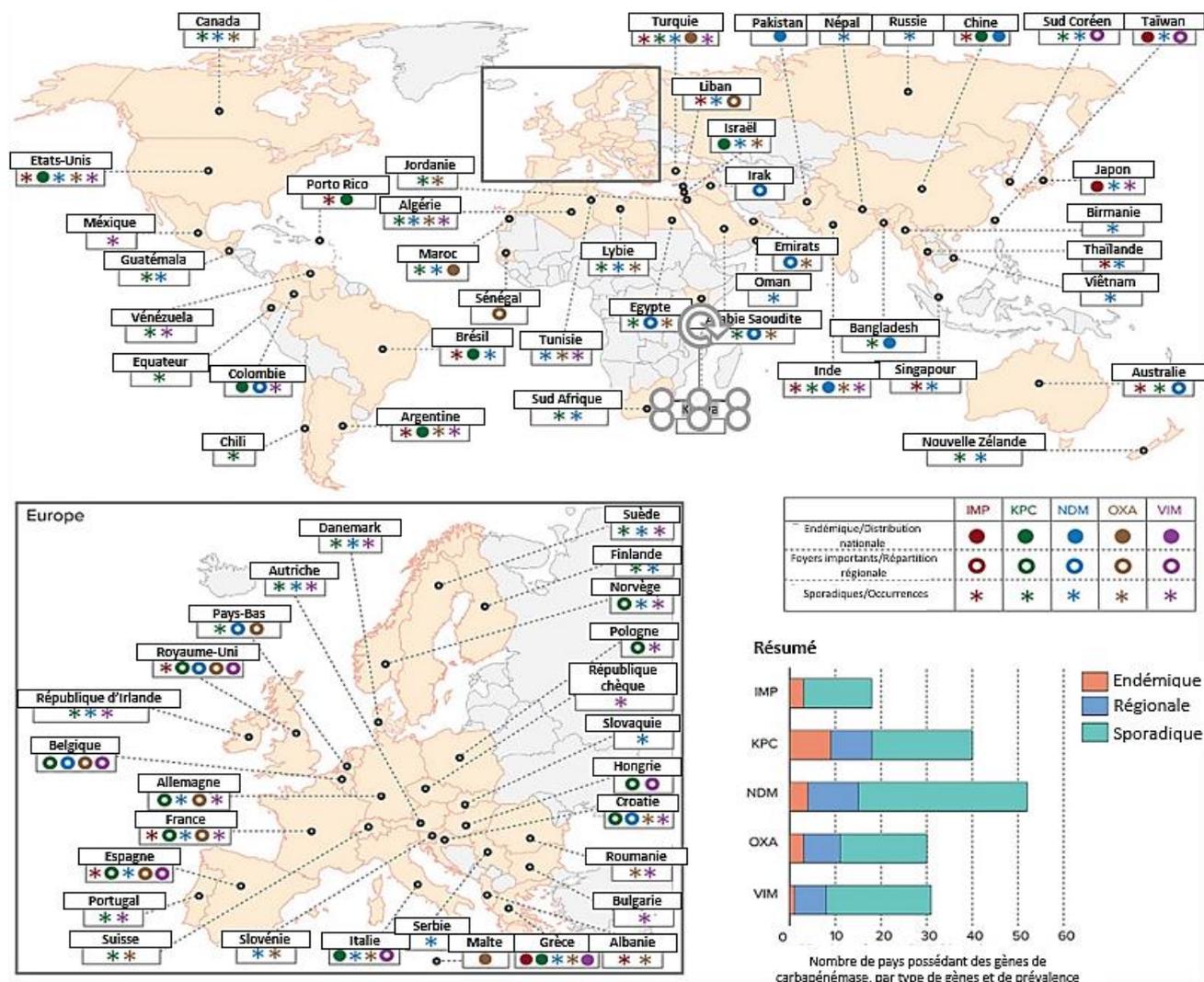


Figure 30 : La répartition géographique des cinq principales carbapénémases dans le monde.

Adapté de Hansen G. T. et al. (156).

IV.2.3.1. Les carbapénémases de type KPC

Les carbapénémases de type KPC sont dans le groupe A de la classification de Ambler. La première KPC a été découverte en 1996 chez *Klebsiella pneumoniae* dans l'est des États-Unis (157). En quelques années, les producteurs de KPC se sont répandus dans le monde entier et ont été décrits aux États-Unis, à Porto Rico, en Colombie, en Grèce, en Israël et en Chine. Ces enzymes sont principalement retrouvées dans des isolats de *Klebsiella pneumoniae*, de *Escherichia coli* et de quelques autres espèces d'entérobactéries (158). De

nos jours, plus de 120 variants ont été identifiés dans une base de données (<http://bldb.eu/>) (110). Le niveau de résistance est variable selon le carbapénème, et les options thérapeutiques pour les traiter sont de plus en plus faibles à cause du manque de nouveaux agents anti-microbiens (159).

IV.2.3.2. Les carbapénémases de type NDM

Les carbapénémases de type NDM sont dans le groupe B de la classification de Ambler. NDM-1 a été identifiée en 2008 chez une entérobactérie en Suède. Elle a été isolée à partir d'une bactérie provenant d'un patient indien hospitalisé précédemment à New Delhi (160). Depuis, plus de 40 variants de NDM ont été recensés dans une base de données (<http://bldb.eu/>) (110). Ces enzymes sont présentes dans des isolats de *Klebsiella pneumoniae*, d'*Escherichia coli* et de quelques autres espèces d'entérobactéries, dans la plupart des continents exceptés au Canada, en Amérique central et en Amérique du sud (161). Tout comme les enzymes KPC, elles confèrent un niveau de résistance variable aux β -lactamines. Toutefois, la plupart des producteurs de NDM reste sensible à la tigécycline ainsi que la colistine, et dans une moindre mesure à la fosfomycine (162).

IV.2.3.3. Les carbapénémases de type IMP

Les carbapénémases de type IMP sont classées dans le groupe B de la classification de Ambler. IMP-1 a été découverte en 1991 chez *Serratia marcescens* au Japon (163). A ce jour, plus de 90 variants de IMP ont été recensés dans une base de données (<http://bldb.eu/>) (110). Depuis, ces producteurs ont été décrits dans le monde entier. Ces enzymes sont principalement retrouvées dans des isolats de *Klebsiella pneumoniae*, de *Pseudomonas aeruginosa*, d'*Escherichia coli* et de quelques autres espèces d'entérobactéries (164). Elles sont souvent impliquées dans des maladies nosocomiales et sont difficiles à traiter car elles sont capables d'hydrolyser la totalité des β -lactamines. Cependant, elles restent sensibles à l'aztréonam (165).

IV.2.3.4. Les carbapénémases de type VIM

Les carbapénémases de type VIM font parties du groupe B de la classification de Ambler. VIM-1 a été découverte en 1997 chez *Pseudomonas aeruginosa* en Italie, chez un patient italien à l'hôpital universitaire de Verona (166). Depuis, les carbapénémases de type VIM sont présentes dans le monde entier, et en particulier dans le sud de l'Europe et de l'Asie. Ces enzymes sont principalement retrouvées chez *Pseudomonas aeruginosa* et dans une moindre mesure dans des isolats d'entérobactéries (167), avec plus de 80 variants recensés dans une base de données (<http://bldb.eu/>) (110). Les enzymes VIM hydrolysent les β -lactamines mais restent sensibles, comme IMP, à l'aztréonam (165).

IV.2.3.5. Les carbapénémases de type OXA-48

Les carbapénémases de type OXA-48 sont retrouvées dans la classe D de la classification de Ambler. La première OXA avec une activité enzymatique a été décrite en 1993 chez *Acinetobacter baumannii* au Royaume-Uni (168). A ce jour, plus de 1100 enzymes OXA sont répertoriées dans une base de données (<http://bldb.eu/>), avec une grande quantité de carbapénémases de type OXA (environ 85-90 %) (110). Désormais, les carbapénémases de type OXA peuvent être retrouvées chez une grande partie des entérobactéries (avec les OXA-48 principalement), les *Pseudomonas spp.* ainsi que les *Acinetobacter spp.* (avec les OXA-23, OXA-24/40 et OXA-58), et leur dissémination s'est faite dans le monde entier (149,169). Certaines OXA sont sensibles aux céphalosporines à spectre étendu (C3G à C5G), mais les options thérapeutiques restent faibles (170).

IV.2.3.6. Les carbapénémases minoritaires

Il existe d'autres carbapénémases moins répandues dans le monde. Elles sont réparties dans les classes A, B, C et D de la classification de Ambler telles que : **1-** Classe A : les Nmca (171), les enzymes SME (172), les enzymes IMI (173), les enzymes SFC (174), et les enzymes GES (une partie des GES est considérée comme des BLSE et l'autre comme des carbapénémases) (175), SHV-38 (176); **2-** Classe B : les enzymes TMB (177), les enzymes FRI

(178), les enzymes GIM (179), les enzymes AIM (180) ; **3-** Classe C : CMY-10 (181) et ACT-28 (182) ; **4-** Classe D : OXA-372 (183). Ces carbapénémases ont des activités hydrolytiques variables sur les carbapénèmes et ont, généralement, des activités relativement faibles sur les céphalosporines à spectre étendu (C3G à C5G).

Chapitre V : La détection des bactéries multi-résistantes aux β -lactamases

Pour la détection des β -lactamases et l'identification des souches bactériennes, différentes méthodes génotypiques et phénotypiques ont été développées au cours de ces dernières années. Chacune de ces méthodes englobe une multitude de tests qui répondent à des besoins et à des objectifs différents.

Il n'existe pas de test qui à lui seul soit idéal dans toutes les situations, ce qui explique la dynamique de développement des tests de diagnostic. Les méthodes génotypiques et phénotypiques doivent être utilisées en synergie. Lors du choix d'une stratégie de détection, plusieurs facteurs sont à prendre en compte tels que le coût, le délai d'obtention des résultats, les performances du test et les informations données par le test. L'identification des résistances doit être la plus rapide et précise possible afin d'adapter le traitement des patients infectés et de limiter leurs disséminations. Ces tests sont donc importants pour les professionnels de santé et pour les acteurs de la prévention des infections au niveau local, régional et national. Un tableau récapitulatif présent en Annexe 1 et regroupant les caractéristiques des différentes techniques a été établi. Il donne une estimation du coût, du délai d'obtention du résultat, des performances, de la nature de la β -lactamase détectée (β -lactamase à spectre étroit, BLSE et/ou carbapénémase), de la simplicité de réalisation ainsi que des principales limites de chaque test. La description de ces tests est réalisée dans la suite de ce chapitre.

V.1. Les notions de performances d'un test de diagnostic

Pour établir un diagnostic et administrer le meilleur traitement, le professionnel de santé souhaite avoir en sa possession des outils simples, fiables, performants et peu coûteux. Ces tests de diagnostic doivent avoir la capacité d'identifier au sein d'une population les individus probablement atteints d'une infection ou d'une maladie, de ceux probablement indemnes (stratification des patients). Cette capacité dépend à la fois des performances

propres du test, dites performances intrinsèques (sensibilité, spécificité) et des caractéristiques de la population testée, dites performances extrinsèques (valeurs prédictives) (184).

V.1.1. Les performances intrinsèques

Dans la démarche de développement d'un test de diagnostic, il est nécessaire de déterminer les performances intrinsèques d'un test. Les deux indicateurs sont la sensibilité et la spécificité, exprimées en pourcentage. Ces dernières se mesurent par rapport à une référence, dite « gold standard », permettant de catégoriser les échantillons de patients en « positif » ou « négatif ».

La sensibilité et la spécificité sont définies et calculées en conditions expérimentales et sont indépendantes du type d'échantillon testée. Les résultats des tests peuvent être résumés dans un tableau de contingence (Tableau 3) (184).

Résultat du test	Échantillon positif	Échantillon négatif	
Test positif	Vrai positif (VP)	Faux positif (FP)	VP + FP
Test négatif	Faux négatif (FN)	Vrai négatif (VN)	FN + VN
	VP + FN	FP + VN	

Tableau 3 : Le tableau de contingence pour définir la sensibilité et la spécificité d'un test.

Adapté de Nendaz M. R. et al. (184). Descriptif : La sensibilité est définie comme $(VP/(VP+FN))$ et la spécificité comme $(VN/(FP+VN))$; (VN : vrai négatif ; VP : vrai positif ; FN : faux négatif ; FP : faux positif).

La sensibilité correspond aux échantillons déclarés positifs avec le test de diagnostic (définis comme vrai positif (VP)) parmi l'ensemble des échantillons positifs composés des échantillons VP et des échantillons faux négatifs (FN). En terme statistique, il s'agit de la probabilité qu'un test réalisé sur un échantillon se révèle positif sachant que l'échantillon est positif (184), comme démontré dans l'équation ci-dessous :

$$\text{Sensibilité} = \text{probabilité}(\text{test positif} | \text{échantillon positif}) = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

La spécificité correspond aux échantillons déclarés négatifs avec le test de diagnostic (définis comme vrai négatif (VN)), parmi l'ensemble des échantillons négatifs composés des échantillons VN et des échantillons faux positifs (FP). En terme statistique, il s'agit de la probabilité qu'un test réalisé sur un échantillon se révèle négatif sachant que l'échantillon est négatif (184), comme démontré dans l'équation ci-dessous :

$$\text{Spécificité} = \text{probabilité}(\text{test négatif} | \text{échantillon négatif}) = \frac{VN}{(FP + VN)}$$

Dans l'évaluation de ces performances, l'objectif est d'atteindre 100% de sensibilité et de spécificité. Toutefois, il est important de noter que l'augmentation de la sensibilité d'un test se fait toujours au détriment de sa spécificité et inversement. Il est donc rare d'obtenir à la fois une sensibilité et une spécificité très élevées ce qui conduit à sélectionner un test dont les caractéristiques sont adaptées à la situation clinique (184).

V.1.2. Les performances extrinsèques

En parallèle de l'étude des performances intrinsèques, les performances extrinsèques ont également une importance pour juger de la pertinence d'un test. En outre, elles sont définies par deux composantes : la valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN). La VPP d'un test est la probabilité que la personne soit réellement malade si son test est positif. La formule de Bayes permet de calculer la VPP d'un test en fonction de sa sensibilité, de sa spécificité et de la prévalence de la maladie. De cette formule, plus la spécificité est élevée, plus la VPP est élevée (184) :

$$VPP = \frac{(\text{Sensibilité} * \text{Prévalence})}{(\text{Sensibilité} * \text{Prévalence}) + (1 - \text{Prévalence}) * (1 - \text{Spécificité})}$$

La VPN d'un test est la probabilité que la personne n'ait pas la maladie si son test est négatif. La formule de Bayes permet de calculer la VPN d'un test en fonction de sa sensibilité, de sa spécificité et de la prévalence de la maladie. De cette formule, plus la sensibilité est élevée, plus la VPN est élevée (184).

$$VPN = \frac{(Spécificité * (1 - Prévalence))}{(Spécificité * (1 - Prévalence) + Prévalence * (1 - Sensibilité))}$$

Ces dernières sont relatives à l'utilisation du test pour une population donnée et diffèrent selon les caractéristiques de la population testée. Elles sont définies et calculées en situation de pratique quotidienne de diagnostic permettant de juger de la pertinence du test dans une population précise. Toutefois, les performances extrinsèques d'un test dépendent des performances intrinsèques (sensibilité et spécificité) et de la prévalence de la maladie dans une population donnée. Selon la gravité de la maladie, plus les formes graves augmentent et plus la sensibilité est élevée et la spécificité est faible. La variation des caractéristiques de la population testée, est l'un des biais pour les performances extrinsèques du test. Également, la prévalence est impliquée dans la variabilité de ces performances. La prévalence est définie comme le nombre de cas de personnes malades à un temps donné dans une population. Elle est calculée de la manière suivante (184) :

$$Prévalence = \frac{VP + FN}{(VP + FN + FP + VN)}$$

En outre, en faisant abstraction des performances intrinsèques du test (sensibilité et spécificité), si la prévalence de la maladie est faible, un test positif a de forte chance d'être un FP car la probabilité que la personne soit malade est faible (184).

V.2. Les méthodes génotypiques

Les méthodes génotypiques permettent de détecter des gènes de résistance (comme par exemple *bla_{OXA}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{CMY}*, *bla_{ACC}*...) ainsi

que de supposer/prévoir l'expression de ces β -lactamases, à partir de colonies isolées sur boîte ou directement à partir d'échantillons cliniques (hémoculture, urine ou milieu de transport d'écouvillon rectal) (185). Ces méthodes sont basées soit sur l'amplification génique telle que les techniques de réaction en chaîne par polymérase (PCR : Polymerase Chain Reaction), soit sur le séquençage du génome, avec le nouveau séquençage du génome (NGS : Next-Generation Sequencing) (186).

V.2.1. L'amplification génique

A l'aide d'amorces spécifiques, la technique d'amplification génique par PCR permet de détecter et confirmer la présence des gènes codant pour les β -lactamases, et en particulier, d'identifier précisément dans un isolat le type de β -lactamase impliqué. Deux principales PCR existent :

- La PCR en point final : les produits d'amplification sont révélés à la fin de la PCR sur un gel d'agarose avec des molécules fluorescentes (bromure d'éthidium/SYBR Green).
- La PCR en temps réel : les produits d'amplification sont détectés en continu pendant la PCR soit grâce à des sondes nucléiques spécifiques marquées avec des molécules fluorescentes, soit avec des colorants d'ADN fluorescents non spécifiques.

La PCR en temps réel est généralement utilisée et est un outil puissant dans le domaine du diagnostic microbien. Elle permet à la fois de détecter et de quantifier (187).

Il existe plusieurs kits commerciaux utilisables sur des colonies isolées, ou directement sur des échantillons cliniques. Ces derniers peuvent proposer des détections simplex ou multiplex afin d'identifier un ou plusieurs gènes de β -lactamases simultanément (188). Deux des principaux kits d'amplification génique utilisés pour la détection et l'identification des β -lactamases sont :

- Le kit « Xpert® Carba-R » qui a la capacité de détecter les gènes de carbapénémases via une PCR multiplex en temps réel.
- Le kit « Check-MDR CT-103 » qui a la capacité de détecter les gènes de BLSE et de carbapénémases via l'utilisation d'une PCR multiplex et d'une biopuce à ADN.

D'autres kits sont également commercialisés pour la détection et/ou la confirmation des gènes de β -lactamases. Ils se différencient par leurs principes théoriques et/ou des panels de gènes cibles différents.

V.2.1.1. Le kit « Xpert® Carba-R »

La société Cepheid a développé le système automatisé GeneXpert de PCR en temps réel. Ce système requiert l'utilisation de cartouches Xpert® Carba-R à usage unique et jetables, contenant les réactifs de PCR (sondes nucléiques, fluorochromes...). Ces réactifs permettent la détection des gènes de carbapénémases tels que *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}*, et depuis peu ses dérivés *bla_{OXA-181}* et *bla_{OXA-232}* qui sont fréquents en France (189). Ce système intègre la préparation des échantillons, l'extraction et l'amplification des ADNs cibles, et la détection de(s) séquence(s) cible(s) dans des échantillons simples (colonies bactériennes) ou complexes (échantillons biologiques) à l'aide de la PCR en temps réel. Il est utilisé en confirmation de diagnostic lors d'une suspicion de production de carbapénémases à partir de l'antibiogramme directement à partir d'un écouvillon rectal, d'une hémoculture, ou de colonies isolées (189–191).

Les avantages de cette technologie sont nombreux : un résultat relativement rapide (48 minutes) ; une mise en œuvre facile ; une interprétation objective ; une sensibilité et une spécificité proches de 100 % ; une identification du type de β -lactamase impliqué (β -lactamases à spectre étroit, BLSE et carbapénémases). Des inconvénients sont également présents : un coût élevé (35 €) ; un personnel qualifié pour l'utilisation de l'automate ; une absence de détection des nouveaux variants qui nécessite une mise à jour régulière du kit (auparavant, non détection de *bla_{OXA-181}* et *bla_{OXA-232}*) (189).

La société Cepheid commercialise d'autres kits pour la détection et l'identification de résistances aux antibiotiques tels que Xpert® vanA/vanB pour la résistance à la vancomycine (192) ou Xpert® MRSA/SA pour la résistance de *S. aureus* à la méthicilline (193) dans le milieu hospitalier.

V.2.1.2. Le kit « Check-MDR CT-103 »

La société Check-Point a développé un large panel de différents kits de PCR en temps réel. Le nombre et le type de gènes cibles varient en fonction du kit, incluant des gènes codant pour tous types de β -lactamases. L'un de ces produits, le Check-MDR CT-103, permet d'identifier simultanément une gamme très large de gènes codant pour des β -lactamases telle que les carbapénémases (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{IMP}), les BLSE (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{BEL}) et les β -lactamases à spectre étroit de type AmpC (*bla*_{CMY-I/MOX}, *bla*_{ACC}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACT}, *bla*_{CMY}, *bla*_{FOX}), à l'aide d'une puce à ADN. Ce kit est constitué d'une puce à ADN qui est un support rigide sur lequel sont déposées des sondes nucléiques ciblant les gènes de β -lactamases (une sonde = un gène). L'échantillon est purifié afin de récupérer les ADN cibles et ces derniers sont amplifiés par PCR. Les produits d'amplification sont hybridés avec les sondes nucléiques présentes sur la puce. La quantification des signaux permet de détecter la présence ou l'absence de chacun des gènes représentés sur la puce à ADN (194).

Les avantages de cette technologie sont nombreux : un résultat rapide (rendu en 6 heures, avec 1 à 2 heures de manipulation manuelle pour l'étape d'hybridation) ; une sensibilité et une spécificité de 100%, à l'exception de la détection des enzymes de type OXA-48 où la sensibilité est de 95% et une interprétation objective. Des inconvénients sont également présents : la nécessité de main d'œuvre qualifiée ; une culture bactérienne est nécessaire (délai de 24 heures) ; un coût de 80€ par échantillon pour ce kit et un équipement coûteux, en plus d'une absence de détection des nouveaux variants qui nécessite une mise à jour régulière du kit (194). Le test Check-MDR CT-103 permet ainsi la détection de résistances aux β -lactamines sur un très large panel de β -lactamases.

V.2.2. Le séquençage

Le séquençage haut-débit de l'ADN, appelé également NGS, est devenu une méthode génotypique permettant l'identification de la souche bactérienne et de l'ensemble des gènes de résistance présent, en quelques heures (195). Le principe de l'une des techniques de

séquençage utilisée est détaillé ci-après avec un processus qui se découpe en trois étapes : la préparation de la librairie, l'amplification de la librairie et le séquençage des librairies.

La préparation de la librairie a pour but de préparer l'ADN pour son amplification. Ce dernier est d'abord fragmenté, soit par voie enzymatique, soit par sonication. Des adaptateurs (courts morceaux d'ADN synthétiques à double brin) sont ensuite liés à ces fragments à l'aide de l'ADN ligase, une enzyme capable de relier deux brins d'ADN. Les adaptateurs permettent, ensuite, à la séquence de s'hybrider à un homologue complémentaire fixé soit sur des billes, soit sur un support solide appelé « flow cell ». L'amplification de la librairie est nécessaire pour que le signal reçu par le séquenceur soit suffisamment fort pour être détecté avec précision. Chaque brin d'ADN est amplifié de telle sorte à former des grappes d'ADN appelées « clusters ». Cette amplification permet une couverture (le séquençage de la totalité du génôme) et une profondeur (le séquençage de chaque base plusieurs fois) de séquençage adéquates. Le séquençage de la librairie peut s'effectuer de plusieurs manières. L'incorporation des nucléotides est suivie directement par détection de luminescence ou par des changements de charge électrique. Ainsi, le NGS génère plusieurs millions de lectures courtes de nucléotides en parallèle en un temps beaucoup plus court permettant de couvrir l'ensemble du génôme (196).

Les avantages de cette technologie sont nombreux : une identification des gènes de résistance avec une sensibilité et une spécificité de 100% ; un support au développement de nouveaux tests diagnostiques ; des nouvelles β -lactamases ou des nouvelles mutations de l'ADN à l'origine des résistances peuvent être identifiées. Elle présente également des inconvénients : le coût relativement important du séquençage d'un génome entier ; la nécessité d'une main d'œuvre qualifiée du fait des nombreuses étapes ; le délai de rendu des résultats allant jusqu'à plusieurs jours ; une utilisation uniquement dans un laboratoire spécialisé ou de recherche. Ainsi, l'utilisation de cette technologie est particulièrement recommandée pour la surveillance des maladies infectieuses (197).

L'utilisation d'une autre technologie de séquençage s'est répandue ces dernières années : la technologie nanopore. Elle est basée sur la détection d'un courant différentiel lors du passage d'une molécule unique linéaire (par exemple un brin d'ADN) à travers un

nanopore biologique ancré dans une membrane synthétique. Cette technique permet d'éviter l'étape d'amplification par PCR ou l'utilisation de molécules marquées (198).

V.2.3. Les limitations

Bien que ces méthodes génotypiques soient considérées comme des outils de références pour l'identification des gènes de β -lactamases, elles présentent trois principales limites (199) :

- La non-détection de gènes de résistance du fait d'une mutation au niveau du site d'hybridation des amorces, engendrant des FN.
- La détection de gènes de résistances silencieux ou qui proviennent d'une bactérie « morte », pouvant fausser le choix de thérapie pour le patient.
- La présence de gènes de résistance dépendant de l'aire géographique et d'un moment donné. Par exemple, la conception du kit développé pour le marché américain n'est pas forcément la plus adéquate pour le marché français.

V.3. Les méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques ont été les premières développées et utilisées pour identifier et caractériser les résistances aux antibiotiques. Elles sont peu chères et simples d'utilisation. Contrairement aux méthodes génotypiques qui cherchent à mettre en évidence les gènes de résistance, les méthodes phénotypiques mettent en évidence la présence des β -lactamases, soit directement par leur détection, soit indirectement en détectant l'activité d'hydrolyse sur les antibiotiques.

Parmi les méthodes phénotypiques, deux groupes de tests se distinguent : les tests de sensibilité aux antibiotiques basés sur l'activité des β -lactamases et les tests immunochromatographiques basés sur la détection des β -lactamases.

V.3.1. Les tests de sensibilité aux antimicrobiens basés sur l'activité β -lactamase

Parmi les méthodes phénotypiques, les tests de sensibilité aux antimicrobiens basés sur l'activité des β -lactamases sont nombreux : les antibiogrammes (l'antibiogramme classique, le test d'inhibition des carbapénèmes (CIM : Carbapenem Inactivation Method), le Etest[®], les tests d'inhibition, les milieux sélectifs, le test de Hodge modifié, les tests colorimétriques, la spectrométrie de masse (SM), la spectrophotométrie ultra-violet, et le test électrochimique. Chacun de ces tests répond à des besoins et à des objectifs différents.

V.3.1.1. Les antibiogrammes

L'antibiogramme est un outil d'aide à la décision thérapeutique en mesurant la résistance bactérienne *in vitro* vis-à-vis de divers antibiotiques. Cela permet de classer les bactéries et de guider le clinicien dans le choix de l'antibiotique à utiliser.

V.3.1.1.1. L'antibiogramme classique

D'après les recommandations du Haut Conseil de la Santé Publique, la détection des E-BLSE au moyen d'un antibiogramme classique peut être considérée comme fiable (200). A partir d'une bactérie diluée à une turbidité de 0,5 McFarland (201), l'antibiogramme consiste à mettre en culture sur une gélose Mueller-Hinton. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface du milieu gélosé. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leur concentration décroît graduellement en s'éloignant du disque. Après une période d'incubation de 16 à 24 heures à 35 °C, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de bactéries, comme illustré en Figure 31 (202).

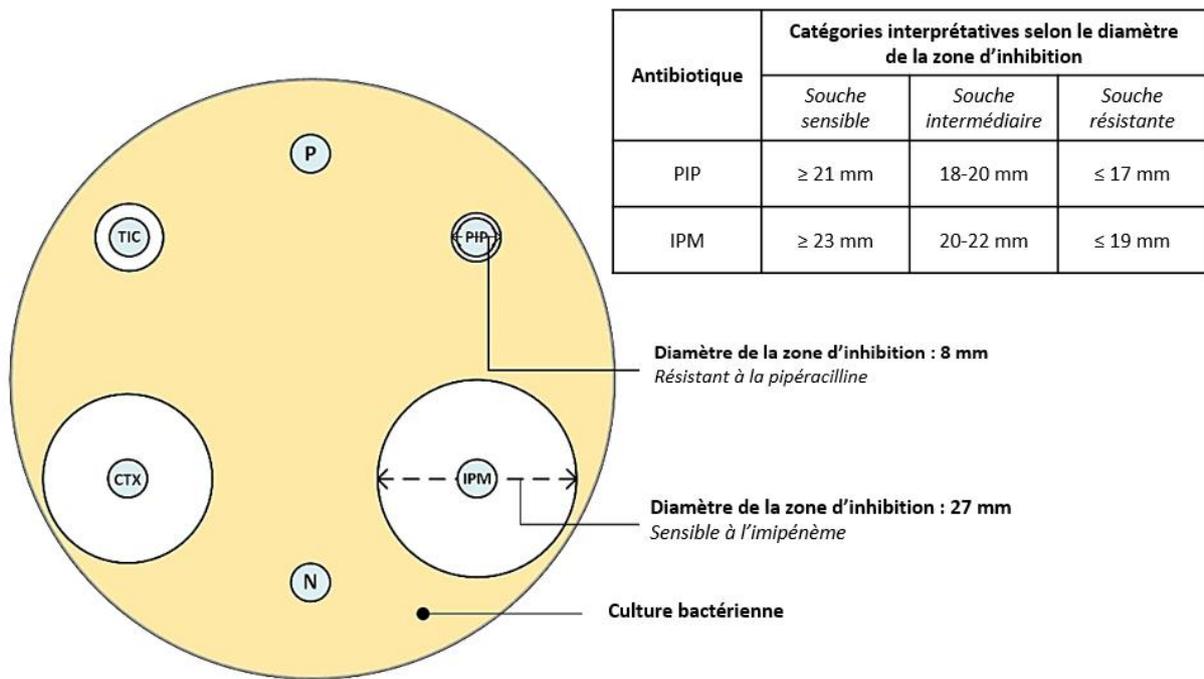


Figure 31 : Les catégories interprétatives selon le diamètre de la zone d'inhibition.

Adapté de Microbiologie clinique.com, Antibiogramme (203). Descriptif : Des disques de papier buvard imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface du milieu gélosé préalablementensemencé avec la souche à tester. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leur concentration décroît graduellement en s'éloignant du disque. Après une incubation sur la nuit à 35 °C en aérobose, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de bactéries ; (TIC : Ticarcilline ; CTX : Céfotaxime ; P : Pénicilline ; PIP : Piperacilline ; IPM : Imipénème).

Lorsque la technique est standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent de la sensibilité de la bactérie. La mesure en millimètre (mm) des diamètres d'inhibition se fait soit à l'œil, soit avec une règle, soit avec un pied à coulisse, soit à l'aide d'un appareil automatisé. L'interprétation des résultats se fait par rapport à des tableaux de références où figurent les concentrations critiques, définies par le comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM) (202).

Les avantages de cette technologie sont nombreux : une possibilité d'orienter le diagnostic vers une BLSE ou une carbapénémase ; une méthode standardisée, simple et peu chère. Elle présente également des inconvénients : un temps de rendu de lecture relativement long (environ 24 heures) car une culture est nécessaire ; une difficulté d'interprétation impactant la CMI si la zone d'inhibition n'est pas nette ; une variabilité des résultats selon la diffusion de l'antibiotique dans la gélose ce qui rend le test plus ou moins précis.

V.3.1.1.2. Le test d'inactivation des carbapénèmes

Le test CIM se base sur l'inactivation d'un antibiotique en présence d'une carbapénémase. Pour ce faire, un disque de 10 µg de méropénème est immergé dans une suspension bactérienne lysée à tester et incubé pendant deux heures à 35 °C. Après incubation, le disque est retiré de la suspension et placé sur une gélose Mueller-Hinton, préalablementensemencée avec une souche de *Escherichia coli* ATCC 25922, dite souche sensible aux β-lactamines. Une incubation à 35 °C est à nouveau réalisée pendant 12 à 18 heures car l'incubation sur toute la nuit est préconisée pour maximiser les performances du test. Puis, une lecture et une interprétation du diamètre des zones d'inhibition sont réalisées. L'absence de zone d'inhibition autour du disque reflète une dégradation de l'antibiotique lors de la première incubation, ce qui indique une activité hydrolytique de type carbapénémase, auquel cas, une zone d'inhibition est visible si l'antibiotique est resté intact (Figure 32) (204).

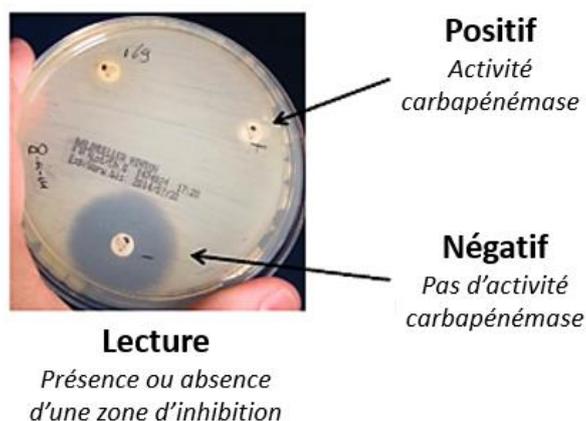


Figure 32 : L'interprétation du test CIM en présence ou en absence de carbapénémases.

Adapté de Zwaluw K. V. D. et al. (204). Descriptif : Un disque de 10 µg de méropénème est immergé dans une suspension bactérienne lysée à tester et incubé pendant deux heures à 35 °C. Après incubation, le disque est retiré de la suspension et placé sur une gélose Mueller-Hinton, préalablementensemencée avec une souche de *Escherichia coli* ATCC 25922, dite souche sensible aux β-lactamines. Une incubation à 35 °C sur la nuit est réalisée. L'absence de zone d'inhibition autour du disque reflète une dégradation de l'antibiotique lors de la première incubation, ce qui indique une activité hydrolytique de type carbapénémase, auquel cas, une zone d'inhibition est visible si l'antibiotique est resté intact ; (CIM (Carbapenem Inactivation Method) : Test d'inhibition des carbapénèmes).

Les avantages de ce test sont : un faible coût pour la détection des carbapénémases ; une simplicité d'exécution ; l'absence de besoin de matériel spécifique ou de main d'œuvre spécialisée ; une sensibilité de 96,3 % et une spécificité de 98,9 % pour la détection des

carbapénémases (205). Les inconvénients de ce test sont : un rendu de résultat tardif (2 heures de pré-incubation et incubation sur la nuit avec *Escherichia coli* ATCC 25922) ; une interprétation subjective concernant l'interprétation du diamètre de la zone d'inhibition.

Il existe des variantes du test CIM où le temps d'incubation est réduit et l'antibiotique est modifié (par exemple, une céphalosporine pour la détection de l'activité des BLSE). Le protocole général d'utilisation reste le même et les performances sont relativement similaires (206,207).

V.3.1.1.3. L'Etest®

Le Etest®, développé par bioMérieux, permet de déterminer la CMI d'un antibiotique et de mettre en évidence des mécanismes de résistances enzymatiques via l'utilisation d'inhibiteurs de β -lactamases. Il existe deux types de bandelettes pour ce test :

- Une bandelette pour la CMI ;
- Une bandelette pour les résistances enzymatiques.

Pour la détermination de la CMI, une extrémité de la bandelette a été imprégnée de l'antibiotique à tester. Lorsque celle-ci est déposée sur une géloseensemencée par la souche bactérienne à tester, l'antibiotique se répartit selon un gradient de concentration. Après une incubation pendant 24 heures à 37 °C, une ellipse d'inhibition de culture se dessine autour de la bandelette et la CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la culture bactérienne et de la bandelette (Figure 33) (208).

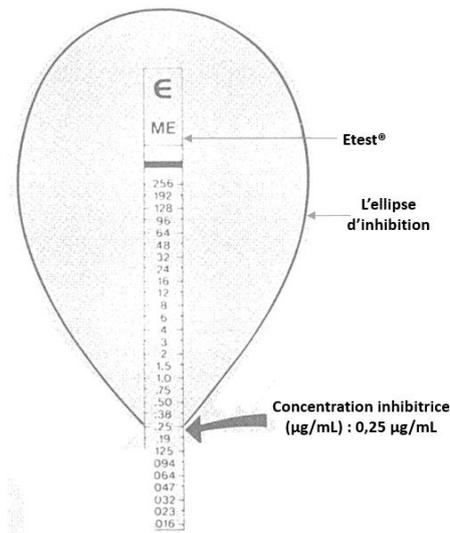


Figure 33 : L'interprétation d'un Etest® pour la détermination de la CMI d'un antibiotique pour une souche donnée.

Adapté de Citron D. M. et al. (208). Descriptif : Sur une géloseensemencée avec la souche à tester, un Etest® est déposé. Après une incubation pendant une nuit à 37 °C, une ellipse d'inhibition est formée. La CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la culture bactérienne et du test ; (CMI : Concentration minimale inhibitrice).

Pour la mise en évidence de résistances enzymatiques, l'une des extrémités de la bandelette est imprégnée de l'antibiotique (céphalosporine ou carbapénème) à tester et l'autre extrémité avec l'antibiotique à tester + inhibiteur de β -lactamases. Après une incubation pendant 24 heures à 37 °C, une différence de CMI entre les deux gradients révèle la présence d'une enzyme responsable de la résistance aux β -lactamines. De plus, selon l'antibiotique testé et l'inhibiteur utilisé, il est possible de mettre en évidence la présence de BLSE ou d'une classe de carbapénémases (209).

Des tests commerciaux pour la mise en évidence de résistances enzymatiques sont présents sur le marché tels que les ETEST ESBL®, ETEST AmpC® et ETEST MBL® de bioMérieux.

Les avantages de cette technique sont : un gain de temps par rapport à la technique de référence pour la détection de la CMI (méthode des microdilutions) ; une identification de la BLSE ou de la classe de carbapénémases impliquée (classe A ou B) ; une sensibilité supérieure à 92 % et une spécificité supérieure à 97 % pour la détection de KPC et des métallob- β -lactamases (209). Des inconvénients sont présents : un délai de rendu de résultat important (24 heures) ; un problème de détection des enzymes de classe D avec des activités hydrolytiques faibles.

V.3.1.1.4. Les tests d'inhibition

Les tests d'inhibition sont basés sur l'utilisation de β -lactamines supplémentées d'inhibiteurs de β -lactamases. Pour rappel, chaque classe de la classification de Ambler possède plusieurs inhibiteurs (75,210,211):

- Classe A : l'acide boronique, le tazobactam, l'avibactam, ou l'acide clavulanique
- Classe B : l'acide dipicolinique ou l'EDTA
- Classe C : la cloxacilline ou l'avibactam
- Classe D : l'acide clavulanique, l'acide borique, l'avibactam ou le tazobactam, ont une efficacité quasi nulle sur les enzymes OXA-48 mais ces enzymes hydrolysent de fortement la témocilline. Ainsi, la témocilline sert d'indicateur de production d'OXA-48.

Les tests d'inhibition permettent ainsi de préciser davantage la classe à laquelle appartient la β -lactamase recherchée. Deux principales techniques existent : le test par disques combinés et le test de double synergie.

V.3.1.1.4.a. Le test par disques combinés

Le test par disques combinés consiste à comparer la zone d'inhibition autour du disque d'une β -lactamine et autour du disque de la même β -lactamine supplémentée d'un inhibiteur. Après une incubation sur la nuit à 37 °C, la lecture des zones d'inhibition s'effectue visuellement. La zone d'inhibition en présence de l'inhibiteur doit être supérieure à celle avec la β -lactamine seule pour que le résultat soit associé à une classe de β -lactamases. Par exemple, pour l'identification de la classe d'une carbapénémase, un carbapénème est utilisé tel que le méropénème, sans ou avec inhibiteurs des différentes classes de Ambler, comme illustré sur la Figure 34 (210) :

- Méropénème seul (Détection de l'activité carbapénémase)
- Méropénème + acide dipicolinique (Identification de la Classe B)
- Méropénème + cloxacilline (Identification de la Classe C)
- Méropénème + acide borique (Identification de la Classe A)

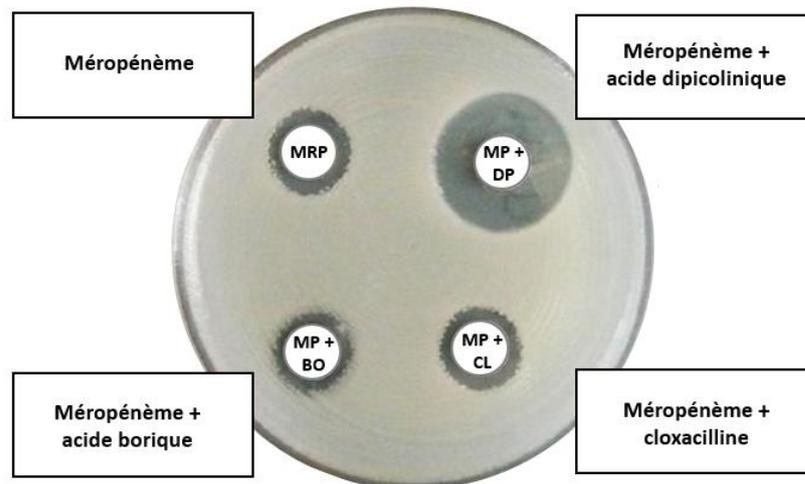


Figure 34 : L'interprétation d'un test par disques combinés pour la détection des carbapénémases.

Adapté de Jeremiah S. S. et al. (212). Descriptif: L'interprétation d'un test par disques combinés pour l'identification de la classe d'une carbapénémase. Sur une gélose ensemencée avec la souche clinique à tester, quatre disques sont déposés : MRP ; MP + DP ; MR + BO ; MP + CL. Après une incubation d'une nuit à 37 °C, la zone d'inhibition en présence de l'inhibiteur doit être supérieure à celle du disque de MRP seul ; (MRP : méropénème ; MP + DP : méropénème + acide dipicolinique ; MR + BO : méropénème + acide borique ; MP + CL : méropénème + cloxacilline).

En test annexe, il est à noter qu'une résistance à des concentrations élevées de témocilline seule, permet l'identification d'une carbapénémase de la classe D (210).

Des produits commerciaux existent tels que le test Neo-Sensitabs KPC/MBL[®] de Rosco Diagnostica et le test Mast Discs[®] de Mast Groups. Ces produits ont pour objectif l'identification des carbapénémases. Pour la détection de l'activité de BLSE, le même principe est repris en changeant l'antibiotique utilisé (céfotaxime ou céftazidime).

V.3.1.1.4.b. Le test de double synergie

Le test de double synergie consiste à déposer sur une gélose ensemencée avec la souche bactérienne à tester, deux disques à une distance de 30 mm contenant pour l'un, une β -lactamine (céphalosporine ou carbapénème) et pour l'autre un inhibiteur des β -lactamases (acide borique, acide clavulanique, EDTA...). Après une incubation d'une nuit à 37 °C, la lecture des zones d'inhibition s'effectue visuellement. La présence d'une BLSE est mise en évidence grâce à un disque de céfotaxime et un disque d'amoxicilline + acide

clavulanique. Le résultat visuel observé en Figure 35 montre une zone d'inhibition élargie pour le disque de céfotaxime, qui s'étend vers le disque contenant l'acide clavulanique. Ce phénomène montre une synergie entre la céphalosporine et l'inhibiteur, avec un profil en forme de « bouchon de champagne » (213). La présence d'une carbapénémase est observée en utilisant un carbapénème et des inhibiteurs spécifiques des carbapénémases.

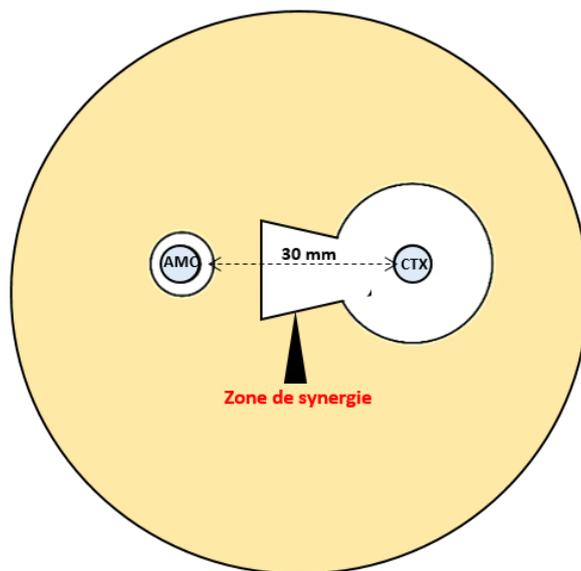


Figure 35 : L'interprétation d'un test de double synergie pour la détection des BLSE.

Adapté de Drieux L. et al. (213). Descriptif : Sur une géloseensemencée avec la souche clinique, deux disques sont déposés à 30 mm l'un de l'autre : céfotaxime et amoxicilline + acide clavulanique. Après l'incubation d'une nuit à 37 °C, la présence d'une BLSE indique une zone d'inhibition élargie pour le disque de céfotaxime, qui s'étend vers le disque contenant l'acide clavulanique. Ce phénomène montre une synergie entre la céphalosporine et l'inhibiteur, avec un profil en forme de « bouchon de champagne » ; (AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; CTX : Céfotaxime).

Les avantages des tests d'inhibition sont : un coût par test très faible ; une identification de la classe de l'enzyme étudiée ; des bonnes performances (sensibilité/spécificité). Les inconvénients de ces tests sont : un temps relativement long pour l'obtention des résultats (16 à 24 heures) ; une variabilité des résultats selon la diffusion de l'antibiotique, de la souche bactérienne testée et de l'inhibiteur dans la gélose.

V.3.1.2. Les milieux chromogéniques sélectifs

Les milieux chromogéniques sélectifs sont destinés au dépistage des phénotypes des E-BLSE ou EPC. Pour ce faire, la gélose estensemencée à partir d'un prélèvement, et est

incubée pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Le résultat est lu à l'œil nu. Ces milieux sont généralement composés de substances chromogènes, d'éléments nutritifs riches ainsi que d'un antibiotique spécifique selon la détection souhaitée. De manière générale, pour la détection de l'activité de BLSE d'une souche, le milieu contient une C3G telle que le céfpodoxime et une substance permettant l'inhibition sélective des bactéries Gram positif/des levures. Pour la détection de l'activité de carbapénémase(s) d'une souche, le milieu est additionné d'un carbapénème (imipénème, méropénème ou ertapénème), d'une substance inhibant les bactéries à Gram positif et les levures. Si présence de métallo- β -lactamases, du sulfate de zinc doit être ajouté (214). D'autre part, ces milieux permettent également d'identifier les souches impliquées grâce à des colorations différentielles induites par la présence d'enzymes caractéristiques du métabolisme de chaque espèce bactérienne (Figure 36). Néanmoins, quelque soit le résultat obtenu, des tests complémentaires doivent être réalisées pour confirmation (215).

Plusieurs fournisseurs proposent des milieux chromogéniques sélectifs tels que bioMérieux (ChromID® ESBL ; ChromID® Carba SMART), Oxoid (Brilliance™ ESBL Agar ; Brilliance™ CRE Agar) ou encore CHROMagar (*CHROMagar™ ESBL* ; *CHROMagar™ KPC* ; *CHROMagar™ mSuperCarba*), avec des performances assez similaires (215).

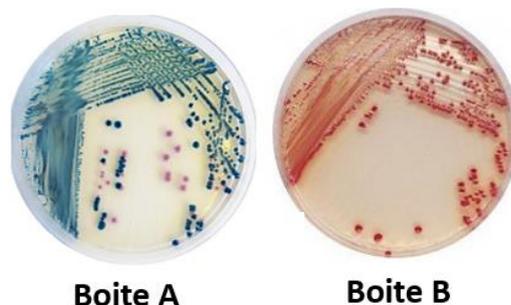


Figure 36 : Les milieux chromogéniques pour identifier les espèces bactériennes.

Adapté de Perry J. D. (215). Descriptif : La boîte A contient du *Yersinia enterocolitica* pathogène (colonies mauves) et la flore de fond telle que *Yersinia enterocolitica* non pathogène, *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp*... La boîte B contient de l'*Acinetobacter baumannii* (colonies rouges).

Les avantages de ces milieux sont : une facilité pour identifier rapidement le type d'enzyme impliqué (BLSE ou carbapénémases) ; un outil peu cher et simple d'utilisation ; une identification de la souche bactérienne impliquée. Des inconvénients sont également présents : une sensibilité et une spécificité variable selon les milieux commercialisés ; une

interprétation subjective induisant des erreurs de lecture ; une détection inconstante des souches hydrolysant faiblement les carbapénèmes (enzymes OXA-48), ce qui impacte la sensibilité du test (215). Ainsi, il est nécessaire de confirmer les résultats obtenus avec ces milieux avec d'autres techniques.

V.3.1.3. Le test de Hodge modifié

Le test de Hodge modifié repose sur une synergie entre la souche à tester dite productrice de carbapénémase(s) et une souche sauvage sensible de référence dite indicatrice. Ce test consiste à ensemencer une gélose Mueller-Hinton avec la souche bactérienne de référence, *Escherichia coli* ATCC 25922, à raison de 0,5 McFarland (201), diluée au $1/10$. Au centre de la gélose, un disque contenant 10 µg de méropénème est déposé. Des colonies de la souche à tester sont prélevées et déposées sous la forme d'une ligne allant du disque vers la périphérie de la boîte. Dans les mêmes conditions, un contrôle positif (souche résistante à l'antibiotique) et un contrôle négatif (souche sensible à l'antibiotique) sont déposés. La gélose est incubée entre 18 et 24 heures à 37 °C. La présence d'une carbapénémase est mise en évidence par une indentation en forme de feuille de trèfle de *Escherichia coli* ATCC 25922 qui se développe le long de la ligne de croissance de l'isolat dans la zone de diffusion du disque, comme illustrée en Figure 37 (216).

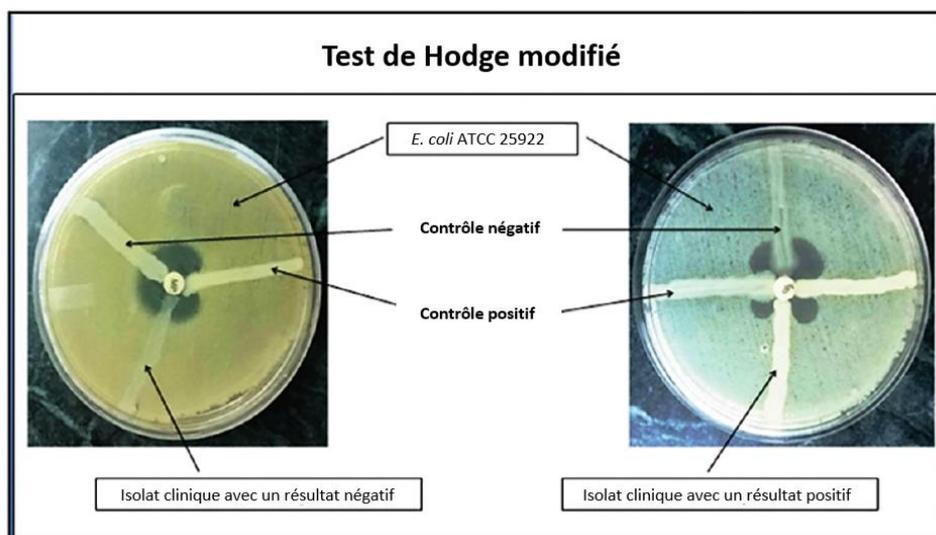


Figure 37 : L'interprétation du test de Hodge modifié pour la détection de carbapénémases.

Adapté de Datta S. et al. (217). Descriptif : Une boîte de pétri est ensemencée avec une souche sensible *Escherichia coli* ATCC 25922. Puis, trois dépôts successifs en trait sont réalisés : **1-** Un contrôle positif (souche résistante) ; **2-** Un contrôle négatif (souche sensible) ; **3-** L'isolat clinique. Enfin, un disque d'antibiotique de méropénème est

déposé au centre de la gélose. Après une incubation d'une nuit à 37 °C, la présence d'une souche résistante dans l'isolat clinique est mise en évidence par une indentation en forme de feuille de trèfle de *Escherichia coli*.

Les avantages de ce test sont : une technique peu coûteuse ; une bonne sensibilité de détection des enzymes de type KPC et de type OXA-48 (218) ; une facilité d'utilisation. Les inconvénients de ce test sont : une interprétation parfois difficile car subjective ; un défaut de sensibilité pour la détection des métallo- β -lactamases (NDM, IMP, VIM...) mais l'ajout de sulfate de zinc permet d'y remédier partiellement (218) ; un manque de spécificité (FN des métallo- β -lactamases) ; un délai de rendu de résultat de 24 heures.

V.3.1.4. Les tests colorimétriques

Les tests d'hydrolyse basés sur des méthodes colorimétriques détectent l'activité des β -lactamases via une variation de couleur du milieu réactif liée à l'activité hydrolytique. Ce changement de coloration est dû à une modification biochimique du milieu telle qu'une acidification. A ce jour, cinq principaux tests existent : le test Carba NP, le test Blue Carba, le test β -Carba, le test ESBL NDP, et le test β -Lacta.

V.3.1.4.1. Le test Carba NP

Le test Carba NP est une technique biochimique de détection de l'activité de carbapénémases. Il met en évidence l'acidification du milieu suite à l'activité hydrolytique de la carbapénémase sur l'imipénème. Cette diminution de pH est visible via l'utilisation d'un indicateur coloré, le rouge de phénol. Cet indicateur de pH (gamme de pH entre 6,8 et 8,2) vire progressivement du rouge au jaune, à mesure que le milieu s'acidifie (Figure 38). Pour cela, à partir de la souche à tester, une lyse est réalisée. La première moitié du lysat est mise au contact du milieu réactionnel seul, alors que la seconde moitié du lysat est déposée dans le même milieu supplémenté d'imipénème. L'ensemble est incubé à 37 °C pendant 1 heure 30 minutes, puis une lecture visuelle est faite pour évaluer le changement de couleur du milieu. Les résultats peuvent être anticipés en fonction de la famille de carbapénémase impliquée mais ne permettent pas de conclure sur la classe impliquée. La couleur passe du rouge au jaune dès 5 à 10 minutes après le début de l'incubation avec les producteurs de KPC. Dans la plupart des cas, une incubation de 30 minutes est suffisante pour obtenir un

changement de couleur franc pour les producteurs de carbapénémases. Au delà de 30 minutes, ce sont les carbapénémases avec des faibles activités enzymatiques qui seront mises en évidence (219).

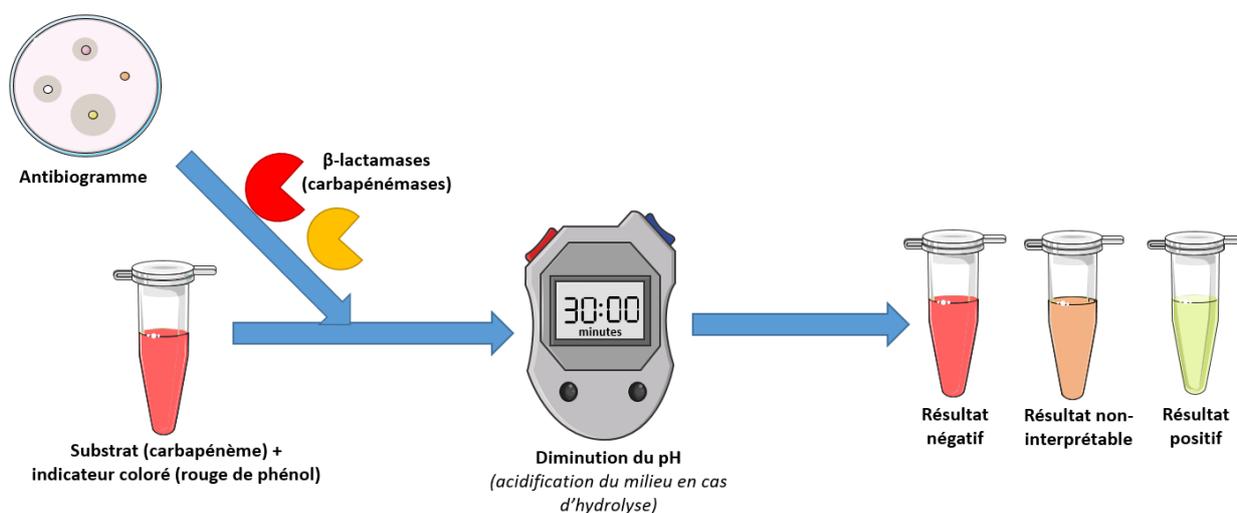


Figure 38 : Le principe du test Carba NP pour la détection des carbapénémases.

Descriptif : A partir d'un antibiogramme, une colonie est prélevée et mise au contact d'un substrat associé à un indicateur coloré. Après 30 minutes d'incubation, un changement de couleur vers le jaune est significatif d'une hydrolyse du substrat (acidification du milieu, c'est-à-dire, changement de pH). Une coloration orange est non-interprétable et est considérée comme un résultat négatif. Pour les β -lactamases à faible activité enzymatique, l'incubation peut aller jusqu'à 1 heure 30 minutes.

Des produits commerciaux du test Carba NP existent tels que le RAPIDEC CARBA NP[®] de bioMérieux et le Rapid Carb Screen[®] de Rosco diagnostics. Des variabilités de sensibilité et spécificité existent selon le kit utilisé (220).

Ce test présente des avantages tels que : une rapidité/une simplicité d'exécution ; un rendu de résultat inférieur à 2 heures ; un faible coût ; une spécificité proche de 100 %. Les inconvénients de ce test sont : une interprétation de la couleur parfois difficile car subjective ; une coloration orange est non-interprétable et est considérée comme un résultat négatif ; des FN pour les souches exprimant une OXA-48-like ou une carbapénémase rare de classe A (221) ; la non-identification de la classe de carbapénémase impliquée ; un manque de standardisation de l'inoculum utilisé ; une variabilité de sensibilité et de spécificité selon le kit utilisé (RAPIDEC CARBA NP[®], Rapid CARB Screen[®], test Carba NP).

V.3.1.4.2. Le test Blue Carba

Le test Blue Carba est une technique biochimique de l'activité des carbapénémases, dérivée du test Carba NP, réalisable directement à partir de souches en culture. La différence réside dans le fait que l'indicateur coloré est le bleu de bromothymol (gamme de pH de 6,0 à 7,6) comprenant ainsi le pH optimal pour la plupart des β -lactamases (pH 6,8). A l'instar du test Carba NP, le principe reste le même, c'est-à-dire que l'hydrolyse du cycle β -lactamine de l'imipénème en présence d'une carbapénémase est mise en évidence par l'acidification du milieu. De ce fait, pour le contrôle négatif, la couleur du puits est verte/bleue. Pour la souche testée, la couleur du puits est jaune/vert en cas de positivité. Les résultats s'obtiennent entre 30 minutes et 2 heures pour la détection des enzymes de type métallo- β -lactamases, de type KPC et de type OXA-48 (222). Un produit commercial du test Blue Carba existe, le Rapid Carb Blue screen® de Rosco diagnostics. Néanmoins, ses performances sont légèrement plus faibles que celles du test Carba NP (223).

Les avantages de ce test sont : une simplicité d'exécution ; un rendu de résultat inférieur à 2 heures ; un faible coût ; la détection de l'activité de la quasi-totalité des carbapénémases ; la simplicité d'utilisation ; une sensibilité et une spécificité proches de 100 %. Les inconvénients de ce test sont : un manque de standardisation de l'inoculum utilisé pouvant engendrer des FN ; la non-identification de la classe de carbapénémase impliquée ; une interprétation de la couleur parfois difficile car subjective ; une coloration orange est non-interprétable et est considérée comme un résultat négatif.

V.3.1.4.3. Le test β -Carba™

Le test β -Carba™, commercialisé par Bio-Rad, est une technique biochimique qui utilise un carbapénème chromogénique pour détecter l'activité de carbapénémases au sein de colonies bactériennes. L'hydrolyse du noyau β -lactame du substrat induit un changement de coloration du milieu. Le choix du substrat doit être judicieux car il existe une multitude de substrats qui sont plus ou moins sélectifs du type de β -lactamase impliquée. Pour ce test, les colonies bactériennes à tester, sont prélevées à partir d'une culture récente et ajoutées

au milieu réactionnel supplémenté d'un carbapénème chromogénique. En parallèle, un témoin négatif est également préparé. Les tubes sont incubés à 37 °C sous agitation. Après quelques minutes, un changement de couleur peut s'opérer mais la lecture ne s'effectue qu'à 30 minutes Figure 39. Deux interprétations sont possibles : **1-** en l'absence d'une carbapénémase, la couleur du milieu est jaune. **2-** en présence d'une carbapénémase, la couleur du milieu varie entre le rouge/violet selon l'activité hydrolytique des enzymes. La couleur orange (résultat non interprétable) est associée à un résultat négatif (224).

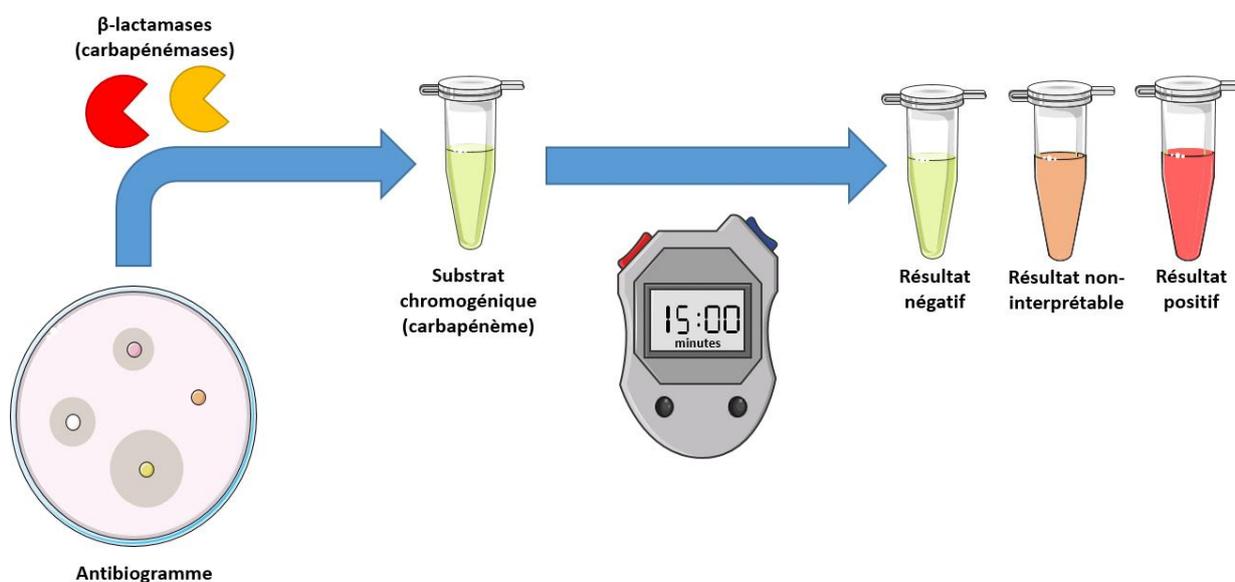


Figure 39 : Le principe du test β -Carba™ pour la détection des carbapénémases.

Descriptif : A partir d'un antibiogramme, une colonie est prélevée et mise au contact d'un substrat chromogénique. Après 15 minutes d'incubation, un changement de couleur vers le rouge est significatif d'une hydrolyse du substrat. Une coloration orange est non-interprétable et est considérée comme un résultat négatif.

Les avantages de ce test sont : un résultat rapide (interprétation en 30 minutes) ; une sensibilité de 84,9 % et une spécificité de 95,6 % (225) ; une détection de l'ensemble des carbapénémases ; la simplicité d'utilisation. Cependant, les deux inconvénients principaux sont : une incubation de 60 minutes au lieu de 30 minutes est nécessaire pour les carbapénémases à faible activité hydrolytique (224) ; une interprétation de la couleur parfois difficile car subjective ; la non-identification de la classe de carbapénémase impliquée ; une coloration orange est non-interprétable et est considérée comme un résultat négatif.

V.3.1.4.4. Le test ESBL NDP

Le test ESBL NDP est une technique biochimique de détection des BLSE. Il met en évidence l'acidification du milieu suite à l'activité hydrolytique d'une BLSE sur le céfotaxime. L'indicateur de pH (rouge de phénol) vire progressivement du rouge au jaune, à mesure que le milieu s'acidifie. La souche bactérienne est lysée et le lysat obtenu, est divisé dans trois tubes distincts : **Tube 1**- Milieu réactionnel seul ; **Tube 2**- Milieu réactionnel supplémenté de céfotaxime ; **Tube 3**- Milieu réactionnel supplémenté de céfotaxime + tazobactame (inhibiteur des β -lactamases, et particulièrement des BLSE). L'ensemble est incubé à 37 °C pendant 30 minutes, puis une lecture visuelle est faite pour évaluer le changement de couleur du milieu. Un test est considéré positif lorsque la couleur du milieu du tube 2 vire du rouge au jaune, et que la couleur des tubes 1 et 3 reste rouge (226).

Un produit commercial du test ESBL NDP existe, le Rapid ESBL screen® de Rosco diagnostics. Néanmoins, ces performances sont plus faibles en termes de sensibilité (80 %) et de spécificité (87 %). La sensibilité peut être augmentée avec une incubation de 2 heures au lieu de 30 minutes, mais au détriment de la spécificité (227).

Ce test présente des avantages tels que : un rendu de résultat en 30 minutes ; un faible coût ; une sensibilité de 92,6 % et une spécificité de 100 % pour le test ESBL NDP (226) ; une rapidité et une simplicité d'exécution. Les inconvénients de ce test sont : une interprétation de la couleur parfois difficile car subjective ; une coloration orange est non-interprétable et est considérée comme un résultat négatif ; une non-discrimination entre les BLSE et les carbapénémases.

V.3.1.4.5. Le test β -Lacta™

Le test β -Lacta™, commercialisé par Bio-Rad, est une technique biochimique qui utilise une céphalosporine chromogénique pour détecter l'activité BLSE des colonies bactériennes (228). Par exemple, un des substrats pouvant être utilisé pour la détection de l'activité des BLSE est la nitrocéfine (céphalosporine chromogénique) (229). Comme pour le test β -Carba™, l'hydrolyse du noyau β -lactame™ du substrat induit un changement de

coloration du milieu passant du jaune à l'orange/rouge/violet selon l'activité hydrolytique de l'enzyme. Ce substrat n'est pas hydrolysé par les pénicillinases de type SHV, TEM, mais par les BLSE et les carbapénémases. Le substrat n'est que faiblement hydrolysé par les AmpC surexprimées. Les colonies bactériennes à tester sont prélevées à partir d'une culture et ajoutées au milieu réactionnel supplémenté de la céphalosporine chromogénique. En parallèle, un témoin négatif est également préparé. Les tubes sont incubés à température ambiante. La lecture visuelle s'effectue à 15 minutes et un changement de couleur peut s'opérer. Trois interprétations sont possibles : **1-** la couleur du milieu est jaune : absence d'activité de BLSE ou de carbapénémases ; **2-** la couleur du milieu est orange : non-interprétable, c'est-à-dire considéré comme négatif ; **3-** la couleur du milieu est rouge : présence d'activité BLSE ou carbapénémases (228).

Les avantages de ce test sont : un rendu de résultat en 15 minutes et une facilité d'utilisation ; une sensibilité de 87,7 % pour la détection de l'activité des BLSE (227) ; une interprétation de la couleur parfois difficile car subjective. Les inconvénients sont : une possible détection des AmpC surexprimées induisant des FP ; une spécificité de 70,8 % (227) ; une non-discrimination entre les BLSE et les carbapénémases ; une coloration orange est non-interprétable et est considérée comme un résultat négatif.

V.3.1.5. La spectrométrie de masse

La SM d'ionisation par désorption laser assistée par matrice – Temps de vol (MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight) est une technique d'ionisation utilisée pour la détection des produits d'hydrolyse des β -lactamines. Cet outil est présent au sein des laboratoires de microbiologie clinique. Le principe de cette méthode est d'ioniser l'échantillon (un antibiotique + une matrice) à l'aide d'une source laser. Les molécules ionisées sont accélérées dans un champ électrique et projetées vers un détecteur, le TOF. Ce détecteur permet de séparer et d'analyser les ions en fonction de leur temps de vol, dépendant de leur masse (230). Pour mettre en évidence la résistance aux β -lactamines, la souche à tester est incubée en présence de l'antibiotique pendant 3 heures sous agitation. Pour une détection de l'activité de BLSE, une céphalosporine est utilisée telle que le

céfotaxime ou la céftazidime. Pour la détection de l'activité de carbapénémases, un carbapénème est employé tel que l'ertapénème, l'imipénème ou encore le méropénème. Après centrifugation de l'échantillon, le surnageant est récupéré et est analysé en SM en moins d'une minute. Comme illustrée en Figure 40, en cas de souche n'exprimant pas de β -lactamases (BLSE et/ou carbapénémases), le pic de la forme non hydrolysée de l'antibiotique est toujours visible, avec quelques possibilités de complexation avec des ions ; en cas de souche exprimant une(des) BLSE et/ou une(des) carbapénémase(s), il y a l'apparition de pics représentatifs du ou des produits d'hydrolyse de l'antibiotique (231).

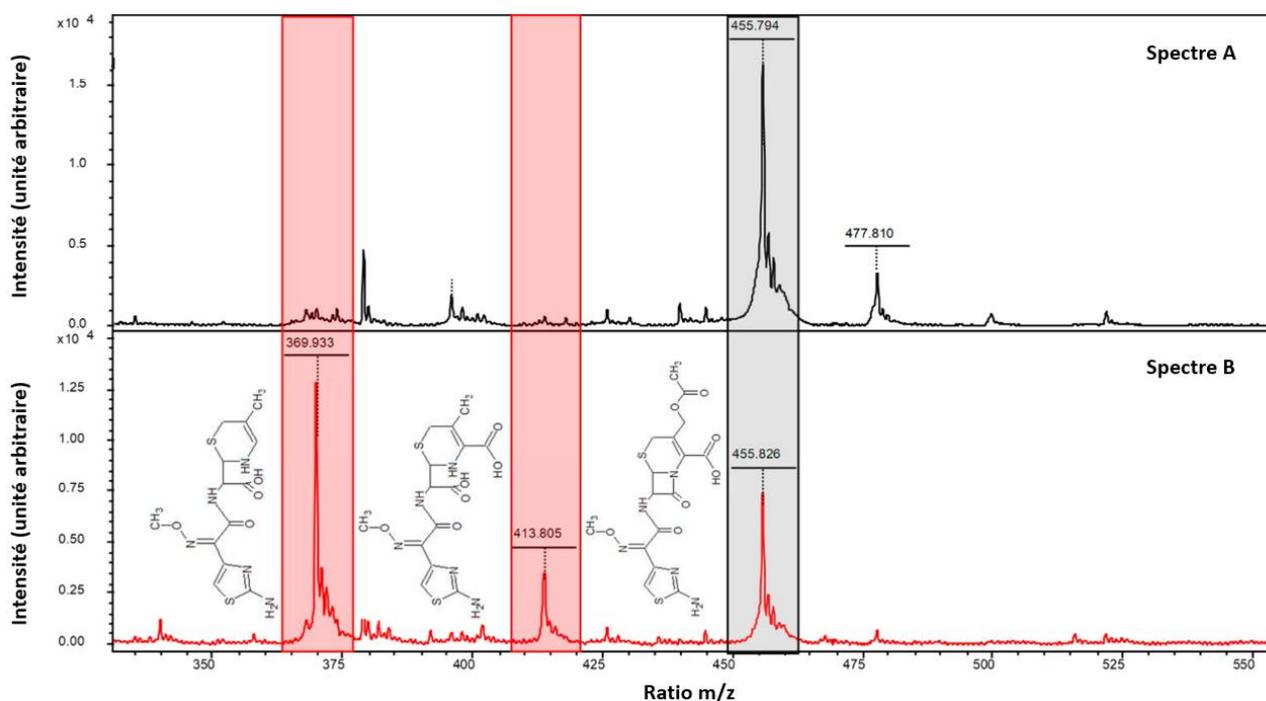


Figure 40 : L'analyse des spectres de masse du céfotaxime non-hydrolysé et du céfotaxime hydrolysé.

Adapté de Oviaño M. et al. (232). Descriptif : Sur le spectre A, en présence d'une souche n'exprimant pas de β -lactamases (BLSE/carbapénémases), une masse de 455,79 Da est représentative du céfotaxime non-hydrolysé. Sur la spectre B, en présence d'une souche exprimant une(des) BLSE/une(des) carbapénémase(s), trois pics sont présents : 369,93 Da ; 413,81 Da ; 455,83 Da ; significatifs d'une hydrolyse du céfotaxime.

En effet, lors de l'hydrolyse de l'antibiotique au niveau du noyau β -lactame, d'autres réactions chimiques peuvent se produire provoquant des décarboxylations et/ou désacétylation selon la structure chimique de la molécule. Chaque antibiotique a une masse moléculaire propre et donc des produits d'hydrolyse de masse moléculaire distinctes (Tableau 4) (231).

			Souche sensible		Souche résistante				
Groupe	Antibiotique	Poids moléculaire	[Non hyd. + H ⁺]	[Non hyd. + Na ⁺]	[Hyd. + H ⁺]	[Hyd. + Na ⁺]	[Hyd. + X + H ⁺]	[Hyd. + Y + H ⁺]	[Hyd. + X + Y + H ⁺]
Pénicilline	Ampicilline	349,4 Da	350,4 Da	372,4 Da	368,4 Da	390,4 Da	324,4 Da	/	/
	Pipéracilline	517,5 Da	518,5 Da	540,5 Da	536,5 Da	558,5 Da	492,5 Da	/	/
Céphalosporine	Céfotaxime	455,5 Da	456,5 Da	478,5 Da	/	/	/	414,5 Da	370,5 Da
	Céftazidime	546,6 Da	547,6 Da	/	/	/	/	486,6 Da	442,6 Da
Carbapénème	Ertapénème	475,5 Da	476,5 Da	498,5 Da	494,5 Da	516,5 Da	450,5 Da	/	/
	Imipénème	299,4 Da	300,4 Da	/	/	/	254 Da	/	/
	Méropénème	383,4 Da	384,5 Da	406,5 Da	/	/	358,6 Da	/	/

X : Décarboxylation

Y : Désacétylation

Hyd. : Hydrolysé

Non hyd. : Non hydrolysé

Tableau 4 : Les masses moléculaires des β -lactamines en spectrométrie de masse avant et après hydrolyse par des β -lactamases.

Adapté de Sparbier K. et al. (231).

Il a été montré qu'une réduction du temps d'incubation (30 minutes au lieu de 3 heures) de l'antibiotique avec la souche permet toujours une détection efficace de l'activité des β -lactamases chez les entérobactéries (233).

Les automates commerciaux les plus présents sur le marché sont le MALDI Biotyper® de Bruker, le Vitek® MS de bioMérieux, et l'Andromas® de Beckman Coulter (230).

Les avantages de cette technique sont : l'obtention des résultats peut se faire entre 30 minutes et 3 heures selon le protocole ; un faible coût en réactifs ; une sensibilité et une spécificité proches de 100% (231,233). Les inconvénients sont : une non-discrimination entre les BLSE et les carbapénémases ; un matériel coûteux (le SM) et la nécessité d'une main d'œuvre qualifiée ; une absence de protocole standardisé (des différences dans le temps d'incubation, les substrats utilisés, les conditions de lyse, les critères de positivité, et la calibration) ; l'absence d'un logiciel d'interprétation automatique des spectres rendant plus difficile l'analyse des résultats (234) ; une visualisation de plusieurs produits de dégradation (231).

V.3.1.6. La spectroscopie ultra-violet

La spectroscopie ultra-violet est une technique permettant la détection de l'hydrolyse du noyau β -lactame par une différence d'absorbance entre la forme non hydrolysée et la forme hydrolysée (appelée ΔA), à une longueur d'onde (λ) donnée. Pour ce faire, une solution d'antibiotique (céphalosporine pour la détection de l'activité de BLSE ; carbapénème pour la détection de l'activité de carbapénémases) est incubée avec une souche bactérienne, de concentration définie, pendant 1 heure à 37 °C sous agitation. Un témoin sans la souche bactérienne est réalisé. L'absorbance est mesurée entre 200 nm et 400 nm. Chaque antibiotique possède une λ spécifique où l'absorbance est à son maximum. Par exemple, l'imipénème a un pic d'absorbance à 297 nm. Lorsque l'hydrolyse enzymatique de l'antibiotique a lieu, l'absorbance à la λ spécifique est fortement diminuée, et le ΔA est le plus fort, comme illustrée en Figure 41 (235).

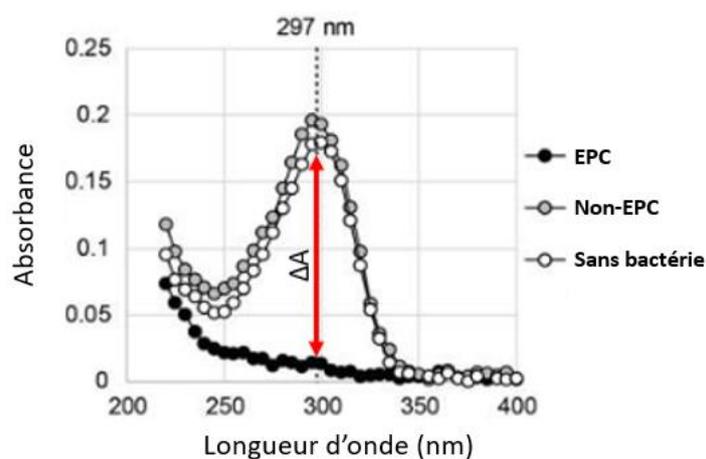


Figure 41 : L'analyse des spectres d'absorbance de l'imipénème non-hydrolysé et de l'imipénème hydrolysé.

Adapté de Takeuchi D. et al. (235). Descriptif : La longueur d'onde 297 nm est le pic maximal d'absorption de l'imipénème. Ainsi, en cas d'hydrolyse de cet antibiotique, la perte d'absorbance à cette longueur d'onde permet de valider la présence d'une EPC ; (EPC : Entérobactéries productrices de β -lactamases).

Les avantages de cette technique sont : une simplicité d'exécution ; un outil relativement peu coûteux ; un rendu de résultat en 1 heure ; une sensibilité et une spécificité de 100% (235). Des inconvénients sont également présents : une non-identification du type de BLSE ou de carbapénémases ; une possible variation des absorbances induite par des

interférences du milieu ; une variabilité dans la différence d'absorbance peut être observée entre deux expériences (235).

V.3.1.7. Le test BYG Carba

Le test BYG Carba est un test électrochimique permettant de détecter la présence d'une activité hydrolytique de type carbapénémase au sein d'un échantillon bactérien. Il s'appuie sur l'analyse de variations de conductivité à l'aide d'une électrode composée de huit sondes (Figure 42) recouverte d'un polymère conducteur, le polyaniline. Cette variation est induite par des modifications de pH et de potentiel d'oxydoréduction liées à une réaction enzymatique d'hydrolyse d'une β -lactamine (236).

En pratique, des colonies bactériennes (trois colonies) sont prélevées à partir d'une culture bactérienne fraîche et suspendues dans du tampon de lyse. Une première partie du lysat est mélangée avec le milieu réactionnel supplémenté en sulfate de zinc (si présence de métallob β -lactamase) et en imipénème. La seconde partie est mise au contact avec le milieu réactionnel supplémenté uniquement en sulfate de zinc. Un aliquot de chaque solution est transféré sur les sondes de l'électrode. Préalablement, un seuil de détection a été défini et les variations de la conductivité sont suivies, analysées en temps réel. La durée d'incubation est d'environ 30 minutes à température ambiante. Si la conductivité dépasse le seuil, le résultat est défini comme positif sinon il est considéré comme négatif (Figure 42) (236). Une nouvelle version plus sensible du BYG Carba a été développée où seulement une colonie bactérienne est nécessaire (237).

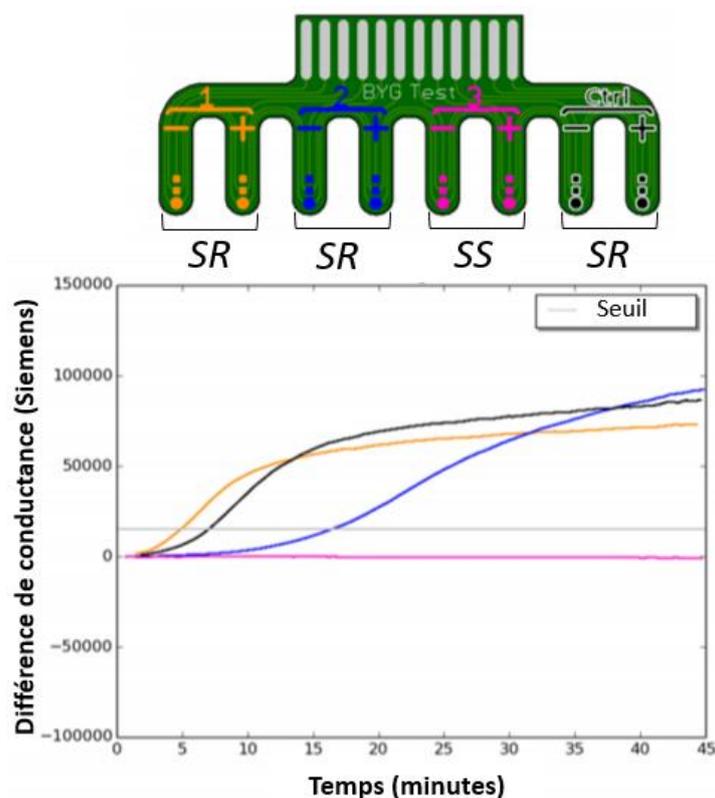


Figure 42 : L'analyse de la conductivité du test BYG Carba pour la détection des carbapénémases.

Adapté de Bogaerts P. et al. (236). Descriptif : En présence de souches résistantes, la différence de conductance s'accroît à mesure que l'antibiotique est hydrolysé. La lecture s'effectue à 30 minutes et les souches sont considérées comme positives lorsque le seuil de conductance est dépassé ; (SS : Souche sensible ; SR : Souche résistante).

Les avantages de ce test sont : une lecture objective via l'aide d'un logiciel ; un rendu de résultat en 30 minutes ; une bonne détection des enzymes de type OXA ; une sensibilité de 96,3 % et une spécificité de 99,7 % pour la nouvelle version (BYG Carba v2.0) (237). Les inconvénients du test sont : une absence de kit commercialisé et donc un coût d'utilisation non connu ; un équipement spécifique nécessaire ; la non-distinction du type de carbapénémase.

V.3.1.8. Les limitations

Pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens basés sur l'activité enzymatique des β -lactamases, plusieurs limites se présentent (238) :

- La difficulté pour discriminer les enzymes au sein d'un mécanisme de résistance tel que les β -lactamases à spectre étroit, les BLSE et les carbapénémases ;
- Un résultat parfois ambigu qui peut laisser place à des erreurs d'interprétation ;
- La durée de l'analyse : la plupart des méthodes phénotypiques nécessitent une étape de culture.

Du fait de la durée d'exécution des tests phénotypiques et de la nécessité parfois de confirmer le résultat par une méthode génotypique, ces techniques peuvent être à l'origine d'un retard dans la mise en place des mesures de contrôle et de prévention. Même si ces techniques présentent des coûts peu élevés et nécessitent un personnel peu qualifié, il est important que les laboratoires soient vigilants quant à l'interprétation des résultats afin d'identifier certaines résistances émergentes. Ainsi, il est donc nécessaire de développer de nouveaux tests permettant une identification rapide, simple et peu coûteuse avec de bonnes performances.

V.3.2. Les tests immunochromatographiques

Les tests immunochromatographiques se sont développés rapidement dans le domaine de l'antibiorésistance et notamment la détection des β -lactamases de par leurs caractéristiques : sensibilité, spécificité, simplicité de mise en oeuvre, rapidité (15 à 30 minutes) et leur faible coût. Un état de l'art dans le domaine de la détection de la résistance aux antibiotiques via l'utilisation des tests immunochromatographiques a été réalisé.

Revue I

Review

The Revolution of Lateral Flow Assay in the Field of AMR Detection

Hervé Boutal¹, Christian Moguelet¹ , Lilas Pommies¹, Stéphanie Simon¹ , Thierry Naas^{2,3,4} 
and Hervé Volland^{1,*} 

- ¹ Département Médicaments et Technologies Pour la Santé (DMTS), Université Paris Saclay, CEA, INRAE, SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France; herve.boutal@cea.fr (H.B.); christian.moguelet@cea.fr (C.M.); lilas.pommies@cea.fr (L.P.); stephanie.simon@cea.fr (S.S.)
- ² Bacteriology-Hygiene Unit, APHP, Hôpital Bicêtre, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France; thierry.naas@aphp.fr
- ³ Team Resist, UMR1184, Université Paris-Saclay—INSERM—CEA, LabEx Lermite, 91190 Gif-sur-Yvette, France
- ⁴ Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance: Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France
- * Correspondence: herve.volland@cea.fr

Abstract: The global spread of antimicrobial resistant (AMR) bacteria represents a considerable public health concern, yet their detection and identification of their resistance mechanisms remain challenging. Optimal diagnostic tests should provide rapid results at low cost to enable implementation in any microbiology laboratory. Lateral flow assays (LFA) meet these requirements and have become essential tools to combat AMR. This review presents the versatility of LFA developed for the AMR detection field, with particular attention to those directly triggering β -lactamases, their performances, and specific limitations. It considers how LFA can be modified by detecting not only the enzyme, but also its β -lactamase activity for a broader clinical sensitivity. Moreover, although LFA allow a short time-to-result, they are generally only implemented after fastidious and time-consuming techniques. We present a sample processing device that shortens and simplifies the handling of clinical samples before the use of LFA. Finally, the capacity of LFA to detect amplified genetic determinants of AMR by isothermal PCR will be discussed. LFA are inexpensive, rapid, and efficient tools that are easy to implement in the routine workflow of laboratories as new first-line tests against AMR with bacterial colonies, and in the near future directly with biological media.

Keywords: lateral flow immunoassay; antibiotic resistance; ESBLs; carbapenemases; detection



Citation: Boutal, H.; Moguelet, C.; Pommies, L.; Simon, S.; Naas, T.; Volland, H. The Revolution of Lateral Flow Assay in the Field of AMR Detection. *Diagnostics* **2022**, *12*, 1744. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071744>

Academic Editor: Anna Baraniak

Received: 20 June 2022
Accepted: 11 July 2022
Published: 19 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Since their first use in the late 1930s, antibiotics have become a valuable tool in the fight against bacterial infections, leading to a considerable improvement in clinic and public health [1,2]. However, subsequent to their use, overuse, and misuse, bacteria resistant to these molecules have emerged [3–5]. Antimicrobial resistance (AMR) is today universally recognised as a global threat because of the rapid emergence and dissemination of resistant bacteria and genes among humans, animals, and the environment on a global scale. AMR thus represents a heavy burden for healthcare systems all over the world. ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp.) combined with antibiotic resistance have greatly increased the risk of morbidity and mortality, especially in ICU settings [6].

Moreover, resistant bacteria are easily transferred from one reservoir to another, and consequently so are the resistance genes they carry [7].

AMR hinders the fight against infectious diseases [8], and the development of new antibiotics is slower than the emergence and spread of resistant organisms [9]. Their dissemination has obvious health impacts, but also economic effects in high- as well as in

low- and middle-income countries [6,10,11]. Indeed, actions have to be taken, and the One Health approach aims to ensure that antimicrobials are optimally used in both human and animal health, but also in agriculture. In the veterinary field, the amounts of antibiotics used, especially those with an important medical value, have been significantly decreased in order to preserve their efficacy in human medicine [12]. Another essential action is the early detection of resistant bacteria in clinical settings to allow implementation of efficient infection control measures and identification of resistance mechanisms so that the most appropriate antibiotic therapies can be proposed. Implementation of rapid point of care (PoC) diagnostic tests is mandatory to achieve this goal [13].

In general, for clinical diagnostic laboratories to identify an antimicrobial-resistant pathogen, it must first be isolated from the matrix (blood, urine, rectal swab) before antimicrobial susceptibility testing (AST) can be performed. AST is a bacterial growth test in the presence of antibiotics that allows the pathogen's susceptibility or resistance to a given antibiotic to be determined. Several techniques are available such as disc diffusion (e.g., Bio-Rad, Oxoid, Hercules, CA, USA), broth dilution (e.g., Micronaut [Bruker]; Sensititre [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA], antibiotic gradient test (e.g., E-test [BioMérieux]), and also automated systems (e.g., Vitek systems [BioMérieux]; Phoenix [Becton Dickinson Diagnostic Systems]; Microscan WalkAway *plus* system [Beckman Coulter]). These tests are often time-consuming, and results generally take 16–24 h.

Nucleic acid amplification technology (NAAT) such as that used in PCR-based techniques, both conventional and real-time formats, can be performed. These tests target genetic determinants of resistance. Compared to phenotypic resistance tests, they can be performed directly using clinical samples with a shorter turnaround time providing earlier information regarding the resistance profile of the clinical strain. Nevertheless, the presence of the resistance gene is not always correlated with a phenotypic resistance, which may also depend on its level of expression [14].

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the context of resistance profile determination can be used to highlight the hydrolysis of antibiotics while incubated with a strain by detecting degradation products [15].

All these methods are complex and require technical skills and expertise or depend on expensive equipment. In case of an infection with a resistant isolate, the situation requires immediate, on-site identification with rapid, economical, and user-friendly methods. In this regard, the lateral flow assay technique (LFA), also known as rapid diagnostic test (RDT), has proven valuable in the detection and identification of antibiotic resistant isolates. LFA meets all the prerequisites defined by the World Health Organization for an ideal PoC test, or in general for any point of need (PoN) test, known as ASSURED [16,17] (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Deliverable). Moreover, LFA can integrate the P5 medicine model, which is becoming prominent in the healthcare system. This model relies on a personalized, predictive, preventive, and participatory approach, with as a final objective the implementation of therapy most suitable for the patient [18].

In this paper, we review the use of LFA for early and rapid identification of AMR strains. These assays are based on the interaction of antigen-antibody (Lateral Flow ImmunoAssay: LFIA) or DNA-DNA hybridization (Nucleic acid Lateral ImmunoAssay: NALFIA or Nucleic Acid Lateral Flow: NAFL) [19–21].

2. General Presentation of LFIA

2.1. Components and Principle

LFIA tests generally consist of a strip supporting different porous compounds on which liquids migrate by capillarity. The sample pad (SP), which is usually made of cellulose, receives the sample that successively drains onto the conjugate pad (CP). Made of glass fiber, the CP is the storage area for the conjugate, a labelled molecule that generates the signal on the strip. This signal is located on a nitrocellulose membrane printed with different compounds in order to form one test line and a control line (Figure 1). The test

line captures the targets of interest while the control line serves as an inner control for confirmation of correct flow and compatible test conditions. Finally, the wicking pad acts as a pump as well as a reservoir for the liquid dispensed on the SP, and its capacity influences the volume of sample that can be analyzed. All components overlap one over the other and are generally enclosed in a plastic cassette. This cassette provides pressure points to maintain close contacts, providing efficient flow of the reagents through the strip, protection, easy handling, a localized sample dispensing area, and a reading frame.

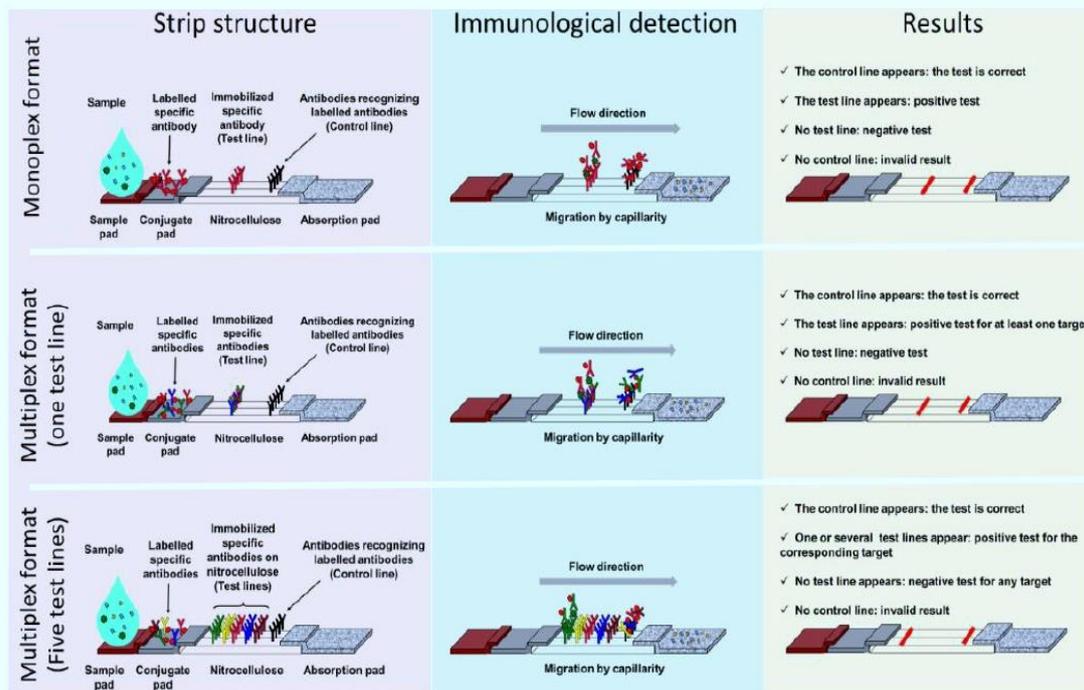


Figure 1. Lateral flow assay formats: components and principle. Presentation of three lateral flow immunoassay formats with, from left to right, their structure (pink panel), immunological detection principle (green panel), and results interpretation (yellow panel). The monoplex format able to detect only one target is presented in the upper panel, a multiplex detection format with one test line and no possible identification of the target is in the central panel, and a multiplex detection format with spatial separation of the test lines and identification of the target(s) detected is presented in the lower panel.

Migration begins once the sample has been loaded on the SP that, depending on the nature of the samples, can be pre-treated in order to reduce matrix effects. The sample solution resuspends the conjugate that forms complexes with the analyte if present. Capillary pressure transports the complexes along the nitrocellulose membrane, and they accumulate on the test line and the excess of conjugate on the control line.

Most of the time, the test line and the conjugate involve antibodies specific for the target being detected, and two formats of LFIA are available. The first, known as non-competitive or sandwich immunoassay format, is for large molecular weight analytes such as proteins that provide several antigenic sites. In this case, a colored test line represents a positive result. The second format, known as competitive or inhibition immunoassay format, is dedicated to small molecular weight antigens, and an attenuated or absent test line indicates a positive result.

2.2. Advantages of LFIA

LFIA are one-step assays that require no washing and only a small sample volume. The time to results, following an easy sample handling, is short (15–30 min), which positions LFIA as a good candidate for primary screening at PoC or PoN. They are inexpensive and do not have specific storage constraints, such as refrigeration, making them accessible to third-world countries [22,23]. The qualitative interpretation of the result can be visual, and no particular skills are required. Moreover, depending on the parameters of the test, results can also be semi-quantitative or even quantitative through the use of a reader [24,25]. In addition, if the reagents are available, the development time to market of an LFIA is relatively short, which can be useful to respond to an urgent sanitary crisis, as illustrated with the recent COVID-19 pandemic. The LFIA, due to its configuration, allows the detection of multiple analytes such as proteins, haptens, or nucleic acids [20].

Interest in LFIAs is best illustrated by the increase in publications describing their use in different fields of application over the last 10 years, especially in the clinical domain (Figure 2). The search query used was (Scopus format): TITLE-ABS-KEY (lateral AND flow AND immunoassay) OR TITLE (lateral AND flow AND assay) OR TITLE (immunochromatographic) AND PUBYEAR > 2009 AND PUBYEAR < 2020 AND (LIMIT-TO (DOCTYPE, "ar")) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE, "English")). The research has been done in October 2020. Then, the articles were selected following the PRISMA guideline for systematic reviews [22]. It is likely that the ease of use, speed, and specificity of these tests are at the origin of their exponential use, including in the field of AMR.

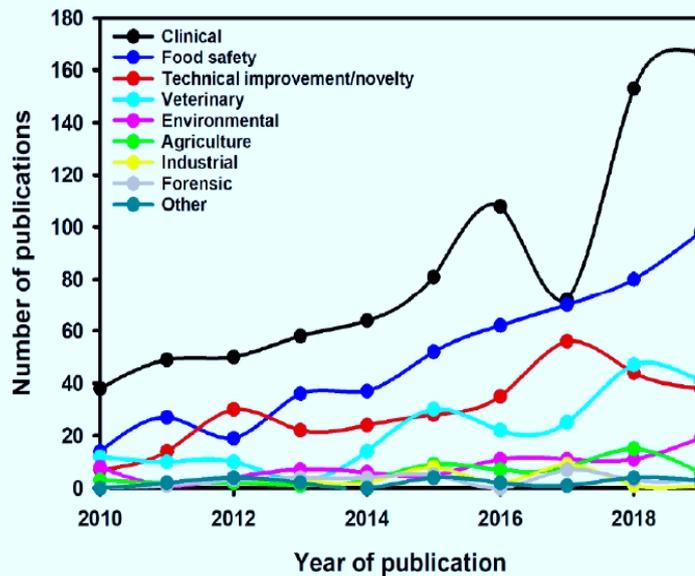


Figure 2. Number of publications per year for different LFIA applications [22].

3. Classical Lateral Flow Assays and AMR

Bacteria possess four main mechanisms that can confer resistance to antibiotics: (i) expression or overexpression of efflux pumps reducing antibiotic concentration within the bacteria; (ii) decreased permeability of the membrane or cell wall leading to ineffective drug concentration in the bacteria; (iii) changed target structure with affinity loss for antibiotics; and (iv) antibiotic degradation mediated by hydrolysis [26]. Any protein involved in a mechanism of AMR can then become a privileged target for LFIA. As a result, a number of LFIA tests have been developed, and some are commercially available.

3.1. Monoplex LFIA to Address AMR Detection

As the number of antibiotic-resistant isolates has increased, LFIA tests have been developed to target enzyme-mediated resistance traits in the clinically most important bacteria, with the primary objective of detecting enzymes involved in the resistance of most prevalent pathogens. A LFIA test detecting the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* 6'-N-acetyltransferase AAC(6)-Iae, which confers resistance to aminoglycosides, was described in 2010 and has a sensitivity of 10^5 cfu/test [27]. Another LFIA targets ArmA 16S rRNA methylase, which is one of the most prevalent 16S rRNA methylase reported and leads to pan-aminoglycoside resistance in Gram-negative bacteria (GNB) such as *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* [28].

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is another major pathogen responsible for severe morbidity and mortality in many hospitals worldwide, which also has an efficient capacity for spreading in the community [29]. The early detection of methicillin resistance, which confers resistance to all β -lactams, is essential. It relies on the detection of the penicillin-binding-protein 2a (PBP2a), which has a reduced affinity for beta-lactam antibiotics. Antibody-based techniques for the detection of MRSA are challenging as *S. aureus* protein A binds to mammalian immunoglobulins. Nevertheless, the use of IgY anti-PBP2a antibodies has been described by Yamada et al. [30], and another study described an optimized LFIA with a detection limit of 10^4 cfu/mL [31].

Vancomycin-resistant enterococcus (VRE) is one of the most important nosocomial pathogens worldwide [32–34]. The vancomycin resistance mechanism in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* is mostly acquired and linked to the production of ligases. In Europe, the most prevalent are VanA and VanB [32,35]. In this context, a LFIA for the identification of VanA-VRE isolates was described with 100% sensitivity and 100% specificity and a limit of detection of 6.3×10^6 cfu and 4.9×10^5 cfu per test when the growth was performed on MH or ChromID[®] VRE plates, respectively [36]. Another LFIA for the detection of VanB-VRE isolates with a lower sensitivity and a mandatory pre-culture on vancomycin-containing media for induction of VanB ligase has also been reported [37].

Beta-lactams represent the major family of antibiotics to treat infections due to Gram-negative bacteria, but their use is currently challenged by the spread of beta-lactamases [38]. In particular, the spread of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) among Enterobacterales represents a major threat as these enzymes are able to inactivate most beta-lactam molecules (including 3rd and 4th generation cephalosporins and aztreonam), sparing only carbapenems [39]. The most common family of the ESBL, the CTX-M, represented by five sub-groups: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, and CTX-M-25, has disseminated worldwide [40]. The increase in the prevalence of ESBL-producing Enterobacterales has led to an increased use of carbapenems, a last resort antibiotic, to treat infections with ESBL-producers. This has led to the selection and subsequent increase in bacteria resistant to these antibiotics. Carbapenem-resistant Enterobacterales (CREs) are usually resistant to most, if not all antibiotics, thus posing serious therapeutic issues in clinical practice. Among CREs, carbapenemase-producing isolates are the most worrisome, as they are capable of efficiently hydrolyzing carbapenems, and their genes are carried by plasmids that may be exchanged between bacteria. Early identification of carriers is essential in order to implement reinforced infection control measures, among which isolation of the patient is a prerequisite. There are five major carbapenemases, KPC, NDM, OXA-48, VIM, and IMP. LFIAs to detect KPC and OXA-48-like enzymes [41] (Coris Bioconcept, Gembloux Belgium), IMP (the most prevalent metallo- β -lactamases in Japan [42,43]), and NDM [44,45] have been developed, all with 100% sensitivity and specificity when used with isolated colony from agar plates.

Faced with infections resistant to carbapenems, the paucity of therapeutic options has led to the use of polymyxins such as colistin as last resort antibiotics [46]. Inexorably, bacteria acquired colistin resistance. While most colistin resistance is due to chromosomal mutations, plasmid-encoded mechanisms, such as MCR-1, have also been described. The latter are considered particularly threatening, as the mcr genes are plasmid encoded, and the

resistance phenotype is difficult to detect. MCR-1, initially described in 2015, mediates the modification of the lipopolysaccharide by a phosphoethanolamine transferase activity [47]. More than eight different MCR-alleles have now been described [48]. Soon after the first description of MCR-1, a LFIA directed against this allele was commercialized (NG-Test MCR-1). This assay has been evaluated in a multicentric study against a collection of human and animal enterobacterial isolates. The results revealed 100% sensitivity for MCR-1 expressing isolates, but some MCR-2 carriers were missed, and the assay did not detect MCR-3, MCR-4, and MCR-5 carriers [49].

3.2. Multiplex LFIA in the AMR Field

Monoplex LFIAs have proven efficacy for the detection and identification of resistance-determining markers. When targeting mechanisms involving a multitude of variants, such as the CTX-M family, a wider specificity can be relevant. Multiplex LFIAs, able to detect CTX-M enzymes but without discriminating the variant or subgroup to which they belong, have been developed. For example, the NG-Test CTX-M MULTI (NG Biotech, Guipry, France) is commercially available and relies on a cocktail of anti-CTX-M mouse antibodies, immobilized on a unique test line (Figure 1, central panel). This test allows the detection of the five CTX-M-subgroups. A recent study showed that the NG-Test CTX-M MULTI could detect 98% of ESBL-producers from a French clinical setting, either from colonies or positive blood cultures, missing only two SHV-ESBL producers [50]. A study, conducted in Italy, reported that the NG-Test CTX-M MULTI was a reliable assay for the detection of CTX-M-like ESBLs from bacterial pellets from blood culture broth, showing excellent sensitivity and specificity [51]. A further study recently described the detection of CTX-M-group-1, -2, and -9 producers using a monoclonal rabbit anti-CTX-M antibody, and showed 100% sensitivity and specificity with clinical isolates grown on agar plates [52]. Most resistance genes are carried by mobile genetic elements [53] and a single strain can harbor more than one resistance determinant. In this scenario, the detection and identification of more than one mechanism of resistance in a single test is relevant. To do so, several test lines are printed on the same strip (Figure 1, lower panel) and target identification is made through a spatial repartition [54]. Several multiplex assays have been described, so far only for the identification of carbapenemase-producing strains. Several versions of the RESIST LFIA test exist (from Coris Bioconcept), which are differentiated by the number of carbapenemases that can be detected. RESIST-3 [55] can detect NDM, KPC, and OXA-48 enzymes. This test has since been upgraded with the additional detection of VIM (RESIST-4 [56]), and IMP or OXA-163 (RESIST-5 [57–59]). All these multiplex assays consist of two-independent cassettes that are used in parallel with the same bacterial extract. Another assay, named NG CARBA-5 [60] (from NG Biotech, Guipry, France), also targets NDM, IMP, VIM, OXA-48, and KPC carbapenemases, but a major difference compared to the RESIST-LFIA test is that the sample has to be loaded onto one unique cassette. The NG Carba-5 has been evaluated by the Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections (AMRHAI) in London, with isolates covering the diversity of the carbapenemases. It showed 97.31% sensitivity and 99.75% specificity, missing IMP-13- and IMP-14-like enzymes [61], also not identified during a previous evaluation by the same team [62]. Missing such enzymes could be an issue in countries with a high IMP prevalence, and since the AMRHAI study, a new version has become available with improved detection of IMP variants [63]. In Europe, NG CARBA-5 shows high sensitivity (97.3% to 100%) and specificity (96.1% to 100%) according to recent studies [61,64–67]. NG CARBA-5 has also received U.S. Food and Drug Administration clearance and evaluation at three medical centers in the USA confirmed its accuracy for detecting and identifying the five most common carbapenemases [68]. NG Carba-5 is often compared to the molecular Xpert Carba-R test (Cepheid) and shows a very high correlation with Carba-R [68–71], but with the advantages of time efficiency and lower cost. LFIAs targeting carbapenemases using the CIM method and its various versions (mCIM, zCIM, and eCIM) make detection of most common and rare variants rapid, simple, and inexpensive [72,73]. Most studies have described the use

of NG Carba-5 with Enterobacterales isolates, but in France, it is also valuable for the detection of carbapenemases produced by *Pseudomonas* spp., 89.4% detected compared with only 12.9% of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. Indeed, the most prevalent carbapenemases in this organism are not targeted by this test [64].

3.3. Limitations of LFIA in the Context of AMR

Despite the many possibilities that LFIA offer, there are some limitations. For example, variations in sample volume loaded on the device can both reduce the accuracy of the result and impact the sensitivity of the test. Moreover, LFIA performance relies mostly on antibody affinity and specificity. However, even if the latter is determinant, we can only detect what we are looking for; thus, the specificity is a limitation in respect of the diversity of enzymes involved in bacterial resistance mechanisms. Implementation of an LFIA test in the clinical setting has to take into account the local epidemiological context in terms of prevalence of resistance mechanisms. The user should keep in mind that any new enzyme variant harboring a mutation in the epitope recognized by any of the antibodies involved in the test may give a reduced signal or a false negative result. Moreover, isolates with an AMR profile but which harbor a mechanism not targeted by the assay will also give a negative result. As for all diagnostic tests, interpretation of results must be made in light of the clinical data and viewed critically. Most LFIAs have been evaluated on colonies grown on agar-containing plates. The ability to use directly from clinical samples would therefore be an important improvement as it would increase turn-around time. For this to be achieved, the sensitivity of the assays has to be improved (on average 10^5 – 10^6 cfu), and interferences with the different biological matrixes needs to be evaluated. The sample or the matrix analyzed may require an additional sample pre-treatment to avoid interferences. Indeed, sample viscosity may prevent efficient migration on the nitrocellulose membrane leading to invalid results, or the matrix may generate interferences leading to false positive or negative results. Current LFIA systems must therefore be improved before they can be used directly with clinical samples [20,74]. Finally, LFIAs only detect the enzymes for which they have been developed. This is the case for the NG-Test CTX-M MULTI that detects the main ESBLs and CTX-Ms, but misses minor ESBLs, and plasmid-encoded cephalosporinase. Combining it with an LFIA that detects hydrolytic activity instead of the enzyme itself would therefore be a major improvement.

4. LFIA: A Phenotypic Method

4.1. Classical Phenotypic Methods

Unlike LFIAs, phenotypic methods allow the detection of all enzymes and variants while maintaining good sensitivity and specificity. They detect the enzymatic activity using a panel of antibiotics, given as an indicator of resistance. These multiple methods are based on different technologies (each test is described in the Figure 3).

1. The diffusion disc test (antibiogram, combined disc synergy test, inhibition test), is one of the reference methods [75–78]. The principle consists of placing the culture of bacteria in the presence of one or more antibiotics and observing the consequences on their development and survival in a Petri dish (Figure 3A).
2. The modified Hodge test consists of inoculating Mueller–Hinton agar with the reference bacterial strain, wild type *Escherichia coli* ATCC 25,922, at 0.5 McFarland diluted 1:10. A disc containing carbapenem (meropenem or ertapenem) is placed in the centre of the agar. Colonies of the test strain are picked and plated in a line from the disc to the periphery of the plate. The presence of a carbapenemase is demonstrated by a cloverleaf indentation of *Escherichia coli* ATCC 25,922 that develops along the growth line of the isolate in the diffusion zone of the disc [79] (Figure 3B).
3. The colorimetric tests detect β -lactamase activity via a color change in the reactive medium related to hydrolytic activity. This change in color is due to a biochemical change in the medium such as acidification. Here, three of them are presented: the Carba NP test, the β -Carba test, and the β -Lacta test [80–82] (Figure 3C,D).

4. The electrochemical test is based on the analysis of conductivity variations within an electrode, composed of eight probes, coated with a conductive polymer, polyaniline. This variation is induced by changes in pH and redox potential related to an enzymatic hydrolysis reaction of imipenem [83] (Figure 3E).
5. Mass spectrometry is used to detect the degradation of antibiotics by measuring their mass. Currently, among the different mass spectrometry technologies the MALDIO-TOF is the most used for this application. After ionization, the ionic molecules are accelerated in an electric field and projected towards a detector. This detector allows the ions to be separated and analysed according to their time of flight, which depends on their mass [84,85] (Figure 3F).
6. The selective media tests are composed of chromogenic substances, rich nutrients, as well as specific antibiotic depending on the desired detection. Thus, they allow the identification of the strains involved through differential staining induced by the presence of characteristic enzymes [86] (Figure 3G).
7. The carbapenem inactivation method consists of lysing the bacterial colonies to be tested in order to recover the suspension containing the possible β -lactamases. This lysate is divided into two separate tubes containing, respectively, a 10 μ g meropenem disc (carbapenemase detection) and a 5 μ g cefotaxime disc (ESBL detection). In parallel, two Mueller–Hinton agar plates were inoculated with an *Escherichia coli* ATCC 25,922 strain, known as a β -lactam sensitive strain. After incubation for 2 h at 36 °C, the meropenem and cefotaxime discs are transferred successively to the two plates. A further incubation is carried out for 4 h at 37 °C, followed by a reading and interpretation of the diameter of the inhibition zones. The absence of inhibition zones around the disc reflects degradation of the antibiotic during the first incubation, indicating hydrolytic activity of β -lactamases [87–89] (Figure 3G).
8. Ultraviolet (UV) spectroscopy is an electron spectroscopy technique allowing the detection of the hydrolysis of the β -lactam core by a difference in absorbance between the non-hydrolysed and hydrolysed form (called ΔA), at a given wavelength [90,91] (Figure 3I).

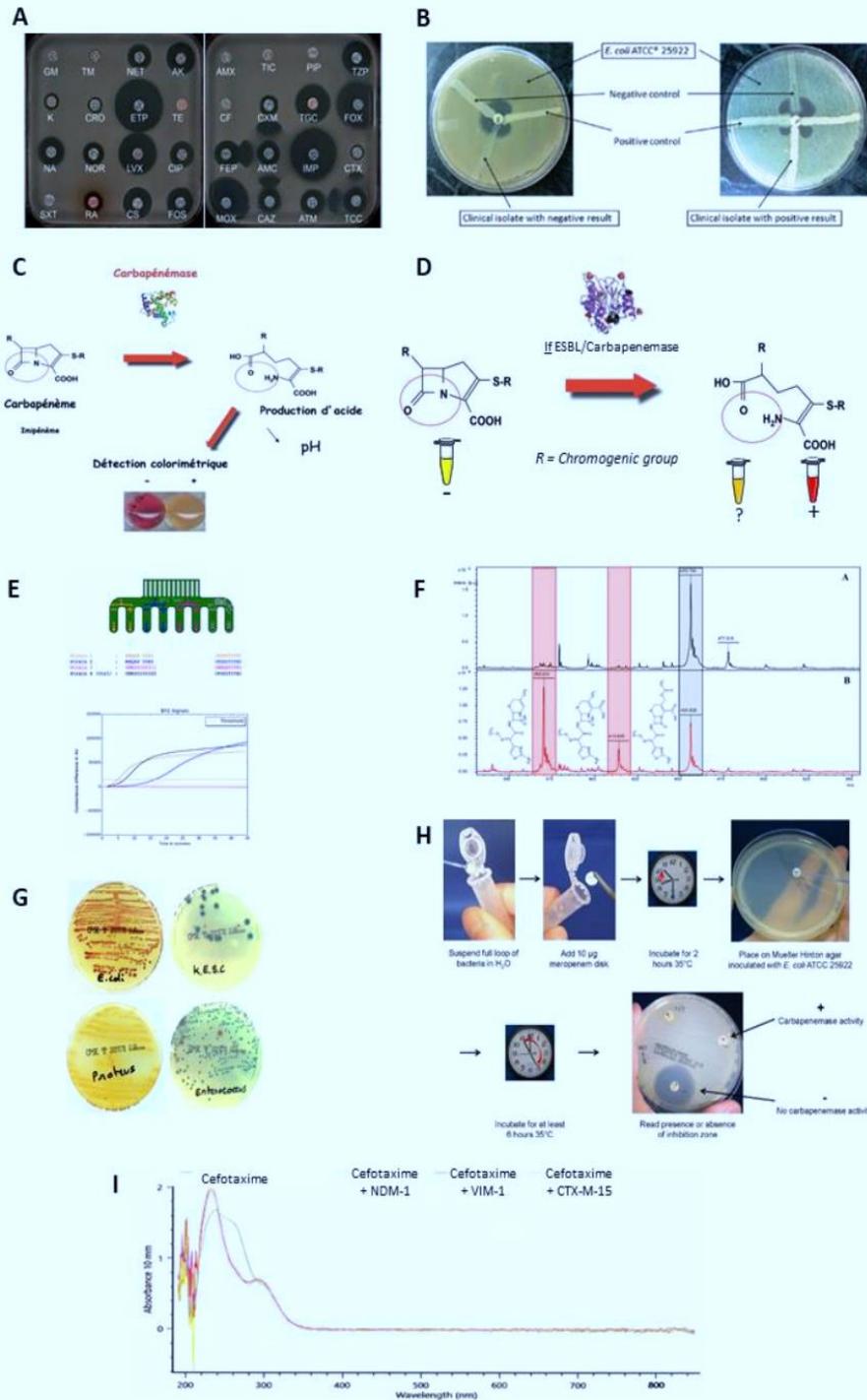


Figure 3. (A) The disc diffusion antibiogram is based on the use of several classes of antibiotics and measures the diameter of the zone of growth inhibition [78] (Reprinted/adapted with permission from [78]. 2014, Nordmann P. and Poirel L.). The smaller the zone, the stronger the resistance to the

antibiotic. Other techniques such as the E-test or broth micro-dilution can be used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) to complete the data. Antibiotic susceptibility testing can often be accompanied by inhibition tests based on the synergy between β -lactamase inhibitors and β -lactams. Based on the inhibition zone diameters, it is possible to orient resistance towards a β -lactamase class. (B) The modified Hodge test, considered as a confirmatory test, is based on the ability of a resistant strain to hydrolyze a third-generation cephalosporin or carbapenem to allow the growth of a non-resistant *E. coli* strain, which is thus synonymous with bacterial resistance [92]. (C) The Carba NP test or the ESBL NDP test uses a colored indicator to track a change in pH. The hydrolysis of a β -lactam induces the opening of the β -lactam ring and an acidification of the medium [78] Reprinted/adapted with permission from [78]. 2014, Nordmann P. and Poirel L.) (D) The β -lacta or β -Carba are based on the use of chromogenic substrates. The hydrolysis of the latter induces the release of the chromophore, which causes a change in the color of the medium. (E) The electrochemical test is based on the use of electrodes that register differences in conductance when the β -lactam substrate is hydrolyzed [93]. (F) Mass spectrometry highlights the structural changes that a β -lactam undergoes upon hydrolysis. Thus, the appearance of peaks at expected molecular weights indicates the presence of bacterial resistance [94]. (G) Chromogen-based selective media are composed of specific antibiotics and a chromogen substrate. The hydrolysis of the substrate and the antibiotics present are representative of a type of resistance. Thus, there are several selective media to identify the resistance group [95]. (H) The CIM is based on an antibiotic disc that is incubated for 2 h with a resistant strain. This is collected and placed on an agar plate containing non-resistant *E. coli*. The diameter of the inhibition zone thus reflects resistance [96]. (I) The UV spectrophotometric technique involves measuring the spectrum of a substrate before and after incubation with a resistant strain. The opening of the β -lactam cycle is reflected by a decrease in absorbance at wavelengths around 260 nm.

Some methods are associated with high costs, require dedicated equipment, long training courses (MALDI-TOF, UV spectrophotometry), or require that kits be commercialized (BYG Carba). Other methods, such as LFIA, are often inexpensive, have rapid results, require low staff skill levels, and are easy to use (disc diffusion antibiogram, modified Hodge test, Carba NP, β -lacta or β -Carba, Chromogen-based selective media, CIM). However, these methods also have some limitations such as: difficulty differentiating enzymes within a resistance group such as extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, and plasmid-mediated cephalosporinases [77]; sensitivity and specificity of the tests dependent on β -lactamases and their hydrolytic activities [97]; and sometimes ambiguous interpretation, especially for colorimetric tests, which may leave room for misinterpretation [98]. It is therefore important that laboratories are vigilant in the interpretation and identification of certain emerging resistances. In some cases, confirmation by genotypic methods is necessary, delaying the delivery of results.

The following table summarizes the characteristics of different tests (Table 1). For the commercialized tests, some suppliers have been stipulated.

It may therefore be interesting to combine the advantages of phenotypic tests (disc diffusion antibiogram, modified Hodge test, Carba NP, β -lacta or β -Carba, Chromogen-based selective media, CIM) and LFIA tests in a new format.

4.2. Evolution of LFIA in the Detection of Antibiotic Resistance

4.2.1. Detection of Enzymatic Activity Using LFIA

Recently, a LFIA was developed to monitor the hydrolysis of a cephalosporin, using an anti-cefotaxime monoclonal antibody. It is based on the very high specificity of the monoclonal antibody for the intact form of the cefotaxime, which is not recognized by this antibody after hydrolysis (Figure 4A(AB)). In this test format, the colloidal gold-labelled antibody recognizing intact cefotaxime is dried between the sample pad and the nitrocellulose membrane. On the nitrocellulose membrane, there is a test line (intact cefotaxime coupled to BSA) and a control line (antibodies recognizing the colloidal gold labelled

antibodies). At the top of the strip, the absorption pad allows the sample to migrate along the strip (Figure 4B).

Table 1. A summary of the turnaround time, intrinsic performance, information provided, simplicity of performance, and major limitation(s) of each β -lactamase test.

Tests	Products	Time	Intrinsic Performance (Variable between Studies)	Information Provided	Easy to Implement	Main Limitation(s)
<i>Hydrolysis of β-lactams</i>	Antibiotic susceptibility test (from bioMérieux, Servilab ...)	16–24 h	High	Points to ESBL or carbapenemases	Little expertise needed	Accumulation of large amount of information
	Chromogenic media (from bioMérieux, Oxoid, CHROMagar)	16–24 h	Medium to high	Points to ESBL or carbapenemases	Little expertise needed	Non-detection of enzymes with low activity
	Modified Hodge Test *	16–24 h	Medium to high	Points to ESBL or carbapenemases	Medium expertise needed	Recurrent FP appearance + Difficulty in detecting MBLs
	Carba NP (from bioMérieux, Rosco Diagnostics)	2 h	Medium to high	Points to carbapenemases	Medium expertise needed	No standardisation Faulty interpretation (FN possible)
	Blue Carba (from Rosco Diagnostics)	2 h	High	Points to carbapenemases	Medium expertise needed	No standardisation Distorted interpretation (FN possible)
	β -Carba (from Bio-Rad)	0.5 h	High	Points to carbapenemases	Little expertise needed	Incubation >0.5 h for strains with OXA-48 enzymes
	ESBL NDP (from Rosco Diagnostics)	2 h	High	Points to ESBL	Medium expertise needed	No standardisation Faulty interpretation (FN possible)
	β -Lacta (from Bio-Rad)	0.25 h	High	Points to ESBL	Little expertise needed	Overexpression of AmpC can lead to \rightarrow FP
	Mass spectrometry (Bruker, BioMérieux, Beckman Coulter)	0.5–3 h	High	Points to ESBL or carbapenemases	Equipment needed + significant expertise needed	Visualisation of degradation products sometimes problematic
	UV spectroscopy *	1 h	High	Points to ESBL or carbapenemases	Equipment needed + significant expertise needed	Interference present + standardisation of OD difficult
	BYG Carba *	0.5 h	High	Points to carbapenemases	Equipment needed + significant expertise needed	No commercialised kit, nor evaluation of the technique
	Carbapenem inactivation method*	6 h	Medium to high	Points to ESBL or carbapenemases	Little expertise needed	Variability of inhibition zones \rightarrow FN
<i>Inhibition of β-lactamases</i>	Combined discs (from Rosco Diagnostics, Mast Groups)	16–24 h	High	Points to ESBL or carbapenemases	Little expertise needed	Variable antibiotic distribution + some inhibitors not very effective
	Double synergy (from bioMérieux, Servilab ...)	16–24 h	High	Points to ESBL or carbapenemases	Little expertise needed	Questionable zones of interpretation + some inhibitors not very effective
<i>Lateral flow immunoassays</i>	E-Test (from Rosco Diagnostics, bioMérieux)	16–24 h	High	Points to ESBL or carbapenemases	Little expertise needed	Difficulty in detecting OXA-48 type enzymes + some inhibitors not very effective
	RESIST (from Coris)	0.25 h	High	Four of the five major carbapenemases in two tests (VIM, OXA-48, NDM, KPC)	Little expertise needed	Does not detect IMP enzymes or all new variants + use of 2 tests
	NG-Test (from NG-Biotech)	0.25 h	High	All five carbapenemases in one test + CTX-M	Little expertise needed	Does not detect all new variants

High intrinsic performance: >90%; medium: 70–90%; low: <70%; * No commercial tests.

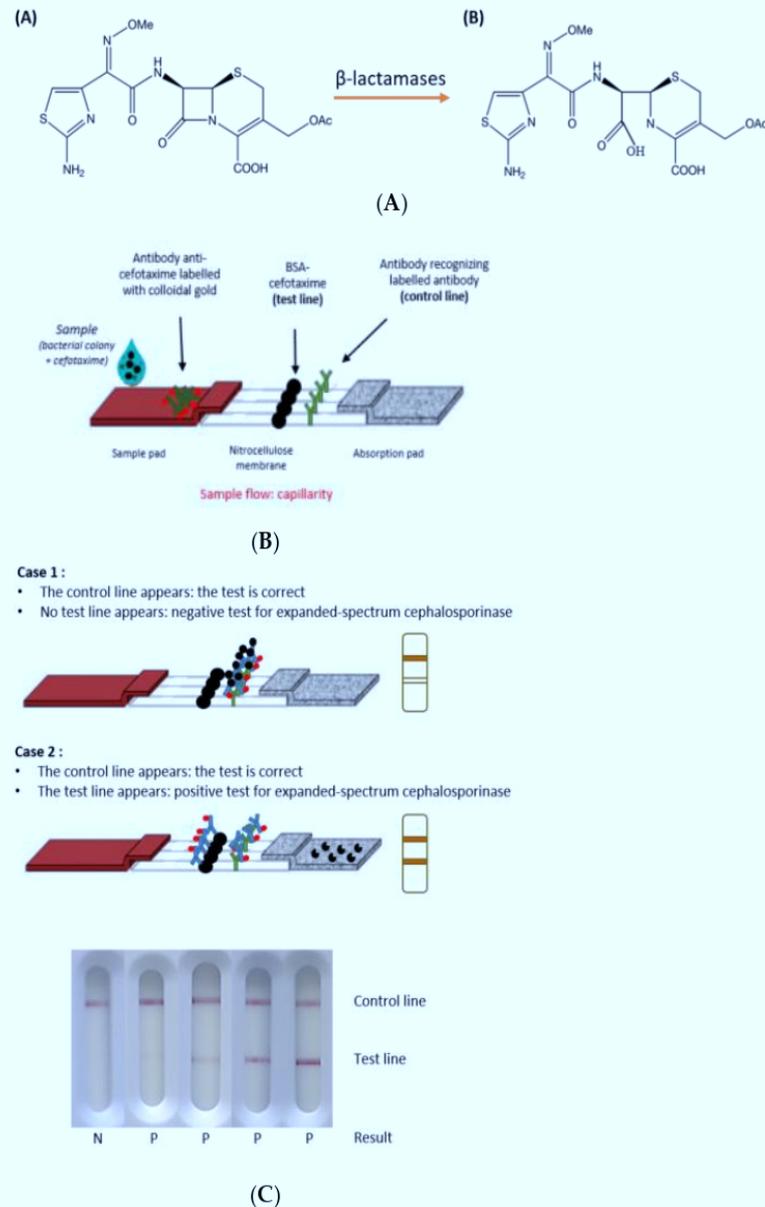


Figure 4. (A): (A) Cefotaxime with β -lactam ring. (B) Hydrolysed cefotaxime with the open β -lactam ring. (B): Next to the sample pad, the colloidal gold-labelled antibody recognizing intact cefotaxime is dried. On the nitrocellulose membrane, there is a test line (intact cefotaxime coupled to BSA) and a control line (antibodies recognizing the colloidal gold labelled antibodies). The absorption pad allows the sample to migrate along the strip. (C) Case 1: In the absence of cephalosporinase expressing strains, the cefotaxime in the sample reacts with the anti-cefotaxime mAb after its re-solubilization. As all the mAb paratopes are occupied, the mAb cannot react with the cefotaxime immobilized on the test line. The mAb is immobilized by goat antibodies on the control line: if only one line appears, the test is negative. Case 2: In the presence of enzymatic activity, hydrolyzed cefotaxime is not recognized by mAbs, thus free paratopes are able to react with immobilized cefotaxime on the test line. A signal appears on the test line and the control line: if two lines appear, the test is positive.

To conduct the test, the sample is grown overnight at 37 °C on culture medium. A single, isolated colony is selected and added to a buffer containing cefotaxime. Following an incubation period of 30 min, the solution is deposited on the test strip. After 10 min of migration, the results are read with the naked eye. There are two scenarios depending on whether or not the strain produces an enzyme with cefotaximase activity [99] (Figure 4C).

Unlike phenotypic assays, which generally detect hydrolyzed products, in this new test, the antibodies detect the intact antibiotic. Thus, the presence of enzymatic activity is reflected by the appearance of a signal on the test line, although this is a competitive test format. It allows an analysis similar to that of enzyme detection (positive test when a test line appears) and is simpler because it is easier to detect the appearance than the decrease of a signal. A study comparing this method to other phenotypic methods has been conducted and showed better performance and interpretation of results with LFIA [100].

The new test can detect the hydrolysis of third generation cephalosporins, regardless of the bacterial isolate or β -lactamase variant involved. It is based on the appearance of a signal that is easier to interpret than a slight color change used in colorimetric detection tests. The test is sensitive, specific, inexpensive and, produces rapid results. However, one of the disadvantages is that it does not, on its own, allow the identification of the enzyme involved, whether it is an ESBL, a carbapenemase, or an AmpC [101].

4.2.2. Enzymatic Activity Detection Coupled to Enzyme Detection Using LFIA

Recently, we combined on one strip the enzymatic activity test and the previously developed CTX-Ms detection test [50]. This new format allows the simultaneous detection of the presence of β -lactamase activity and the identification of CTX-M enzymes with a specificity and sensitivity close to 100% [101].

These results open new perspectives for developing LFIA to detect other AMR mechanisms and so make efficient diagnostic tools available to most healthcare professionals.

At the same time, direct detection methods from clinical samples are of increasing interest because results would be obtained faster than from bacterial colonies. Nevertheless, this detection is often complex because the constituents of the media can interfere with LFIA.

5. Direct Detection of Antibiotic-Resistant Bacteria in Clinical Samples

The detection of antibiotic-resistant bacteria is performed with clinical samples such as blood cultures, urine, and rectal swabs. Between the collection of the sample and the rendering of the results, there is a very important step: the processing of the sample. This step modifies the characteristics of the sample so that it can be analyzed accurately by the selected technology. Depending on requirements, this may involve a varying number of steps, using different technologies, and having a variable duration.

The oldest (more than 100 years) and most commonly used method is the culture of samples on an agar plate [102]. This allows the concentration of bacteria to be increased and the eventual isolation of bacteria present in the sample. Depending on the composition of the media used, this method can allow the identification of bacterial strains [103]. The addition of antibiotic to the culture medium allows the direct detection of resistant bacteria. Sample culture can also be combined with the different methodologies used for the detection and identification of antibiotic resistance (molecular, immunological, biochemical, and mass spectrometry methods). Sample culture is inexpensive and simple but takes a long time (between 16 and 24 h).

Another processing method combines centrifugation and washing steps. It allows the bacteria from the clinical samples to be concentrated and the elimination of potential interferences due to elements present in the sample. This method has been applied to sample processing before AMR detection using LFIA [66], mass spectrometry [104,105], and biochemical techniques [106]. Although it may appear simple, a number of steps are involved, requiring pipetting and the use of a centrifuge. This process takes between 30 and 60 min.

Following the introduction of microfluidic and its application in the biological domain, new devices have been developed that integrate sample processing and target detection. All the steps in these assays, which use PCR or RT-PCR technology [107–109], are automated. These all-in-one tests have been applied to the direct detection of antibiotic resistance genes in clinical samples [110,111]. While these systems are easy to use and provide rapid results (around 1 h), they are expensive and require costly specific equipment which limits their use.

Until recently, immunochromatographic tests were used after sample culture on agar [60] or after centrifugation and washing steps [112].

5.1. Direct Detection Using Centrifugation/Washing Steps

Several studies [55,65,67,113,114] have shown that it is possible to detect carbapenemases directly from blood cultures using immunochromatographic tests (LFIA tests). In these studies, centrifugation and washing steps were performed to eliminate potential interferences present in the sample. The test was then performed using the final pellet and an extraction buffer. This procedure has been also used for the detection of CTX-M in blood culture [115]. Concentrations of bacteria in blood cultures are high and one study has shown that it would be possible to directly detect carbapenemases in blood cultures without centrifugation and washing steps [66].

Other teams have used centrifugation and washing steps for the detection of carbapenemases from rectal swabs using LFIA. However, for this sample matrix, prior incubation in the presence of an antibiotic is necessary [116,117].

5.2. Direct Detection Using a Dedicated Device

The objective of one of our research projects was to directly detect beta-lactamases in clinical samples using immunochromatographic tests in order to decrease the time to result by skipping the culture step. To maintain the advantages of LFIA tests, the sample processing had to be simple, economical, fast, without instrumentation, and had to integrate detection. To reach these objectives, we designed and produced using 3D printing a device named SPID for «Sampling, Processing, Incubation, Detection».

SPID has three elements: (i) a filtration element including a syringe adaptor, a cup with a membrane of 0.2 µm pore size, and a lower element; (ii) an extraction element including a cap with a plunger and a tank; and (iii) a detection element consisting of a plastic cassette integrating a lateral flow immunochromatographic strip. The filtration and extraction elements form the processing part (Figure 5).

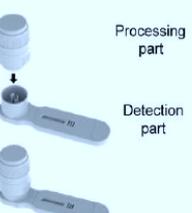
Sample Processing		AMR Detection
Filtration/Concentration	Extraction/ Incubation	Deposition/Detection
1 minute	2 minutes	3-30 minutes
 <ul style="list-style-type: none"> • Concentrates bacteria from samples • Eliminates media interferences 	 <ul style="list-style-type: none"> • β-lactamases extraction 	 <ul style="list-style-type: none"> • β-Lactamases detection Lateral flow Immunoassay • Single use • No equipment needed

Figure 5. SPID platform elements.

For AMR detection with the SPID platform, the sample is collected with some air using a syringe. The syringe is then screwed on to the filtration device and the plunger pressed to filter the sample through the cup membrane. The filtration element is then opened, and the cup is transferred into the tank by sliding it inside. Extraction buffer is added to the cup and the tank is closed by screwing the cap. During this operation, the plunger of the cap will push the extract through the membrane into the tank. The tank is then placed on top of the cassette and pressed firmly until the operculum breaks down. This will release the extracted sample onto the strip, launching the migration. After 15 to 30 min, the results can be read with the naked eye (Figure 6).

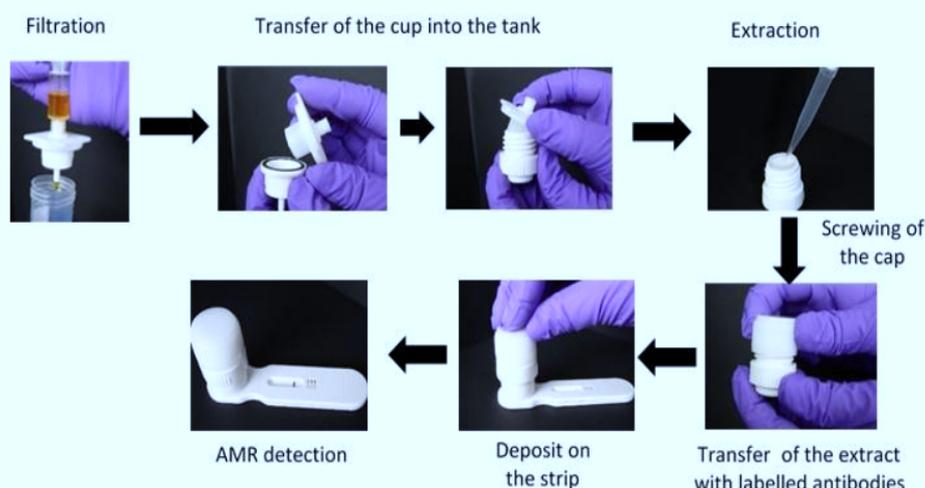


Figure 6. AMR detection workflow using the SPID platform.

The entire sample preparation takes about 2 min and the time to result with SPID for direct AMR detection in clinical samples is around 30 min.

This device has been evaluated in three different hospitals for the detection of CTX-M and the five major carbapenemases (NDM; KPC; OXA48; VIM; and IMP) directly in clinical samples. Three types of samples were used: blood culture, urine, and rectal swabs. The results showed that the device allows direct detection of these beta-lactamases in 30 min from blood cultures and urine, with a sensitivity and specificity between 98 and 100% for the detection of CTXM and between 94 and 100% for the detection of carbapenemases. For rectal swabs, an enrichment step is necessary to achieve the same performance for the detection of CTXM and carbapenemases (publication submitted).

This device is simple to use, low cost, and requires no equipment, and has the advantage of being adaptable to all existing immunochromatographic tests. These characteristics make the device perfectly adapted to the detection of AMR in the veterinary and environmental area.

6. Detection of Amplicons by LFIA

Conventionally, microbiology laboratories use phenotypic testing which involves incubating bacteria with antibiotics for AMR detection (disk diffusion, other systems calibrated by EUCAST). These methods take several days and require trained personnel. Rapid diagnosis helps reduce the spread of AMR, allows early isolation of the patient, and hence rapid and correct treatment. It also avoids unnecessary isolation and saves resources and money. Nucleic acid amplification technology (NAAT), immunochromatographic tests, electrochemical methods, microarrays, micro/nanoparticles, and mass spectrometry are all considered rapid detection tools. In this section, we will focus on nucleic acid amplification. With this powerful tool, it is not necessary to purify the nucleic acids, and the technology

allows rapid diagnosis partly because it uses patient samples without enrichment and because many genes can be targeted from the same sample [118]. Furthermore, genetic-based tests are more accurate for tracing the spread of resistance genes [119].

6.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) allows the replication and amplification of a target DNA through the Taq polymerase (or another thermostable enzyme). PCR is quite a fast test, sensitive, and reproducible [120]. It takes place in three steps: denaturation (95 °C), annealing (50–55 °C), and elongation (72 °C). These steps are repeated over several cycles to generate a large number of copies (30–35 cycles). Samples are then loaded on to agarose gel for electrophoresis and a single band for each target can be observed [121]. Multiplex PCR methods exist and can also be visualized by agarose gel electrophoresis [122]. There are two approaches: the first is known as specific PCR with specific primer targeting a single microorganism and the second as broad-spectrum PCR with primers targeting a gene (which may be present in several microorganisms) [120].

Many groups have developed different commercial kits depending on the application or the target (e.g., ThermoFisher, Biorad, Niotron, Sentinel, Norgen biotek corp, Biolabs, Altona diagnostic, Biobase, Redcaptain, and Biotron).

Unfortunately, PCR remains expensive for routine analytics or PoC testing as it is necessary to buy kits and complex devices for temperature variation.

Moreover, in complex matrices, inhibitors can disrupt amplification. This loss of information is avoided by processing the samples before analysis [119]. One of the possible solutions is to detect amplicons on LFA test. Some studies have used LFA as a detection method after PCR [123–126]. This technology is known as nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) or nucleic acid lateral flow (NALF). NALFIA involves reporter oligonucleotide probes, whereas NALF involves nucleic acid with hapten labels [74]. As PCR requires an instrument, the usefulness of a LFIA after PCR seems limited. Moreover, with real time PCR, detection is performed directly on the thermocycler.

Convective PCR (cPCR) is a new alternative to classic PCR that allows rapid amplification of DNA (less than 30 min) without complex equipment (Figure 7). The cPCR is performed on a heat block at 95 °C for 30 min, and the amplicons are analyzed on LFIA. With this technique, amplification and detection could be achieved with portable devices [127].

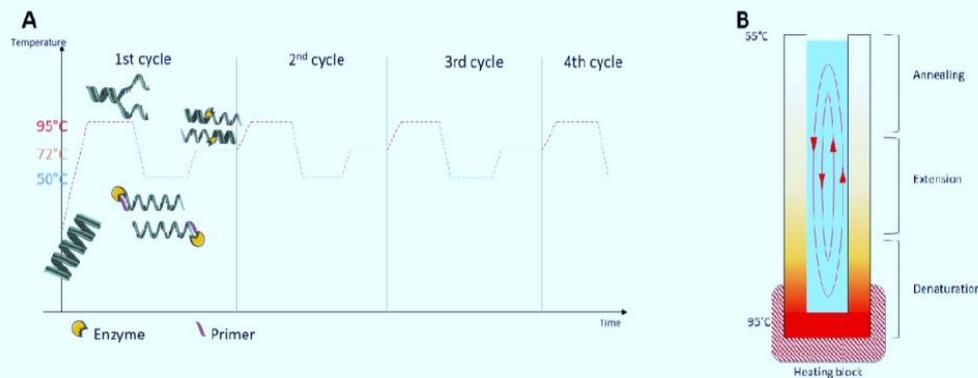


Figure 7. (A) PCR steps; (B) Principles of a cPCR.

To use the PCR technique in PoC testing, several methods of amplification exist using particular enzymes that allow an amplification reaction at a constant temperature (NASBA [128], RCA [129], SDA [130], RPA [131], HAD [132], and LAMP [133]).

6.2. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is an isothermal DNA amplification method developed by Notomi et al. in 2000 [133]. It can be performed in less than 1 h. The DNA polymerase (Bst polymerase) has a strong strand displacement activity, which allows the technique to be performed at a lower and constant temperature (between 60 and 65 °C). This method employs a set of specific primers that recognize different sequences on the target: the inner primer (FIP, BIP), the outer primer (F3, B3), and the loop primer (LF, LB). An illustration of the amplification process is provided in Figure 8 [134].

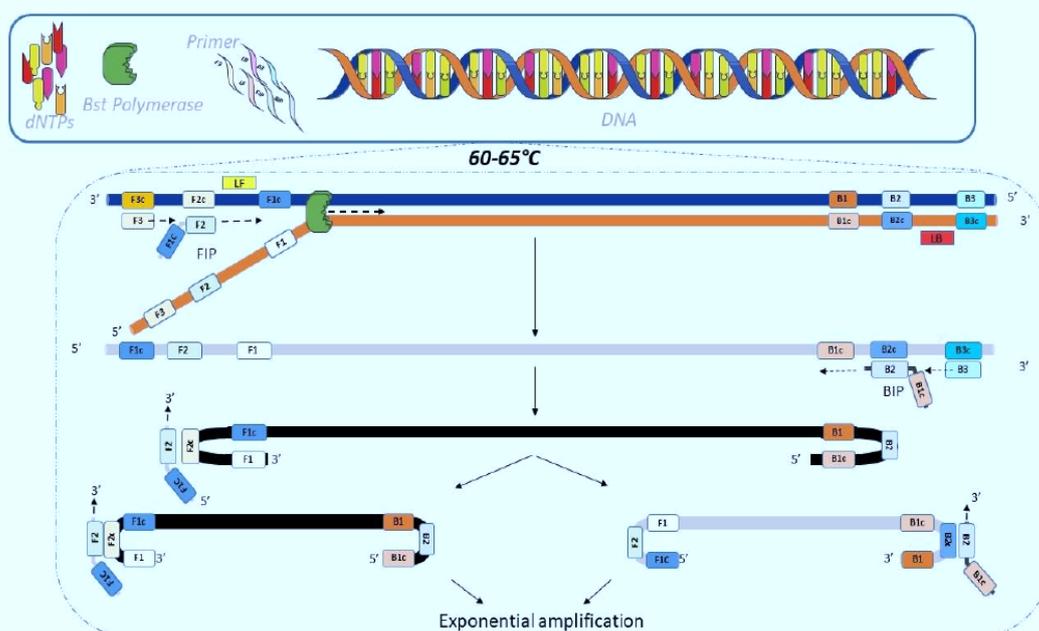


Figure 8. LAMP principle. The amplification starts when the FIP primer hybridizes to the F2c region of the strand. The F3 primer hybridizes to the F3c fragment on the DNA strand which initiates DNA synthesis by strand displacement. The strand bound to the FIP primer is then released and forms a loop structure at one end. This last structure allows the BIP primer to initiate subsequent DNA synthesis by strand displacement. This releases the sequence bound to BIP. The strand forms an altar-like structure and serves as the base for the LAMP cycles. The exponential amplification process then starts. BIP (or FIP) primer hybridizes to the loop structure. LF and LB primers are used to accelerate the amplification [135].

Compared to PCR, LAMP is more robust (DNA extraction not always required), less sensitive to inhibitor, and uses a smaller sample volume (blood, urine, stool). As a result, LAMP is associated with reduced costs and can be used in low-resource field settings [118].

LAMP has been applied to the detection of many pathogens (virus, bacteria, and parasites). In the last few years, more and more LAMP tests have been developed for the detection of antibiotic-resistant pathogens. The method is increasingly used in this field as it does not require complex equipment. Indeed, the amplification reaction can be realized using a heat block or water bath. The detection of amplification product can be analyzed using a range of common methods [136].

6.2.1. LAMP Detection Methods

Several detection methods are compatible with LAMP (Figure 9). Indeed, the amplicons can be visualized by electrophoresis [137] and by monitoring the turbidity or the fluorescence. It is possible to look for color changes induced by chemical reaction [137–139]. The amplicons can be also detected using labelled primers with fluorescent dyes [140] or fluorescent intercalating dyes [137].

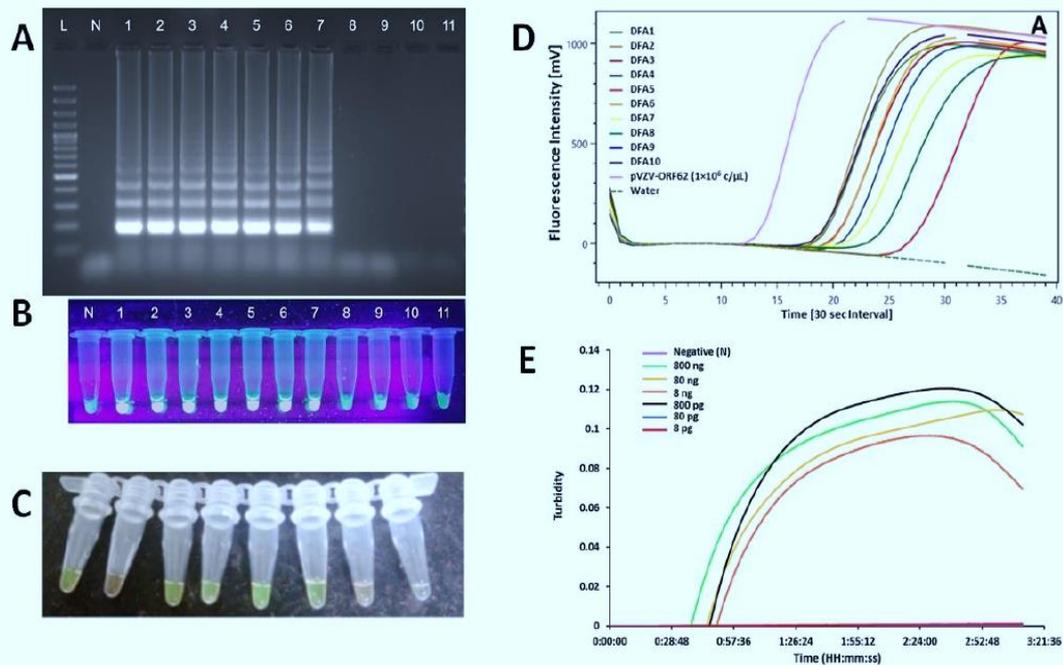


Figure 9. Detection methods for amplicons; (A) Gel electrophoresis [137]; (B) Chemical reaction, visual inspection with fluorescence [137]; (C) Chemical reaction, visual inspection with color change [139]; (D) Fluorescent primers, fluorescence monitoring [140]; (E) Chemical reaction, in real-time, turbidity monitoring [138].

6.2.2. LAMP Coupled to LFA Detection

Recently, LFA has been used as a tool for the detection of LAMP product. Indeed, few studies have focused on the use of LFA for the detection of antibiotic resistance genes [136,141,142].

To detect amplicons on a test strip, primers must first be labelled, e.g., with FITC, Texas red, biotin, Digoxigenin, FAM, or Hex. In addition to the labelled primers, other labelled probes or biotin-labelled dUTPs can be introduced into the reaction mix [136,143–147].

Some of the labeled primers involved in amplicon detection will be recognized by antibodies immobilized on the membrane. Frequently, streptavidin-gold-nanoparticles are dried and immobilized on the conjugate pad to reveal the captured amplicon [148] (Figure 10).

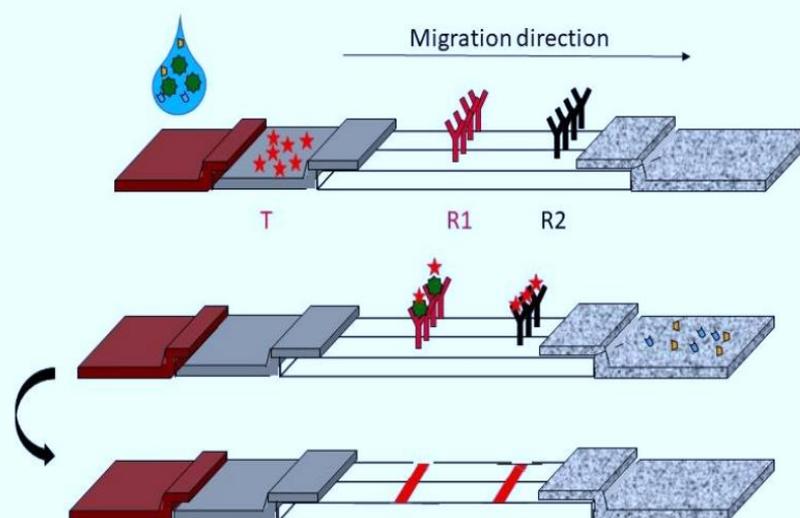


Figure 10. Example of lateral flow assay format for LAMP; R1: receptor 1, R2: Receptor 2, T: Tracker.

Gong et al. developed a LAMP assay combined with LFA for the detection of colistin resistance *mcr-1* gene [142]. The detection of amplicons is performed with a gold-nanoparticle-based lateral flow biosensor. The time-to-result (including sample treatment, LAMP reaction, and detection) is about 85 min, which is at least 90 min faster than *mcr-1* PCR. Moreover, the LAMP test is ten-fold more sensitive than the *mcr-1* PCR assay [142].

Multiplexing is important in the detection of antibiotic resistance as with a single test, several targets may be detected allowing the diagnosis to be refined. Chen et al. tried to simultaneously detect *mecA*, *femB*, and *nuc* genes. They compared multiplex PCR and three reactions with LAMP (one for each gene). The authors chose to detect LAMP amplicons with 2% agarose gel electrophoresis, and the addition of dye, which allows a color change of the solution. They found that multiplexing with these detection methods was not possible for LAMP. Indeed, a smear was observed on gel electrophoresis, and it was impossible to define which gene was amplified [149].

To solve this problem, Chen et al. developed a protocol to detect MSSA (targeting *femA*) and MRSA (targeting *mecA*) using LFA [141]. The FIP primers were labeled with digoxigenin (for *femA*) and with FAM (for *mecA*); both LF primers were also labeled with biotin. This protocol has been validated with biological samples and the results were similar using LFA-LAMP and traditional techniques. Similarly, Liu et al. developed a multiplex LAMP assay coupled with LFA to detect *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. These mycobacteria are resistant to several antimicrobial agents [136].

The main drawback of LFA is that it is not a quantitative method. LAMP reactions are performed with small volumes that can limit the sensitivity of the test.

6.2.3. Other Amplification Methods for AMR Detection

There are many isothermal amplification methods; those used for AMR detection are those that require the fewest steps and/or the least amount of enzyme. The methods used are as follows: GEAR, RPA, SDA, SMAP/SMAP2, HDA, NASBA, RCA, and TMA. [150,151]

LAMP remains the most suitable technique with a more efficient direct amplification, more resistance to matrix interference, and more sensitivity. In addition, LAMP seems to be more adapted to a POC application [150,151].

7. Conclusions

The development of LFA in the field of antibiotic resistance has continued to grow. The first generation of tests, based on the detection of the enzyme responsible for the resistance, avoided some of the limitations encountered in genotypic methods (detection of resistance genes by PCR) or in phenotypic methods (detection of enzymatic activity by modification of the antibiotic). The two main drawbacks of this first generation of tests were the non-detection of certain new variants of enzymes involved in resistance and the difficulty of detecting resistance directly in biological media. These issues have been overcome with the second generation LFA, which have consolidated their position as rapid, efficient, inexpensive, and easy-to-use tools. Additional developments include LFIA tests capable of directly detecting enzymatic activity (LFIA-CTX test), a SPID system to allow rapid and reliable detection in biological media with LFIA, and a LFA test associated with LAMP for improved test reliability and performance. These advances have considerably increased the involvement of LFA in the field of antibiotic resistance. All of the LFA tools are inexpensive, rapid, efficient, and are easy to implement in the routine workflow of laboratories as new first-line tests on bacterial colonies, and in the near future on biological media.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Adedeji, W.A. The treasure called antibiotics. *Ann. Ib. Postgrad. Med.* **2016**, *14*, 56–57. [[PubMed](#)]
- Gould, K. Antibiotics: From Prehistory to the Present Day. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 572–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ventola, C.L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharm. Ther.* **2015**, *40*, 277–283.
- Tangcharoensathien, V.; Chanvatik, S.; Sommanustweechai, A. Complex Determinants of Inappropriate Use of Antibiotics. *Bull. World Health Organ.* **2018**, *96*, 141–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Golding, S.E.; Ogden, J.; Higgins, H.M. Shared Goals, Different Barriers: A Qualitative Study of UK Veterinarians' and Farmers' Beliefs About Antimicrobial Resistance and Stewardship. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Founou, R.C.; Founou, L.L.; Essack, S.Y. Clinical and Economic Impact of Antibiotic Resistance in Developing Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0189621. [[CrossRef](#)]
- White, A.; Hughes, J.M. Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. *EcoHealth* **2019**, *16*, 404–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Michael, C.A.; Dominey-Howes, D.; Labbate, M. The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. *Front. Public Health* **2014**, *2*, 145. [[CrossRef](#)]
- Zucca, M.; Savoia, D. The Post-Antibiotic Era: Promising Developments in the Therapy of Infectious Diseases. *Int. J. Biomed. Sci.* **2010**, *6*, 77–86.
- Naylor, N.R.; Atun, R.; Zhu, N.; Kulasabanathan, K.; Silva, S.; Chatterjee, A.; Knight, G.M.; Robotham, J.V. Estimating the Burden of Antimicrobial Resistance: A Systematic Literature Review. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2018**, *7*, 58. [[CrossRef](#)]
- Ronat, J.-B.; Natale, A.; Kesteman, T.; Andreumont, A.; Elamin, W.; Hardy, L.; Kanapathipillai, R.; Michel, J.; Langendorf, C.; Vandenberg, O.; et al. AMR in Low-Resource Settings: Médecins Sans Frontières Bridges Surveillance Gaps by Developing a Turnkey Solution, the Mini-Lab. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 1414–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Antimicrobial Consumption and Resistance in Bacteria from Humans and Animals: Third Joint Inter-Agency Report on Integrated Analysis of Antimicrobial Agent Consumption and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Humans and Food-Producing Animals in the EU/EEA: JIACRA III 2016–2018*; European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control; European Medicines Agency: Stockholm, Sweden, 2021.
- Price, C.P. Regular Review: Point of Care Testing. *BMJ* **2001**, *322*, 1285–1288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Noster, J.; Thelen, P.; Hamprecht, A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales—From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dortet, L.; Tandé, D.; de Briel, D.; Bernabeu, S.; Lasserre, C.; Gregorowicz, G.; Jousset, A.B.; Naas, T. MALDI-TOF for the Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae: Comparison of the Commercialized MBT STAR®-Carba IVD Kit with Two in-House MALDI-TOF Techniques and the RAPIDEC®CARBA NP. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 2352–2359. [[CrossRef](#)]
- Naseri, M.; Ziora, Z.M.; Simon, G.P.; Batchelor, W. ASSURED-compliant Point-of-care Diagnostics for the Detection of Human Viral Infections. *Rev. Med. Virol.* **2021**, *32*, e2263. [[CrossRef](#)]
- Land, K.J.; Boeras, D.I.; Chen, X.-S.; Ramsay, A.R.; Peeling, R.W. REASSURED Diagnostics to Inform Disease Control Strategies, Strengthen Health Systems and Improve Patient Outcomes. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 46–54. [[CrossRef](#)]

18. Tuena, C.; Semonella, M.; Fernández-Álvarez, J.; Colombo, D.; Ciproso, P. Predictive Precision Medicine: Towards the Computational Challenge. In *P5 eHealth: An Agenda for the Health Technologies of the Future*; Pravettoni, G., Triberti, S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; pp. 71–86. ISBN 978-3-030-27993-6.
19. Bahadır, E.B.; Sezgintürk, M.K. Lateral Flow Assays: Principles, Designs and Labels. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *82*, 286–306. [[CrossRef](#)]
20. Koczula, K.M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 111–120. [[CrossRef](#)]
21. Liu, Y.; Zhan, L.; Qin, Z.; Sackrison, J.; Bischof, J.C. Ultrasensitive and Highly Specific Lateral Flow Assays for Point-of-Care Diagnosis. *ACS Nano* **2021**, *15*, 3593–3611. [[CrossRef](#)]
22. Di Nardo, F.; Chiarello, M.; Cavalera, S.; Baggiani, C.; Anfossi, L. Ten Years of Lateral Flow Immunoassay Technique Applications: Trends, Challenges and Future Perspectives. *Sensors* **2021**, *21*, 5185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Posthuma-Trumpie, G.A.; Korf, J.; van Amerongen, A. Lateral Flow (Immuno)assay: Its Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats. A Literature Survey. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 569–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Park, J. An Optimized Colorimetric Readout Method for Lateral Flow Immunoassays. *Sensors* **2018**, *18*, 4084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Xiao, R.; Lu, L.; Rong, Z.; Wang, C.; Peng, Y.; Wang, F.; Wang, J.; Sun, M.; Dong, J.; Wang, D.; et al. Portable and Multiplexed Lateral Flow Immunoassay Reader Based on SERS for Highly Sensitive Point-of-Care Testing. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *168*, 112524. [[CrossRef](#)]
26. Mühlberg, E.; Umstätter, F.; Kleist, C.; Domhan, C.; Mier, W.; Uhl, P. Renaissance of Vancomycin: Approaches for Breaking Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant Bacteria. *Can. J. Microbiol.* **2020**, *66*, 11–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kitao, T.; Miyoshi-Akiyama, T.; Shimada, K.; Tanaka, M.; Narahara, K.; Saito, N.; Kirikae, T. Development of an Immunochromatographic Assay for the Rapid Detection of AAC(6′)-Iae-Producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 1382–1386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Oshiro, S.; Tada, T.; Kameoka, Y.; Suzuki, K.; Ohmagari, N.; Miyoshi-Akiyama, T.; Kirikae, T. Development and Evaluation of Immunochromatography to Detect Gram-Negative Bacteria Producing ArmA 16S rRNA Methylase Responsible for Aminoglycoside Resistance. *J. Microbiol. Methods* **2015**, *118*, 159–163. [[CrossRef](#)]
29. Turner, N.A.; Sharma-Kuinkel, B.K.; Maskarinec, S.A.; Eichenberger, E.M.; Shah, P.P.; Carugati, M.; Holland, T.L.; Fowler, V.G. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: An Overview of Basic and Clinical Research. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 203–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Yamada, K.; Wanchun, J.; Ohkura, T.; Murai, A.; Hayakawa, R.; Kinoshita, K.; Mizutani, M.; Okamoto, A.; Namikawa, T.; Ohta, M. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Using a Specific Anti-PBP2a Chicken IgY Antibody. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2013**, *66*, 103–108. [[CrossRef](#)]
31. Amini, M.; Pourmand, M.R.; Faridi-Majidi, R.; Heiat, M.; Mohammad Nezhady, M.A.; Safari, M.; Noorbakhsh, F.; Baharifar, H. Optimising Effective Parameters to Improve Performance Quality in Lateral Flow Immunoassay for Detection of PBP2a in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). *J. Exp. Nanosci.* **2020**, *15*, 266–279. [[CrossRef](#)]
32. Cattoir, V.; Leclercq, R. Twenty-Five Years of Shared Life with Vancomycin-Resistant Enterococci: Is It Time to Divorce? *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 731–742. [[CrossRef](#)]
33. Shadel, B.N.; Puzniak, L.A.; Gillespie, K.N.; Lawrence, S.J.; Kollef, M.; Mundy, L.M. Surveillance for Vancomycin-Resistant Enterococci: Type, Rates, Costs, and Implications. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2006**, *27*, 1068–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Prematunge, C.; MacDougall, C.; Johnstone, J.; Adomako, K.; Lam, F.; Robertson, J.; Garber, G. VRE and VSE Bacteremia Outcomes in the Era of Effective VRE Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2016**, *37*, 26–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bender, J.K.; Cattoir, V.; Hegstad, K.; Sadowy, E.; Coque, T.M.; Westh, H.; Hammerum, A.M.; Schaffer, K.; Burns, K.; Murchan, S.; et al. Update on Prevalence and Mechanisms of Resistance to Linezolid, Tigecycline and Daptomycin in Enterococci in Europe: Towards a Common Nomenclature. *Drug Resist. Updates* **2018**, *40*, 25–39. [[CrossRef](#)]
36. Oueslati, S.; Volland, H.; Cattoir, V.; Bernabeu, S.; Girlich, D.; Dulac, D.; Plaisance, M.; Laroche, M.; Dortet, L.; Simon, S.; et al. Development and Validation of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of VanA-Producing Enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 146–151. [[CrossRef](#)]
37. Oueslati, S.; Gonzalez, C.; Volland, H.; Cattoir, V.; Bernabeu, S.; Girlich, D.; Dulac, D.; Plaisance, M.; Boutigny, L.; Dortet, L.; et al. Rapid Detection of VanA/B-Producing Vancomycin-Resistant Enterococci Using Lateral Flow Immunoassay. *Diagnosis* **2021**, *11*, 1805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Jacoby, G.A.; Munoz-Price, L.S. The New β -Lactamases. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 380–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bush, K.; Jacoby, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 969–976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Woerther, P.-L.; Burdet, C.; Chachaty, E.; Andremont, A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 744–758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wareham, D.W.; Shah, R.; Betts, J.W.; Phee, L.M.; Momin, M.H.F.A. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 471–473. [[CrossRef](#)]

42. Kitao, T.; Miyoshi-Akiyama, T.; Tanaka, M.; Narahara, K.; Shimojima, M.; Kirikae, T. Development of an Immunochromatographic Assay for Diagnosing the Production of IMP-Type Metallo- β -Lactamases That Mediate Carbapenem Resistance in *Pseudomonas*. *J. Microbiol. Methods* **2011**, *87*, 330–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Notake, S.; Matsuda, M.; Tamai, K.; Yanagisawa, H.; Hiramatsu, K.; Kikuchi, K. Detection of IMP Metallo- β -Lactamase in Carbapenem-Nonsusceptible Enterobacteriaceae and Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Rods by Immunochromatography Assay. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 1762–1768. [[CrossRef](#)]
44. Tada, T.; Sekiguchi, J.-I.; Watanabe, S.; Kuwahara-Arai, K.; Mizutani, N.; Yanagisawa, I.; Hishinuma, T.; Zan, K.N.; Mya, S.; Tin, H.H.; et al. Assessment of a Newly Developed Immunochromatographic Assay for NDM-Type Metallo- β -Lactamase Producing Gram-Negative Pathogens in Myanmar. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19*, 565. [[CrossRef](#)]
45. Boutal, H.; Naas, T.; Devilliers, K.; Oueslati, S.; Dortet, L.; Bernabeu, S.; Simon, S.; Volland, H. Development and Validation of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of NDM-Producing Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2018–2029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Falagas, M.E.; Kasiakou, S.K.; Saravolatz, L.D. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *40*, 1333–1341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.-X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; et al. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 161–168. [[CrossRef](#)]
48. Ling, Z.; Yin, W.; Shen, Z.; Wang, Y.; Shen, J.; Walsh, T.R. Epidemiology of Mobile Colistin Resistance Genes *Mcr-1* to *Mcr-9*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 3087–3095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Volland, H.; Dortet, L.; Bernabeu, S.; Boutal, H.; Haenni, M.; Madec, J.-Y.; Robin, F.; Beyrouthy, R.; Naas, T.; Simon, S. Development and Multicentric Validation of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of MCR-1-Producing Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e01454-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bernabeu, S.; Ratnam, K.C.; Boutal, H.; Gonzalez, C.; Vogel, A.; Devilliers, K.; Plaisance, M.; Oueslati, S.; Malhotra-Kumar, S.; Dortet, L.; et al. A Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Identification of CTX-M-Producing Enterobacteriales from Culture Plates and Positive Blood Cultures. *Diagnostics* **2020**, *10*, 764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Bianco, G.; Boattini, M.; Iannaccone, M.; Cavallo, R.; Costa, C. Evaluation of the NG-Test CTX-M MULTI Immunochromatographic Assay for the Rapid Detection of CTX-M Extended-Spectrum- β -Lactamase Producers from Positive Blood Cultures. *J. Hosp. Infect.* **2020**, *105*, 341–343. [[CrossRef](#)]
52. Nishida, S.; Nakagawa, M.; Ouchi, Y.; Sakuma, C.; Nakajima, Y.; Shimizu, H.; Shibata, T.; Kurosawa, Y.; Maruyama, T.; Okumura, C.J.; et al. A Rabbit Monoclonal Antibody-Mediated Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriales. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *185*, 317–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Partridge, S.R.; Kwong, S.M.; Firth, N.; Jensen, S.O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00088-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Anfossi, L.; Di Nardo, F.; Cavalera, S.; Giovannoli, C.; Baggiani, C. Multiplex Lateral Flow Immunoassay: An Overview of Strategies towards High-Throughput Point-of-Need Testing. *Biosensors* **2018**, *9*, 2. [[CrossRef](#)]
55. Hamprecht, A.; Vehreschild, J.J.; Seifert, H.; Saleh, A. Rapid Detection of NDM, KPC and OXA-48 Carbapenemases Directly from Positive Blood Cultures Using a New Multiplex Immunochromatographic Assay. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Glupczynski, Y.; Evrard, S.; Huang, T.-D.; Bogaerts, P. Evaluation of the RESIST-4 K-SeT Assay, a Multiplex Immunochromatographic Assay for the Rapid Detection of OXA-48-Like, KPC, VIM and NDM Carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 1284–1287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Hong, J.; Kang, D.; Kim, D. Performance Evaluation of the Newly Developed In Vitro Rapid Diagnostic Test for Detecting OXA-48-Like, KPC-, NDM-, VIM- and IMP-Type Carbapenemases: The RESIST-5 O.K.N.V.I. Multiplex Lateral Flow Assay. *Antibiotics* **2021**, *10*, 460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. El Kettani, A.; Maaloum, F.; Nzoyikorera, N.; Khalis, M.; Katfy, K.; Belabbes, H.; Zerouali, K. Evaluation of the Performances of the Rapid Test RESIST-5 O.O.K.N.V Used for the Detection of Carbapenemases-Producing Enterobacteriales. *Antibiotics* **2021**, *10*, 953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Han, R.; Guo, Y.; Peng, M.; Shi, Q.; Wu, S.; Yang, Y.; Zheng, Y.; Yin, D.; Hu, F. Evaluation of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5, RESIST-5 O.O.K.N.V., and IMP K-SeT for Rapid Detection of KPC-, NDM-, IMP-, VIM-Type, and OXA-48-like Carbapenemase Among Enterobacteriales. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 3296. [[CrossRef](#)]
60. Boutal, H.; Vogel, A.; Bernabeu, S.; Devilliers, K.; Creton, E.; Cotellon, G.; Plaisance, M.; Oueslati, S.; Dortet, L.; Jousset, A.; et al. A Multiplex Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-Type and OXA-48-like Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 909–915. [[CrossRef](#)]
61. Hopkins, K.L.; Meunier, D.; Naas, T.; Volland, H.; Woodford, N. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 Multiplex Immunochromatographic Assay for the Detection of KPC, OXA-48-Like, NDM, VIM and IMP Carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 3523–3526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Findlay, J.; Hopkins, K.L.; Meunier, D.; Woodford, N. Evaluation of Three Commercial Assays for Rapid Detection of Genes Encoding Clinically Relevant Carbapenemases in Cultured Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 1338–1342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Volland, H.; Girlich, D.; Laguide, M.; Gonzalez, C.; Paris, V.; Laroche, M.; Oueslati, S.; Dortet, L.; Simon, S.; Naas, T. Improvement of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5 Assay for the Detection of IMP Variants Previously Undetected. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *64*, e01940-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Potron, A.; Fournier, D.; Emeraud, C.; Triponney, P.; Plésiat, P.; Naas, T.; Dortet, L. Evaluation of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5 for Rapid Identification of Carbapenemase in Nonfermenters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00968-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Bodendoerfer, E.; Keller, P.M.; Mancini, S. Rapid Identification of NDM-, KPC-, IMP-, VIM- and OXA-48-like Carbapenemase-Producing Enterobacterales from Blood Cultures by a Multiplex Lateral Flow Immunoassay. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 1749–1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Giordano, L.; Fiori, B.; D'Inzeo, T.; Parisi, G.; Liotti, F.M.; Menchinelli, G.; De Angelis, G.; De Maio, F.; Luzzaro, F.; Sanguinetti, M.; et al. Simplified Testing Method for Direct Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Positive Blood Cultures Using the NG-Test Carba 5 Assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00550-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Takissian, J.; Bonnin, R.A.; Naas, T.; Dortet, L. NG-Test Carba 5 for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacterales from Positive Blood Cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00011-19. [[CrossRef](#)]
68. Jenkins, S.; Ledebore, N.A.; Westblade, L.F.; Burnham, C.-A.D.; Faron, M.L.; Bergman, Y.; Yee, R.; Mesich, B.; Gerstbrein, D.; Wallace, M.A.; et al. Evaluation of NG-Test Carba 5 for Rapid Phenotypic Detection and Differentiation of Five Common Carbapenemase Families: Results of a Multicenter Clinical Evaluation. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e00344-20. [[CrossRef](#)]
69. Huang, Y.-T.; Kuo, Y.-W.; Lee, N.-Y.; Tien, N.; Liao, C.-H.; Teng, L.-J.; Ko, W.-C.; Hsueh, P.-R. Evaluating NG-Test CARBA 5 Multiplex Immunochromatographic and Cepheid Xpert CARBA-R Assays among Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Isolates Associated with Bloodstream Infection. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e01728-21. [[CrossRef](#)]
70. Liu, Z.; Bai, L.; Liu, J.; Lei, J.; Gao, X.; Tenover, F.C.; Lei, K.; Tang, Y.-W.; Geng, Y.; He, A. Parallel Validation of the NG-Test Carba 5 and the Xpert Carba-R for Detection and Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacterales Causing Bloodstream Infections. *J. Mol. Diagn.* **2021**, *23*, 1007–1014. [[CrossRef](#)]
71. Yoon, J.; Kim, C.H.; Yoon, S.-Y.; Lim, C.S.; Lee, C.K. Application of a Multiplex Immunochromatographic Assay for Rapid Identification of Carbapenemases in a Clinical Microbiology Laboratory: Performance and Turn-around-Time Evaluation of NG-Test Carba 5. *BMC Microbiol.* **2021**, *21*, 260. [[CrossRef](#)]
72. Zhu, Y.; Jia, P.; Li, X.; Wang, T.; Zhang, J.; Zhang, G.; Duan, S.; Kang, W.; Xu, Y.; Yang, Q. Carbapenemase Detection by NG-Test CARBA 5—a Rapid Immunochromatographic Assay in Carbapenem-Resistant Enterobacterales Diagnosis. *Ann. Transl. Med.* **2021**, *9*, 769. [[CrossRef](#)]
73. Baeza, L.L.; Pfennigwerth, N.; Greissl, C.; Göttig, S.; Saleh, A.; Stelzer, Y.; Gattermann, S.G.; Hamprecht, A. Comparison of Five Methods for Detection of Carbapenemases in Enterobacterales with Proposal of a New Algorithm. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 1286.e9–1286.e15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Andryukov, B.G. Six Decades of Lateral Flow Immunoassay: From Determining Metabolic Markers to Diagnosing COVID-19. *AIMS Microbiol.* **2020**, *6*, 280–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Giske, C.G.; Martinez-Martinez, L.; Canton, R.; Stefani, S.; Skov, R.; Glupczynski, Y.; Nordmann, P.; Wootton, M.; Miriagou, V.; Skov Simonsen, G.; et al. *EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance*; EUCAST—European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Växjö, Sweden, 2017; p. 43.
76. Jorgensen, J.H.; Ferraro, M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49*, 1749–1755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Drieux, L.; Brossier, F.; Sougakoff, W.; Jarlier, V. Phenotypic Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production in Enterobacteriaceae: Review and Bench Guide. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14* (Suppl. 1), 90–103. [[CrossRef](#)]
78. Nordmann, P.; Poirel, L. Résistances aux antibiotiques émergentes et importantes chez les bactéries Gram négatif: Épidémiologie, aspects théoriques et détection. *Rev. Méd. Suisse* **2014**, *10*, 902–907.
79. Cury, A.P.; Andreatzi, D.; Maffucci, M.; Caiaffa-Junior, H.H.; Rossi, F. The Modified Hodge Test Is a Useful Tool for Ruling out *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase. *Clinics* **2012**, *67*, 1427–1431. [[CrossRef](#)]
80. Nordmann, P.; Poirel, L.; Dortet, L. Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1503–1507. [[CrossRef](#)]
81. Shinde, S.; Gupta, R.; Raut, S.S.; Nataraj, G.; Mehta, P.R. Carba NP as a Simpler, Rapid, Cost-Effective, and a More Sensitive Alternative to Other Phenotypic Tests for Detection of Carbapenem Resistance in Routine Diagnostic Laboratories. *J. Lab. Physic.* **2017**, *9*, 100–103. [[CrossRef](#)]
82. Vrioni, G.; Mamali, V.; Zarkotou, O.; Voulgari, E.; Dimitroulia, E.; Themeli-Digalaki, K.; Pournaras, S.; Tsakris, A. Performance of the β LACTATM Test for Rapid Detection of Expanded-Spectrum Cephalosporin-Non-Susceptible Enterobacteriaceae. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2017**, *10*, 285–288. [[CrossRef](#)]
83. Bogaerts, P.; Oueslati, S.; Meunier, D.; Nonhoff, C.; Yunus, S.; Massart, M.; Denis, O.; Woodford, N.; Hopkins, K.L.; Naas, T.; et al. Multicentre Evaluation of the BYG Carba v2.0 Test, a Simplified Electrochemical Assay for the Rapid Laboratory Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9937. [[CrossRef](#)]
84. Hrabák, J.; Chudácková, E.; Walková, R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-ToF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: From Research to Routine Diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 103–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

85. Sparbier, K.; Schubert, S.; Weller, U.; Boogen, C.; Kostrzewa, M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β -Lactam Antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 927–937. [CrossRef] [PubMed]
86. Perry, J.D. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 449–479. [CrossRef] [PubMed]
87. Gutiérrez, S.; Correa, A.; Hernández-Gómez, C.; De La Cadena, E.; Pallares, C.; Villegas, M.V. Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas Aeruginosa*: Evaluation of the Carbapenem Inactivation Method (CIM). *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* **2019**, *37*, 648–651. [CrossRef]
88. Jing, X.; Zhou, H.; Min, X.; Zhang, X.; Yang, Q.; Du, S.; Li, Y.; Yu, F.; Jia, M.; Zhan, Y.; et al. The Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) for Simple and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2391. [CrossRef]
89. Muntean, M.-M.; Muntean, A.-A.; Gauthier, L.; Creton, E.; Cotellon, G.; Popa, M.I.; Bonnin, R.A.; Naas, T. Evaluation of the Rapid Carbapenem Inactivation Method (rCIM): A Phenotypic Screening Test for Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 900–908. [CrossRef]
90. Laraki, N.; Franceschini, N.; Rossolini, G.M.; Santucci, P.; Meunier, C.; de Pauw, E.; Amicosante, G.; Frère, J.M.; Galleni, M. Biochemical Characterization of the *Pseudomonas Aeruginosa* 101/1477 Metallo- β -Lactamase IMP-1 Produced by *Escherichia Coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 902–906. [CrossRef]
91. Takeuchi, D.; Akeda, Y.; Sugawara, Y.; Sakamoto, N.; Yamamoto, N.; Shanmugakani, R.K.; Ishihara, T.; Shintani, A.; Tomono, K.; Hamada, S. Establishment of a Dual-Wavelength Spectrophotometric Method for Analysing and Detecting Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15689. [CrossRef]
92. Datta, S.; Dey, R.; Dey, J.B.; Ghosh, S. A Comparative Study of Modified Hodge Test and Carba NP Test for Detecting Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacteria. *Med. J. Dr. D. Y. Patil Univ.* **2017**, *10*, 365. [CrossRef]
93. Bogaerts, P.; Yunus, S.; Massart, M.; Huang, T.-D.; Glupczynski, Y. Evaluation of the BYG Carba Test, a New Electrochemical Assay for Rapid Laboratory Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 349–358. [CrossRef]
94. Oviaño, M.; Rodicio, M.R.; Heinisch, J.J.; Rodicio, R.; Bou, G.; Fernández, J. Analysis of the Degradation of Broad-Spectrum Cephalosporins by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae Using MALDI-TOF MS. *Microorganisms* **2019**, *7*, 614. [CrossRef] [PubMed]
95. Milieu de Culture. Wikipédia 2021. Available online: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Milieu_de_culture&oldid=185004580 (accessed on 19 June 2022).
96. Van der Zwaluw, K.; de Haan, A.; Pluister, G.; Bootsma, H.; de Neeling, A.D.; Schouls, L. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0213690. [CrossRef] [PubMed]
97. Aguirre-Quinonero, A.; Martínez-Martínez, L. Non-Molecular Detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae Clinical Isolates. *J. Infect. Chemother.* **2017**, *23*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
98. Choquet, M.; Guiheneuf, R.; Castelain, S.; Cattoir, V.; Auzou, M.; Pluquet, E.; Decroix, V. Comparison of MALDI-ToF MS with the Rapidec Carba NP Test for the Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *37*, 149–155. [CrossRef] [PubMed]
99. Moguet, C.; Gonzalez, C.; Sallustrau, A.; Gelhaye, S.; Naas, T.; Simon, S.; Volland, H. Detection of Expanded-Spectrum Cephalosporin Hydrolysis by Lateral Flow Immunoassay. *Microb. Biotechnol.* **2021**, *15*, 603–612. [CrossRef]
100. Gonzalez, C.; Moguet, C.; Chalin, A.; Oueslati, S.; Dortet, L.; Simon, S.; Volland, H.; Naas, T. Comparison of Three Expanded-Spectrum Cephalosporin Hydrolysis Assays and the NG-Test CTX-M Multi Assay That Detects All CTX-M-Like Enzymes. *Diagnostics* **2022**, *12*, 197. [CrossRef]
101. Moguet, C.; Gonzalez, C.; Naas, T.; Simon, S.; Volland, H. Multiplex Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Expanded-Spectrum Hydrolysis and CTX-M Enzymes. *Diagnostics* **2022**, *12*, 190. [CrossRef]
102. Hitchens, A.P.; Leikind, M.C. The Introduction of Agar-Agar into Bacteriology. *J. Bacteriol.* **1939**, *37*, 485–493. [CrossRef]
103. Kawanishi, T.; Shiraishi, T.; Okano, Y.; Sugawara, K.; Hashimoto, M.; Maejima, K.; Komatsu, K.; Kakizawa, S.; Yamaji, Y.; Hamamoto, H.; et al. New Detection Systems of Bacteria Using Highly Selective Media Designed by SMART: Selective Medium-Design Algorithm Restricted by Two Constraints. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16512. [CrossRef]
104. Oviaño, M.; de la Ramírez, C.L.; Barbeyto, L.P.; Bou, G. Rapid Direct Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Clinical Urine Samples by MALDI-TOF MS Analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 1350–1354. [CrossRef]
105. Fleurbaaij, F.; Goessens, W.; van Leeuwen, H.C.; Kraakman, M.E.M.; Bernards, S.T.; Hensbergen, P.J.; Kuijper, E.J. Direct Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases (CTX-M) from Blood Cultures by LC-MS/MS Bottom-up Proteomics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 1621–1628. [CrossRef] [PubMed]
106. Meier, M.; Hamprecht, A. Systematic Comparison of Four Methods for Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriales Directly from Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00709-19. [CrossRef] [PubMed]
107. Raja, S.; Ching, J.; Xi, L.; Hughes, S.J.; Chang, R.; Wong, W.; McMillan, W.; Gooding, W.E.; McCarty, K.S.; Chestney, M.; et al. Technology for Automated, Rapid, and Quantitative PCR or Reverse Transcription-PCR Clinical Testing. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 882–890. [CrossRef]

108. Hagan, K.A.; Reedy, C.R.; Uchimoto, M.L.; Basu, D.; Engel, D.A.; Landers, J.P. An Integrated, Valveless System for Microfluidic Purification and Reverse Transcription-PCR Amplification of RNA for Detection of Infectious Agents. *Lab. Chip.* **2011**, *11*, 957–961. [CrossRef]
109. Xu, G.; Hsieh, T.-M.; Lee, D.Y.S.; Ali, E.M.; Xie, H.; Looi, X.L.; Koay, E.S.-C.; Li, M.-H.; Ying, J.Y. A Self-Contained All-in-One Cartridge for Sample Preparation and Real-Time PCR in Rapid Influenza Diagnosis. *Lab. Chip.* **2010**, *10*, 3103–3111. [CrossRef] [PubMed]
110. Kim, D.-K.; Kim, H.S.; Pinto, N.; Jeon, J.; D'Souza, R.; Kim, M.S.; Choi, J.Y.; Yong, D.; Jeong, S.H.; Lee, K. Xpert CARBA-R Assay for the Detection of Carbapenemase-Producing Organisms in Intensive Care Unit Patients of a Korean Tertiary Care Hospital. *Ann. Lab. Med.* **2016**, *36*, 162–165. [CrossRef] [PubMed]
111. Li, Z.-L.; Luo, Q.-B.; Xiao, S.-S.; Lin, Z.-H.; Liu, Y.-L.; Han, M.-Y.; Zhong, J.-H.; Ji, T.-X.; Guo, X.-G. Evaluation of GeneXpert vanA/vanB in the Early Diagnosis of Vancomycin-Resistant Enterococci Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009869. [CrossRef]
112. Bianco, G.; Boattini, M.; van Asten, S.A.V.; Iannaccone, M.; Zanotto, E.; Zaccaria, T.; Bernards, A.T.; Cavallo, R.; Costa, C. RESIST-5 O.O.K.N.V. and NG-Test Carba 5 Assays for the Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacterales from Positive Blood Cultures: A Comparative Study. *J. Hosp. Infect.* **2020**, *105*, 162–166. [CrossRef]
113. Wareham, D.W.; Phee, L.M.; Abdul Momin, M.H.F. Direct Detection of Carbapenem Resistance Determinants in Clinical Specimens Using Immunochromatographic Lateral Flow Devices. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1997–1998. [CrossRef]
114. Baer, D.; Azrad, M.; Saleh, N.; Peretz, A. Detection of Carbapenem-Resistant Enterobacterales in Simulated Blood Culture in 15 Minutes. *Life* **2021**, *11*, 145. [CrossRef]
115. Boattini, M.; Bianco, G.; Iannaccone, M.; Ghibaud, D.; Almeida, A.; Cavallo, R.; Costa, C. Fast-Track Identification of CTX-M-Extended-Spectrum- β -Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacterales in Bloodstream Infections: Implications on the Likelihood of Deduction of Antibiotic Susceptibility in Emergency and Internal Medicine Departments. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *40*, 1495–1501. [CrossRef] [PubMed]
116. Vasilakopoulou, A.; Karakosta, P.; Vourli, S.; Kalogeropoulou, E.; Pournaras, S. Detection of KPC, NDM and VIM-Producing Organisms Directly from Rectal Swabs by a Multiplex Lateral Flow Immunoassay. *Microorganisms* **2021**, *9*, 942. [CrossRef] [PubMed]
117. Fauconnier, C.; Dodemont, M.; Depouhon, A.; Anantharajah, A.; Verroken, A.; Rodriguez-Villalobos, H. Lateral Flow Immunochromatographic Assay for Rapid Screening of Faecal Carriage of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 357–359. [CrossRef]
118. Vasala, A.; Hytönen, V.P.; Laitinen, O.H. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 308. [CrossRef] [PubMed]
119. Volkmann, H.; Schwartz, T.; Bischoff, P.; Kirchen, S.; Obst, U. Detection of Clinically Relevant Antibiotic-Resistance Genes in Municipal Wastewater Using Real-Time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* **2004**, *56*, 277–286. [CrossRef] [PubMed]
120. PCR en Microbiologie: De l'Amplification de l'ADN à l'Interprétation du Résultat. Available online: <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2007/revue-medicale-suisse-106/pcr-en-microbiologie-de-l-adn-a-l-interpretation-du-resultat> (accessed on 28 June 2021).
121. Singh, J.; Birbian, N.; Sinha, S.; Goswami, A. Reaction (pcr, P.C. Review Article A Critical Review on PCR, Its Types and Applications. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* **2014**, *1*, 65–80.
122. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Staphylococcus Aureus. Available online: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003> (accessed on 16 September 2021).
123. Aktas, G.B.; Wichers, J.H.; Skouridou, V.; van Amerongen, A.; Masip, L. Nucleic Acid Lateral Flow Assays Using a Conjugate of a DNA Binding Protein and Carbon Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 426. [CrossRef]
124. Kostoulas, P.; Eusebi, P.; Hartnack, S. Diagnostic Accuracy Estimates for COVID-19 Real-Time Polymerase Chain Reaction and Lateral Flow Immunoassay Tests With Bayesian Latent-Class Models. *Am. J. Epidemiol.* **2021**, *190*, 1689–1695. [CrossRef]
125. Pecchia, S.; Da Lio, D. Development of a Rapid PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay (PCR-NALFIA) Based on rDNA IGS Sequence Analysis for the Detection of Macrophomina Phaseolina in Soil. *J. Microbiol. Methods* **2018**, *151*, 118–128. [CrossRef]
126. Moers, A.P.H.A.; Hallett, R.L.; Burrow, R.; Schallig, H.D.F.H.; Sutherland, C.J.; van Amerongen, A. Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms in Plasmodium Falciparum by PCR Primer Extension and Lateral Flow Immunoassay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 365–371. [CrossRef]
127. Rajendran, V.K.; Bakthavathsalam, P.; Bergquist, P.L.; Sunna, A. Smartphone Detection of Antibiotic Resistance Using Convective PCR and a Lateral Flow Assay. *Sens. Actuators B Chem.* **2019**, *298*, 126849. [CrossRef]
128. Kievits, T.; van Gemen, B.; van Strijp, D.; Schukink, R.; Dircks, M.; Adriaanse, H.; Malek, L.; Sookninan, R.; Lens, P. NASBATM Isothermal Enzymatic in Vitro Nucleic Acid Amplification Optimized for the Diagnosis of HIV-1 Infection. *J. Virol. Methods* **1991**, *35*, 273–286. [CrossRef]
129. Fire, A.; Xu, S.Q. Rolling Replication of Short DNA Circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4641–4645. [CrossRef] [PubMed]
130. Walker, G.T.; Fraiser, M.S.; Schram, J.L.; Little, M.C.; Nadeau, J.G.; Malinowski, D.P. Strand Displacement Amplification—An Isothermal, in Vitro DNA Amplification Technique. *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 1691–1696. [CrossRef] [PubMed]
131. Piepenburg, O.; Williams, C.H.; Stemple, D.L.; Armes, N.A. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e204. [CrossRef]

132. Vincent, M.; Xu, Y.; Kong, H. Helicase-Dependent Isothermal DNA Amplification. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 795–800. [CrossRef]
133. Notomi, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, e63. [CrossRef]
134. Wong, Y.-P.; Othman, S.; Lau, Y.-L.; Radu, S.; Chee, H.-Y. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Versatile Technique for Detection of Micro-Organisms. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124*, 626–643. [CrossRef]
135. Loop-Mediated Isothermal Amplification NEB. Available online: <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp> (accessed on 2 September 2021).
136. Liu, D.; He, W.; Jiang, M.; Zhao, B.; Ou, X.; Liu, C.; Xia, H.; Zhou, Y.; Wang, S.; Song, Y.; et al. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Coupled Lateral Flow Dipstick Targeting erm(41) for Detection of Mycobacterium Abscessus and Mycobacterium Massiliense. *AMB Express* **2019**, *9*, 11. [CrossRef]
137. Foo, P.C.; Nurul Najian, A.B.; Muhamad, N.A.; Ahamad, M.; Mohamed, M.; Yean Yean, C.; Lim, B.H. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Reaction as Viable PCR Substitute for Diagnostic Applications: A Comparative Analysis Study of LAMP, Conventional PCR, Nested PCR (nPCR) and Real-Time PCR (qPCR) Based on Entamoeba Histolytica DNA Derived from Faecal Sample. *BMC Biotechnol.* **2020**, *20*, 34. [CrossRef]
138. Mori, Y.; Kitao, M.; Tomita, N.; Notomi, T. Real-Time Turbidimetry of LAMP Reaction for Quantifying Template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *59*, 145–157. [CrossRef] [PubMed]
139. Nancy, K.; Lillian, W.; Wilkinson, M.; Claire, M.; Luna, K.; Dorcas, W.; Rosemary, G.; Japheth, L.; Christine, I.; Emily, W.; et al. Optimization of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay as a Point-of-Care Tool for the Detection of Wuchereria Bancrofti in Human Blood in Tana River Delta, Kenya. *J. Parasitol. Res.* **2021**, *2021*, e6650870. [CrossRef] [PubMed]
140. Gadkar, V.J.; Goldfarb, D.M.; Gantt, S.; Tilley, P.A.G. Real-Time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-Quenching and De-Quenching Fluorogenic Probes. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5548. [CrossRef] [PubMed]
141. Chen, X.; Ma, K.; Yi, X.; Xiong, L.; Wang, Y.; Li, S. The Rapid and Visual Detection of Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Using Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification Linked to a Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2020**, *9*, 111. [CrossRef] [PubMed]
142. Gong, L.; Tang, F.; Liu, E.; Liu, X.; Xu, H.; Wang, Y.; Song, Y.; Liang, J. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Combined with a Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor for Rapid Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene Mcr-1. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0249582. [CrossRef] [PubMed]
143. Wang, Y.; Wang, Y.; Li, D.; Xu, J.; Ye, C. Detection of Nucleic Acids and Elimination of Carryover Contamination by Using Loop-Mediated Isothermal Amplification and Antarctic Thermal Sensitive Uracil-DNA-Glycosylase in a Lateral Flow Biosensor: Application to the Detection of Streptococcus Pneumoniae. *Microchim. Acta* **2018**, *185*, 212. [CrossRef]
144. Chen, Y.; Cheng, N.; Xu, Y.; Huang, K.; Luo, Y.; Xu, W. Point-of-Care and Visual Detection of P. Aeruginosa and Its Toxin Genes by Multiple LAMP and Lateral Flow Nucleic Acid Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *81*, 317–323. [CrossRef] [PubMed]
145. Njiru, Z.K. Rapid and Sensitive Detection of Human African Trypanosomiasis by Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with a Lateral-Flow Dipstick. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *69*, 205–209. [CrossRef] [PubMed]
146. Lee, D.; Kim, Y.T.; Lee, J.W.; Kim, D.H.; Seo, T.S. An Integrated Direct Loop-Mediated Isothermal Amplification Microdevice Incorporated with an Immunochromatographic Strip for Bacteria Detection in Human Whole Blood and Milk without a Sample Preparation Step. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 273–279. [CrossRef]
147. Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)—Lateral Flow. Available online: <https://www.milenia-biotec.com/en/isothermal-amplification-lateral-flow/> (accessed on 5 May 2021).
148. Gong, L.; Liu, E.; Che, J.; Li, J.; Liu, X.; Xu, H.; Liang, J. Multiple Cross Displacement Amplification Coupled With Gold Nanoparticles-Based Lateral Flow Biosensor for Detection of the Mobilized Colistin Resistance Gene Mcr-1. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 226. [CrossRef] [PubMed]
149. Chen, C.; Zhao, Q.; Guo, J.; Li, Y.; Chen, Q. Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Using Simultaneous Detection of mecA, Nuc, and femB by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Curr. Microbiol.* **2017**, *74*, 965–971. [CrossRef] [PubMed]
150. Williams, M.R.; Stedtfeld, R.D.; Waseem, H.; Stedtfeld, T.; Upham, B.; Khalife, W.; Etchebarne, B.; Hughes, M.; Tiedje, J.M.; Hashsham, S.A. Implications of Direct Amplification for Measuring Antimicrobial Resistance Using Point-of-Care Devices. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 1229–1241. [CrossRef] [PubMed]
151. Alamolhoda, S.Z.; Zarghami, N.; Kahroba, H.; Mehdipour, A.; Pourhassan-Moghaddam, M.; Jahanban-Esfahlan, R.; Milani, M. Isothermal Amplification of Nucleic Acids Coupled with Nanotechnology and Microfluidic Platforms for Detecting Antimicrobial Drug Resistance and Beyond. *Adv. Pharm. Bull.* **2021**, *12*, 58–76. [CrossRef]

V.3.2.1. La technologie du test immunochromatographique par flux latéral

Depuis les années 1950, les principes de base de la technologie de détection en test par flux latéral (LFA : Lateral Flow Assay) n'ont fait que d'évoluer à la suite de l'amélioration des réactifs impliqués dans leur fabrication et notamment, l'apparition des anticorps monoclonaux avec le développement des cellules fusionnées (cellule splénique et cellule de myélome) (239). A ce jour, au moins 500 brevets ont été déposés sur divers aspects de la technologie. L'immunochromatographie à flux latéral (LFIA : Lateral Flow ImmunoAssay) est une catégorie de LFA qui utilise les anticorps comme sonde spécifique d'une cible à détecter. Le test LFIA est considéré comme un dispositif de diagnostic détectant au moins un analyte susceptible d'être présent dans un échantillon liquide. Ce système repose sur un support poreux sous forme de bandelettes sur lesquelles sont intégrés des réactifs séchés. En outre, le test LFIA est largement utilisé pour la détection qualitative, dans de rares cas pour la détection semi-quantitative et dans de très rares cas pour la détection quantitative d'Ag, d'anticorps monoclonaux et de produits d'amplification génique (240). Il est retrouvé dans différents domaines tels que la médecine humaine, la sécurité alimentaire, la médecine vétérinaire, et dans l'environnement (241). Cette technologie permet ainsi de détecter diverses cibles comme des protéines (anticorps, enzymes, drogues, hormones...), à partir d'une grande variété d'échantillons biologiques tels que l'urine, la salive, la sueur, le sérum, le plasma, le sang total ainsi que d'autres fluides biologiques (240). Comme les autres technologies, les tests LFIA possèdent des avantages et des inconvénients décrits dans le Tableau 5.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Développement d'un produit relativement court ✓ Facilité de production du fait des équipements et procédés déjà développés ✓ Durée de conservation de 24 à 36 mois, sans besoin de réfrigération ✓ Grande sensibilité, spécificité, et bonne stabilité ✓ Coût relativement faible ✓ Formation minimale requise pour les utilisateurs ✓ Facilement transportables 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Miniaturisation des volumes d'échantillonnage ✓ Multiplexage de différents marqueurs : potentielles réactions croisées ✓ Perte de sensibilité par rapport à d'autres techniques (ELISA, PCR) ✓ Intégration difficile d'électronique embarquée et de fonctions de contrôle qualité ✓ Rendu qualitatif (difficulté de mettre au point des systèmes de tests LFIA semi-quantitatif et quantitatif) ✓ Perte de l'analyte (temps de contact réduit entre les anticorps et l'analyte → Liaison incomplète) ✓ Possibilité de FN (apparition de nouvelles mutations) et de FP

Tableau 5 : Les avantages et les inconvénients d'un test immunochromatographique à flux latéral.

Adapté de Koczula K. M. et al. (240).

V.3.2.1.1. La composition du test immunochromatographique à flux latéral

Ce dispositif est donc constitué de plusieurs matériaux fixés et superposés sur un support de polychlorure de vinyle : le papier échantillon (PE) ; le papier conjugué (PC) ; la membrane de nitrocellulose (MbN) ; le papier absorbant (PA) (Figure 43).

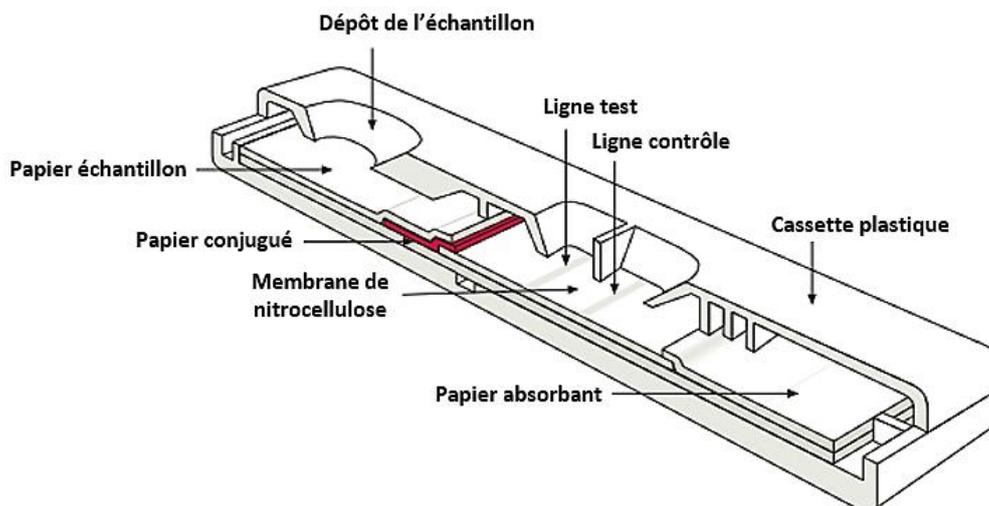


Figure 43 : La composition d'un test rapide.

Adapté de Yetisen A. K. et al. (242). Descriptif : La bandelette est composée de trois zones assemblées sur un support plastifié, le tout déposé dans une cassette plastique. La zone 1 est la zone de dépôt de l'échantillon. Elle est constituée du papier échantillon et du papier conjugué sur lequel l'anticorps marqué (spécifique d'une cible) a été déposé et séché. La zone 2 est constituée de la membrane de nitrocellulose sur laquelle plusieurs lignes d'anticorps y sont apposées et définissent la ligne test (spécifique d'une cible) et la ligne contrôle (souvent dirigée contre le réactif marqué). La zone 3 est une zone d'absorption avec le papier absorbant qui permet la bonne migration de l'échantillon à travers la bandelette.

Le PE est l'endroit où est déposé l'échantillon. Les paramètres de ce papier fluctuent en fonction du type d'échantillon visé. En effet, certains interférents (globules rouges (taille importante), urée (dénaturant), etc.) doivent être retenus par ce papier pour favoriser la migration de l'échantillon ou d'être à l'origine de FP. Ainsi, le type de papier ainsi que les traitements chimiques (détergent, chélateur, sucre, conservateur, protéines...) doivent être adaptés selon les spécifications techniques attendues (240).

Le PC contient un réactif marqué (antigène (Ag) ou anticorps monoclonal) capable d'être reconnu ou de reconnaître l'analyte recherché (Ag ou anticorps monoclonal). Ce réactif, séché sur le PC, est couplé à un marqueur permettant sa détection. Les marqueurs les plus couramment utilisés pour le test LFIA sont les nanoparticules d'or, qui sont couplées aux anticorps par des liaisons ioniques. Les paramètres liés au papier utilisé, aux traitements chimiques (détergent, chélateur, sucre, conservateur, protéines, nanoparticules d'or, anticorps...), aux réactifs de détection et à la méthode de dépôt, sont des facteurs influençant l'interaction entre l'analyte et les réactifs de détection (240).

La MbN est composée de nitrocellulose qui est un ester de cellulose. Sur cette MbN, les réactifs de capture sont immobilisés sous la forme de lignes. La liaison entre les réactifs de capture et la MbN se fait par adsorption passive. La MbN doit respecter des critères définis tels que la porosité, la stabilité dans le temps, la capacité de charge de protéines, et l'homogénéité au niveau de la nitrocellulose. La porosité est choisie en fonction de la taille des marqueurs utilisés, de la taille de l'analyte recherché et de la vitesse à laquelle la migration de l'échantillon est désirée lors du test. Ainsi, plus la vitesse de migration est lente et plus le temps de contact entre le réactif de détection et l'analyte recherché est long (240).

Le PA maintient la migration en absorbant l'échantillon ayant parcouru l'ensemble de la MbN. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour le choix du PA tels que sa composition, son épaisseur, sa longueur et sa capacité d'absorption. Cette dernière est choisie selon le volume et le type d'échantillon testé (240).

La longueur de ces différents matériaux est de 30 cm. Une fois les modifications (dépôt du réactif de détection, impression des lignes...) apportées et le montage effectué, les bandelettes sont découpées en largeur de 5 mm. Ces dernières sont montées dans des boîtiers plastiques, appelés cassettes, qui sont des éléments clés pour faciliter l'utilisation

des bandelettes, fournir des points de pression permettant le contact entre les composants superposés (PE, PC, PA) et garantir la bonne migration de l'échantillon. De plus, ces cassettes ont une zone de dépôt adaptée pour le dépôt de l'échantillon et une fenêtre de lecture au niveau des zones réactives sur la MbN (243).

V.3.2.1.2. Le déroulement du test LFIA

D'un point de vue fonctionnel, un échantillon liquide contenant l'analyte est déposé dans la zone de dépôt du test au niveau du PE. L'échantillon migre vers le PC ce qui provoque la resolubilisation du réactif de détection pour interagir avec l'analyte ciblé, si celui-ci est présent pour former des complexes marqués Ag/Anticorps. Cette migration se poursuit sur la MbN au niveau de la ligne test (LT) (capture des complexes marqués) et de la ligne contrôle (LC) (excès de réactif de détection) et se termine dans le PA. Ainsi, après migration de l'échantillon, des signaux peuvent apparaître sur la MbN au niveau des lignes de capture si l'analyte est présent, comme illustrée dans la Figure 44 (243). La lecture d'intensité des lignes peut être faite visuellement ou à l'aide d'un lecteur dédié. Elle évolue à mesure que l'analyte présent dans l'échantillon est détecté. Ces signaux peuvent être de différentes natures en fonction du marqueur utilisé : colorés, fluorescents, magnétiques ou carbonés (244). Il est à noter qu'en cas de non-absorption du liquide par le PA, l'effet de « backflow » est visible, c'est-à-dire que le surplus d'échantillon et du réactif de détection retournent sur la MbN. Cet effet provoque un bruit de fond considérable sur la MbN ce qui détériore la qualité de lecture du résultat (240). Il est possible de tester plusieurs analytes simultanément dans les mêmes conditions en ajoutant des LT supplémentaires sur la MbN et des réactifs de détection dans le PC (243).

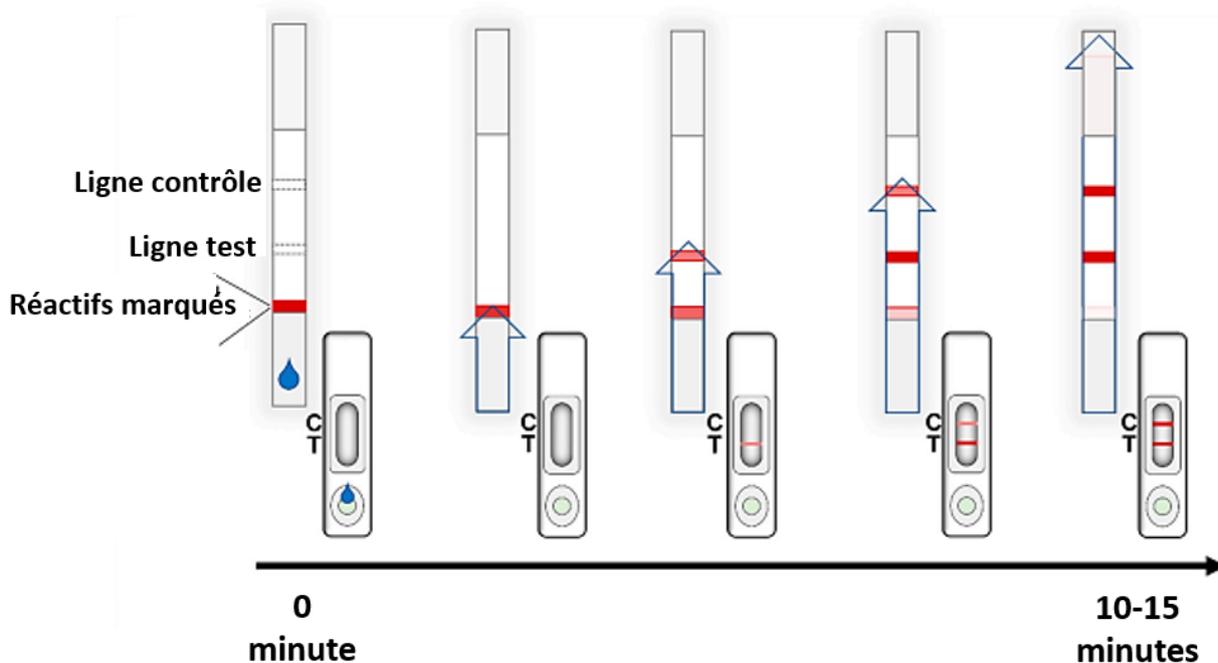


Figure 44 : Le déroulement d'un test LFIA avec un échantillon positif.

Adapté de Di Nardo F. et al. (241). Descriptif : L'échantillon est déposé sur la cassette avec le réactif marqué. Si la cible d'intérêt est présente, le réactif marqué s'y fixe. Puis, lors de la migration, le réactif de capture présents sur la ligne test fixe le complexe marqué antigène/anticorps s'il est présent. Enfin, l'excédent du réactif marqué migre jusqu'à la ligne contrôle pour y être capturé. Après 15 minutes de migration, deux lignes apparaissent : le test est positif ; (LFIA (Lateral flow immunoassay : Test immunochromatographique à flux latéral).

V.3.2.1.3. Les méthodes d'immunodosage

Deux formats peuvent être utilisés pour le développement d'un test LFIA : **1-** le format « Sandwich » ; **2-** le format « Compétitif ».

Le format « Sandwich » est employé dans la détection d'Ag de grande taille et disposant d'au moins deux épitopes. Au cours du test, l'Ag recherché est capturé par l'anticorps marqué au niveau PC. Puis, le complexe Ag/anticorps marqué est capturé par l'anticorps immobilisé au niveau de la LT. Cette capture permet l'apparition d'un signal porté par le marqueur. L'intensité de signal est proportionnelle à la quantité d'Ag présent dans l'échantillon (Figure 45) (244).

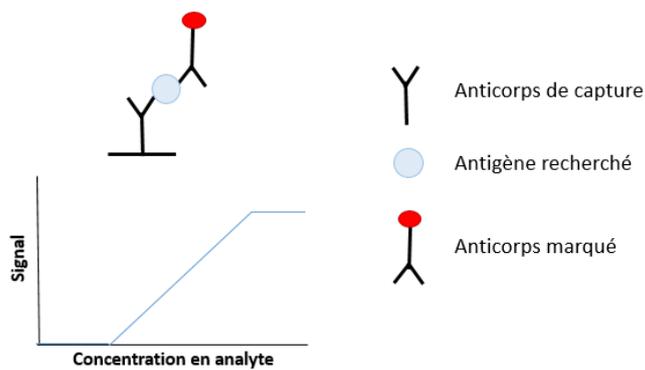


Figure 45 : Le format « Sandwich » et le signal résultant d'un test immunologique.

Descriptif : Ce format est utilisé pour le dosage de molécules de grande taille et disposant d'au moins deux épitopes. Ainsi, plus la concentration en antigène augmente, plus les anticorps (anticorps de capture et anticorps marqués) fixent de cibles et plus le signal s'accroît.

Le format « Compétitif » est employé dans la détection d'Ag de faible taille tels que les stéroïdes, les antibiotiques et les drogues, du fait de leur incapacité à être fixé par deux anticorps simultanément. Ce format possède plusieurs variantes, où dans l'une d'elles, l'Ag recherché est fixé sur la LT. Si l'Ag est présent dans l'échantillon, l'anticorps marqué s'y fixe pour former des complexes Ag/anticorps marqué, résultant une occupation des paratopes de l'anticorps. Ainsi, cet anticorps ne pourra pas se fixer sur l'Ag immobilisé sur la LT : aucun signal n'apparaît sur la LT. Si l'Ag est absent de l'échantillon, les paratopes de l'anticorps marqué restent libres et peuvent réagir avec l'Ag immobilisé sur la LT : un signal apparaît sur la LT. Dans ce format, plus l'Ag est concentré dans l'échantillon et plus l'intensité du signal de la ligne est faible. Le signal est donc inversement proportionnel à cette concentration (Figure 46) (244).

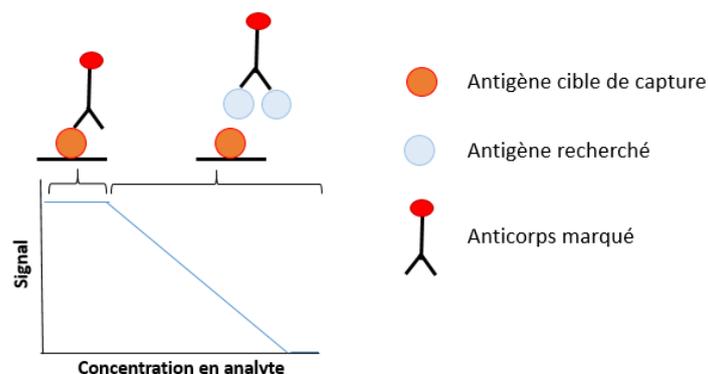


Figure 46 : Le format « Compétitif » et le signal résultant d'un test immunologique.

Descriptif : Ce format est utilisé pour le dosage de molécules de petite taille et disposant d'un seul épitope. Ainsi, une compétition s'opère entre l'antigène d'intérêt présent dans l'échantillon et l'antigène sur la ligne test. Plus la concentration en antigène dans l'échantillon augmente, et plus les sites de fixation de l'anticorps marqué sont occupés. Les anticorps ne se fixent plus à l'antigène sur la ligne test et le signal diminue.

V.3.2.1.4. Les méthodes de lecture

Les informations découlant du test peuvent être d'ordre qualitatif, semi-quantitatif ou quantitatif, quelle que soit la méthode d'immunodosage employée pour la détection d'analyte (Ag ou anticorps).

Le test qualitatif est le couramment développé pour des diagnostics médicaux car il permet de conclure simplement sur la présence ou l'absence de l'analyte d'intérêt dans l'échantillon (245).

Le test semi-quantitatif, développé dans de rares cas, permet d'indiquer une plage de concentrations pour un analyte ; soit il peut être effectué à l'aide d'un lecteur qui mesure l'intensité de la ligne test et déduire la plage de concentrations par rapport à des valeurs préenregistrées ; soit il peut être effectué en réalisant plusieurs LT identiques sur la même bandelette. Le signal au niveau de ces lignes varie en fonction de la concentration de l'analyte d'intérêt. Par exemple, un test a été développé pour la détection de la concentration de la protéine C-réactive pour distinguer une infection bactérienne d'une infection virale (246).

Le test quantitatif, développé dans de très rares cas, permet de doser un analyte d'intérêt avec une précision de mesure qui est généralement inférieure à 20 %. Pour ce type de test, l'intensité de la LT est mesurée avec un lecteur et comparée à une courbe de référence. Cette courbe permet de relier une concentration d'analyte à une intensité de LT (245).

V.3.2.2. Les tests commerciaux liés à l'antibiorésistance

Comme les méthodes génotypiques, ces tests ne détectent que ce qui est recherché ; ce sont des tests avec à priori. Sur le marché actuel, les trois principales sociétés proposant des tests immunochromatographiques pour une large identification de β -lactamases sont Coris Bioconcept (Belgique), Era-Bio (Chine) et NG Biotech (France).

V.3.2.2.1. Coris Bioconcept

La société Coris Bioconcept propose une gamme RESIST qui permet de détecter plusieurs carbapénémases à partir d'isolats bactériens, en 15 minutes (247). Cette gamme propose les produits suivants :

- RESIST-5 O.K.N.V.I. (détection d'enzymes de type OXA-48-like, KPC, NDM sur une première cassette et VIM, IMP sur une seconde cassette) ;
- RESIST-4 O.K.N.V. (détection d'enzymes de type NDM, VIM, KPC, OXA-48) ;
- RESIST-3 O.K.N. K-SeT (détection d'enzymes de type NDM, KPC, OXA-48) ;
- RESIST-3 O.O.K. K-SeT (détection d'enzymes de type OXA-163, KPC, OXA-48) ;
- OXA-23 K-SeT ;
- OXA-48 K-SeT ;
- KPC K-SeT ;
- IMP K-SeT.

Un des tests les plus polyvalents de cette gamme est le RESIST-4 O.K.N.V., qui propose de détecter les carbapénémases OXA-48-like, KPC, NDM et VIM en même temps (248). De même, le développement d'un test rapide pour la détection simultanée de OXA-48-like (hydrolyse les carbapénèmes) et OXA-163 (hydrolyse les pénicillines et les C3G (céfotaxime/céftazidime)) est un outil utile du fait de leur zone géographique commune et de leur dissémination de plus en plus importante. Leur association au sein de bactéries est un risque de santé majeur (249).

Les avantages de ces tests sont nombreux : une sensibilité et une spécificité proches de 100% ; une identification des carbapénémases de type OXA-48-like, OXA-163, KPC, NDM et VIM (248,249) ; aucun équipement repris, une facilité d'utilisation pour toute personne ; un temps de lecture en 15 minutes. Cependant, les tests de cette gamme présentent des inconvénients : une non-détection des BLSE de type CTX-M ; la nécessité de deux cassettes pour l'identification des cinq carbapénémases (KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48-like) ; l'apparition de FN en cas de nouveaux variants d'enzymes (mutation au niveau de l'épitope).

V.3.2.2.2. Era-bio

La société Era-bio propose également une gamme de tests pour la détection des carbapénémases, à partir d'isolats bactériens en 15 minutes (250). Cette gamme propose les produits suivants :

- Carbapenem-resistant K.N.I.V.O Detection K-Set (détection d'enzymes de type IMP, KPC, NDM sur une première cassette et VIM, OXA-48 sur une seconde cassette) ;
- Carbapenem-resistant VIM Detection K-Set ;
- Carbapenem-resistant NDM Detection K-Set ;
- Carbapenem-resistant KPC Detection K-Set.

Le test le plus polyvalent de cette gamme est le carbapenem-resistant K.N.I.V.O Detection K-Set, qui propose de détecter les cinq principales carbapénémases (KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48-like) (251).

Les avantages et les inconvénients de ces tests (251) sont identiques à ceux énoncés pour les tests de la gamme RESIST de Coris Bioconcept.

V.3.2.2.3. NG Biotech

La société NG Biotech propose également une gamme NG-test pour la détection de BLSE et de carbapénémases, à partir d'isolats bactériens, en 15 minutes (252). Cette gamme propose les produits suivants :

- NG-Test CTX-M Multi (détection des cinq groupes de CTX-M 1, 2, 8, 9, et 25) ;
- NG-Test Carba 5 (détection des principales carbapénémases : NDM, VIM, IMP, KPC, OXA-48) ;
- NG-Test MCR-1 (détection d'une enzyme impliquée dans la résistance à la colistine).

Le NG-Test Carba 5 est le plus polyvalent de cette gamme car il permet de détecter simultanément les cinq principales carbapénémases (253). Le NG-Test CTX-M est également

intéressant pour la détection des principales BLSE, de type CTX-M, sur colonies bactériennes et dans les hémocultures où leurs prévalences s'accroissent (254).

Les avantages de ces tests sont nombreux : une sensibilité et une spécificité proches de 100% ; une identification simultanée des cinq principales carbapénémases (OXA-48, IMP, KPC, NDM et VIM) (253) ; une identification des BLSE de type CTX-M (testé en hémoculture) (254) ; aucun équipement spécifique requis, une facilité d'utilisation pour toute personne ; un temps de lecture en 15 minutes ; une utilisation en test de dépistage car un seul test permet de détecter les cinq principales carbapénémases. Cependant, les tests de cette gamme présentent des inconvénients : l'apparition potentielle de FN en cas de nouveaux variants d'enzymes (mutation au niveau de l'épitope) ; la non reconnaissance des BLSE de type SHV et TEM.

V.3.2.3. Les limitations et les perspectives d'évolution

Pour les tests LFIA basés sur la détection de β -lactamases, deux principales limitations existent :

- L'apparition de nouvelles mutations sur les carbapénémases ou BLSE peut modifier l'épitope de reconnaissance par l'anticorps et provoquer sa non-détection (FN) ;
- La détection simultanée de plusieurs analytes a ses limites à cause des réactions croisées.

Pour pallier l'apparition de nouveaux variants de β -lactamases, de nouvelles optimisations doivent donc être réalisées sur les tests pour s'assurer de leur capacité à les détecter. En parallèle, des axes de recherche ont émergé dans le but d'augmenter la gamme des cibles potentielles à détecter en test LFIA, tels que la détection de produits d'amplification par PCR (gènes de résistance) ou encore la détection de l'activité enzymatique des β -lactamases.

De ce fait, ce projet de thèse s'inscrit dans l'un de ces axes de recherche. Les tests développés seront capables de détecter les β -lactamases quelle que soit la bactérie productrice, leur nature ou leur variant. Leurs détections se baseront sur l'activité enzymatique des β -lactamases, et non plus sur l'identification de ces dernières.

Projet de thèse

Grâce au partenariat entre le CNR de la résistance aux antibiotiques de l'Hôpital Bicêtre AP-HP, la société NG Biotech et le laboratoire d'étude et recherche en immunoanalyse (LERI) du CEA Saclay, la gamme NG-test pour la détection de BLSE (CTX-M) et de carbapénémases (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like) a été développée.

Dans l'optique de compléter cette gamme de produit et d'aborder un nouvel axe de recherche, ce projet de thèse porte sur le développement de deux nouveaux tests LFIA permettant de détecter l'activité enzymatique des β -lactamases (BLSE et carbapénémases). Ils détecteront l'hydrolyse de deux classes de β -lactamines : les céphalosporines et les carbapénèmes. Le principe de ces tests repose sur l'utilisation d'un anticorps capable de discriminer la forme non-hydrolysée du cycle β -lactame d'une β -lactamine, de son produit d'hydrolyse. Ainsi, ces tests seront capables de détecter les β -lactamases quelle que soit la bactérie productrice, leur nature ou leur variant. Pour atteindre cet objectif, différentes tâches ont été réalisées :

- ✓ Production d'anticorps monoclonaux : L'obtention d'anticorps capable de discriminer la forme non-hydrolysée d'une β -lactamine, de son produit d'hydrolyse, nécessite plusieurs étapes : **1-** la conception et la production d'immunogènes ; **2-** l'immunisation de souris ; **3-** l'hybridation des splénocytes des souris avec des cellules de myélome ; **4-** le développement et l'utilisation de tests permettant la sélection des cellules productrices d'anticorps d'intérêt ; **5-** la production et la purification des anticorps monoclonaux sélectionnés ;
- ✓ Développement des tests rapides : Les performances d'un test LFIA reposent non seulement sur les qualités intrinsèques des anticorps monoclonaux utilisés mais aussi sur la préparation de l'échantillon et des réactifs utilisés pour produire les bandelettes. Ainsi, différents traitements des échantillons biologiques ont été mis au point, et les anticorps possédant les qualités adaptées aux tests ont été sélectionnés. Puis, les différents constituants des tests et leur traitement ont été optimisés. Le protocole d'utilisation de ces tests a été établi afin de correspondre au cahier des charges des tests rapides : rapidité, simplicité, faible coût, sensibilité et spécificité ;

- ✓ Validation des tests : L'objectif ultime de ces travaux de thèse étant la valorisation et la commercialisation, il est très important de valider ces tests dans des conditions réelles d'utilisation. Pour ce faire, des lots industriels ont été produits par un partenaire industriel et évalués, puis validés par un partenaire hospitalier.

Déroulement du projet de thèse

Chapitre I : La stratégie générale

Dans ce chapitre I, la stratégie générale pour réaliser les différentes étapes de ce sujet de thèse est décrite. Une description plus détaillée est effectuée par la suite pour chacune des étapes dans les chapitres II et III.

I.1. La production des anticorps monoclonaux

I.1.1. La production des immunogènes

Les β -lactamines sont des petites molécules incapables d'induire une réponse immunitaire, indispensable à l'obtention d'anticorps. Il a donc été nécessaire de coupler ces dernières à une plus grosse molécule immunogénique comme par exemple l'albumine bovine sérique (BSA). Pour ce faire, l'antibiotique doit posséder un groupement réactif capable de réagir avec une autre fonction présente sur la BSA. Ainsi, la première étape est de modifier chimiquement l'antibiotique sélectionné en y greffant un des groupements suivants : Amine primaire ($-\text{NH}_2$), Thiol ($-\text{SH}$), Alcyne ($-\text{C}\equiv\text{C}$), Azido ($-\text{N}_3$), N-hydroxy-succinimide (NHS), Chloroacétamido. Pour favoriser la différence de reconnaissance des anticorps pour les deux formes d'un antibiotique (formes non-hydrolysée et hydrolysée), le couplage doit se faire sur la fonction la plus éloignée du noyau β -lactame pour une exposition optimale de ce dernier et éviter un potentiel encombrement stérique. Ensuite, la seconde étape est d'ajouter, au niveau de la BSA, un groupement capable de réagir avec celui de l'antibiotique. Par exemple, un groupement chloroacétamide réagit avec un groupement $-\text{SH}$ ou encore un groupement $-\text{C}\equiv\text{C}$ réagit avec un groupement $-\text{N}_3$ (par chimie click). Enfin, la dernière étape est de coupler l'antibiotique à la BSA. De manière générale, l'antibiotique est ajouté en excès étant donné que plusieurs groupements réactifs peuvent être fixés sur la BSA. Le protocole de couplage est différent selon les groupements impliqués dans la réaction.

L'immunogène produit est dosé par le dosage de l'acide bi-cinchoninique (BCA), avec le kit de dosage protéique Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific). Il s'agit d'un dosage

colorimétrique des protéines où ces dernières réduisent les ions Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin. Ainsi, le BCA (réactif spécifique pour le Cu(I)) forme un complexe coloré ayant une absorbance à DO_{560 nm}. L'absorbance mesurée, est proportionnelle à la concentration de protéines.

I.1.2. L'immunisation des souris

Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux réglementations françaises et européennes sur les soins aux animaux de laboratoire (Directive de la Communauté Européenne 86/609, Loi française 2001-486, 6 juin 2001) et aux accords du Comité d'Ethique du Commissariat à l'Energie Atomique (CEtEA 'Comité d'Ethique en Expérimentation Animale' n°44) no. 12-026 et 15-055 délivrés à S. S. par les Services Vétérinaires Français et l'accord CEA D-91-272-106 de l'Inspection Vétérinaire de l'Essonne (France). L'injection des différents immunogènes a été réalisée sur des souris de lignée Biozzi et proviennent de l'animalerie du CEA de Saclay (Gif sur Yvette, France). Il s'agit d'une lignée pour laquelle la production d'immunoglobulines lors d'une réponse immunitaire est particulièrement élevée (255). Pour réaliser les immunisations, des injections par voie sous-cutanée de 50 µg de l'immunogène/souris ont été réalisées toutes les trois semaines pendant trois mois (quatre souris par immunogène) (Figure 47). Après 2 mois, de nouvelles injections d'immunogène ont été réalisées par voie intraveineuse sur les souris possédant la meilleure réponse immunitaire : 50 µg de produit/souris, une fois par jour pendant trois jours. Après deux jours, les cellules de la rate de la souris ont été fusionnées avec des cellules de myélome de souris NS1, et la production d'anticorps anti-β-lactamine dans les surnageants de culture de myélome a été évaluée à l'aide de tests immuno-enzymatiques.

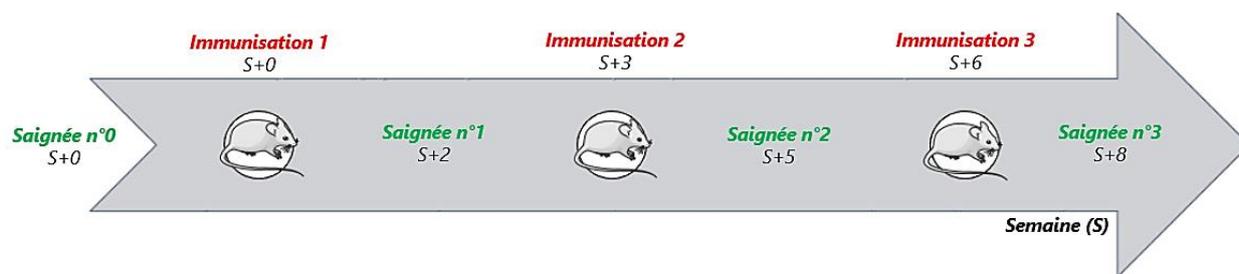


Figure 47 : L'échéancier des immunisations et des prélèvements sanguins sur les souris.

Descriptif : Pour l'immunisation, des injections par voie intrapéritonéale de 50 μ g d'immunogène/souris ont été réalisées toutes les trois semaines pendant trois mois, à raison de quatre souris par immunogène. Quinze jours après chaque immunisation, des prélèvements rétro-orbitaires (saignées) sont réalisés.

I.1.3. Le suivi de la réponse immunitaire et la sélection des anticorps

Pour sélectionner les anticorps ayant une reconnaissance maximale pour la forme non-hydrolysée et minimale pour la forme hydrolysée de l'antibiotique, il a fallu disposer de molécules marquées (couplage de l'antibiotique avec la biotine) permettant de détecter ces anticorps spécifiques. Ces molécules peuvent être détectées avec de la streptavidine couplée à l'acétylcholinestérase, dont l'activité enzymatique peut être révélée grâce à une réaction colorimétrique. Tout comme le couplage entre l'antibiotique et la BSA, celui de l'antibiotique avec la biotine doit se faire via des groupements réactifs complémentaires. Puis, pour obtenir la forme hydrolysée de la molécule, une réaction enzymatique est réalisée avec des billes couplées à une β -lactamase recombinante. Par la suite, ces molécules (antibiotiques non-hydrolysé et hydrolysé) sont utilisées dans des tests immuno-enzymatiques pour caractériser les réponses immunitaires des souris et les anticorps contenus dans les surnageants de culture des hybridomes.

Les hybridomes ont été obtenus selon le protocole décrit par Kohler G. et Milstein C. en 1975 (239). Pour chaque immunogène, les deux souris présentant la meilleure réponse immunitaire sont sacrifiées et les rates sont récupérées pour être broyées. Les splénocytes extraits sont mélangés à des cellules de myélome murin (NS-1) avec un ratio 3:1. Après sept à dix jours, les milieux de cultures des hybridomes sont récupérés et la sécrétion d'anticorps spécifiques est évaluée à l'aide de tests immuno-enzymatiques. Après différentes étapes de sélection, vingt hybridomes sont retenus pour la production des anticorps monoclonaux. Ces anticorps sont caractérisés (affinité et spécificité pour les deux formes d'un antibiotique ;

réaction croisée avec d'autres antibiotiques) et utilisés pour le développement des tests rapides.

I.2. Le développement d'un test rapide

I.2.1. Le test immunochromatographique à flux latéral

Les bandelettes de LFIA sont composées de trois zones distinctes, fixées sur un support plastifié.

La zone 1 est la zone de dépôt de l'échantillon. Cette dernière est souvent constituée du PE (dépôt de l'échantillon) et du PC (dépôt et séchage l'anticorps marqué). Cet anticorps, spécifique de la cible recherchée, est marqué avec des nanoparticules d'or colloïdal permettant d'obtenir un signal coloré visible à l'œil nu. Le pic d'absorption de ces particules est situé à $DO_{530\text{ nm}}$, donnant une couleur rouge aux anticorps marqués. La quantité d'anticorps à marquer est évaluée en fonction de l'intensité de l'absorbance mesurée à $DO_{530\text{ nm}}$. La zone 2 est la zone où sont déposées plusieurs lignes d'anticorps sur une MbN : les LT et LC. Le signal sur la LT indique un résultat positif (ligne colorée), auquel cas, le résultat est négatif (pas de ligne colorée). La LC permet d'attester du bon déroulement du test. La zone 3 est une zone d'absorption qui favorise la migration de l'échantillon à travers la bandelette (diffusion par capillarité). Ces trois zones sont préalablement assemblées sur le support plastifié de 30 cm, avant de découper des bandelettes de 0,5 cm de large à l'aide d'une guillotine automatique et de les insérer dans une cassette plastique (Figure 43).

I.2.2. Le principe du test rapide

Les antibiotiques sont des petites molécules de taille $<1\ 000\text{ Da}$ qui ne peuvent être détectées que par une méthode dite « compétitive » du fait de leur incapacité à fixer deux anticorps monoclonaux simultanément. Ainsi, pour le développement de ces dosages, le test LFIA par compétition est employé. Pour ce faire, tous les anticorps purifiés sont utilisés comme des anticorps marqués, capables de reconnaître uniquement la forme non-

hydrolysée de l'antibiotique dans un échantillon. Sur la MbN, la LT est composée de l'immunogène qui est l'antibiotique-BSA non-hydrolysé.

Ainsi, basé sur le principe par compétition illustré sur la Figure 48, une quantité connue d'antibiotique non-hydrolysé est ajoutée à l'échantillon. En l'absence de β -lactamase, ce dernier reste non-hydrolysé et est fixé par les anticorps marqués. Les sites de reconnaissance de l'anticorps étant occupés, de ce fait, l'anticorps ne pourra pas se fixer sur l'antibiotique présent sur la LT. Ils seront retenus seulement sur la LC. Une seule ligne apparaît : le test est négatif. En présence de β -lactamase, l'antibiotique est hydrolysé et n'est plus reconnu par les anticorps marqués. Les sites libres de l'anticorps sont alors capables de fixer l'antibiotique-BSA non-hydrolysé présent sur la LT. L'excédent d'anticorps marqués non retenu sur la LT, se fixe sur la LC. Deux lignes apparaissent : le test est positif.

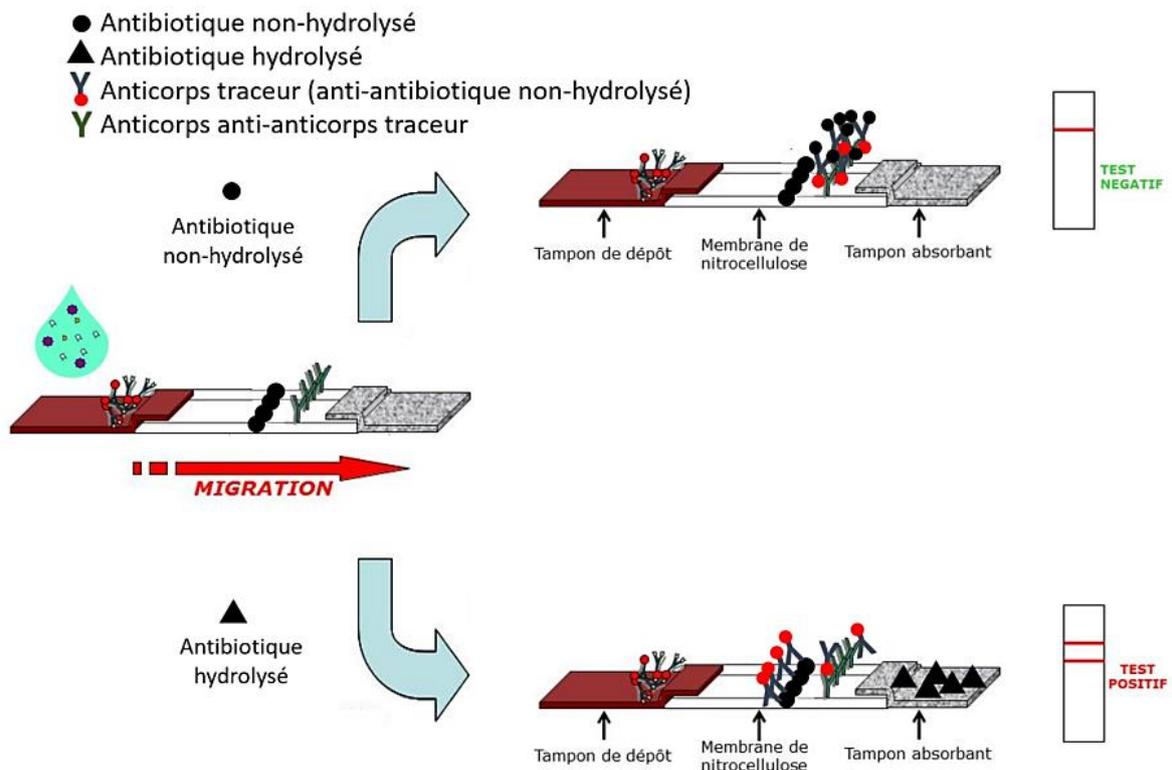


Figure 48 : Le principe du test rapide pour la détection de l'activité enzymatique des β -lactamases.

Descriptif : Ce test est basé sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal capable de se fixer uniquement à la forme non-hydrolysée d'un antibiotique et non à ses produits de dégradation. Ainsi, pour ce test, deux possibilités : 1- Dans l'échantillon, l'antibiotique est non-hydrolysé. Lorsqu'il est déposé sur la bandelette, la totalité des sites de fixation des anticorps marqués est occupée et n'a pas la possibilité de se fixer sur la ligne test (antibiotique-BSA). Les anticorps marqués sont alors retenus uniquement sur la ligne contrôle : le test est négatif ; 2- Dans l'échantillon, l'antibiotique est hydrolysé. Lorsqu'il est déposé sur la bandelette, la totalité des sites de fixation des anticorps marqués reste libre. Ils sont alors capables de se fixer sur la ligne test. L'excédent d'anticorps marqués est capturé par les anticorps de la ligne contrôle : le test est positif.

Pour le développement du test rapide, trois principales optimisations sont réalisées :

- 1-** La première est la quantité d'anticorps marqué avec pour objectif de déterminer la plus petite quantité permettant d'observer un signal significatif après 10 minutes de dépôt de l'échantillon sur la bandelette ;
- 2-** La seconde est la quantité de BSA-antibiotique non-hydrolysé sur la LT. La concentration la plus faible, mais non limitante pour le signal observé au niveau de la LT, est sélectionnée ;
- 3-** La troisième est la quantité d'antibiotique non-hydrolysée à utiliser dans les échantillons. Le but est de déterminer la concentration minimale en antibiotique non-hydrolysé à partir de laquelle aucun signal n'est observé sur la LT.

I.3. La validation du test rapide sur des colonies bactériennes

Une fois les différentes optimisations réalisées, une validation du test est faite sur des colonies bactériennes dans du tampon de migration (Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 + NaCl 0,15 M + BSA 0,1 % + Tween 20 0,5 % + CHAPS 1,0 % + Azide de sodium 0,01 %). Plusieurs temps d'incubation à température ambiante entre l'antibiotique et la souche bactérienne ont été testés pour favoriser l'hydrolyse de l'antibiotique.

Une fois le temps d'incubation optimal sélectionné, un transfert des différents réactifs a été réalisé auprès de la société NG Biotech (Guipry, France), puis un lot de test rapide a été préparé.

Ce lot de test a été validé avec le souchier du CNR de la résistance aux antibiotiques (Service de Bactériologie-Hygiène, Hôpital Bicêtre AP-HP, France).

I.4. La validation du test rapide sur des échantillons biologiques

Par la suite, un nouveau transfert industriel a été réalisé avec pour but de détecter une activité enzymatique (et l'identification de β -lactamases dans un second temps) directement à partir d'urine, de milieu de transport d'écouvillon rectal et d'hémoculture.

L'outil d'échantillonnage, de préparation, d'incubation et de détection (SPID : Sampling, Processing, Incubation, Detection) est un dispositif breveté par le CEA qui intègre

un dispositif de préparation des échantillons décrit dans le Tableau 6, et une cassette de détection de LFIA.

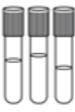
Échantillons	Traitement des échantillons			Détection
	Prétraitement	Filtration & Concentration 1 minute	Extraction & Incubation 30 minutes	Dépôt & Détection 30 minutes
 Urine (3 mL)	Aucun	 Adaptateur seringue  Cupule avec membrane	 Capuchon  Cupule avec membrane  Réservoir	 Traitement de l'échantillon  Détection
 Hémoculture (0,5 mL)	Lyse des hématies (2 minutes)	 Partie inférieure		 Détection des β-lactamases par LFIA
 Écouvillon rectal (0,5 mL)	Aucun	Concentre les bactéries dans l'échantillon Élimine les interférences du milieu	Améliore la sensibilité	Détection des β-lactamases par LFIA Utilisation unique Aucun équipement nécessaire

Tableau 6 : Les différents composants du SPID.

Descriptif : Le SPID est composé de trois parties : 1- Le système de filtration et de concentration de l'échantillon constitué d'un adaptateur de seringue, d'une cupule avec une membrane de 0,45 µm et une partie inférieure. Les échantillons filtrés sont soit de l'urine (3 mL), soit de l'hémoculture (0,5 mL) pour lequel un prétraitement a lieu pour la lyse des hématies pendant 2 minutes, soit du milieu de transport d'écouvillon rectal (0,5 mL) ; 2- Le système d'extraction et d'incubation de l'antibiotique où la cupule est transférée dans un réservoir. Un tampon est ajouté sur cette cupule et le réservoir est fermé avec un capuchon. Une incubation de 30 minutes est réalisée à l'œil nu. Cette étape améliore la sensibilité car le volume de reprise avec le tampon de migration est inférieur au volume filtré de l'échantillon ; 3- Le système de dépôt de l'échantillon et de détection de l'antigène recherché. Le réservoir fermé est directement clipsé sur une cassette de détection de LFIA et la migration se fait pendant 30 minutes avant une lecture. Ceci permet une utilisation unique et sans aucun équipement. Le test LFIA permet de détecter les résistances liées aux β-lactamases.

Plus en détail, pour l'utilisation du SPID dans des échantillons biologiques, cinq étapes sont nécessaires (Figure 49) :

- 1 – La filtration de l'échantillon à travers un filtre situé au fond d'une cupule ;
- 2 – Le transfert de la cupule contenant l'échantillon dans un incubateur ;
- 3 – Le dépôt du tampon de migration (300 µL) et de l'antibiotique dans la cupule, avant de fermer le réservoir suivi d'une incubation de 30 minutes ;
- 4 – Le dépôt de l'échantillon sur la cassette ;
- 5 – L'interprétation à 30 minutes de migration.



Figure 49 : Les différentes étapes du SPID associées à une détection en test rapide.

Protocole : L'utilisation du SPID (dispositif de préparation d'échantillon et une cassette de détection par un test immunochromatographique à flux latéral) nécessite cinq étapes: **1-** La filtration de l'échantillon à travers un filtre (le volume dépend de la matrice) ; **2-** Le transfert du filtre contenant l'échantillon dans un incubateur ; **3-** Le dépôt du tampon de migration et de l'antibiotique (300 µl) sur l'échantillon. Lorsque l'incubateur est fermé, un piston pousse la solution à travers le filtre vers la partie basse de l'incubateur. ; **4-** Après 30 minutes d'incubation le réservoir est percuté sur la cassette ce qui permet à l'échantillon de migrer sur la bandelette ; **5-** Interprétation du test après 30 minutes de migration ; (SPID (Sampling, Processing, Incubation, Détection) : Échantillonnage, Traitement, Incubation, Détection ; ATB (Antibiotique)).

Pour intégrer la détection, un format spécial de cassette a été développé, comme montré sur la Figure 49.

Chapitre II : Le test de détection de l'activité céphalosporinase

Sauf précision, tous les réactifs chimiques proviennent de chez Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier Cedex, France).

II.1. La production de l'immunogène

Le céfotaxime est une céphalosporine de troisième génération. Il a été sélectionné car il est d'ores et déjà utilisé dans certains tests (par exemple Demord A. et al. (256)) qui permettent la détection de l'activité enzymatique de l'ensemble des carbapénémases, des BLSE ainsi que certaines AmpC chromosomiques surexprimées et AmpC plasmidiques. De plus, le céfotaxime est stable comparé à d'autres C3G.

Dans un premier temps, le céfotaxime a été activé avec du chlorure de chloroacétyle (257). Pour cela, une suspension de céfotaxime (500 mg, 1,09 mmol, 1 équivalent) dissout dans 2 mL de diméthylacétamide a été ajoutée à du chlorure de chloroacétyle (128 μ L, 1,65 mmol, 1,5 équivalents) entre 5 °C et 10 °C. Le mélange a ensuite été agité pendant 90 minutes à température ambiante. Une fois l'opération terminée, la solution a été placée dans de la glace. Le précipité a été recueilli par filtration et lavé successivement avec de l'H₂O, de l'éthanol, de l'éther diéthylique et séché pour obtenir le produit souhaité sous forme de poudre blanche-grise (349 mg, 0,66 mmol, 60 %). Cette réaction a abouti à la formation d'une fonction chloroacétamide qui peut réagir notamment avec des fonctions thiols (Figure 50).

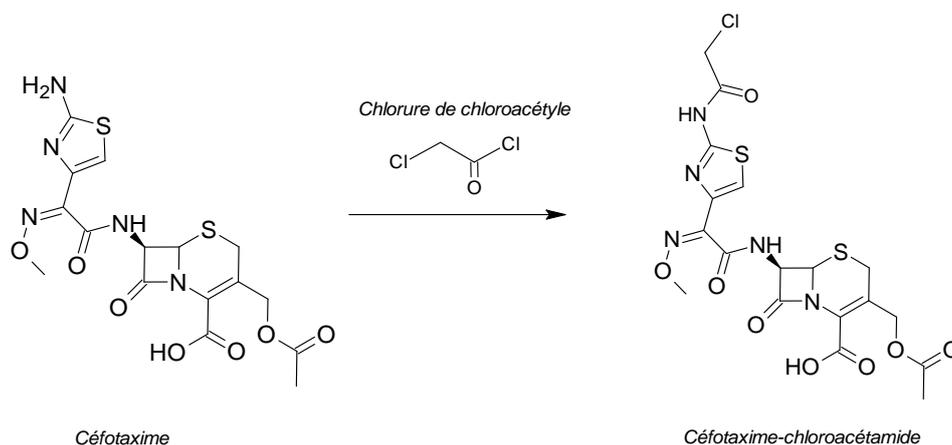


Figure 50 : La réaction chimique nécessaire pour obtenir le céfotaxime-chloroacétamide.

Protocole : Du céfotaxime dissout dans 2 mL de diméthylacétamide, a été ajoutée à du chlorure de chloroacétyle (1,5 équivalents/céfotaxime) entre 5 °C et 10 °C. La solution a été agitée pendant 90 minutes à température ambiante. La solution est placée sur de la glace et le précipité est recueilli par filtration et lavé avec de l'eau distillée, de l'éthanol et de l'éther diéthylique. Le produit est séché pour obtenir une poudre.

En parallèle, 35 mg de BSA ont été dissous dans 1 mL de tampon au phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4, puis 50 µL d'une solution de 122 mg/mL de N-succinimidyl-S-acétylthioacétate (SATA) dans du diméthylformamide (DMF) ont été ajoutés (rapport molaire SATA/BSA = 50). Après une réaction de 16 heures à 4°C, le produit a été purifié par chromatographie d'exclusion en utilisant une colonne Sephadex G25 (Cas n°17-0033-01, GE Healthcare). Ensuite, la fonction thiol a été déprotégée en ajoutant 100 µL d'hydroxylamine 1 M pH 7 pendant 30 minutes à 20°C. La concentration de thiol a été mesurée (SH/BSA = 20,7) par réaction avec de l'acide 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB). Ce produit peut ainsi réagir avec la fonction chloroacétamide du céfotaxime modifié. De ce fait, 2,34 mg de céfotaxime-chloroacétamide à 6 mg/mL dans du diméthylsulfoxyde (Cas n°67-68-5, Invitrogen) ont été ajoutés à 2,76 mg de BSA-SH (rapport molaire céfotaxime-chloroacétamide/SH = 5). Après une réaction de 1 heure 30 minutes à 20°C, 50 µL de tampon borate 1 M pH 9,0 ont été ajoutés et incubés pendant 90 minutes. Une dialyse a été effectuée avec une cassette de dialyse (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, Thermo Fisher Scientific), avec un seuil de coupure de 3 500 Da. Ensuite, la concentration de céfotaxime-BSA (Figure 51) a été déterminée par réaction BCA.

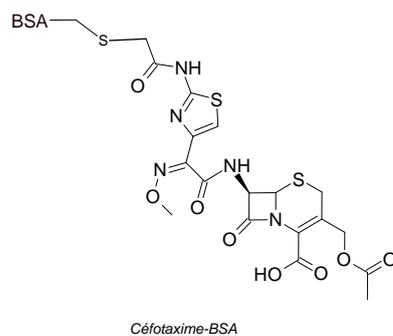


Figure 51 : La structure chimique du céfotaxime-BSA, utilisé comme immunogène.

II.2. L'obtention des anticorps monoclonaux

Pour obtenir des anticorps monoclonaux dirigés uniquement contre le céfotaxime non-hydrolysé, plusieurs étapes doivent être réalisées afin d'atteindre les spécifications souhaitées :

- Immunisation des souris avec le céfotaxime-BSA obtenu préalablement ;
- Purifier les différentes formes de céfotaxime marquées et non marquées ayant pour but *in fine* de sélectionner les anticorps d'intérêts issus des hybridomes ;
- Suivre la réponse immunitaire chez les souris ayant reçu l'immunogène pour sélectionner les souris dont les splénocytes seront fusionnés ;
- Sélectionner les hybridomes produisant les anticorps monoclonaux ayant un maximum de reconnaissance pour la forme non-hydrolysée et un minimum de reconnaissance pour la forme hydrolysée du céfotaxime, puis caractériser les anticorps selon leur spécificité et leur affinité pour les deux formes de céfotaxime et leurs réactions croisées avec d'autres β -lactamines.

II.2.1. La purification des deux formes d'antibiotique marquées et non marquées

Pour sélectionner les anticorps ayant une reconnaissance maximale pour la forme non-hydrolysée et minimale pour la forme hydrolysée du céfotaxime, il a fallu disposer de molécules marquées ; le couplage du céfotaxime avec la biotine a donc été réalisé. Ces molécules peuvent ainsi être détectées par réaction avec de la streptavidine-acétylcholinestérase via une réaction colorimétrique. D'autre part, il a également été

nécessaire de purifier le céfotaxime non-hydrolysé commercial et le céfotaxime hydrolysé non marqué afin d'évaluer la spécificité des anticorps pour les deux formes du céfotaxime.

II.2.1.1. Le matériel et les méthodes

Le céfotaxime-biotine non-hydrolysé a été obtenu par couplage du céfotaxime-chloroacétamide avec de la biotine couplée à un bras polyéthylène glycol (PEG) associée à une fonction thiol, appelée la biotine-PEGx-thiol (référence : B2YHU2, Interchim), en utilisant la procédure précédemment décrite pour l'immunogène. Du céfotaxime-chloroacétamide (31,6 mg, 0,06 mmol) et de la biotine-PEGx-thiol (94 mg, 0,119 mmol, 2 équivalents/céfotaxime-chloroacétamide) ont été solubilisés dans 0,5 mL de DMF et 2 μ L de triéthylamine, et ont ensuite été ajoutés au mélange sous Argon. La réaction a été agitée pendant 3 jours. Une fois la réaction terminée, le mélange a été évaporé sous vide. Ensuite, le produit a été purifié par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile de 0 à 80 % sur un appareil de chromatographie AKTA (AKTA Purifier, GE Healthcare). Le poids moléculaire est vérifié par chromatographie liquide couplée à la SM (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific), où un cycle de séparation de 15 minutes sur colonne C18 est réalisé. Puis, l'échantillon est ionisé à l'aide d'une source électrospray et les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge au sein du quadripôle (Figure 52).

Le céfotaxime-biotine hydrolysé a été obtenu par réaction enzymatique avec des billes couplées à une β -lactamase recombinante : KPC-2. Pour ce faire, 5 mg de billes contenant un noyau ferrique (Dynabeads M-280 tosylactivées, Thermo Fisher Scientific) ont été lavées avec du tampon borate 0,1 M pH 9,5. 100 μ g de la protéine recombinante ont été ajoutés aux billes dans un volume de 150 μ L. Ensuite, 100 μ L de tampon borate 0,1 M pH 9,5 contenant du sulfate d'ammonium 3 M ont été ajoutés. Après 16 heures de réaction à 25°C, 1 mL de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4 contenant du chlorure de sodium 0,15 M et de la BSA 0,5 % a été ajouté. Après 60 minutes de réaction à 37 °C, le produit de couplage a été lavé avec du tampon de phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M et de la BSA 0,1 %. Les billes ont été concentrées à 20 mg/mL à l'aide d'un aimant. L'activité enzymatique de la protéine recombinante immobilisée a été testée avec

de la nitrocéfine, un substrat chromogénique de β -lactamase. Pour cela, dans une plaque de microtitration 96 puits (plaque en polypropylène, Greiner bio one), 20 μ L de nitrocéfine à 0,5 mM ont été ajoutés à une solution de 10 μ g/mL de billes- β -lactamase, diluée dans un tampon de phosphate de sodium 50 mM pH 7,4, dans un volume total de 200 μ L. Après 30 minutes de réaction à 20°C, l'absorbance est mesurée à DO_{492 nm}. La présence d'une activité enzymatique est synonyme d'une augmentation de cette absorbance. Par la suite, 50 μ L de solution de billes- β -lactamase à 20 mg/mL ont été ajoutés à 1 mL d'une solution de céfotaxime biotine non-hydrolysé concentrée à 2 mg/mL. Après une réaction de 16 heures à 25 °C, les billes- β -lactamases ont été éliminées à l'aide d'un aimant et la solution est récupérée. Le même protocole d'hydrolyse a été réalisé sur le céfotaxime non-hydrolysé commercial pour obtenir le céfotaxime hydrolysé. Ces molécules sont purifiées par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile de 0 à 80 % sur un appareil de chromatographie AKTA (AKTA Purifier, GE Healthcare). La mesure de l'absorbance à DO_{300 nm} est représentative du cycle β -lactame. En cas d'hydrolyse de la β -lactamine, une perte d'absorbance est visible. Le poids moléculaire est vérifié par chromatographie liquide couplée à la SM (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific), où un cycle de séparation de 15 minutes sur colonne C18 est réalisé. Puis, l'échantillon est ionisé à l'aide d'une source électrospray et les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge au sein du quadripôle (Figure 52).

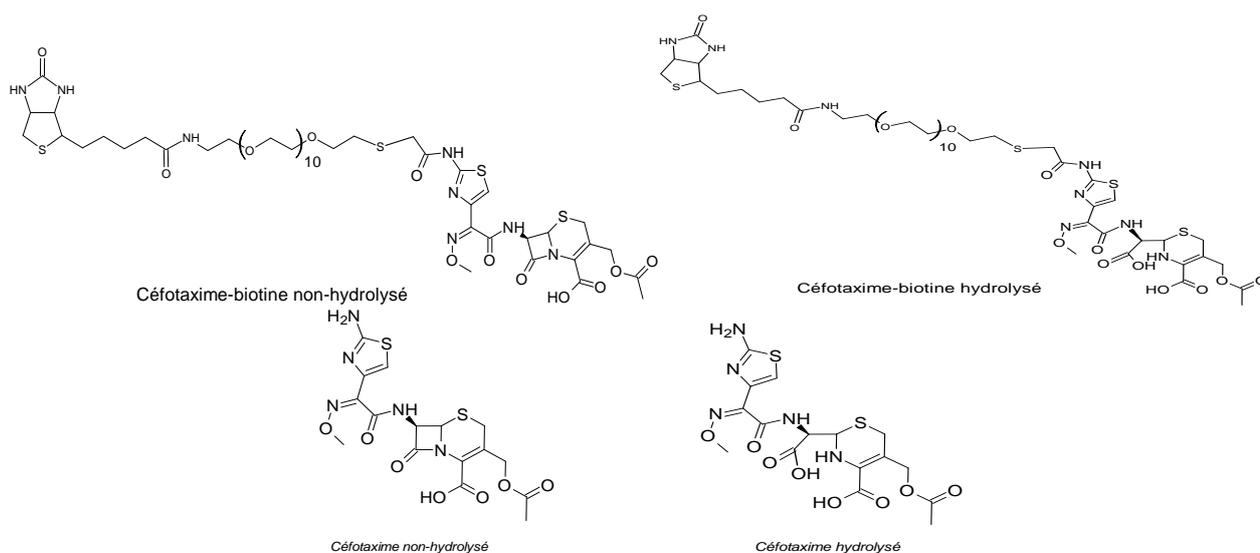


Figure 52 : Les différentes structures utilisées pour la sélection et la caractérisation des anticorps anti-céfotaxime.

II.2.1.2. Les résultats et l'interprétation

La forme non-hydrolysée du céfotaxime-biotine est éluée à 26 % d'acétonitrile (Figure 53) avec une masse moléculaire en SM de 1283,45 Da. La forme hydrolysée est, quant-à-elle, éluée à 23 % d'acétonitrile (Figure 53) avec des masses moléculaires en SM de 1241,46 Da et 1301,46 Da. La masse de 1301,46 Da correspond au céfotaxime-biotine hydrolysé (cycle β -lactame ouvert). La masse de 1241,46 Da correspond au céfotaxime-biotine hydrolysé (cycle β -lactame ouvert) ayant subi une décarboxylation et une déacétylation spontanées. Ces pertes de groupements chimiques dues à l'ionisation par SM ont été observées dans d'autres études (231).

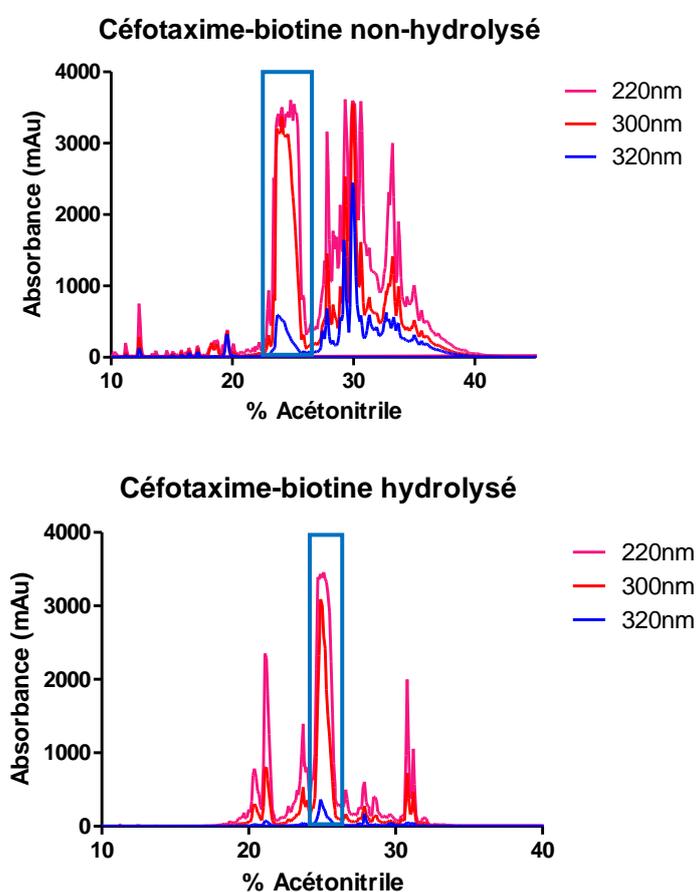


Figure 53 : Les profils d'éluion du céfotaxime-biotine non-hydrolysé et du céfotaxime-biotine hydrolysé en chromatographie en phase inverse.

Protocole : Le céfotaxime-biotine non-hydrolysé et le céfotaxime-biotine hydrolysé ont été purifiés par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile (0 à 80 %) sur une colonne C18. Le volume d'injection sur la colonne est de 2 mL. Le poids moléculaire est vérifié par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse où un cycle de séparation de 15 minutes sur colonne C18 est réalisé. Puis, l'échantillon est ionisé à l'aide d'une source électrospray et les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge au sein du quadripôle. Pour le céfotaxime-biotine non-hydrolysé, le pic d'intérêt est à 26 %. Pour le céfotaxime-biotine hydrolysé, le pic d'intérêt est à 23 %.

Pour le céfotaxime non-hydrolysé, après purification, le pic d'intérêt se situe à 8,5 % d'acétonitrile (Figure 54). La masse moléculaire obtenue en SM est de 456,06 Da. Après l'étape d'hydrolyse, le chromatogramme d'élution a montré deux pics distincts : un pic à 8,5 % correspondant au céfotaxime non-hydrolysé et un pic à 2 % correspondant au céfotaxime hydrolysé (Figure 54). La masse moléculaire obtenue pour ce second pic en SM est de 414,07 Da. Cette forme correspond à une ouverture du cycle β -lactame associé à une décarboxylation et à une déacétylation, déjà observé en SM dans une autre étude (232).

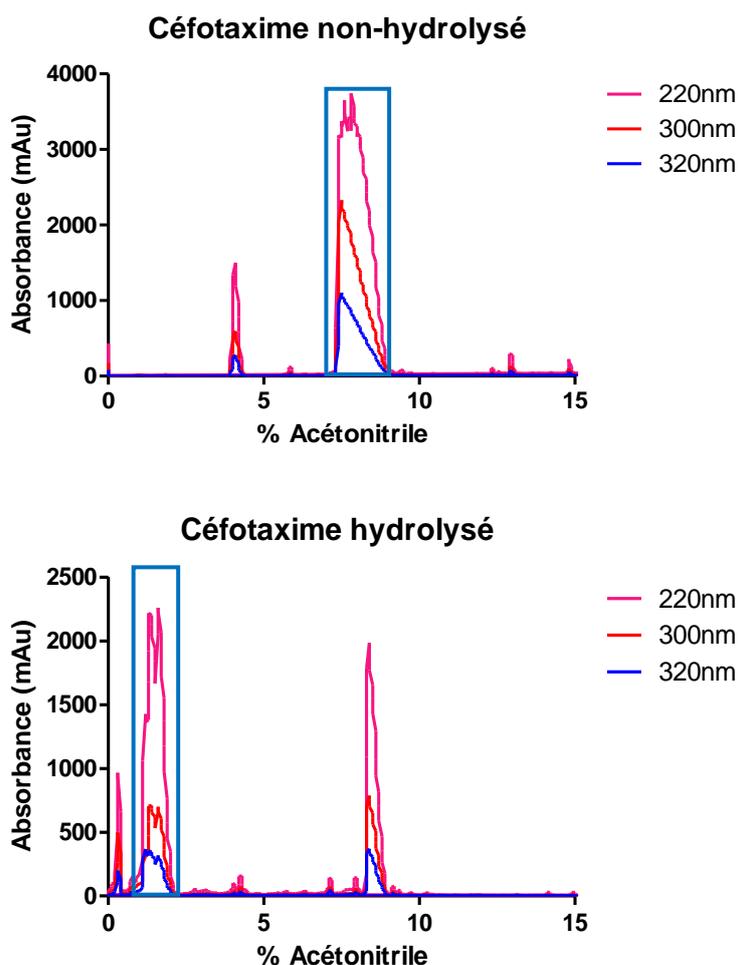


Figure 54 : Les profils d'élution du céfotaxime non-hydrolysé et du céfotaxime hydrolysé en chromatographie en phase inverse.

Protocole : Le céfotaxime non-hydrolysé et le céfotaxime hydrolysé ont été purifiés par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile (0 à 80 %) sur une colonne C18 d'un appareil de chromatographie AKTA. Le volume d'injection sur la colonne est de 2 mL. Le poids moléculaire est vérifié par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse où un cycle de séparation de 15 minutes sur colonne C18 est réalisé. Puis, l'échantillon est ionisé à l'aide d'une source électrospray et les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge au sein du quadripôle. Pour le céfotaxime non-hydrolysé, le pic d'intérêt est à 8,5 %. Pour le céfotaxime hydrolysé, le pic d'intérêt est à 2 %.

II.2.2. Le suivi de la réponse immunitaire des souris

II.2.2.1. Le matériel et les méthodes

Des injections par voie sous-cutanée de 50 µg de l'immunogène/souris ont été réalisées toutes les trois semaines pendant trois mois, à raison de quatre souris par immunogène. Deux semaines après chaque immunisation, des prélèvements sanguins appelés saignées, sont réalisés (Figure 47) et les anticorps spécifiques du céfotaxime sont dosés par réaction immuno-enzymatique.

Pour ce faire, des anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris (CAS) (Cas n°115-005-066, Jackson ImmunoResearch) sont immobilisés par adsorption passive sur des plaques de microtitration 96 puits (plaque Nunc-Immuno, Thermo Fisher Scientific). 100 µL d'une solution CAS à 10 µg/mL en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 sont déposés et incubés sur la nuit à température ambiante. Puis, la plaque est vidée et 300 µL de tampon EIA-PVP (Phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 + NaCl 0,15 M + PVP 0,1 % + Azide de sodium 0,01 %) sont déposés pour la saturation et la conservation des plaques. Après 1 jour de saturation, les plaques sont lavées en tampon de lavage (phosphate de potassium 10 mM pH 7,4 + Tween 20 0,05 %). Les prélèvements sanguins sont dilués en tampon EIA-PVP, à raison de dilutions aux 1/100^{ième} ; 1/1 000^{ième} ; 1/10 000^{ième} ; 1/100 000^{ième}. 50 µL de chaque dilution sont déposés en double sur une plaque de microtitration où a été immobilisé le CAS. Simultanément, 50 µL de l'antibiotique-biotine non-hydrolysé préalablement dilué en tampon EIA-PVP, sont déposés dans les puits avec les différentes dilutions des prélèvements sanguins. L'incubation est faite sur une nuit à 4°C. A l'issue de l'incubation sur la nuit pour les deux cas, 2*3 lavages en tampon de lavage sont réalisés puis 100 µL de Streptavidine-acétylcholinestérase à 1 unité enzymatique (UE)/mL (c'est-à-dire, la quantité d'enzyme donnant une absorbance d'une unité à DO_{414 nm} en 1 minute dans 1 mL) sont déposés et incubés pendant 1 heure à température ambiante. Après 2*5 lavages en tampon de lavage, 200 µL du réactif d'Ellmann (DTNB + acétylthiocholine iodide) sont ajoutés. Les plaques sont lues à DO_{414 nm} au bout de 30 minutes et 1 heure

(Figure 55). L'intensité des signaux obtenus lors de ce test est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques du céfotaxime non-hydrolysé.

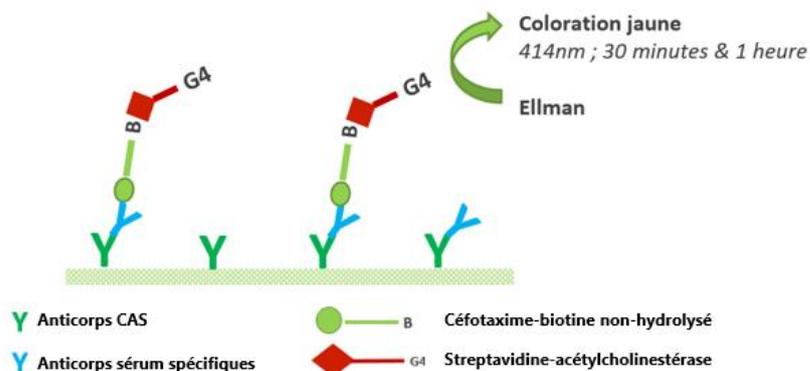


Figure 55 : Le dosage immuno-enzymatique pour suivre les anticorps spécifiques du céfotaxime non-hydrolysé.

Protocole : Les anticorps présents dans les prélèvements sanguins sont capturés par un premier anticorps CAS immobilisé sur la paroi des puits d'une plaque de microtitration 96 puits. Du céfotaxime-biotine non-hydrolysé est ajouté dans chaque puits. L'incubation est faite sur une nuit à 4°C. Puis, après lavage des plaques, de la streptavidine-acétylcholinestérase est déposée et incubée pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, du réactif d'Ellmann (DTNB + acétylthiocholine iodide) est ajouté. Les plaques sont lues à $DO_{414\text{ nm}}$ au bout de 30 minutes et 1 heure. L'intensité des signaux obtenus lors de ce test est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques du céfotaxime non-hydrolysé ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris ; DTNB : acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)).

Pour la sélection des anticorps spécifiques et l'évaluation de l'affinité de ces mêmes anticorps, différents tests sont mis en place avec les différentes formes d'antibiotiques décrites précédemment. Ces derniers sont présentés en Figure 56.

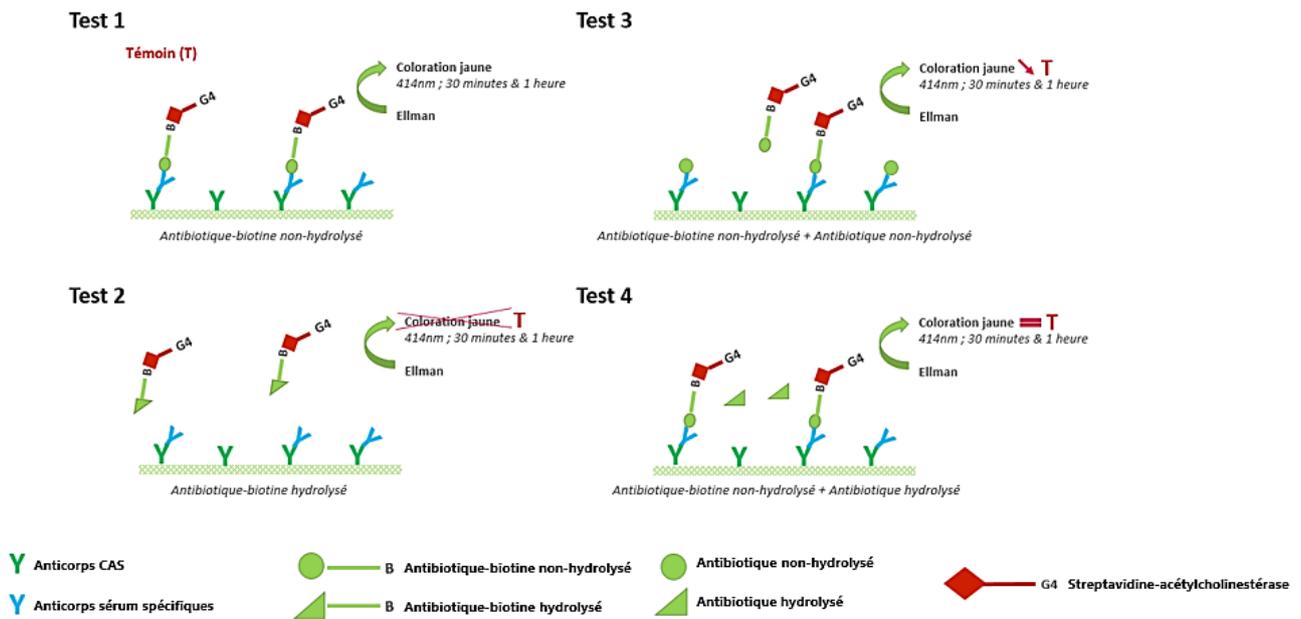


Figure 56 : Les dosages immuno-enzymatiques pour suivre les anticorps spécifiques d'un antibiotique dans les prélèvements sanguins, pour la sélection des hybridomes et la caractérisation des anticorps.

Protocole : **Test 1** : Dans ce test, les anticorps présents dans les prélèvements sanguins sont capturés par un premier anticorps CAS immobilisé sur la paroi des puits d'une plaque de microtitration 96 puits. De l'antibiotique-biotine non-hydrolysé est ajouté dans chaque puits. Après une incubation à 4°C pendant une nuit et après lavage, de la streptavidine-acétylcholinestérase est déposée et incubée pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, du réactif d'Ellman (DTNB + acétylthiocholine iodide) est ajouté. Les plaques sont lues à $DO_{414\text{ nm}}$ au bout de 30 minutes et 1 heure. L'intensité des signaux obtenus lors de ce test est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques de l'antibiotique non-hydrolysé. **Test 2** : Le même principe que le test 1 est réalisé. L'antibiotique-biotine non-hydrolysé est remplacé par l'antibiotique-biotine hydrolysé. **Test 3** : Le même principe que le test 1 est réalisé. L'antibiotique non-hydrolysé est ajouté avec l'antibiotique-biotine non-hydrolysé. **Test 4** : Le même principe que le test 1 est réalisé. L'antibiotique hydrolysé est ajouté avec l'antibiotique-biotine non-hydrolysé ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris ; DTNB : acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)).

Pour les tests 1 et 2, l'apparition d'un signal dans les puits indique la présence d'anticorps anti-céfotaxime non hydrolysé et anti-céfotaxime hydrolysé respectivement. Les souris sélectionnées seront celles pour lesquelles les saignées ont donné un signal maximal dans le test 1 et minimal dans le test 2.

Pour les tests 3 et 4, une baisse des signaux à $DO_{414\text{ nm}}$ proportionnelle à la concentration en compétiteur révèle la présence d'anticorps reconnaissant le compétiteur : céfotaxime non-hydrolysé (test 3) ou céfotaxime hydrolysé (test 4). D'autre part, ces tests permettent d'évaluer la spécificité relative des anticorps pour le céfotaxime non-hydrolysé et le céfotaxime hydrolysé. Ainsi, si la baisse du signal est similaire pour les deux formes de

céfotaxime alors les anticorps possèdent la même affinité pour ces deux molécules. Si la baisse du signal est plus faible pour l'une des deux formes de céfotaxime alors l'anticorps possède une affinité plus faible pour cette forme.

Les graphiques obtenus sont $f(\text{[dilution saignée]}) = \text{Absorbance (mAu)}$ pour le test 1 et $f(\text{[Antibiotique]}) = B/B_0 (\%)$ pour le test 3. Pour rappel, le signal B_0 correspond à l'absorbance obtenue en absence de compétiteur (Absorbance maximale). Le signal B est l'absorbance obtenue lorsque le compétiteur et le marqueur sont en interaction avec l'anticorps. Le $B/B_0 (50 \%)$ correspond à la concentration en compétiteur où 50 % du signal issu du marqueur est déplacé par le compétiteur (exemple de courbe en Figure 57).

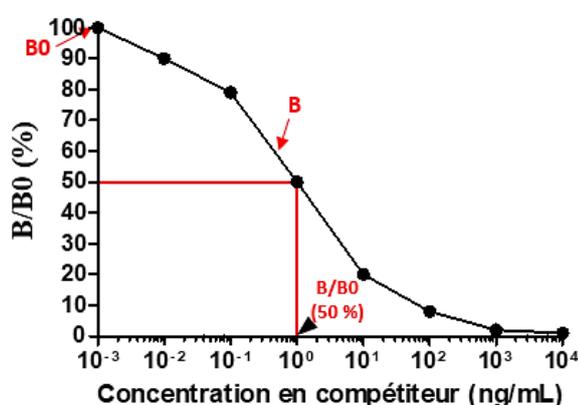


Figure 57 : Exemple de courbe d'étalonnage pour un dosage par compétition.

Descriptif : Dans cet exemple, le signal B_0 correspond à l'absorbance obtenue en absence de compétiteur (100 %). Le signal B est l'absorbance obtenue lorsque le compétiteur et le marqueur sont en interaction avec l'anticorps. Le $B/B_0 (50 \%)$ correspond à la concentration en compétiteur où 50 % du signal issu du marqueur est déplacé par le compétiteur.

II.2.2.2. Les résultats et l'interprétation

Dans un premier temps, la concentration optimale à utiliser pour le céfotaxime-biotine non-hydrolysé est définie. Avec le test 1, les concentrations suivantes ont été testées : 1 $\mu\text{g/ml}$; 100 ng/ml ; 10 ng/ml , sur la saignée n°3 de la souris Biozzi 173. La dilution avec le moins de non-spécifique et sans perte significative de signal à $\text{DO}_{414 \text{ nm}}$ a été sélectionnée. Ainsi, la concentration à 10 ng/ml est gardée.

Puis, à partir des différentes saignées récupérées, un dosage est réalisé sur chacune d'entre elles avec le test 1. Le temps de révélation optimal sélectionné est de 30 minutes (absorbance entre 1,5 à 2,0 à $\text{DO}_{414 \text{ nm}}$). Après 30 minutes de révélation avec le réactif d'Ellmann, les plaques sont lues et les résultats sont présentés en Figure 58.

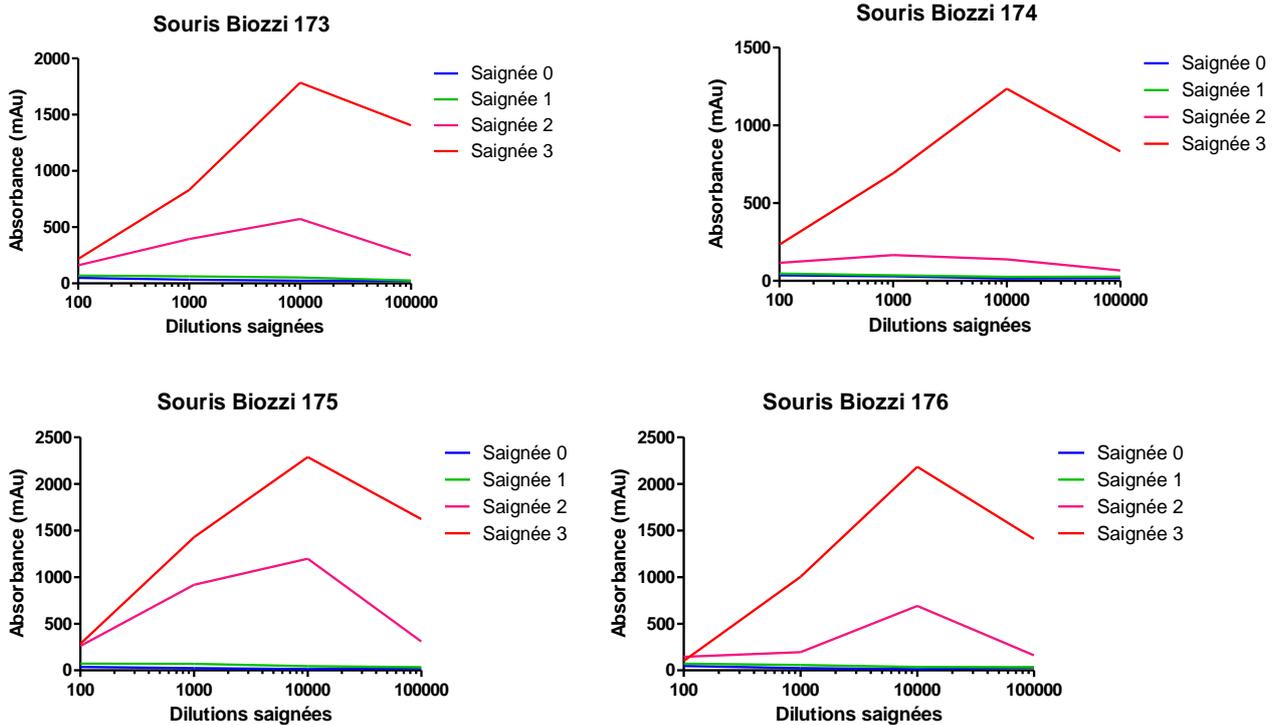


Figure 58 : Le suivi des réponses immunitaires sur les saignées des souris immunisées avec du céfotaxime-BSA.

Protocole : Les prélèvements sanguins sont dilués aux $1/100^{\text{ième}}$; $1/1\ 000^{\text{ième}}$; $1/10\ 000^{\text{ième}}$; $1/100\ 000^{\text{ième}}$. Sur les plaques où du CAS a été immobilisé, $50\ \mu\text{L}$ de chaque dilution sont déposés en double sur une plaque de microtitration, et $50\ \mu\text{L}$ de céfotaxime-biotine non-hydrolysé à $10\ \text{ng/mL}$ est déposé dans chacun des puits. L'incubation est faite sur une nuit à 4°C . Puis, la révélation des puits à l'aide de la streptavidine-acétylcholinestérase et du réactif d'Ellmann est réalisée. L'absorbance à $DO_{414\ \text{nm}}$ est lue à 30 minutes d'incubation ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris).

Toutes les souris Biozzi indiquent des absorbances positives dès la saignée n°2, avec les plus fortes intensités pour les saignées n°3. Les souris Biozzi 175 et 176 ont les plus forts signaux pour les saignées n°3. Pour sélectionner les deux souris à utiliser pour la fusion, des compétitions en ELISA sont réalisées sur les différentes saignées.

Au préalable, des optimisations sur la concentration en céfotaxime-biotine non-hydrolysé et en dilution des saignées n°3 sont réalisées de telles sortes à être en quantité limitante pour ces deux composants (autour d'une $DO_{414\ \text{nm}}$ de 0,5 après 30 minutes de révélation). Ces études ont permis de sélectionner les conditions suivantes :

- Souris Biozzi 173 ; Saignée n°3 : $1/100\ 000$ – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé : $1\ \text{ng/mL}$;
- Souris Biozzi 174 ; Saignée n°3 : $1/100\ 000$ – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé : $10\ \text{ng/mL}$;

- Souris Biozzi 175 ; Saignée n°3 : 1/200 000 – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé : 3 ng/mL ;
- Souris Biozzi 176 ; Saignée n°3 : 1/200 000 – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé : 1 ng/mL.

Ensuite, le test est réalisé pour tracer les courbes de compétitions pour chaque saignée n°3 des quatre souris. Pour la compétition avec le céfotaxime non-hydrolysé, la gamme de concentration est : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL ; 0 ng/mL. Après 30 minutes de révélation avec le réactif d'Ellmann, les plaques sont lues et les résultats sont présents en Figure 59.

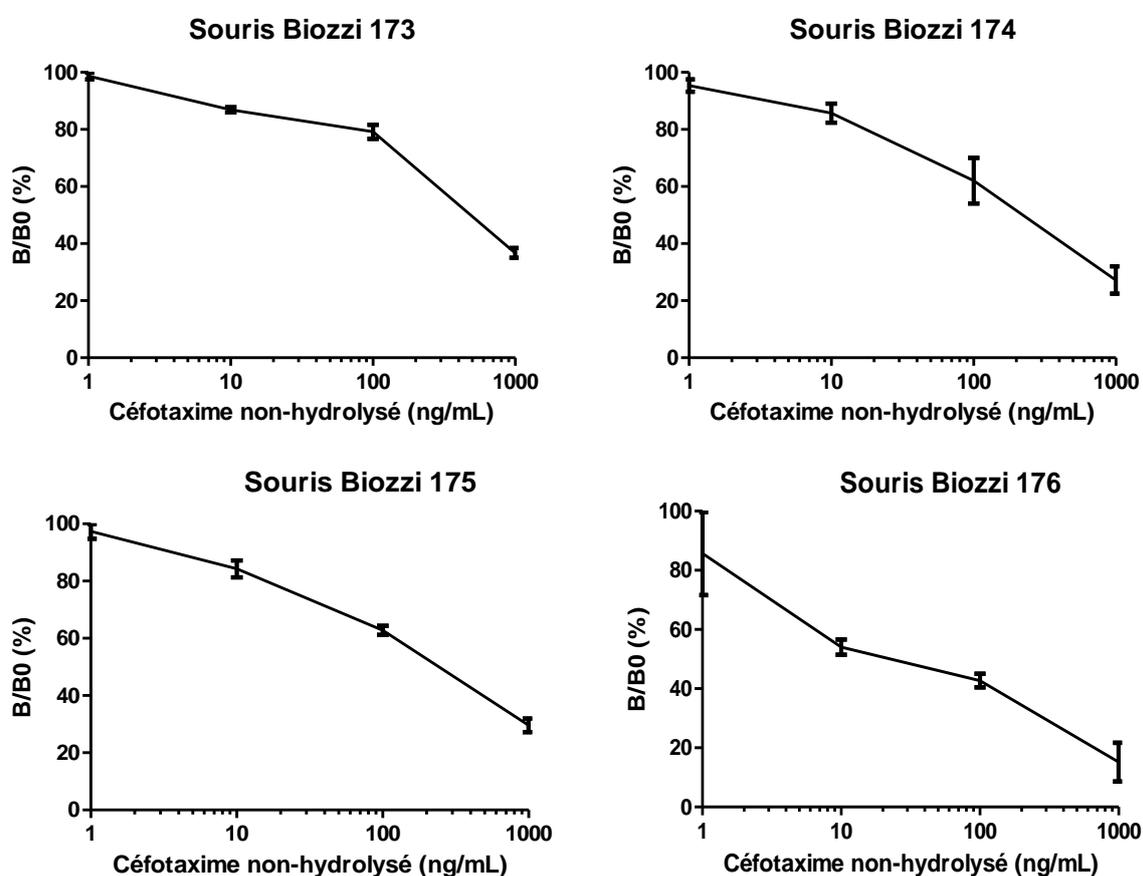


Figure 59 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime sur les saignées des souris immunisées avec du céfotaxime-BSA.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, 50 μ L d'anticorps du dernier prélèvement sanguin de chaque souris sont mis en compétition avec 50 μ L de céfotaxime-biotine non-hydrolysé (souris Biozzi 173 à 176, respectivement 1 ng/mL, 10 ng/mL, 3 ng/mL, 1 ng/mL) et 50 μ L de céfotaxime non-hydrolysé (différentes concentrations testées : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL ; 0 ng/mL). Pour chaque concentration de céfotaxime non-hydrolysé, le pourcentage de déplacement du céfotaxime-biotine non-hydrolysé est déterminé ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris).

Les courbes de compétitions présentées ci-dessus indiquent des diminutions de signal de 50 % avec des concentrations en céfotaxime non-hydrolysé inférieures à 1 µg/ml :

- Souris Biozzi 173 ; B/B0 (50 %) : 0,971 µg/mL ;
- Souris Biozzi 174 ; B/B0 (50 %) : 0,134 µg/mL ;
- Souris Biozzi 175 ; B/B0 (50 %) : 0,223 µg/mL ;
- Souris Biozzi 176 ; B/B0 (50 %) : 0,094 µg/mL.

La diminution du signal avec la plus petite concentration est obtenue avec la saignée de la souris Biozzi 176, et similaire entre les souris Biozzi 174 et 175. Par contre, la souris Biozzi 173 présentait un taux d'anticorps spécifiques inférieur aux autres souris Biozzi. Au vu des résultats obtenus, les souris Biozzi 175 et 176 sont donc sélectionnées pour initier la fusion et obtenir des hybridomes.

II.2.3. La sélection des hybridomes et la caractérisation des anticorps

II.2.3.1. La sélection des hybridomes

II.2.3.1.1. Le matériel et les méthodes

L'obtention des hybridomes s'est faite selon le protocole décrit par Kohler G. et Milstein C. (239). Les deux souris possédant la meilleure réponse immunitaire sont sacrifiées et les rates sont récupérées pour être broyées. Les splénocytes extraits, sont mélangés à des cellules de myélome murin (NS-1) avec un ratio 3 : 1. Après centrifugation, le culot de cellules est repris par du polyéthylène glycol, qui favorise la fusion membranaire. Après lavage, les cellules sont suspendues dans du milieu Hypoxanthine-Aminoptérine-Thyamidine (Gibco, Life Technologies), puis sont réparties en microplaques de culture contenant du milieu RPMI 1640 + sérum de veau foetal 15 % (Gibco, Life Technologies) et des macrophages (favorisent la survie cellulaire). Les cellules sont cultivées à 37 °C et 7 % de CO₂. Dans ce milieu de culture, seuls les hybridomes (cellules issues de la fusion entre une cellule de myélome (NS1) et une cellule splénique) sont capables de proliférer. Après sept à dix jours, les milieux de

cultures des hybridomes sont récupérés et la sécrétion d'anticorps spécifiques est évaluée par les tests immuno-enzymatiques décrits précédemment.

Pour effectuer les différents tests, les concentrations du céfotaxime-biotine non-hydrolysé et du céfotaxime-biotine hydrolysé ont été déterminées. Ainsi, la concentration du céfotaxime-biotine non-hydrolysé est de 0,33 ng/mL et la concentration du céfotaxime-biotine hydrolysé est de 1 ng/mL. La concentration du céfotaxime non-hydrolysé et du céfotaxime hydrolysé pour la sélection des hybridomes est de 1 µg/mL.

Une pré-sélection sur cent hybridomes est réalisée avec les tests 1 et 2. L'objectif est d'obtenir les plus fortes absorbances à $DO_{414\text{ nm}}$ pour le test 1 et les plus faibles voire inexistantes pour le test 2. Puis, les surnageants des cent hybridomes sont évalués, avec les tests 1 à 4, le but étant de sélectionner les vingt hybridomes présentant les signaux les plus élevés pour ces tests 1 et 4, et les plus faibles (voire inexistantes) pour les tests 2 et 3. Ces vingt hybridomes sont clonés par la méthode de dilution limite afin d'obtenir une lignée cellulaire pure sécrétant un anticorps monoclonal issu d'un hybridome. Pour ce faire, une quantité connue de cellules est diluée dans un grand volume de culture et répartie sur une plaque 96 puits avec pour but d'avoir une population homogène (résultats équivalents avec les différents tests immuno-enzymatiques).

Les vingt anticorps monoclonaux obtenus, sont produits en grande quantité par culture *in vitro* en milieu RPMI + sérum de veau foetal « Low IgG » 10 % (Gibco, Life Technologies). La purification s'effectue par chromatographie d'affinité protéine G greffée sur un gel (GE Healthcare) en utilisant un appareil de chromatographie AKTA (AKTExpress, GE Healthcare). Chaque surnageant est injecté dans l'appareil de purification, puis un lavage avec du tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,4 est réalisé. Un tampon glycine 100 mM pH 2,5 est ajouté pour éluer les anticorps fixés sur les protéines G. L'appareil collecte les fractions en fonction de l'absorbance à $DO_{280\text{ nm}}$. Les fractions contenant l'anticorps purifié sont regroupées, puis dialysées en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4. Après dialyse, la concentration des anticorps monoclonaux est calculée à partir de l'absorbance des solutions à 280 nm ; 1 mg d'anticorps correspondant à $1,4 * DO_{280\text{ nm}}$. Enfin, un gel SDS-Page à 13,4 % est réalisé pour déterminer la pureté des anticorps en conditions non réduite et réduite.

L'isotypage de l'anticorps monoclonal présent dans le milieu de culture est déterminé avec le kit « Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping » (Thermo Fisher Scientific).

II.2.3.1.2. Les résultats et l'interprétation

Sur les 458 hybridomes obtenus, une première sélection a été réalisée avec les tests 1 et 2 ; 107 hybridomes ont été sélectionnés avec une reconnaissance maximale pour le céfotaxime-biotine non-hydrolysé et minimale pour le céfotaxime-biotine hydrolysé. Puis, une seconde sélection a été faite avec les tests 1, 2, 3 et 4. Sur ces tests, ceux indiquant les meilleurs déplacements avec le céfotaxime non-hydrolysé et des déplacements nuls pour le céfotaxime hydrolysé sont sélectionnés ; dix-neuf hybridomes ont été sélectionnés.

Après les étapes de clonage par la méthode des dilutions, les hybridomes ont été mis en culture pour produire ces anticorps, puis ont été purifiés. La pureté et l'isotypage de chaque anticorps ont été déterminés.

II.2.3.2. L'évaluation de la spécificité

II.2.3.2.1. Le matériel et les méthodes

Pour évaluer la spécificité de chaque anticorps monoclonal, les tests 3 et 4 décrits précédemment sont réalisés, cette fois-ci, avec différentes concentrations de céfotaxime non-hydrolysé et hydrolysé, utilisés comme compétiteur. Pour déterminer les concentrations optimales en anticorps pour ces tests, les concentrations suivantes ont été testées : 1 000 ng/mL, 300 ng/mL, 100 ng/mL, 30 ng/mL, 10 ng/mL, 3 ng/mL ; avec le céfotaxime-biotine non-hydrolysé à une concentration de 0,33 ng/mL. L'objectif étant d'être à environ $DO_{414\text{ nm}}$ de 0,5 après une heure de révélation en absence de compétiteur. Puis, les concentrations des compétiteurs utilisées sont les suivantes : 0,2 nmol/mL, 0,02 nmol/mL, 0,002 nmol/mL, 0,0002 nmol/mL, 0 nmol/mL. Pour certains anticorps, des concentrations plus élevées en céfotaxime ont dues être utilisées afin d'observer une baisse du signal.

Les solutions ont été déposées en microplaque 96 puits, sur la paroi où du CAS a été préalablement immobilisé, à raison de 50 μL de marqueur (céfotaxime-biotine non-

hydrolysé), de 50 µL de compétiteur (céfotaxime non hydrolysé ou hydrolysé) et de 50 µL de la solution d'anticorps. Une incubation des microplaques pendant une nuit à 4°C est réalisée. Ensuite, après un lavage en tampon de lavage, 100 µL de streptavidine-acétylcholinestérase ont été ajoutés pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation. Après lavage des puits en tampon de lavage, 200µL de réactif d'Ellmann ont été déposés. La lecture de l'absorbance a été effectuée après 1 heure d'incubation sous agitation à DO_{414 nm} au spectrophotomètre (Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific).

Les graphiques obtenus par superposition des différentes courbes, sont f([Antibiotique]) = B/B0 (%). Pour rappel, le signal B0 correspond à l'absorbance obtenue en absence de compétiteur (Absorbance maximale). Le signal B est l'absorbance obtenue lorsque le compétiteur et le marqueur sont en interaction avec l'anticorps. Le B/B0 (50 %) correspond à la concentration en compétiteur où 50 % du signal issu du marqueur est déplacé par le compétiteur. Le pourcentage de réactions croisées est calculé en divisant une concentration de céfotaxime par la concentration de compétiteur qui induit une baisse de signal similaire à cette concentration de céfotaxime. Ce résultat est multiplié par 100 pour être exprimé en pourcentage (exemple de courbe en Figure 60).

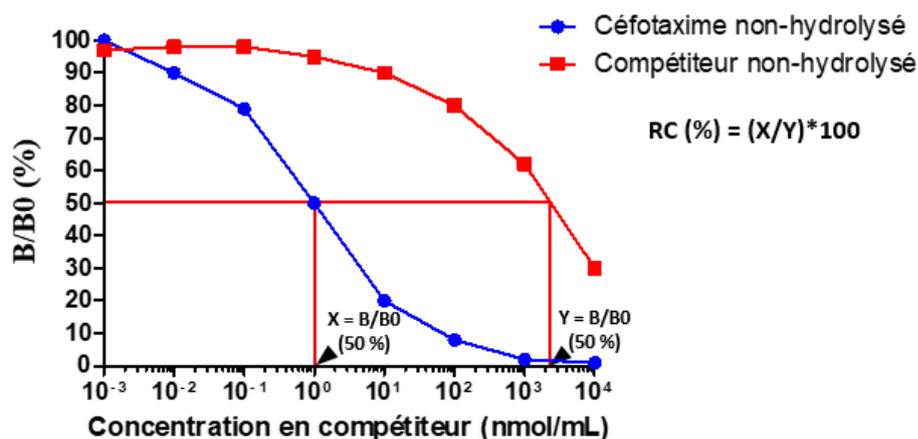


Figure 60 : Exemple de courbe d'étalonnage pour un dosage par compétition.

Descriptif : Dans cet exemple, le signal B0 correspond à l'absorbance obtenue en absence de compétiteur (100 %). Le signal B est l'absorbance obtenue lorsque le compétiteur et le marqueur sont en interaction avec l'anticorps. Le B/B0 (50 %) correspond à la concentration en compétiteur où 50 % du signal issu du marqueur est déplacé par le compétiteur. Le pourcentage de réactions croisées (RC) est calculé en divisant une concentration (X) de céfotaxime par la concentration (Y) de compétiteur qui permet une diminution du signal équivalente à celle induite par la concentration X de céfotaxime. Ce résultat est multiplié par 100 pour être exprimé en pourcentage.

II.2.3.2.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats obtenus après 1 heure d'incubation avec le réactif d'Ellmann ont permis d'établir les profils de courbes de compétition pour les dix-neuf anticorps sélectionnés. Pour plus de clarté, les différentes situations rencontrées sont représentées sur différentes figures. Sur la Figure 61, les courbes de compétition de cinq anticorps avec le céfotaxime non-hydrolysé (test 3 ; trait plein) et avec le céfotaxime hydrolysé (test 4 ; trait pointillé) sont présentées.

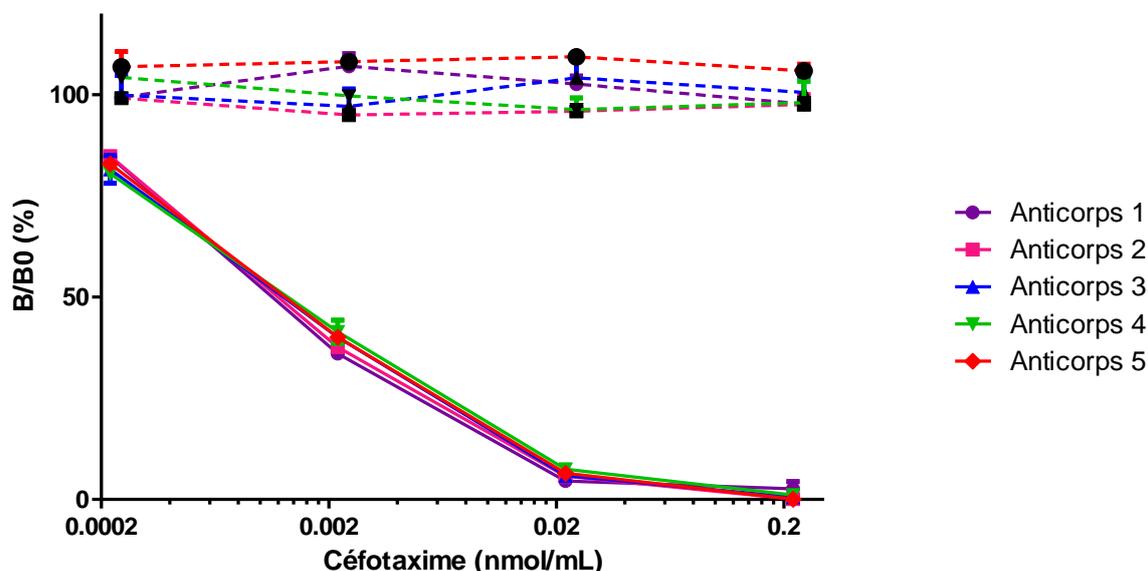


Figure 61 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime sur cinq anticorps.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, 50 μ L de céfotaxime-biotine non-hydrolysé (0,33 ng/mL) et 50 μ L de céfotaxime non-hydrolysé (trait plein) ou hydrolysé (trait pointillé) (différentes concentrations testées : 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL ; 0 nmol/mL) sont mis en compétition pour la reconnaissance par cinq anticorps monoclonaux. Pour chaque concentration de céfotaxime, le pourcentage de déplacement du céfotaxime-biotine non-hydrolysé est déterminé ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris).

Pour les cinq anticorps, les courbes de compétition obtenues sont quasiment identiques, et le B/B0 (50 %) est inférieur à 2 pmol/mL avec le céfotaxime non-hydrolysé. Cependant, comme illustré sur la Figure 62, les courbes obtenues avec les différents anticorps ne sont pas toutes identiques.

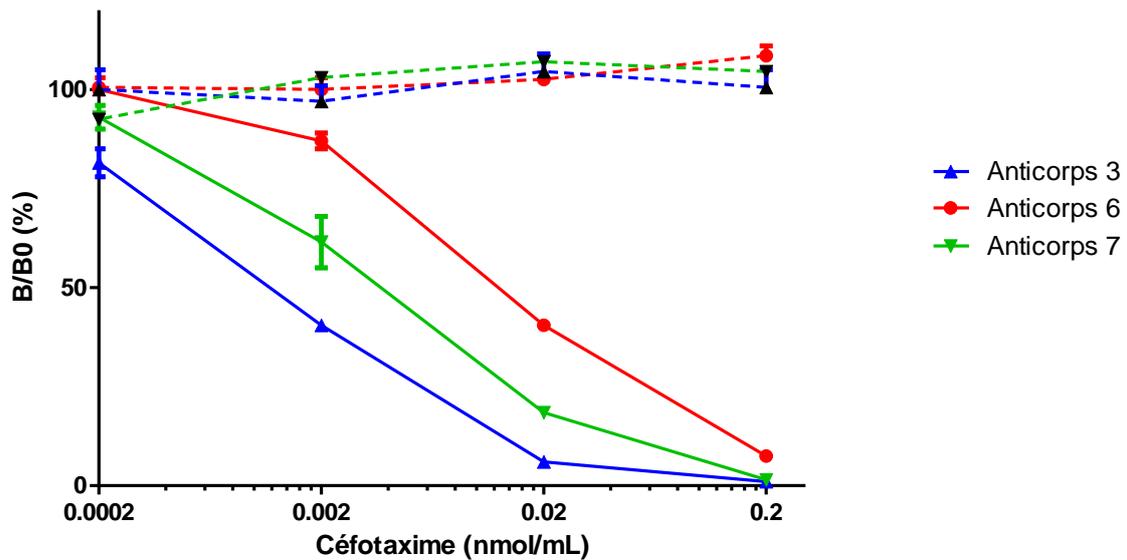


Figure 62 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime sur trois anticorps.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, 50 μ L de céfotaxime-biotine non-hydrolysé (0,33 ng/mL) et 50 μ L de céfotaxime non-hydrolysé (trait plein) ou hydrolysé (trait pointillé) (différentes concentrations testées : 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL ; 0 nmol/mL) sont mis en compétition pour leur reconnaissance par trois anticorps monoclonaux. Pour chaque concentration de céfotaxime, le pourcentage de déplacement du céfotaxime-biotine non-hydrolysé est déterminé ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris).

Ainsi, pour l'anticorps 3, le B/B0 (50 %) est inférieur à 2 pmol/mL, pour l'anticorps 6, le B/B0 (50 %) est d'environ 3,29 pmol/mL et pour l'anticorps 7, le B/B0 (50 %) est de 22 pmol/mL avec le céfotaxime non-hydrolysé.

Pour ces sept anticorps (anticorps 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) représentés, une baisse du signal par le céfotaxime hydrolysé n'est observé que pour des concentrations très élevées, ce qui démontre la spécificité de l'anticorps vis-à-vis de la forme non-hydrolysée de l'antibiotique (Figure 63).

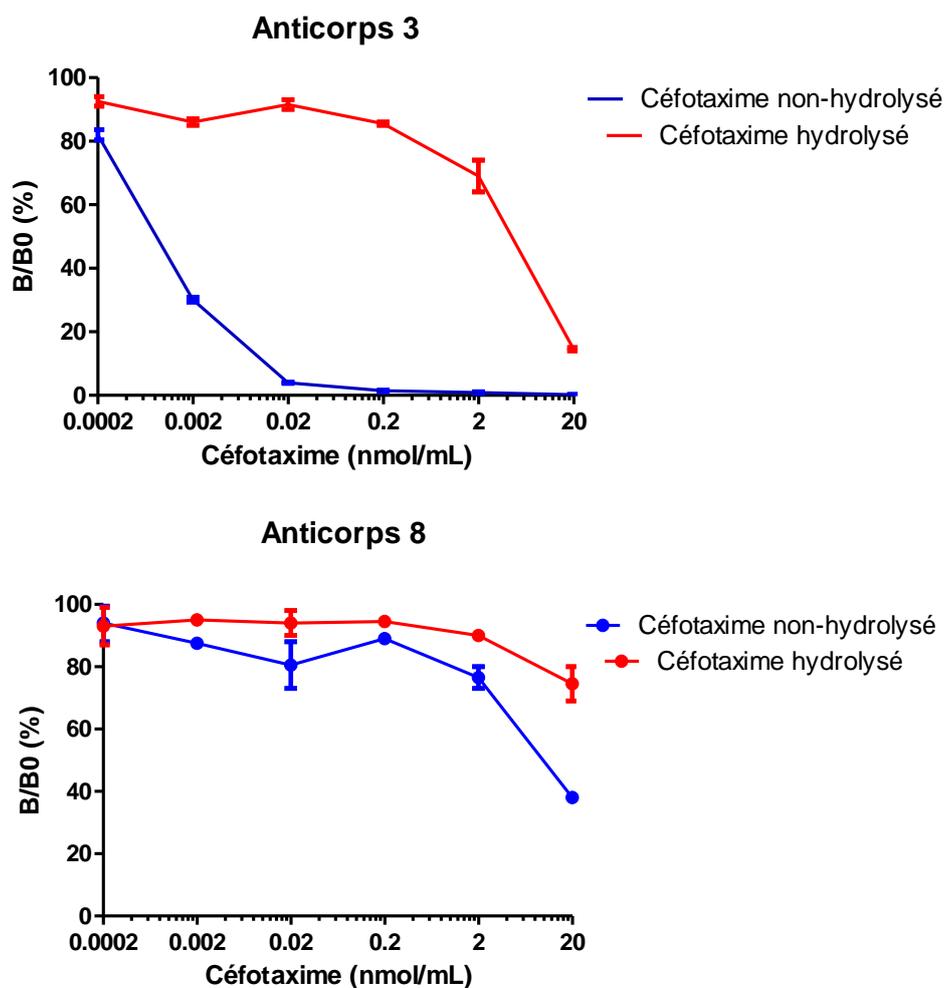


Figure 63 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime sur deux anticorps.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, 50 μ L de céfotaxime-biotine non-hydrolysé (0,33 ng/mL) et 50 μ L de céfotaxime non-hydrolysé ou hydrolysé (différentes concentrations testées : 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL ; 0 nmol/mL) sont mis en compétition pour leur reconnaissance par deux anticorps monoclonaux. Pour chaque concentration de céfotaxime, le pourcentage de déplacement du céfotaxime-biotine non-hydrolysé est déterminé ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris).

Ainsi, le céfotaxime hydrolysé est reconnu par les anticorps mais avec un taux de réaction croisée très faible (exemple avec l'anticorps 3). Parmi les dix-neuf anticorps obtenus, l'anticorps 8 présentait des courbes similaires entre les deux formes de céfotaxime. Le résultat obtenu avec l'anticorps 8 (courbes similaires) était dû à une mauvaise reconnaissance de la forme non-hydrolysée plutôt qu'à une meilleure reconnaissance de la forme hydrolysée.

Les concentrations en B/B0 (50 %) avec le céfotaxime non-hydrolysé ainsi que les pourcentages de réactions croisées des dix-neuf anticorps obtenus entre les deux formes de céfotaxime sont répertoriés dans le Tableau 7.

Anticorps monoclonaux obtenus	Concentrations en B/B0 (50 %) du céfotaxime non-hydrolysé (nmol/mL)	Réactions croisées entre les deux formes de céfotaxime (%)
Anticorps 1	0,0011	< 0,1 %
Anticorps 2	0,0011	< 0,1 %
Anticorps 3	0,0011	< 0,1 %
Anticorps 4	0,0012	< 0,1 %
Anticorps 5	0,0011	< 0,1 %
Anticorps 6	0,018	< 0,1 %
Anticorps 7	0,0034	< 0,1 %
Anticorps 8	251,96	1295,76 %
Anticorps 9	0,0017	< 0,1 %
Anticorps 10	0,0009	< 0,1 %
Anticorps 11	0,0018	< 0,1 %
Anticorps 12	0,0017	< 0,1 %
Anticorps 13	0,0019	< 0,1 %
Anticorps 14	0,0024	< 0,1 %
Anticorps 15	0,0074	< 0,1 %
Anticorps 16	0,0009	< 0,1 %
Anticorps 17	0,0025	< 0,1 %
Anticorps 18	0,0015	< 0,1 %
Anticorps 19	0,011	< 0,1 %

Tableau 7 : Les pourcentages de réactions croisées des dix-neuf anticorps obtenus entre les deux formes de céfotaxime ainsi que les concentrations B/B0 (50 %) du céfotaxime non-hydrolysé.

Descriptif : Le B/B0 (50 %) correspond à la concentration en compétiteur où 50 % du signal issu du marqueur est déplacé par le compétiteur. Les pourcentages de réactions croisées sont déterminés de la manière suivante : pour une baisse de signal similaire, la concentration de céfotaxime non-hydrolysé est divisée par la concentration de céfotaxime hydrolysé, et ce résultat est multiplié par 100 pour être exprimé en pourcentage. Dans le cas où le B/B0 (50 %) n'a pas été déterminé pour le céfotaxime hydrolysé (même à la plus forte concentration), la valeur < 0,1 % est inscrite.

Les B/B0 (50 %) pour le céfotaxime non-hydrolysé varient de 0,011 nmol/mL pour les anticorps 1, 2, 3, 5, et 19 à 251,96 nmol/mL pour l'anticorps 8. Dans le cas où aucune baisse de signal n'a été observé à 0,2 nmol/mL pour le céfotaxime hydrolysé, les réactions croisées sont inférieures à 0,1 %. Les résultats obtenus (Tableau 7) montrent que les réactions croisées entre les deux formes de céfotaxime sont très faibles, sauf pour l'anticorps 8 qui présente 1295,78 % (mauvaise reconnaissance du céfotaxime non-hydrolysé). Ainsi, la grande majorité des anticorps présente une bonne spécificité pour le céfotaxime non-hydrolysé.

II.2.3.3. L'évaluation de l'affinité

II.2.3.3.1. Le matériel et les méthodes

Pour évaluer l'affinité des anticorps vis-à-vis du céfotaxime, une technologie basée sur l'interférométrie a été utilisée (biolayer interferometry) et est représentée en Figure 64. Dans cette technologie, l'antigène ou l'anticorps est immobilisé à l'extrémité d'une fibre optique. De la lumière blanche est dirigée dans cette fibre optique et est réfléchi au niveau de l'extrémité de cette dernière. La formation du complexe antigène/anticorps à l'extrémité de cette fibre modifie la longueur d'onde de la lumière. Pour réaliser l'ensemble des étapes en plaques de microtitration et mesurer le décalage de la longueur d'onde ($\Delta\lambda$), un appareil nommé OCTET est utilisé (OCTET Red 96, Pall). Ainsi, les interactions entre l'antigène et l'anticorps sont mesurées en continu ce qui permet de calculer les constantes de dissociation (k_d) et d'association (k_a).

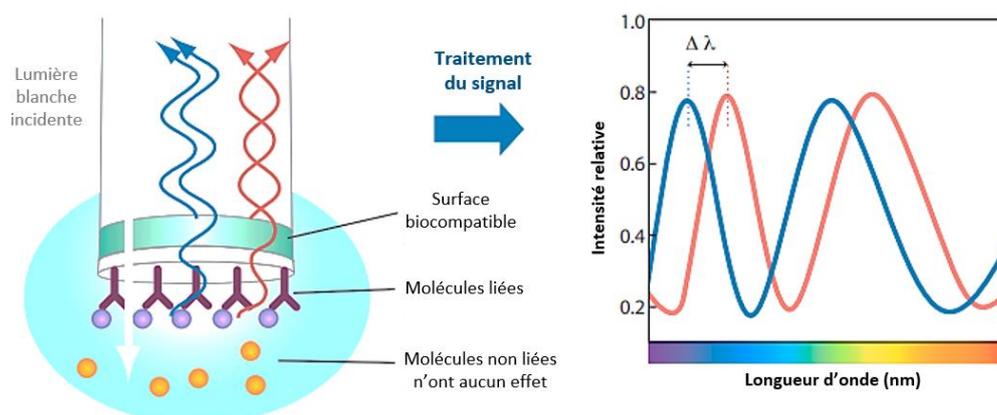


Figure 64 : Le principe du test d'interférométrie pour évaluer l'affinité des anticorps.

Descriptif : L'interférométrie est une technique d'analyse optique qui analyse le schéma d'interférence de la lumière blanche réfléchi par deux surfaces. La modification du nombre de molécules liées au biocapteur (fibres optiques sur lesquelles a été immobilisé de la streptavidine ou des anticorps) entraîne un décalage de longueur d'onde, mesuré en temps réel.

Pour chaque anticorps d'intérêt, le KD (k_d/k_a) est mesuré respectivement pour le céfotaxime-biotine non-hydrolysé et le céfotaxime-biotine hydrolysé. Plus le KD est faible, plus l'affinité de l'anticorps est forte. Pour ce faire, les deux molécules de céfotaxime biotinylées ont été utilisées à 1 $\mu\text{g/mL}$ avec des fibres optiques sur lesquelles a été immobilisée de la streptavidine (Sartorius). Une gamme de concentration pour chaque

anticorps est réalisée : 100 nM ; 33,3 nM ; 11,1 nM ; 3,7 nM ; 1,23 nM ; 0,41 nM ; 0,137 nM ; 0 nM. Chaque solution a été préparée dans un tampon OCTET (phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 + PVP 0,1 % + NaCl 0,15 M + Tween 20 0,02 % + Azide de sodium 0,01 %). Les senseurs doivent être immergés dans 200 μ L de solution pour chaque étape du test, qui sont les suivantes (Figure 65) :

- Définir une ligne de base : les fibres streptavidine sont plongées pendant 300 secondes dans du tampon OCTET ;
- Former les complexes streptavidine-biotine-antibiotique (céfotaxime non-hydrolysé ou hydrolysé) : les fibres sont immergées pendant 600 secondes dans du tampon OCTET ;
- Définir à nouveau une ligne de base : les fibres sont placées pendant 200 secondes dans du tampon OCTET ;
- Association des anticorps avec l'antibiotique (céfotaxime non-hydrolysé ou hydrolysé) : les fibres sont plongées dans les solutions d'anticorps pendant 300 secondes afin de former les complexes anticorps/antibiotiques ;
- Dissociation des complexes des anticorps : les fibres sont à nouveau plongées dans du tampon OCTET pendant 600 secondes afin de visualiser une dissociation du complexe antibiotique/anticorps.

Pour chaque concentration, un décalage de longueur d'onde est mesuré lorsqu'il y a fixation de l'anticorps au complexe. Ces valeurs permettent de calculer les k_d et k_a donnant ainsi des résultats sur l'affinité de l'anticorps vis-à-vis des deux formes de céfotaxime-biotine.

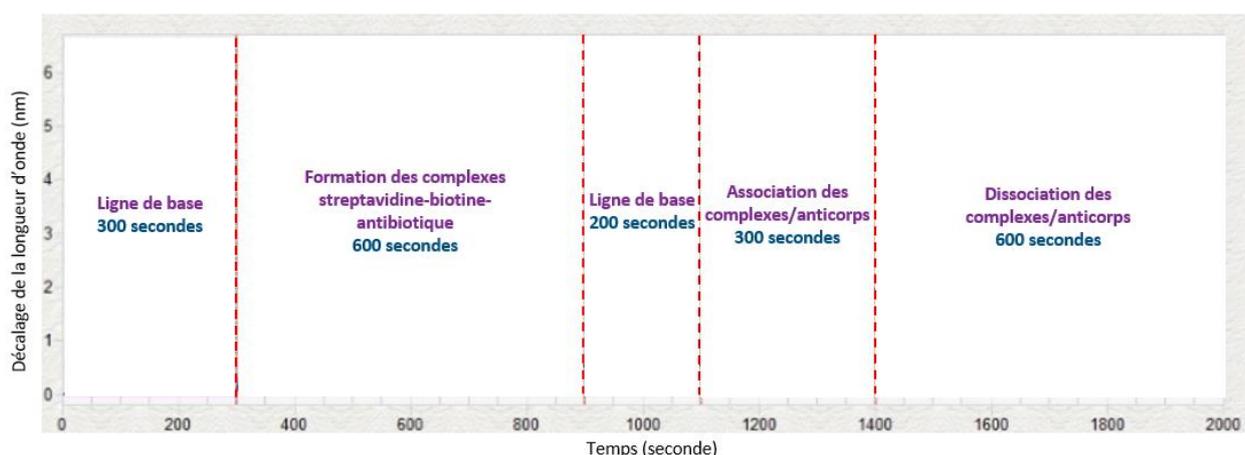


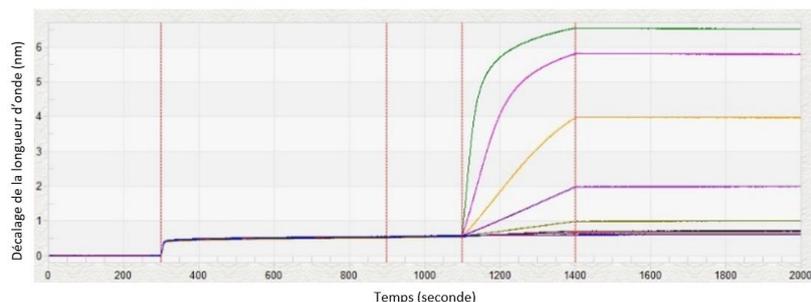
Figure 65 : Les différentes étapes du test d'interférométrie pour évaluer l'affinité des anticorps pour l'antibiotique-biotine.

Descriptif : Pour évaluer l'affinité des anticorps pour l'antibiotique-biotine par interférométrie, cinq étapes sont réalisées : **1-** Définir une ligne de base : les fibres streptavidine sont plongées pendant 300 secondes dans du tampon OCTET (phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 + PVP 0,1 % + NaCl 0,15 M + Azide de sodium 0,01 % + Tween 20 0,02 %) ; **2-** Former les complexes streptavidine-biotine-antibiotique : les fibres sont immergées pendant 600 secondes dans du tampon OCTET ; **3-** Définir à nouveau une ligne de base : les fibres sont placées pendant 200 secondes dans du tampon OCTET ; **4-** Association des anticorps avec l'antibiotique : les fibres sont plongées dans les solutions d'anticorps pendant 300 secondes afin de former les complexes anticorps/antibiotiques ; **5-** Dissociation des complexes des anticorps : les fibres sont à nouveau plongées dans du tampon OCTET pendant 600 secondes afin de visualiser une dissociation du complexe antibiotique/anticorps.

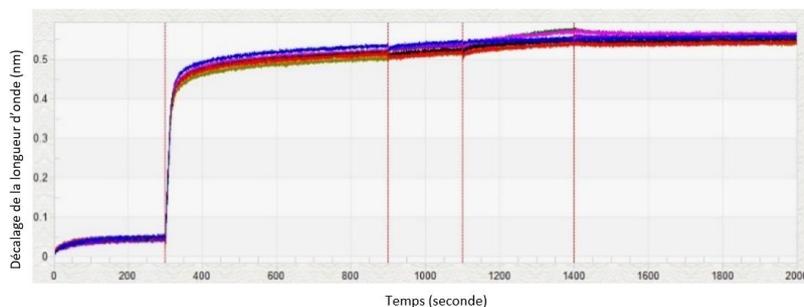
II.2.3.3.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats graphiques obtenus par l'OCTET sur les différentes étapes du test sont présentés en Figure 66 pour l'anticorps 3 et pour l'anticorps 8, sur les deux formes de céfotaxime-biotine.

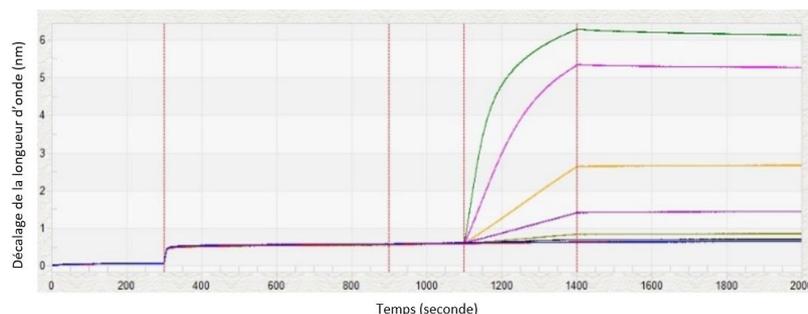
Anticorps 3 – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé



Anticorps 3 – Céfotaxime-biotine hydrolysé



Anticorps 8 – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé



Anticorps 8 – Céfotaxime-biotine hydrolysé

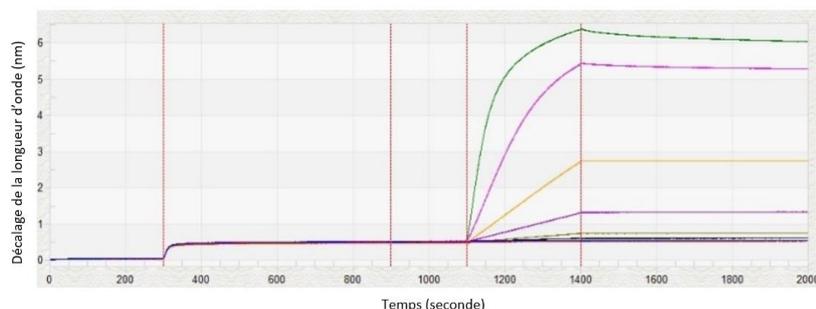


Figure 66 : Les graphiques obtenus en OCTET sur l'affinité du céfotaxime-biotine non-hydrolysé et du céfotaxime-biotine hydrolysé sur deux anticorps.

Descriptif : Les graphiques obtenus sont constitués de différentes phases qui sont : **1-** Une ligne de base pendant 300 secondes effectuée dans le tampon ; **2-** Une association entre le senseur streptavidine et le céfotaxime-biotine non-hydrolysé ou hydrolysé (concentration définie précédemment à 1 µg/mL) pendant 600 secondes. Chaque courbe correspond à une concentration d'anticorps ; **3-** Une ligne de base pendant 200 secondes effectuée dans le tampon ; **4-** Une association entre les anticorps et le céfotaxime-biotine-streptavidine pendant 300 secondes ; **5-** Une dissociation des complexes anticorps/céfotaxime-biotine-streptavidine pendant 600 secondes effectuée dans du tampon. L'association ou la dissociation sont mesurées par un décalage de longueur d'onde. Les courbes de couleur verte, violet clair, jaune, violet foncée, verte kaki, rose, noire et rouge correspondent respectivement aux concentrations d'anticorps à 100 nM, 33,3 nM, 11,1 nM, 3,7 nM, 1,23 nM, 0,41 nM, 0,137 nM, 0 nM.

Pour l'anticorps 3, une différence d'affinité est bien visible entre les formes non-hydrolysée et hydrolysée du céfotaxime-biotine, contrairement à l'anticorps 8 où la différence d'affinité n'est pas observable. Il faut noter que l'OCTET ajuste automatiquement les échelles aux valeurs obtenues, c'est pourquoi il y a un facteur 10 entre les échelles des deux graphiques pour l'anticorps 3. De même, à mesure que la concentration en anticorps augmente (différentes courbes de couleur), la quantité d'anticorps fixée sur les fibres optiques de streptavidine augmente et le décalage de longueur d'onde est ainsi de plus en plus important.

La même expérience a été réalisée sur les anticorps 1, 2, 4, 5, 6 et 7. A partir de ces données, la constante d'association k_a (1/M.s) et la constante de dissociation k_d (s) ont été calculées pour les différents anticorps d'intérêts et présentés dans le Tableau 8. Ces deux valeurs permettent de calculer la constante d'affinité K_D (M^{-1}) ($K_D = k_d/k_a$)

Anticorps	Céfotaxime-biotine non-hydrolysé			Céfotaxime-biotine hydrolysé		
	KD (M^{-1})	k_d (s)	k_a (1/M.s)	KD (M^{-1})	k_d (s)	k_a (1/M.s)
Anticorps 1	Non déterminé	$< 1,0 \cdot 10^{-12}$	$2,05 \cdot 10^5$	$1,35 \cdot 10^{-14}$	$3,62 \cdot 10^{-10}$	$2,68 \cdot 10^4$
Anticorps 2	Non déterminé	$< 1,0 \cdot 10^{-12}$	$1,73 \cdot 10^5$	$2,72 \cdot 10^{-14}$	$2,11 \cdot 10^{-9}$	$7,75 \cdot 10^4$
Anticorps 3	Non déterminé	$< 1,0 \cdot 10^{-12}$	$2,61 \cdot 10^5$	$8,60 \cdot 10^{-14}$	$1,66 \cdot 10^{-9}$	$1,93 \cdot 10^4$
Anticorps 4	Non déterminé	$< 1,0 \cdot 10^{-12}$	$2,19 \cdot 10^5$	$3,48 \cdot 10^{-12}$	$4,80 \cdot 10^{-9}$	$1,38 \cdot 10^3$
Anticorps 5	Non déterminé	$< 1,0 \cdot 10^{-12}$	$2,15 \cdot 10^5$	$4,28 \cdot 10^{-13}$	$1,74 \cdot 10^{-9}$	$4,07 \cdot 10^3$
Anticorps 6	$8,28 \cdot 10^{-18}$	$1,40 \cdot 10^{-12}$	$1,69 \cdot 10^5$	$3,80 \cdot 10^{-14}$	$2,56 \cdot 10^{-9}$	$6,74 \cdot 10^4$
Anticorps 7	$1,55 \cdot 10^{-16}$	$3,21 \cdot 10^{-11}$	$2,07 \cdot 10^5$	$1,41 \cdot 10^{-9}$	$8,83 \cdot 10^{-7}$	$6,25 \cdot 10^2$
Anticorps 8	$1,28 \cdot 10^{-15}$	$1,65 \cdot 10^{-10}$	$1,29 \cdot 10^5$	$3,41 \cdot 10^{-15}$	$5,11 \cdot 10^{-10}$	$1,50 \cdot 10^5$

Tableau 8 : Les constantes d'association et de dissociation et d'affinité pour le céfotaxime-biotine non-hydrolysé et le céfotaxime-biotine hydrolysé sur huit anticorps.

Protocole : Les constantes d'affinité (KD) ($K_D = k_d/k_a$) ont été calculées à partir des constantes d'association (k_a) et de dissociation (k_d). Lorsque le k_d (M) est de $< 1,0 \cdot 10^{-12}$, le KD n'a pas été déterminé.

Pour les anticorps 1 à 5, les k_d sont inférieurs à $1 \cdot 10^{-12}$ s pour le céfotaxime-biotine non-hydrolysé et entre 10^{-10} à 10^{-9} s pour le céfotaxime-biotine hydrolysé. De même, les constantes d'association k_a sont plus faibles pour la forme hydrolysée, comparée à la forme non-hydrolysée. Ces cinq anticorps démontrent une très bonne spécificité entre les deux formes liées à une bonne affinité pour la forme non-hydrolysée.

Pour les anticorps 6 et 7, le KD est plus faible pour la forme non-hydrolysée (respectivement 10^{-18} à $10^{-16} M^{-1}$) et plus forte pour la forme hydrolysée (respectivement 10^{-14} à $10^{-9} M^{-1}$).

¹⁴ et 10^{-9} M⁻¹). Cette différence d'affinité pour ces deux anticorps confirme les résultats précédents obtenus dans les tests par compétition (Figure 62).

Enfin, l'anticorps 8 montre des KD similaires pour les deux formes de céfotaxime-biotine (autour de 10^{-15} M⁻¹), ce qui explique les courbes de compétition similaires obtenues en ELISA (Figure 63). Ceci permet de confirmer une mauvaise reconnaissance de la forme non-hydrolysée et non une meilleure reconnaissance de la forme hydrolysée.

II.2.3.4. L'évaluation des réactions croisées avec d'autres antibiotiques

II.2.3.4.1. Le matériel et les méthodes

Pour évaluer les réactions croisées de chaque anticorps monoclonal avec d'autres β -lactamines, le test 3 décrit précédemment a été réalisé, cette fois-ci, avec différents antibiotiques non-hydrolysés à différentes concentrations comme compétiteur.

Les concentrations définies de chaque anticorps lors de l'évaluation de la spécificité pour être à $DO_{414\text{ nm}}$ de 0,5 et la concentration de 0,33 ng/mL pour le céfotaxime-biotine non-hydrolysé, sont utilisées dans cette expérience. Les réactions croisées ont été déterminées pour chaque anticorps avec différents antibiotiques que sont : le céfazoline, la céftazidime, le céfépime, le céfoxitine, le céfotaxime, la céftriaxone, le méropénème, l'ertapénème et la pénicilline G. Pour le céfotaxime non-hydrolysé, utilisé pour la courbe de compétition, une gamme de concentration a été réalisée : 20 pmol/mL ; 10 pmol/mL ; 5 pmol/mL ; 2,5 pmol/mL ; 1,25 pmol/mL ; 0,625 pmol/mL ; 0,3125 pmol/mL ; 0,15625 pmol/mL et 0 pmol/mL. Pour les autres antibiotiques non-hydrolysés, les concentrations testées sont : 2 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL et 0 nmol/mL.

Pour ces tests, 50 μ L de marqueur (céfotaxime-biotine non-hydrolysé), 50 μ L d'antibiotique et 50 μ L de la solution d'anticorps sont déposés en microplaque 96 puits, sur la paroi où du CAS a été préalablement immobilisé. Les microplaques sont incubées pendant une nuit à 4°C. Puis, après un lavage en tampon de lavage, 100 μ L de streptavidine-acétylcholinestérase ont été ajoutés pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation. Après lavage des puits en tampon de lavage, 200 μ L de réactif d'Ellmann ont été

déposés. La lecture de l'absorbance a été effectuée après 1 heure d'incubation sous agitation, à $DO_{414\text{ nm}}$ au spectrophotomètre.

Avec le céfotaxime non-hydrolysé commercial utilisé pour la sélection des hybridomes et le céfotaxime-biotine non-hydrolysé, le graphique obtenu est $f([\text{Antibiotique}]) = B/B_0$ (%). Pour rappel, le signal B_0 correspond à l'absorbance obtenue en absence de compétiteur (Absorbance maximale). Le signal B est l'absorbance obtenue avec le compétiteur. Le B/B_0 (50 %) correspond à la concentration en compétiteur où 50 % du signal issu du marqueur est déplacé par le compétiteur.

II.2.3.4.2. Les résultats et l'interprétation

Pour chaque anticorps, une courbe de compétition avec le céfotaxime non-hydrolysé est réalisée. Pour plus de clarté, les résultats de seulement quatre anticorps sont représentés en Figure 67.

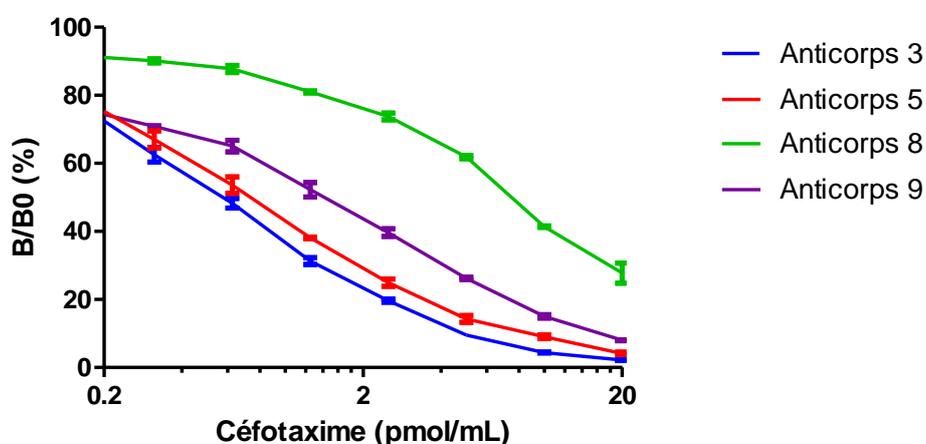


Figure 67 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime non-hydrolysé de quatre anticorps.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, 50 μL de céfotaxime-biotine non-hydrolysé (0,33 ng/mL) et 50 μL de céfotaxime non-hydrolysé (différentes concentrations testées : 20 pmol/mL ; 10 pmol/mL ; 5 pmol/mL ; 2,5 pmol/mL ; 1,25 pmol/mL ; 0,625 pmol/mL ; 0,3125 pmol/mL ; 0,15625 pmol/mL et 0 pmol/mL) sont mis en compétition pour leur reconnaissance par quatre anticorps monoclonaux. Pour chaque concentration de céfotaxime, le pourcentage de déplacement du céfotaxime-biotine non-hydrolysé est déterminé ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris).

Le pourcentage de réactions croisées a été calculé pour chaque anticorps avec les différents antibiotiques. Pour le calcul des réactions croisées, la concentration en céfotaxime a été déterminée à partir des courbes en Figure 67 ainsi que la concentration des différents

compétiteurs pour obtenir la même baisse de signal. Les résultats des mêmes quatre anticorps sont regroupés dans le Tableau 9.

Antibiotiques	Anticorps 3	Anticorps 5	Anticorps 8	Anticorps 9
<i>Céfazoline</i>	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %
<i>Céftazidime</i>	0,021 %	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %
<i>Céfoxitine</i>	0,093 %	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %
<i>Céftriaxone</i>	< 0,01 %	0,012 %	< 0,01 %	< 0,01 %
<i>Céfépime</i>	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %
<i>Ertapénème</i>	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %
<i>Méropénème</i>	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %	< 0,01 %
<i>Pénicilline</i>	< 0,01 %	< 0,01 %	0,010 %	< 0,01 %

Tableau 9 : Les pourcentages de réactions croisées de différentes β -lactamines sur quatre anticorps.

Protocole : Pour calculer les réactions croisées, la concentration de céfotaxime est divisée par la concentration en antibiotique qui permet une diminution du signal équivalente à celle induite par la concentration de céfotaxime. Le résultat est multiplié par 100 pour être exprimé en pourcentage.

Pour certains antibiotiques, aucune baisse de signal n'est observée, même pour la plus forte concentration utilisée à 2 nmol/mL, alors qu'une baisse du signal est observée avec 0,2 pmol/mL de céfotaxime. Cela signifie qu'il faut au moins 10 000 fois plus de cet antibiotique pour observer une baisse du signal similaire à celle observée avec le céfotaxime. Dans cette situation, les réactions croisées sont inférieures à 0,01 %. L'anticorps 3 présente la réaction croisée la plus élevée est avec le céfoxitine.

II.2.4. La discussion

La sélection des hybridomes à l'aide des différentes molécules (céfotaxime-biotine non-hydrolysé et hydrolysé ; céfotaxime non-hydrolysé et hydrolysé) a permis de sélectionner des anticorps ayant une très forte affinité pour la forme non-hydrolysée du céfotaxime et aucune pour le céfotaxime hydrolysé. Cette spécificité a été mise en évidence grâce à des compétitions en ELISA et à des affinités en interférométrie. De même, ces anticorps possèdent une très forte spécificité pour le céfotaxime non-hydrolysé par rapport à d'autres β -lactamines non-hydrolysés.

Les différentes structures des antibiotiques non-hydrolysés utilisées pour évaluer les réactions croisées avec le céfotaxime non-hydrolysé sont présentées en Figure 68. La

céftriaxone possède la même région 1 (cercle rouge) que le céfotaxime. Or, le pourcentage de réactions croisées de cette molécule reste inférieur à 0,01 % ce qui démontre la non-fixation de l'anticorps sur cette région. Le potentiel site de fixation de l'anticorps sur le céfotaxime est présenté sur la Figure 68 (trait orange) et se situe à l'opposé du site de couplage entre le céfotaxime et la BSA. Le céfoxitine possède une région 2 (cercle vert), située au niveau de cet épitope potentiel, quasiment identique à celle du céfotaxime mais n'induit pas de fortes réactions croisées (0,093 %). Cela est probablement dû au changement d'un groupement acétyl (céfotaxime) par un groupement amide (céfoxitine). Dans ce cas, cette modification semble induire une perte quasiment totale de l'affinité de l'anticorps pour le céfoxitine. De ce fait, l'utilisation d'un des anticorps dans des échantillons biologiques contenant d'éventuels autres antibiotiques n'aura pas d'impact sur les résultats d'analyse.

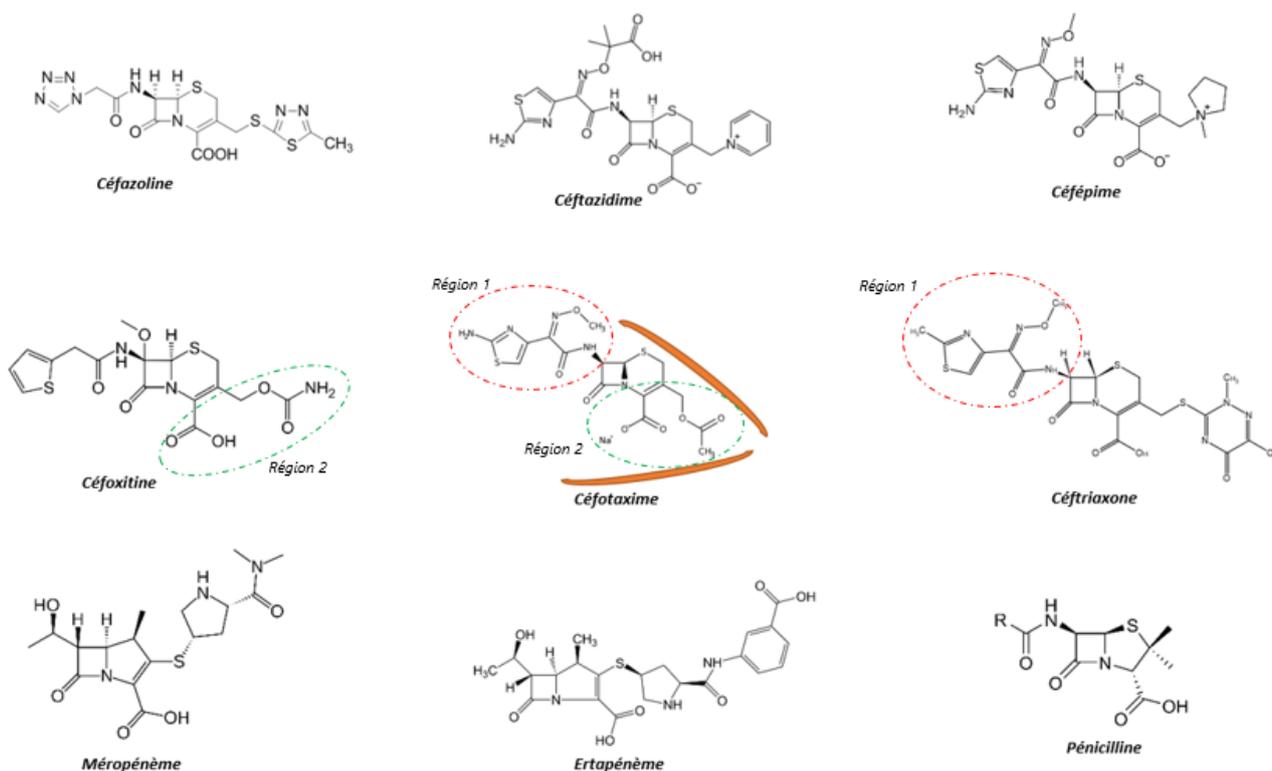


Figure 68 : Les structures chimiques des différentes β -lactamines utilisées dans les réactions croisées.

Description : Les traits oranges entourent le potentiel site de fixation des anticorps monoclonaux (épitope).

Ainsi, parmi les dix-neuf anticorps monoclonaux obtenus, les cinq anticorps présentant les meilleurs résultats lors de l'évaluation de la spécificité sont sélectionnés et évalués pour le développement d'un test LFIA.

II.3. Le développement du test immunochromatographique à flux latéral

II.3.1. La préparation des bandelettes

II.3.1.1. La zone 1

Cette première zone est souvent constituée de deux sous-parties comme précédemment décrit.

La partie recevant l'échantillon est appelée le PE (0,7 cm et 2,1 cm de standard 14, Whatman®). Les caractéristiques du PE peuvent fluctuer en fonction du type d'échantillon visé : sa capacité d'absorption, sa vitesse d'écoulement, sa composition, son épaisseur ou sa porosité. Le PE peut subir des traitements chimiques pour pallier à la nature de l'échantillon (pH, composition en protéines et en sels) afin d'améliorer les performances du test (Tableau 10).

La partie contenant l'anticorps marqué et séché, est appelée le PC (0,4 cm de standard 14, Whatman®). Tout comme le PE, les paramètres intrinsèques du PC peuvent fluctuer ainsi que les traitements chimiques qui lui sont apportés (Tableau 10). Les anticorps marqués à l'or colloïdal déposés sur cette partie, reconnaissent ainsi les molécules recherchées dans l'échantillon. Le couplage entre l'anticorps et les nanoparticules d'or colloïdal se fait par des liaisons ioniques. Pour ce faire, 25 µL d'une solution à 1 mg/mL d'anticorps en tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,4 sont ajoutés à 100 µL d'or colloïdal, mesurés à $DO_{530\text{ nm}} = 20$. Ensuite, 125 µL de tampon borate 20 mM pH 9,0 sont ajoutés avant une incubation de 60 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Ensuite, 125 µL de tampon borate 10 mM pH 9,0 + Caséine 0,3 % sont ajoutés pour bloquer les sites non spécifiques. Une centrifugation de 30 minutes à 15000 g est réalisée. Le surnageant est éliminé et le culot repris avec 1mL de tampon borate 10 mM pH 9,0 + Caséine 0,1 %. La solution est soniquée et vortexée, avant d'être centrifugée à nouveau. Enfin, après que le surnageant ait été retiré, le culot est repris par 250 µL de tampon borate 10 mM pH 9,0 + Caséine 0,1 %. La solution est à $DO_{530\text{ nm}} = 8$. Deux possibilités se présentent pour l'utilisation de cet anticorps :

1- Soit l'anticorps marqué est utilisé directement avec le tampon de migration de la bandelette à une DO_{530nm} définie. Il est alors ajouté à l'échantillon avant le dépôt de celui-ci sur le PE ;

2- Soit l'anticorps marqué est repris dans un tampon spécifique avec une $DO_{530 nm}$ définie et immergé sur le PC puis séché. L'anticorps marqué est resolubilisé lors du dépôt de l'échantillon sur le PE.

Réactifs	Action	Effet	Substance(s)
Bloqueur	Sature les sites d'adsorption	Diminution des réactions non spécifiques	BSA, Caséine
Polymère	Augmentation de la viscosité	Augmentation de l'interaction anticorps couplé à l'or colloïdal/échantillon	PEG, Glycérol
Tampon	Stabilise et ajuste le pH	Création d'un environnement stable pour l'échantillon	Tris, MES, HEPES
Détergent	Diminution de la tension de surface	Réduction des réactions non spécifiques de type hydrophile/hydrophobe	Tween 20, CHAPS, Igepal
Chélateur	Diminution de la force ionique	Homogénéisation des résultats	EDTA
Conservateur	Bactéricide	Augmentation de la conservation	Proclin300, Azide
Sucre	Encapsule	Solubilisation/Conservation	Sucrose, Tréhalose
Nanoparticule	Colore les LTs et la LC	Visualisation des complexes immuns formés	Or colloïdal, latex, cellulose

Tableau 10 : Les réactifs chimiques pouvant être impliqués dans le traitement chimique des composants d'un test immunochromatographique à flux latéral.

II.3.1.2. La zone 2

Cette seconde zone est composée de la MbN sur laquelle seront déposées des lignes de réactifs intervenant dans la détection de la ou des cibles. Pour ce dépôt, un distributeur automatique (Biodot XYZ dispenser 3050, Biodot) est utilisé pour la(les) LT. Pour ce faire, une(des) solution(s) d'anticorps et/ou d'antigène(s) à 1 mg/mL en tampon phosphate 50 mM pH 7,4 est(sont) déposée(s) sous la forme d'une ligne à raison de 1 μ L/cm sur une MbN Prima 40 (GE Healthcare). Pour la LC, du CAS à 0,5 mg/mL est également déposé selon les mêmes conditions que précédemment. Les concentrations sur les lignes sont ajustables afin d'optimiser les performances du test. Ensuite, la MbN est séchée 60 minutes à 37 °C dans une étuve sèche, puis immergée dans une solution de saturation contenant de la BSA 0,5 % + NaCl 0,15 M, dans du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4 pendant 30 minutes à

température ambiante. Après trois lavages successifs à l'eau distillée, la MbN est à nouveau immergée pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de conservation contenant du glucose 7,5 % + Tween 20 0,1 % + NaCl 0,15 M, dans du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4. Après trois lavages également à l'eau distillée, la MbN est ensuite séchée 90 minutes à 37 °C dans une étuve sèche.

II.3.1.3. La zone 3

Cette dernière zone permet l'absorption du tampon de migration ce qui maintient la migration de l'échantillon à travers la bandelette par capillarité. Elle est composée d'un PA (2,5 cm CF5, Whatman®). Ses caractéristiques peuvent s'adapter en fonction de la capacité d'absorption et de la vitesse d'écoulement qui sont désirées.

II.3.2. Le procédé d'optimisation du test rapide

II.3.2.1. L'optimisation des trois principaux paramètres du test rapide

II.3.2.1.1. Le matériel et les méthodes

Les antibiotiques sont des molécules de petite taille <1 000 Da qui ne peuvent être détectées que par une méthode dite « compétitive » du fait de leur incapacité à fixer deux anticorps simultanément. Ainsi, le test LFIA par compétition est employé. Les cinq anticorps purifiés et sélectionnés, sont utilisés en test LFIA comme des anticorps marqués capables de reconnaître uniquement la forme non-hydrolysée de l'antibiotique dans un échantillon (*voir II.2.3.2.1.*)

Pour le développement du test rapide, trois principales optimisations sont réalisées. La première est la quantité d'anticorps marqué (absorbance initiale à DO_{530 nm} : 8 ; absorbances testées : de 8 à 0,125) ; la seconde est la concentration de céfotaxime-BSA non-hydrolysé sur la LT (concentration initiale de 1 mg/mL ; concentrations testées : de 1 mg/mL

à 0,03 mg/mL) ; la troisième est la concentration de céfotaxime non-hydrolysé à utiliser dans l'échantillon (concentrations testées : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL).

La méthodologie appliquée pour la préparation des bandelettes (zone 1 à 3) a été décrite précédemment. Pour l'ensemble de ces tests, des microplaques 96 puits sont utilisées. Pour lancer un test, 10 µL d'anticorps marqué sous forme liquide ont été ajoutés à 100 µL de tampon de migration contenant ou non de l'antibiotique (non-hydrolysé ou hydrolysé). Puis, une bandelette est déposée dans le puits. Après 15 minutes de migration, les résultats sont analysés visuellement. Pour ce faire, une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes pour les cinq anticorps. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif. A l'issue de ces optimisations, un des cinq anticorps marqués sera gardé pour la suite du développement du test.

II.3.2.1.2. Les résultats et l'interprétation

Les optimisations ont été réalisées sur les anticorps 1 à 5 car ces derniers ont montré les meilleurs résultats d'affinité, de spécificité et de réactions croisées avec d'autres antibiotiques. Pour des raisons de clarté pour les deux premières optimisations, seuls les résultats de l'anticorps 3 sont présentés.

Pour déterminer la quantité optimale en anticorps marqué à utiliser, la concentration de céfotaxime-BSA a été fixée par défaut à 1 mg/mL. Des dilutions au 1/2 de la solution d'anticorps marqué ont été appliquées ($DO_{530\text{ nm}} : 8$ à $DO_{530\text{ nm}} : 0,125$) et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 11.

DO_{530 nm} utilisée	Intensité du signal
<i>DO_{530 nm} : 8</i>	10
<i>DO_{530 nm} : 4</i>	10
<i>DO_{530 nm} : 2</i>	9
<i>DO_{530 nm} : 1</i>	9
<i>DO_{530 nm} : 0.5</i>	8,5
<i>DO_{530 nm} : 0.25</i>	7,5
<i>DO_{530 nm} : 0.125</i>	5,5

Tableau 11 : L'impact de la diminution de la DO_{530 nm} de l'anticorps 3 sur l'intensité du signal sur la LT.

Protocole : Une gamme de l'anticorps marqué est testée, avec une concentration exprimée en DO_{530nm}. Dans une microplaque 96 puits, 10 µL d'anticorps marqué (DO_{530 nm} : 8 ; DO_{530 nm} : 4 ; DO_{530 nm} : 2 ; DO_{530 nm} : 1 ; DO_{530 nm} : 0,5 ; DO_{530 nm} : 0,25 ; DO_{530 nm} : 0,125) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 µL de tampon de migration. Puis, une bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 1 mg/mL) est déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Ensuite, une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif ; (LT : Ligne test).

L'objectif est de déterminer la plus petite quantité d'anticorps marqué permettant d'observer un signal significatif après 15 minutes de dépôt de l'échantillon sur la bandelette. Dans ce cas (anticorps 3), le choix s'est porté sur la DO_{530 nm} : 0,5 car l'intensité de 8,5 était relativement forte et les dilutions inférieures indiquent une baisse conséquente du signal.

Pour déterminer la concentration optimale en céfotaxime-BSA non-hydrolysé présente sur la LT, plusieurs concentrations sont testées : 1 mg/mL ; 0,6 mg/mL ; 0,3 mg/mL ; 0,1 mg/mL ; 0,03 mg/mL ; avec une DO_{530 nm} : 0,5 d'anticorps 3 marqué. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 12.

Concentration en Céfotaxime-BSA	Intensité du signal
	$DO_{530\text{ nm}} : 0,5$
1 mg/mL	9,5
0,6 mg/mL	10
0,3 mg/mL	10
0,1 mg/mL	9
0,03 mg/mL	8

Tableau 12 : L'impact de la diminution de la concentration en céfotaxime-BSA sur la LT sur l'intensité du signal sur la LT.

Protocole : Une gamme de céfotaxime-BSA sur la ligne test de la bandelette est testée. Dans une microplaque 96 puits, 10 μL d'anticorps marqué ($DO_{530\text{ nm}} : 0,5$) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 μL de tampon de migration. La bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 1 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,1 mg/mL et 0,03 mg/mL) est ensuite déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif ; (LT : Ligne test).

Le but est de sélectionner la concentration la plus faible pour observer un signal maximal sur la LT. Dans ce cas, une diminution du signal est observée à partir de 0,03 mg/mL. Par conséquent la concentration à 0,1 mg/mL a été sélectionnée.

Enfin, la concentration minimale de céfotaxime non-hydrolysé à utiliser dans l'échantillon a été déterminée pour inhiber la totalité du signal pouvant être observé lors de la fixation de l'anticorps marqué sur le céfotaxime-BSA. En parallèle, des concentrations de céfotaxime hydrolysé ont été testées pour évaluer la fixation de ces derniers aux anticorps marqués.

Pour ce faire, deux gammes de céfotaxime sont réalisées : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 69 et le Tableau 13.

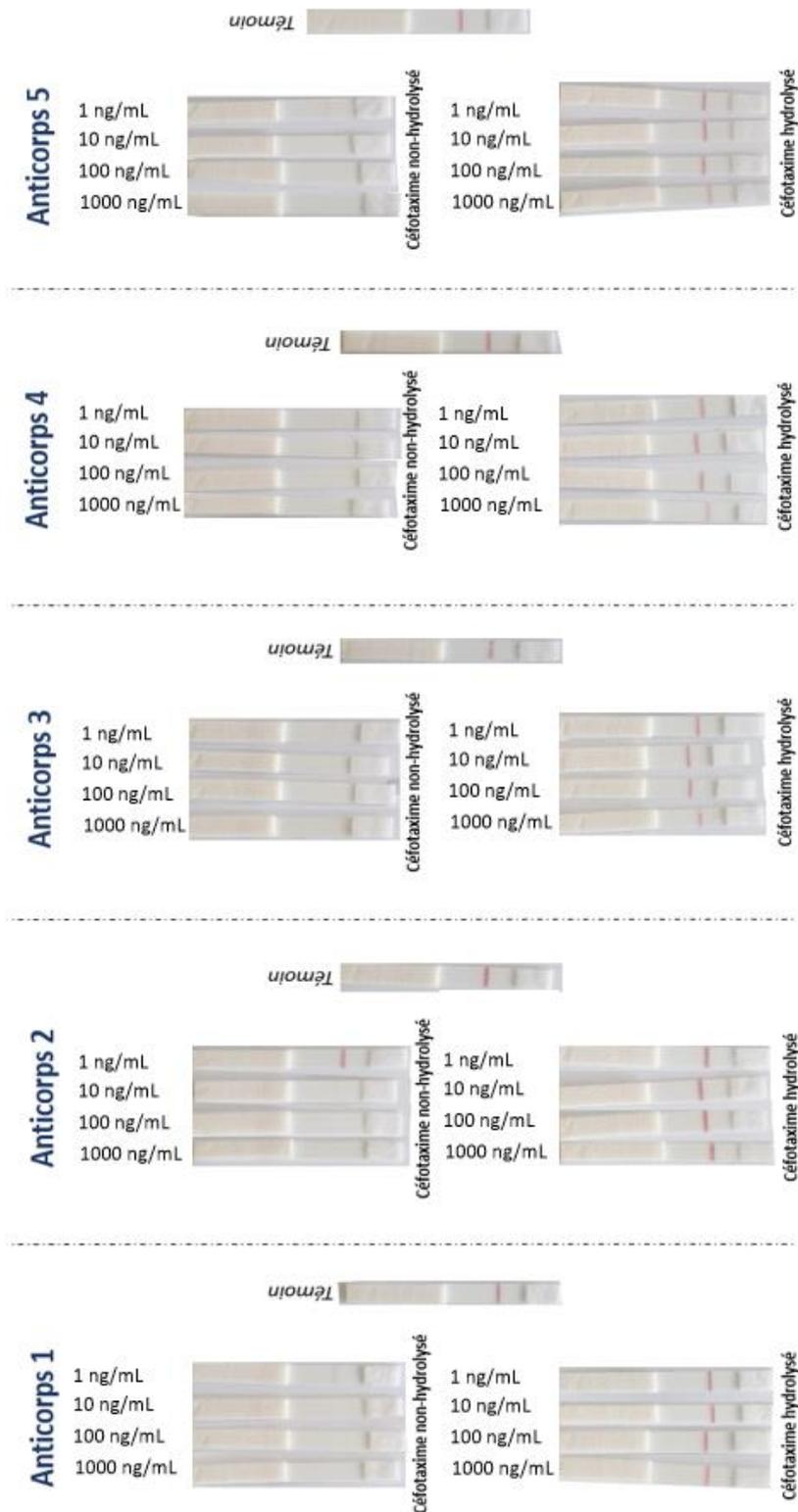


Figure 69 : Les tests d'inhibition de signal avec le céfotaxime non-hydrolysé commercial et le céfotaxime hydrolysé sur cinq anticorps.

Protocole : Des gammes de céfotaxime non-hydrolysé et hydrolysé ont été réalisées (différents concentrations : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL ; 0 ng/mL). Dans une microplaque 96 puits, 10 μ L d'anticorps marqué ($DO_{530\text{ nm}}$: 0,5) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 μ L de tampon de migration contenant du céfotaxime (non-hydrolysé ou hydrolysé) à une concentration définie ci-dessus. La bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 0,1 mg/mL) est ensuite déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Un signal visible sur la ligne test est considéré comme un test positif.

Concentration en céfotaxime	Anticorps 1		Anticorps 2		Anticorps 3		Anticorps 4		Anticorps 5	
	CNH	CH	CNH	CH	CNH	CH	CNH	CH	CNH	CH
1 000 ng/mL	1	7,5	1	8,5	1	8	1	7	1	7,5
100 ng/mL	1	9	1	8,5	1	9	1	9	1	9
10 ng/mL	1	9	4	8,5	1	9	1	9	1	9
1 ng/mL	5	9	8	8,5	4	9	4,5	9	4,5	9
0 ng/mL	9	/	8,5	/	9	/	9	/	9	/

*CNH : Céfotaxime non hydrolysé ; CH: Céfotaxime hydrolysé

Tableau 13 : Les tests d'inhibition de signal avec le céfotaxime non-hydrolysé commercial et le céfotaxime hydrolysé sur bandelette, avec cinq anticorps sélectionnés.

Protocole : Des gammes de céfotaxime non-hydrolysé et hydrolysé ont été réalisées (différentes concentrations : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL ; 0 ng/mL). Dans une microplaque 96 puits, 10 µL d'anticorps marqué (DO_{530 nm} : 0,5) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 µL de tampon de migration contenant du céfotaxime (non-hydrolysé ou hydrolysé) à une concentration définie ci-dessus. La bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 0,1 mg/mL) est ensuite déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

Le but de cette expérience est de déterminer quel anticorps nécessite la concentration de céfotaxime non-hydrolysé la plus faible et où la discrimination est la meilleure entre les deux formes de céfotaxime.

Les résultats montrent que l'anticorps 3 répond au mieux à ce cahier des charges avec un signal d'une intensité de 4 à 1 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé et une intensité de 8 à 1 000 ng/mL de céfotaxime hydrolysé. Ainsi, pour la suite du développement du test, l'anticorps 3 a été sélectionné à 0,5 DO_{530 nm} avec une concentration de 0,1 mg/mL pour le céfotaxime-BSA sur la LT et une concentration de 10 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé dans l'échantillon.

II.3.2.2. L'influence de la configuration du test sur la limite de détection

II.3.2.2.1. Le matériel et les méthodes

Pour déterminer précisément les limites de détection en terme de quantité d'enzyme détectée, l'enzyme recombinante suivante a été utilisée : CTX-M-2. Il est clair que l'activité hydrolytique de cette enzyme recombinante ne reflète pas l'activité naturelle de la même enzyme présente dans une bactérie. Cependant, cette enzyme recombinante permet de

comparer précisément les limites de détection obtenues dans différentes configurations du test.

Dans un premier temps, dans les conditions précédemment définies, l'influence du temps d'incubation entre l'échantillon (ici l'enzyme recombinante) et le céfotaxime a été évaluée sur la limite de détection du test. Pour ce faire, l'enzyme recombinante CTX-M-2 est utilisée aux concentrations suivantes : 10 ng/mL, 3 ng/mL, 1 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,1 ng/mL et 0 ng/mL. L'enzyme est diluée en tampon de migration. La concentration en céfotaxime non-hydrolysé employée est de 10 ng/mL (déterminée préalablement). Les temps d'incubation testés entre l'enzyme et le céfotaxime sont : 0 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes et 60 minutes. Ces incubations sont réalisées à température ambiante sans agitation. Puis, dans un puits d'une microplaque 96 puits et une fois le temps d'incubation écoulé, 100 µL d'une solution contenant l'enzyme recombinante et le céfotaxime sont déposés. 10 µL de l'anticorps marqué à DO_{530 nm} sont ajoutés et une bandelette est déposée dans le puits. La lecture est effectuée à l'œil nu après 15 minutes de migration. Un signal supérieur ou égal à une intensité de 3,5 est considéré comme positif.

Dans un second temps, l'influence du séchage de l'anticorps marqué sur le PC est évaluée. Les autres paramètres du test sont identiques à ceux de l'expérience précédente.

Dans un troisième temps, l'influence de l'orientation de la bandelette (verticale ou horizontale) est évaluée. Dans cette expérience, la bandelette est placée dans une cassette plastique. Les autres paramètres du test sont identiques à ceux de l'expérience précédente. Dans ces conditions, la lecture s'effectue à l'œil nu après 10 minutes de migration.

II.3.2.2.2. Les résultats et l'interprétation

II.3.2.2.2.a. L'influence de la durée de l'incubation

Les résultats obtenus sur l'influence de la durée de l'incubation sont présentés dans le Tableau 14.

Concentration en CTX-M-2	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL	N	P	P	P	P
3 ng/mL	N	N	N	P	P
1 ng/mL	N	N	N	N	N
0,3 ng/mL	N	N	N	N	N
0,1 ng/mL	N	N	N	N	N
Témoins	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé	N	N	N	N	N
Tampon d'extraction 1X	P	P	P	P	P

*P : Positif $\geq 3,5$; N : Négatif $< 3,5$

Tableau 14 : L'évaluation de l'activité enzymatique de CTX-M-2 sur le céfotaxime non-hydrolysé au cours du temps avec l'anticorps 3 (état liquide et migration verticale).

Protocole : Une gamme de concentration en CTX-M-2 a été réalisée (différentes concentrations : 10 ng/mL, 3 ng/mL, 1 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0 ng/mL). Dans une microplaque 96 puits, 100 μ L de tampon de migration contenant du céfotaxime (10 ng/mL) sont mis au contact de différentes concentrations d'enzyme CTX-M-2. Différents temps d'incubation sont réalisés pour chaque concentration : 0 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 60 minutes. A l'issue de chaque incubation, 10 μ L d'anticorps 3 marqué ($DO_{530\text{ nm}}$: 0,5) sous forme liquide ont été ajoutés. La bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 0,1 mg/mL) est ensuite déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Un signal visible sur la ligne test ($\geq 3,5$) est considéré comme un test positif (P), auquel cas, le test est négatif (N).

Il est observé qu'à partir de 45 minutes d'incubation entre le céfotaxime et l'enzyme recombinante CTX-M-2 à 3 ng/mL, une apparition du signal sur la LT est visible, c'est-à-dire que des sites de fixation de l'anticorps sont libres et ont la capacité de se fixer sur la LT. A 10 ng/mL de CTX-M-2, un signal est visible dès 15 minutes d'incubation.

Les mêmes conditions ont été réalisées avec des incubations à 37 °C mais le changement de température n'induit pas une meilleure sensibilité dans la détection de l'hydrolyse du céfotaxime.

II.3.2.2.2.b. L'influence du séchage de l'anticorps marqué

L'anticorps marqué à $DO_{530\text{ nm}}$: 0,5 a été séché sur un PC. Dans cette configuration, le temps de contact « utile » entre le céfotaxime et l'anticorps marqué correspond à la durée de migration entre le PC où l'anticorps marqué est déposé et la LT. En effet, la formation de complexe anticorps marqué/céfotaxime après cette ligne n'aura aucune incidence sur le test. Cette durée utile est plus courte que celle de la configuration précédente (anticorps marqué ajouté à l'échantillon). Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 15.

Concentration en CTX-M-2	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL	N	P	P	P	P
3 ng/mL	N	P	P	P	P
1 ng/mL	N	N	N	P	P
0,3 ng/mL	N	N	N	N	N
0,1 ng/mL	N	N	N	N	N
Témoins	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé	N	N	N	N	N
Tampon d'extraction 1X	P	P	P	P	P

*P : Positif $\geq 3,5$; N : Négatif $< 3,5$

Tableau 15 : L'évaluation de l'activité enzymatique de CTX-M-2 sur le céfotaxime non-hydrolysé au cours du temps avec l'anticorps 3 (état séché et migration verticale).

Protocole : Une gamme de concentration en CTX-M-2 a été réalisée (différentes concentrations : 10 ng/mL, 3 ng/mL, 1 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0 ng/mL). Dans une microplaque 96 puits, 100 μ L de tampon de migration contenant du céfotaxime (10 ng/mL) sont mis au contact de différentes concentrations d'enzyme CTX-M-2. Différents temps d'incubation sont réalisés pour chaque concentration : 0 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 60 minutes. A l'issue de chaque incubation, une bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 0,1 mg/mL, papier conjugué : anticorps marqué séché à $DO_{530\text{ nm}} : 0,5$) est ensuite déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Un signal visible sur la ligne test ($\geq 3,5$) est considéré comme un test positif (P), auquel cas, le test est négatif (N).

Par rapport à l'expérience précédente, il est constaté que la positivité des tests pour une même durée d'incubation apparait pour des concentrations plus faibles en CTX-M-2. En effet, en réduisant la durée d'interaction entre le céfotaxime présent dans l'échantillon et l'anticorps marqué dans le PC, cette nouvelle configuration diminue le nombre de complexes céfotaxime/anticorps formés pour une même concentration en céfotaxime non-hydrolysé au moment du passage sur la LT. Par conséquent, dans cette configuration, des sites de reconnaissance de l'anticorps seront libres pour des concentrations plus fortes en céfotaxime et donc pour des concentrations en CTX-M-2 plus faibles.

II.3.2.2.2.c. L'influence de l'orientation de la bandelette

La bandelette est placée dans une cassette plastique et les résultats obtenus au cours de cette expérience sont reportés dans le Tableau 16.

Concentration en CTX-M-2	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL	N	P	P	P	P
3 ng/mL	N	P	P	P	P
1 ng/mL	N	N	P	P	P
0,3 ng/mL	N	N	N	N	N
0,1 ng/mL	N	N	N	N	N
Témoins	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé	N	N	N	N	N
Tampon d'extraction 1X	P	P	P	P	P

*P : Positif $\geq 3,5$; N : Négatif $< 3,5$

Tableau 16 : L'évaluation de l'activité enzymatique de CTX-M-2 sur le céfotaxime non-hydrolysé au cours du temps, avec l'anticorps 3 (état séché et migration horizontale).

Protocole : Une gamme de concentration en CTX-M-2 a été réalisée (différentes concentrations : 10 ng/mL, 3 ng/mL, 1 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0 ng/mL). 100 μ L de tampon de migration contenant du céfotaxime (10 ng/mL) sont mis au contact de différentes concentrations d'enzyme CTX-M-2. Différents temps d'incubation sont réalisés pour chaque concentration : 0 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 60 minutes. A l'issue de chaque incubation, 100 μ L de la solution sont déposés dans la zone de dépôt d'une cassette plastique contenant une bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 0,1 mg/mL, papier conjugué : anticorps marqué séché à $DO_{530\text{ nm}}$: 0,5). Une migration de 10 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Un signal visible sur la ligne test ($\geq 3,5$) est considéré comme un test positif (P), auquel cas, le test est négatif (N).

Dans ce tableau, il est observé qu'un signal positif apparaît après 30 minutes d'incubation avec une concentration de 1 ng/mL de CTX-M-2. Dans l'étude précédente, la concentration nécessaire à l'apparition d'un signal positif pour la même durée d'incubation était de 3 ng/mL. Cette augmentation de la sensibilité a également comme origine la diminution du temps de contact entre l'échantillon et l'anticorps marqué. En effet, la migration à l'horizontale est plus rapide que la migration à la verticale ce qui induit cette baisse du temps de contact.

II.3.2.3. L'optimisation de la concentration en anticorps marqué

II.3.2.3.1. Le matériel et les méthodes

La dernière optimisation est l'optimisation de la concentration en anticorps marqué à cette nouvelle configuration du test : anticorps marqué séché sur le PC et migration horizontale. En effet, si l'augmentation de la vitesse de migration permet l'augmentation de la sensibilité du test, elle induit également une baisse du signal obtenu au niveau de la LT

car la durée de contact entre l'anticorps marqué et le céfotaxime-BSA est plus court. Pour compenser cet effet, des plus grandes concentrations en anticorps marqué sont testées. Ces concentrations ne doivent, cependant, pas excéder la capacité de liaison du céfotaxime contenu dans l'échantillon pour ne pas induire du signal en absence d'hydrolyse. Quatre DO_{530 nm} en anticorps marqués ont été testées : 0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0.

II.3.2.3.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats obtenus pour les DO_{530 nm} : 1,0 ; 1,5 sont reportés dans le Tableau 17. Les résultats pour la DO_{530 nm} : 0,5 sont identiques à ceux obtenus dans le Tableau 16.

DO_{530 nm} : 1,0 ; Concentration en CTX-M-2	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL	N	P	P	P	P
3 ng/mL	N	P	P	P	P
1 ng/mL	N	N	P	P	P
0,3 ng/mL	N	N	N	N	N
0,1 ng/mL	N	N	N	N	N
Témoins	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé	N	N	N	N	N
Tampon d'extraction 1X	P	P	P	P	P
DO_{530 nm} : 1,5 ; Concentration en CTX-M-2	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL	N	P	P	P	P
3 ng/mL	N	P	P	P	P
1 ng/mL	N	P	P	P	P
0,3 ng/mL	N	N	N	N	N
0,1 ng/mL	N	N	N	N	N
Témoins	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes
10 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé	N	N	N	N	N
Tampon d'extraction 1X	P	P	P	P	P

*P : Positif $\geq 3,5$; N : Négatif $< 3,5$

Tableau 17 : L'optimisation de la DO_{530 nm} de l'anticorps 3 sur l'activité enzymatique de CTX-M-2 sur le céfotaxime non-hydrolysé au cours du temps, avec l'anticorps 3 (état séché et migration horizontale).

Protocole : Une gamme de concentration en CTX-M-2 a été réalisée (différentes concentrations : 10 ng/mL, 3 ng/mL, 1 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0 ng/mL). 100 μ L de tampon de migration contenant du céfotaxime (10 ng/mL) sont mis au contact de différentes concentrations d'enzyme CTX-M-2. Différents temps d'incubation sont réalisés pour chaque concentration : 0 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 60 minutes. A l'issue de chaque incubation, 100 μ L de la solution sont déposés dans la zone de dépôt d'une cassette plastique contenant une bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 0,1 mg/mL, papier conjugué : anticorps marqué séché à DO_{530 nm} : 1,0 ou DO_{530 nm} : 1,5). Une migration de 10 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Un signal visible sur la ligne test ($\geq 3,5$) est considéré comme un test positif (P), sinon le test est négatif (N).

Dans le Tableau 17 ($DO_{530\text{ nm}} : 1,5$), il est observé qu'un signal positif apparaît après 15 minutes d'incubation avec une concentration de 1 ng/mL de CTX-M-2. Dans l'étude précédente ($DO_{530\text{ nm}} : 0,5$), la concentration nécessaire à l'apparition d'un signal positif pour la même durée d'incubation était de 3 ng/ml. L'accroissement de la $DO_{530\text{ nm}}$ augmente le nombre de sites de liaisons d'anticorps présents. Ainsi, des sites de liaisons seront libres pour interagir avec la LT pour une hydrolyse plus faible et donc pour des concentrations plus faibles en enzymes. Néanmoins, au-delà de $DO_{530\text{ nm}} : 1,5$, du signal non-spécifique apparaît sur la LT pour les témoins avec 10 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé. Ceci s'explique par le fait que les 10 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé ne permettent plus d'occuper la totalité des sites de fixation de l'anticorps marqué pour une $DO_{530\text{ nm}} > 1,5$. Ainsi, l'excédent d'anticorps marqués libres se fixent sur la LT contenant le céfotaxime-BSA.

Au terme de ces expériences avec la CTX-M-2 recombinante, les paramètres suivants ont été sélectionnés pour le format cassette (migration horizontale) :

- $DO_{530\text{ nm}} : 1,5$ pour l'anticorps marqué
- 0,1 mg/mL de céfotaxime-BSA (LT).
- 10 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé dans l'échantillon
- 100 μ L d'échantillon déposé sur le test (dans du tampon de migration)

II.3.2.4. L'optimisation du test avec des colonies bactériennes

II.3.2.4.1. Le matériel et les méthodes

Une fois les différentes optimisations du test LFIA réalisées en utilisant une enzyme recombinante, une validation du test est effectuée sur des colonies bactériennes. Pour effectuer cette étude, un panel de quinze souches bactériennes ayant des activités enzymatiques diverses sur le céfotaxime a été choisi (9 BLSE et 6 carbapénémases). De même, deux souches dites sauvages (WT), c'est-à-dire ne présentant pas de gènes de résistance aux céphalosporines à spectre étendu, ont été sélectionnées.

Plusieurs temps d'incubation à température ambiante entre le céfotaxime et la souche bactérienne ont été testés : 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes. En effet,

il est compliqué de transposer les concentrations utilisées en enzyme recombinante CTX-M-2 avec les concentrations pouvant être retrouvées dans une colonie sur gélose. D'autre part, d'une enzyme à l'autre, les activités sont différentes ; c'est pourquoi il est nécessaire de définir le temps d'incubation adéquate pour détecter l'activité β -lactamase quelles que soient la bactérie et l'enzyme.

Pour ce faire, dans un tube eppendorf de 1,5 mL, 150 μ L d'une solution de céfotaxime non-hydrolysé diluée dans du tampon de migration à 10 ng/mL sont déposés. Une colonie, préalablement cultivée sur une gélose de bouillon de lysogénie (LB), est prélevée à l'aide d'un ose, puis est déposée dans le tampon de migration. Le tube est vortexé et incubé à température ambiante sans agitation. A l'issue du temps d'incubation défini, 100 μ L de la solution sont déposés sur le test. La lecture s'effectue à l'œil nu après 10 minutes de migration. Un signal supérieur ou égal à une intensité de 3,5 est considéré comme positif.

II.3.2.4.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats obtenus pour déterminer le temps d'incubation optimal entre le céfotaxime non-hydrolysé et une colonie bactérienne, sont présentés dans le Tableau 18.

Enzyme	Espèce	5 minutes	10 minutes	20 minutes	30 minutes
BLSE					
CTX-M-1	<i>C. freundii</i>	P	P	P	P
CTX-M-2	<i>E. coli</i>	P	P	P	P
CTX-M-8	<i>E. coli</i>	N	N	P (faible)	P
CTX-M-14	<i>K. oxytoca</i>	N	P	P	P
CTX-M-15	<i>E. coli</i>	P	P	P	P
CTX-M-27	<i>E. coli</i>	P	P	P	P
CTX-M-32	<i>E. coli</i>	P	P	P	P
CTX-M-57	<i>E. coli</i>	P	P	P	P
CTX-M-94	<i>E. coli</i>	P	P	P	P
Carbapénémases					
KPC-2	<i>K. pneumoniae</i>	N	P	P	P
NDM-7	<i>E. coli</i>	P	P	P	P
IMP-1	<i>E. coli</i>	P	P	P	P
VIM-1	<i>E. coli</i>	P	P	P	P
OXA-48	<i>C. freundii</i>	N	N	P (faible)	P
OXA-163	<i>E. cloacae</i>	P	P	P	P
Souches WT					
WT	<i>E. coli</i>	N	N	N	N
WT	<i>E. coli</i>	N	N	N	N

*P : Positif $\geq 3,5$; N : Négatif $< 3,5$

Tableau 18 : La détermination du temps d'incubation optimale entre le céfotaxime non-hydrolysé commercial et une colonie bactérienne pour obtenir un signal positif.

Protocole : Plusieurs colonies bactériennes contenant des β -lactamases (BLSE, carbapénémases) ou ne contenant pas de céphalosporinases (WT) ont été testées. 150 μ L de tampon de migration contenant du céfotaxime (10 ng/mL) sont mis au contact d'une colonie bactérienne. Différents temps d'incubation sont réalisés pour chaque colonie : 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes. A l'issue de chaque incubation, 100 μ L de la solution sont déposés dans la zone de dépôt d'une cassette plastique contenant une bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 0,1 mg/mL, papier conjugué : anticorps marqué séché à $DO_{530\text{ nm}}$: 1,5). Une migration de 10 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Un signal visible sur la ligne test ($\geq 3,5$) est considéré comme un test positif (P), auquel cas, le test est négatif (N) ; (WT (Wild-Type) : Souche sauvage).

Dans le Tableau 18, il est observé qu'à partir de 20 minutes d'incubation, toutes les bactéries produisant une céfotaximase (β -lactamase capable d'hydrolyser le céfotaxime) donnent des signaux positifs sur la LT. Les bactéries ayant les gènes de résistance produisant les enzymes CTX-M-8 et OXA-48 donnent des signaux faiblement positifs sur la LT. Pour s'assurer que toutes les bactéries produisant une céfotaximase donnent un résultat positif intense, quel que soit leur activité, le temps d'incubation sélectionné est de 30 minutes.

II.3.3. Le transfert industriel du test

Pour la suite des validations, il a été décidé que des tests proches de la version commerciale soient utilisés. C'est pourquoi, un transfert industriel a été réalisé auprès de la société NG Biotech (Guipry, France). Les tests LFIA commerciaux répondent à un cahier des charges qui implique notamment la conservation des différents réactifs à température ambiante. Parmi l'ensemble des réactifs utilisés dans ce test, seul le céfotaxime était conservé à -20°C. Pour évaluer la possibilité de le conserver à température ambiante, des études de stabilité sur vingt jours ont été réalisées à température ambiante, à 45 °C et à 60 °C, avec du céfotaxime lyophilisé. Aucun FP n'a été obtenu avec les différentes conditions du céfotaxime lyophilisé. La lyophilisation (Lyophilisateur Christ β 2-8 LSC, Allemagne) a été réalisée à l'aide d'un piège à froid à -85°C, dans un piège à vide à une pression autour de 0,030 mbar. Parmi les différents tampons de lyophilisation testés, le tampon de lyophilisation retenu est : phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 + NaCl 0,15 M + BSA 0,1 % + Azide de sodium 0,01 % + Sucrose 1 % + Tréhalose 1 %, avec 30 ng/mL de céfotaxime non-hydrolysé.

II.3.4. La validation du test rapide sur un soucier d'antibiorésistance

II.3.4.1. Le matériel et les méthodes

Pour réaliser cette validation, des bactéries provenant du soucier du CNR de la résistance aux antibiotiques (Service de Bactériologie-Hygiène, Hôpital Bicêtre AP-HP, France) ont été utilisées.

Les souches sont cultivées sur un milieu gélosé pendant une nuit à 37 °C. 150 μ L de tampon de migration sont ajoutés au céfotaxime lyophilisé, et une colonie est ajoutée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante sans agitation, 100 μ L de l'échantillon sont déposés sur le test et la lecture s'effectue après 10 minutes de migration (Figure 70).

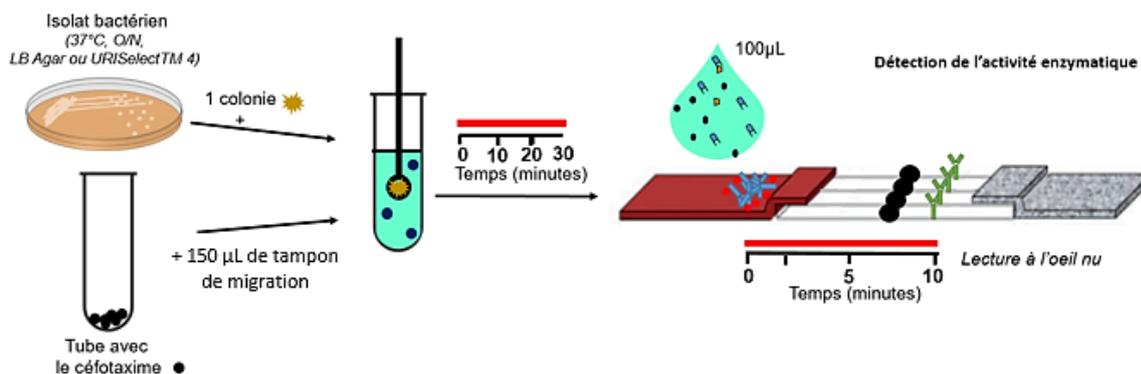


Figure 70 : Le principe du test d'activité enzymatique des β -lactamases sur les céphalosporines à spectre étendu.

Protocole : Une colonie bactérienne est mise au contact de céfotaxime (3,75 ng) préalablement repris dans 150 μL de tampon de migration. Après 30 minutes d'incubation, 100 μL de la solution sont déposés dans la zone de dépôt d'une cassette plastique contenant une bandelette (ligne test : céfotaxime-BSA à 0,1 mg/mL, papier conjugué : anticorps marqué séché à $\text{DO}_{530\text{ nm}}$: 1,5). Une migration de 10 minutes est réalisée avant la lecture du résultat.

II.3.4.2. Les résultats et l'interprétation

La validation du test d'activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu, dénommé le test LFIA-CTX, sur le souchier du CNR a fait l'objet d'un article (258).

Article I

Detection of expanded-spectrum cephalosporin hydrolysis by lateral flow immunoassay

Christian Moguet,¹  Camille Gonzalez,² Antoine Sallustrau,³ Stéphanie Gelhaye,¹ Thierry Naas,^{2,4,5} Stéphanie Simon¹ and Hervé Volland¹

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

²Bacteriology-Hygiene Unit, APHP, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

³Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SCBM, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Gif-sur-Yvette, 91191, France.

⁴Team Resist, UMR1184, Université Paris-Saclay – INSERM – CEA, LabEx Lermite, Le Kremlin-Bicêtre, France.

⁵Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance: Carbapenemase-producing Enterobacterales, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Summary

Early detection of expanded-spectrum cephalosporin (ESC) resistance is essential not only for an effective therapy but also for the prompt implementation of infection control measures to prevent dissemination in the hospital. We have developed and validated a lateral flow immunoassay (LFIA), called LFIA-CTX test, for the detection of ESC (cefotaxime) hydrolytic activity based on structural discrimination between the intact antibiotic and its hydrolysed product. A single bacterial colony was suspended in an extraction buffer containing cefotaxime. After a 30-min incubation, the solution is loaded on the LFIA for reading within 10 min. A total of 348 well-characterized Gram-negative isolates were tested. Among them, the 38 isolates that did not express

any cefotaxime-hydrolysing β -lactamase gave negative results. Of the 310 isolates expressing at least one cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, all were tested positive, except three OXA-48-like producers, which were repeatedly detected negative. Therefore, the sensitivity was 99.1% and the specificity was 100%. The LFIA-CTX test is efficient, fast, low-cost and easy to implement in the workflow of a routine microbiology laboratory.

Introduction

The discovery of antibiotics has revolutionized medicine by enabling effective treatment of many life-threatening bacterial infections. During the 20th century, described as the golden age of antibiotics, the entire spectrum of antibiotics was discovered allowing efficient treatment of most bacterial infections (Silver, 2011; Bbosa *et al.*, 2014). The latter products were obtained by chemical modification of pre-existing antibiotics to produce different generations with improved efficacy and broadened spectrum of activity (Silver, 2011). However, the abundance of antibiotics in the environment, water and medicine and the recurrent use of the same classes of antibiotics over the past decades have led to the emergence of resistant bacteria to these antibiotics and to difficult-to-treat bacterial infections, which constitute a significant problem to the global health (Silver, 2011). Today, c.a. 7000 molecules have been described with antibacterial activity, but only about 100 have made it into human therapy, as some are toxic to human cells, not very effective in vivo or chemically unstable (Awad *et al.*, 2012). Thus, the fight against bacteria is again turning into one of the greatest challenges faced by our societies, especially with the spread of multi-drug-resistant (MDR) bacteria (O'Neill, 2014).

Acquisition of antibiotic resistance mechanisms is a natural process that is amplified by overuse and misuse of antibiotics and inadequate or absent epidemiological surveillance in human and veterinary medicine, which has led to the dissemination of these MDR bacteria.

β -Lactams, due to their safety, reliable killing properties and clinical efficacy, are among the most frequently prescribed antibiotics used to treat bacterial infections. However, their utility is being threatened by the worldwide proliferation of β -lactamases (BL) with broad hydrolytic capabilities, especially in MDR Gram-negative

Received 19 March, 2021; revised 24 June, 2021; accepted 3 July, 2021.

For correspondence. E-mail herve.volland@cea.fr; Tel. +33-1-69-08-78-98; Fax +33-1-69-08-59-07.

Microbial Biotechnology (2022) 15(2), 603–612

doi:10.1111/1751-7915.13892

Funding Information

This work was supported by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), the University Paris-Saclay, INSERM, the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT) supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-10-LABX-33), and the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA).

© 2021 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

bacteria (GNB; Bush and Bradford, 2016). As the incidence of GNB infections increases, for which few effective treatments are available, so does the contribution of β -lactam-hydrolysing enzymes, the BL, to this serious clinical problem. Currently, BL-mediated resistance does not spare even the newest and most powerful β -lactams (i.e. expanded-spectrum cephalosporins (ESC) and carbapenems; Munita and Arias, 2016). Their dissemination is a matter of great clinical concern given the importance of these pathogens as causes of nosocomial infections and of community-acquired infections, resulting in difficult-to-treat infections associated with high mortality rates and increased costs (Li and Webster, 2018).

The production of BL is a commonly encountered mechanism of resistance in Gram-negative bacteria, especially in Enterobacterales (Bush and Bradford, 2016; Bonomo, 2017). In healthcare settings, the activity of ESCs is challenged by extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and plasmid-encoded cephalosporinases and carbapenemases, but ESBLs are by far the most prevalent mechanism in Enterobacterales (Jacoby, 2006; Munita and Arias, 2016). The CDC has estimated that ESBL-producing Enterobacterales (ESBL-E) account for 19% of healthcare-related infections annually and that infections involving ESBL-E are also associated with increased mortality and cost of care (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). ESBLs hydrolyse most β -lactams, including penicillins and ESCs (e.g. cefotaxime, ceftazidime), and as their genes are carried by plasmids, ESBL producers are often resistant to other families of antibiotics, thus resulting in an MDR phenotype (Paterson, 2006), and in some cases, resistance extends to the entire repertoire of available therapeutic agents (the so-called pan-drug-resistant phenotypes), posing a formidable challenge to antimicrobial therapy. Within the ESBLs, the CTX-M family appeared in the early 1980s and now represent the most prevalent ESBLs worldwide. They are divided into five groups based on amino acid sequence identity: the CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 and CTX-M-25 groups (Cantón *et al.*, 2012; Bevan *et al.*, 2017).

The rapid and effective detection of antibiotic resistant bacteria is a critical step for antibiotic stewardship and infection control. Despite technological improvements, the identification of pathogenic bacteria, as well as the detection of antibiotic resistance, remains complex and time-consuming, with time to results often in the range from 24 h to 48 h (Shanmugakani *et al.*, 2020).

Detection is mainly based on phenotypic approaches with antimicrobial susceptibility using disc diffusion methods in the presence and absence of BL inhibitors (Dijk *et al.*, 2014; Benkova *et al.*, 2020). These conventional screenings are usually slow, requiring overnight culture, and labour intense and require expertise for interpretation.

The molecular methods, DNA microarray-based and nucleic acid amplification-based, either home-made or commercially available, remain the gold standard for the detection of CTX-Ms and other ESBLs (Rood and Li, 2017). Molecular methods are usually slow (1–4 h), labour intense and expensive, and require specific equipment and trained staff in order to be implemented in any clinical laboratory (ResearchGate). Lateral flow immunoassays (LFIA) have proven to be useful as easy, rapid and reliable confirmatory tests for detection of antibiotic resistance mechanisms, especially for β -lactamases in Gram-negatives (Boutal *et al.*, 2018; Takissian *et al.*, 2019). The NG test CTX-M MULTI showed 100% sensitivity and specificity with isolates cultured on agar plates and was able to detect 98% of the ESBL producers identified in a clinical setting in France, either from colonies or from positive blood cultures (Bernabeu *et al.*, 2020). These assays detect the presence of enzymes that confer resistance to ESCs, and even though CTX-Ms account for most of the resistance mechanisms leading to ESC resistance, some rare enzymes may be missed. Biochemical confirmatory tests have been developed, which evaluate the enzyme's ability to hydrolyse β -lactams (ESBL NPd test; MALDI-TOF in mass spectrometry; UV spectroscopy; electrochemical test; β -lacta™ test; Bernabeu *et al.*, 2020). Even though these tests display good analytical performances, the ESBL NPd test and β -lacta™ test are sometimes difficult to interpret, and MALDI-TOF, UV spectroscopy and the electrochemical tests require expertise, hands-on time and specific equipment.

Here, we have developed an assay that takes advantage of the ease of LFIA and the universality of biochemical tests and that detects the enzymatic activity of ESC hydrolysis. This LFIA, called the LFIA-CTX test, is based on the structural discrimination of cefotaxime and its hydrolytic product (see Fig. 1A and B). It uses a monoclonal antibody recognizing only the non-hydrolysed cefotaxime. This makes it possible to detect the presence of BLs that are capable of hydrolysing 'cefotaxime', such as hyper-producers of the chromosomally encoded cephalosporinases (cAmpC), plasmid-encoded cephalosporinases (pAmpC), ESBLs and some of the carbapenemases. The aim is to develop a new tool that is fast, of low-cost and easy to use for the detection of BLs that hydrolyse ESCs to overcome the disadvantages of other detection tests.

Results

Test development

Our test is based on the use of monoclonal antibodies specific to cefotaxime. In order to obtain these antibodies, several steps were necessary. Biozzi mice (10 weeks old) were immunized with the immunogen cefotaxime-BSA,

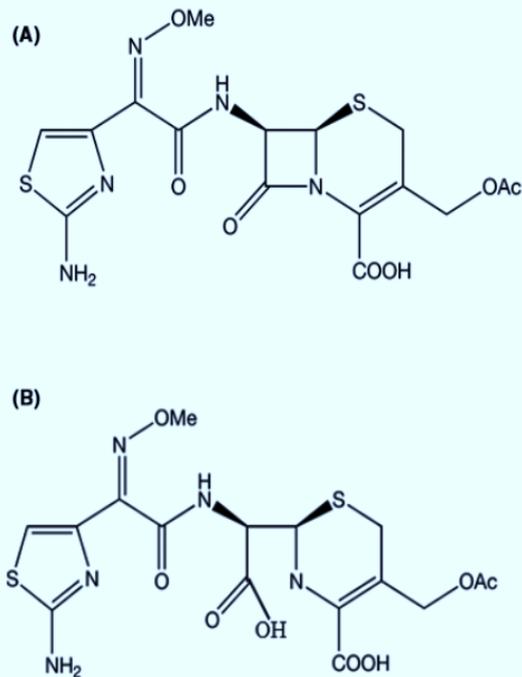


Fig. 1. (A) Intact cefotaxime, recognized by the antibody of the LFIA. (B) Hydrolysed cefotaxime, not recognized by the antibody LFIA.

previously produced. The immune response was followed by immunoenzymatic tests (Grassi *et al.*, 1988), measuring the anti-cefotaxime antibodies in sera using biotin-labelled cefotaxime as antigen. The two mice with the highest antibody titres were selected for mAb production. Spleen cells were fused with NS1 mouse myeloma cells, and specific anti-cefotaxime antibodies in myeloma culture supernatants were detected using the same immunoenzymatic

test as the one previously used for the polyclonal response evaluation. At this step, one hundred hybridomas were selected, and then, a second round of selection was based on total recognition of the intact form of cefotaxime and non-recognition of the hydrolysed form (cross-reactions < 0.1%). A third round of selection was performed with the twenty monoclonal antibodies previously selected using a competitive immunoassay in order to evaluate their relative affinity for cefotaxime and hydrolysed cefotaxime. At the end of this step, five monoclonal antibodies were selected. These five antibodies were evaluated in an LFIA test, named LFIA-CTX. In this LFIA, there is competition between the cefotaxime present in the sample and the cefotaxime immobilized on the membrane of the strip at the test line for recognition by the monoclonal antibody labelled with colloidal gold (Fig. 2). If the cefotaxime in the sample is intact, it will occupy all the sites of the antibody, which will not be able to bind to the immobilized cefotaxime. If cefotaxime is hydrolysed, it will not be recognized by the monoclonal antibody, which will be able to bind to the immobilized cefotaxime at the test line (Fig. 3; video available on <https://youtu.be/F2PM9uKjXN0>).

Thus, to select the best mAbs for the LFIA, each previously selected antibody was coupled with colloidal gold (Feraudet-Tarisse *et al.*, 2021). The strips (0.5 cm in width and 4.5 cm in length) were composed of three parts: (i) a sample pad (Standard 14; Whatman, Munich, Germany; 0.5 cm in length), (ii) a nitrocellulose membrane (Prima 40; 2.5 cm in length) and (iii) an absorption pad (Cellulose grade 470; Whatman; 1.5 cm in length), all attached to a backing card. The detection zone contained immobilized cefotaxime–BSA as a test line (1 mg ml^{-1}) dispensed at $1 \mu\text{l cm}^{-1}$ using an automatic dispenser (Biojet XYZ 3050; BioDot, Westergate, England). After drying for 1 h at 37°C in an air oven, the membrane was incubated with a blocking solution containing BSA for

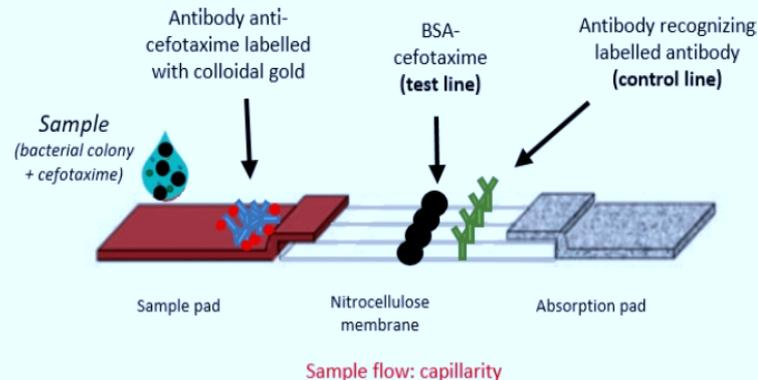
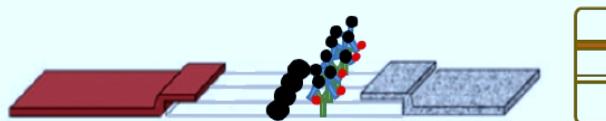


Fig. 2. Structure of the strips. The sample containing cefotaxime and the bacterial strain is deposited upstream of the sample paper. Downstream of the sample pad, the colloidal gold-labelled antibody recognizing the intact cefotaxime (also called mAb tracer) is dried. On the nitrocellulose membrane, we made a test line consisting of intact cefotaxime coupled with BSA and a control line consisting of antibodies recognizing the colloidal gold-labelled antibodies. Finally, the absorption pad allows the sample to migrate along the strip.

Case 1 :

- The control line appears: the test is correct
- No test line appears: negative test for expanded-spectrum cephalosporinase

**Case 2 :**

- The control line appears: the test is correct
- The test line appears: positive test for expanded-spectrum cephalosporinase

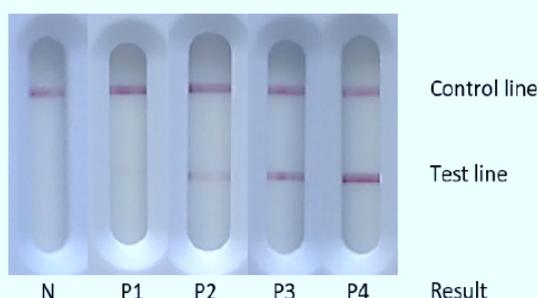
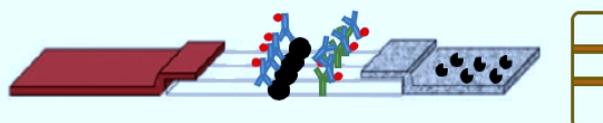


Fig. 3. Test procedure. One colony resuspended in 150 μl of extraction buffer with 25 ng ml^{-1} of cefotaxime, after a 30-min incubation, 100 μl loaded on the cassette. Then, the results are obtained after 10 min of migration. Data acquisition by a naked eye reading. Case 1: In the absence of enzymatic activity, all the mAb's paratopes are occupied by the cefotaxime added to the sample before the test. The mAb tracer is captured by the goat antibodies on the control line: 'N', equal to a negative result. Case 2: in the presence of enzymatic activity, the hydrolysed cefotaxime is not recognized by the mAbs, which are able to react with the cefotaxime immobilized on the test line. A signal appears on the test line and the control line: 'P', defined as a positive result, when cephalosporinase-expressing strains are present. The associated number of 'P' is relative to the increasing intensities observed on the test line

30 min at RT. The membrane was washed twice with deionized water and then dried for 1 h at 37°C in an air oven. After the absorption pad and the sample pad were fixed to the top and bottom of the membrane, respectively, the card was cut into strips 5 mm in width using an automatic programmable cutter (CM4000 Guillotine Cutting System; BioDot). Each mAb was evaluated in the LFIA format using serial dilutions of cefotaxime and hydrolysed cefotaxime (1000, 100, 10, 1 and 0 ng ml^{-1}) in extraction buffer. One hundred μl of this solution was mixed with 10 μl of the conjugate antibody with colloidal gold (tracer) before dipping the strip.

In this experiment, the aim is to identify the antibody among those selected for which the signal is maximal whatever the concentration of hydrolysed cefotaxime and absent for the lowest concentration of intact cefotaxime. Using the selected antibody, several

optimizations were made. First, the tracer was dried on a conjugate pad, which is placed between the sample pad and the nitrocellulose membrane. Different amounts of tracer were tested with a defined concentration of cefotaxime. The $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ is 1.75, which is the amount of tracer before an apparition of signal on the test line. Second, the concentration of intact cefotaxime in the sample to inhibit any signal on the test was optimized. To obtain the best competition, the minimum concentration of intact cefotaxime to inhibit any signal on the test line must be found. Different amounts of cefotaxime were tested with the amount of tracer fixed. The 25 ng ml^{-1} concentration was selected. Finally, different amounts of BSA–cefotaxime on the test line were optimized: 1, 0.6, 0.3, 0.1 and 0.03 mg ml^{-1} . The 0.1 mg ml^{-1} was selected with not lose of signal when all the amount of tracer fix the test line.

FOR the validation with isolated colonies, the tests were manufactured by NG Biotech. A control line was added on the strip by immobilizing antibodies recognizing the labelled monoclonal antibody (Fig. 2), and the strips were enclosed in a plastic cassette to facilitate execution of the test.

Test validation

Three hundred and forty-eight GNB isolates with PCR-characterized β -lactamase content were tested for the validation of the LFIA-CTX test. This collection included 38 isolates unable to hydrolyse cefotaxime, as revealed by routine antibiotic susceptibility testing (fully susceptible bacteria) and whole-genome sequencing used as negative controls (see Table 1), and 310 isolates able to hydrolyse cefotaxime (see Table 2). One single colony of these bacteria grown on MH plates was resuspended in an extraction buffer supplemented with cefotaxime and incubated for 30 min at room temperature (between 20 and 25°C), prior to loading on the LFIA-CTX test. The test was read by eye after 10 min of migration. The ESC (cefotaxime) hydrolytic activities are identified by associating the positive result with a signal on the test line.

Isolates unable to hydrolyse cefotaxime

None of the 38 negative control isolates gave a positive signal (Table 1). These isolates corresponded to 21 Enterobacteriales that were either wild-type (WT) or expressed various BLs unable to hydrolyse cefotaxime (low-level cAmpC, OXA-23, OXA-58, IMI-like, SME-like, narrow-spectrum penicillinases [TEM, CHV], CTX-M-93), 12 *Pseudomonas* spp. (WT), impermeability mutants, narrow-spectrum β -lactamase producers (CARB-4, OXA-32) poorly expressed ESBLs (PME-1) and carbapenemases lacking ESC hydrolytic activity (OXA-198, AIM-1) and 5 *Acinetobacter baumannii* either WT or expressing narrow-spectrum enzymes (RTG-4, OXA-13 and OXA-21).

LFIA-CTX test results with known cefotaxime-hydrolysing enzymes

Of the 310 isolates expressing at least one cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, all were tested positive, except three OXA-48-like producers alone that were repeatedly detected negative (Table 2). These isolates belonged to Enterobacteriales ($n = 209$), *P. aeruginosa* ($n = 50$) and *A. baumannii* ($n = 51$). All overexpressed AmpCs, ESBLs and carbapenemases can be detected by the test. All CTX-Ms were detected, as well as all the different carbapenemases known to hydrolyse ESCs (KPC, NDM, VIM and IMP). Even OXA-48 producers were detected, except three of them. However, the tested isolates contained all either an ESBL, a pAmpC or another carbapenemase. Likewise, *A. baumannii* producing OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-51, OXA-58, OXA-66, OXA-72, OXA-97, OXA-143 and OXA-253 were efficiently detected, as a consequence of the natural cAmpC present in these isolates.

Test performance on OXA-48-like producers alone

OXA-48 has moderate hydrolytic activity for cefotaxime (Docquier *et al.*, 2009; Oviaño *et al.*, 2019; Oueslati *et al.*, 2020). In order to evaluate the property of OXA-48-like enzymes alone to hydrolyse cefotaxime in our assay, we tested 4 *K. pneumoniae* isolates producing OXA-48 along with its chromosomally encoded broad-spectrum SHV enzyme and 13 *E. coli* producing either OXA-48 (5), OXA-181 (4), OXA-244 (3) or OXA-484 (1). Three out of the 4 OXA-48-producing *K. pneumoniae* were detected, and 11 out of the 13 OXA-48-like *E. coli* producers were detected (OXA-48 (5/5), OXA-181 (3/4), OXA-244 (2/3) and OXA-484 (1/1)). Thus, the LFIA-CTX test was able to detect 82% of the OXA-48 producers in which OXA-48 was the only acquired β -lactamase.

Table 1. LFIA-CTX test results with negative control isolates.

	Acquired enzymes	Positive results
Enterobacteriales ($n = 21$)		0/21
<i>Escherichia coli</i> ($n = 5$)	WT (4); CTX-M-93	0/5
<i>Proteus mirabilis</i> ($n = 3$)	WT (1); OXA-58; OXA-23	0/3
<i>Citrobacter freundii</i> ($n = 1$)	WT (1)	0/1
<i>Enterobacter</i> spp. ($n = 6$)	WT (2); IMI-1/2/17 (4)	0/6
<i>Salmonella</i> spp. ($n = 4$)	WT (4)	0/4
<i>Serratia marcescens</i> ($n = 2$)	SME-1/2 (2)	0/2
<i>Pseudomonas</i> spp. ($n = 12$)	WT (5); Overexpressed efflux pumps (2); CARBA-4; OXA-32; OXA-198; PME-1; AIM-1	0/12
<i>Acinetobacter baumannii</i> ($n = 5$)	WT (2); RTG-4; OXA-13; OXA-21	0/5

Table 2. LFIA-CTX test results with isolates having known cefotaxime-hydrolysing enzymes.

	Acquired enzymes	Positive results
Enterobacterales (<i>n</i> = 209)		206/209
AmpCs (<i>n</i> = 17)	Overexpressed AmpC (12), DHA-1/2 (2); ACC-1 (2); CMY-136	17/17
Broad-spectrum penicillinases (<i>n</i> = 2)	SHV-11/38 (2)	2/2
ESBLs (<i>n</i> = 75)	SHV-2/2a/12/36 (5); TEM-3/24/52 (6); CTX-M-1/2/3/8/10/14/15/17/18/19/24/27/32/37/55/57/65/71/82/100/101/182 (58); GES-1/6 (2); OXA-48-like (4)	75/75
Carbapenemases (<i>n</i> = 46)	KPC-2/3 (9); NDM-1/7/9/19 (5); IMP-1/8/14 (3); VIM-2 (2); OXA-48-like (17); TMB-1; GIM-1; FRI-1; GES-5; NDM-1 + VIM-2; KPC-28 + OXA-48; KPC-4 + NDM-7; KPC + VIM; VIM-4 + OXA-48; NDM-5 + VIM-1 + OXA-181	43/46
AmpCs + ESBLs (<i>n</i> = 6)	Overexpressed AmpC + TEM-3 (2); overexpressed AmpC + CTX-M-15; DHA-2/1 + SHV-2/75 (2); CTX-M-13 + CMY-2;	6/6
AmpCs + carbapenemases (<i>n</i> = 10)	CMY-16 + NDM-1; CMY-2/13 + VIM-1/4 (2); CMY-2/4 + OXA-48-like (2); CMY-150 + LMB-1; CMY-135 + MOX-9 + OXA-372; overexpressed AmpC + IMI-3; overexpressed AmpC + NMCA; overexpressed AmpC + SME-2	10/10
ESBLs + carbapenemases (<i>n</i> = 46)	SHV-5/70 + VIM-1 (3); SHV-5/12 + IMP-1/8/10 (5); SHV-5/11/12 + OXA-48 (3); CTX-M-15 + GES-5; CTX-M-1/15 + OXA-48-like (19); CTX-M-15 + KPC-2/3 (2); CTX-M-15 + NDM-1/6/19 (4); CTX-M-3 + VIM-19; CTX-M-15 + NDM-4 + KPC-2; CTX-M-15 + NDM-1/5 + OXA-48-like (6); CTX-M-15 + VIM-1 + OXA-48	46/46
AmpCs + ESBLs + carbapenemases (<i>n</i> = 7)	CTX-M-15 + CMY-2/6 + NDM-1/4 (2); CTX-M-15 + CMY-2/4/48 + OXA-48-like (5)	7/7
<i>Pseudomonas</i> spp. (<i>n</i> = 50)		50/50
ESBLs (<i>n</i> = 10)	SHV-2a/5 (2); TEM-4; GES-2/9 (2); PER-1/2 (2); CTX-M-2; BEL; VEB-1	10/10
Carbapenemases (<i>n</i> = 36)	GES-5 (1); SPM-1; KPC-2 (4); NDM-1 (2); VIM-1/2/4 (9); IMP-1/2/7/13/15/19/26/29/31/39/46/56/63/71 (18); DIM-1	36/36
AmpCs + impermeability (<i>n</i> = 3)	Overexpressed AmpC + porin deficiency + overexpressed efflux pumps (3)	3/3
Broad spectrum penicillinase + carbapenemases (<i>n</i> = 1)	OXA-2 + OXA-395 + GIM-1	1/1
<i>Acinetobacter</i> spp. (<i>n</i> = 51)		51/51
AmpCs (<i>n</i> = 1)	Overexpressed AmpC	1/1
ESBLs (<i>n</i> = 18)	SHV-5 (2); GES-11/12/14 (10); PER-1; CTX-M-15; SCO-1; VEB-1; OXA-14; VEB-1 + OXA-10	18/18
Carbapenemases (<i>n</i> = 16)	SIM-1; NDM-1/2 (5); IMP-1/4 (3); VIM-1/4 (2); NDM-1 + OXA-23 (5)	16/16
AmpCs + ESBLs (<i>n</i> = 1)	Overexpressed AmpC + OXA-18/20	1/1
AmpCs + carbapenemases (<i>n</i> = 13)	Overexpressed AmpC + OXA-23 (5); overexpressed AmpC + OXA-51-like (2); overexpressed AmpC + OXA-58-like (2); overexpressed AmpC + OXA-143-like (2); overexpressed AmpC + OXA-24-like (2)	13/13
AmpCs + ESBLs + carbapenemases (<i>n</i> = 2)	Overexpressed AmpC + GES-11/14 + OXA-23 (2)	2/2

Overall performance

The results obtained during this validation of the LFIA-CTX test revealed a sensitivity of 99.1% and a specificity of 100%. Culture on chromogenic media such as URISelect™ Agar 4 (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) or LB Agar (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier Cedex, France) did not alter the test results. Of the 348 isolates tested, 44 of them expressed at least one OXA-48-like equivalent to 12.6% of isolates. In 61.3% of the cases, they were at least associated with an overexpressed cAmpC, a pAmpC, an ESBL or a carbapenemase (27/44). The number of isolates that expressed OXA-48 as the only β -lactamase was high in this study with 17/44 isolates. Nevertheless, the LFIA-CTX test was able to detect 82% of them, even though cefotaxime hydrolysis is low (14/17). It is worth noting that the proportion of the different β -lactamases in this study do not reflect the prevalence of β -lactamases in clinical samples, and in

particular those of OXA-type β -lactamases. Indeed, the prevalence of OXA-48-like producers alone is very low in clinical samples. If our results are mitigated with the actual prevalence of the different isolates, the sensitivity of the test reaches nearly 100%. Detailed results are available in Appendix S1.

Discussion

The spread of GNB isolates expressing BLs capable of hydrolysing ESC, such as cephalosporinases (cAmpC and pAmpC), ESBLs and a large proportion of carbapenemases, is associated with a major public health and economic burden. The rapid identification of these isolates is essential not only to adapt treatment in the case of an infection but also to prevent their spread in the hospital environment. The earlier the enzyme activity is detected, the more effective is the treatment and the likelihood of nosocomial spread is reduced (Thomson,

2010). In this sense, the LFIA-CTX test allows the detection of BLs capable of hydrolysing ESCs such as cefotaxime. After 30 min of incubation, positive results were interpretable within 10 min of migration. All the BLs in this study known to hydrolyse cefotaxime were correctly detected. No false positives and three false negatives were obtained. As a result, the analytical performance of the LFIA-CTX test reached a sensitivity of 99.1% and a specificity of 100%.

The choice of cefotaxime as substrate for the test LFIA-CTX was dictated by the fact that it is hydrolysed by most AmpCs, ESBLs and a large proportion of carbapenemases. This contrasts with ceftazidime, another expanded-spectrum cephalosporin, which is not hydrolysed by all of CTX-M type ESBLs (large class of ESBLs).

The LFIA-CTX test was validated on Enterobacterales ($n = 230$), *Pseudomonas* spp. ($n = 62$) and *Acinetobacter* spp. ($n = 56$). Despite the natural resistance to ESC by *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp (Lupo *et al.*, 2018) due to impaired outer membrane, their β -lactamase resistance could be detected. As a result, this test detects any significant hydrolytic activity leading to enzyme-mediated resistance, even making it possible to differentiate between basal levels of AmpC expression (WT) and increased levels of AmpC (as a consequence of overexpressed cAmpC or plasmid-encoded AmpC). These increased levels of enzymes may lead to hydrolysis of expanded-spectrum cephalosporins such as cefotaxime. This selectivity allows the distinction between sensitive bacteria that naturally produce AmpC and the resistant bacteria that overproduce AmpC (Jacoby, 2009).

The most worrying BLs are ESBLs and carbapenemases. The majority of ESBLs can be divided into four groups: TEM, SHV, CTX-M and minor ESBLs (GES, PER, VEB, . . . ; Naas *et al.*, 2008). Most TEM-ESBLs are derived from the penicillinase TEM-1. TEM-ESBL variants are usually more active against ceftazidime than cefotaxime or ceftriaxone. TEM-10 and TEM-26 are still highly prevalent in the United States but seem to be replaced by CTX-Ms in many European countries (Villegas *et al.*, 2004). SHV-type ESBLs are all derived by point mutations from the narrow-spectrum penicillinase SHV-1 (Naas *et al.*, 2017). Today, SHV-5 and SHV-12 are among the most represented members of this family (Bauernfeind *et al.*, 1992), but have also been outcompeted by CTX-M enzymes.

CTX-M type ESBLs presently comprise known 246 enzymes (Naas *et al.*, 2017). These enzymes are more widespread than the classic TEM- and SHV-type ESBLs, with CTX-M-14 and CTX-M-15 being the most common variants (Govinden *et al.*, 2007). Minor ESBLs, such as the GES-type ESBLs, have emerged from the shadows

to become a recognized resistance threat (Weldhagen, 2006). GES-type ESBLs have now spread worldwide, especially in *P. aeruginosa*, where detection is very difficult, as GES enzymes are not targeted by commercially available molecular assays. In this study, a wide variety of SHV, TEM, CTX-M and GES variants was tested, which is not representative of the prevalence that may be observed in different countries. Nevertheless, the LFIA-CTX test was capable of detecting most ESBLs expressed in Enterobacterales, *Pseudomonas* spp. (except PME-1) and *Acinetobacter* spp. (except RTG-4).

PME-1 and RTG-4 have the particularity of hydrolysing cefotaxime or ceftazidime very weakly, unlike cefepime, which is strongly hydrolysed by these two ESBLs (Potron *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2011). ESBLs that have low hydrolysis for cefotaxime or are associated with other resistance mechanisms (i.e. impermeability) could be detected. Also, when broad-spectrum penicillinases are overexpressed, the test is able to differentiate them from those expressed at a basal level, such as CTX-M-93 (loss of activity for cefotaxime due to a mutation), CARB-4, OXA-13/21/13.

The LFIA-CTX test also allowed detection of some carbapenemases, e.g. KPC-like, MBLs and even of OXA-48, which has a moderate hydrolytic activity for cefotaxime (Oueslati *et al.*, 2015). In more than 80% of the cases, OXA-48 is associated with ESBLs that will hydrolyse cefotaxime efficiently (https://maquette.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_2018v1.pdf, T. Naas, personal communication). For the remaining, 20% the outcome of the LFIA-CTX test is unpredictable. Indeed, 3 of 17 OXA-48 producers tested yielded a negative result. Previous studies showed that the catalytic activity (K_{cat}/K_m) of OXA-48 for cefotaxime is moderate, whereas it is practically null for ceftazidime or cefepime (Docquier *et al.*, 2009; Oviaño *et al.*, 2019; Oueslati *et al.*, 2020). This is the case for most OXA-48 variants, except OXA-405, OXA-247 and OXA-163 that hydrolyse strongly ESCs, but lack carbapenemase activity (Oueslati *et al.*, 2020). This inconsistent detection probably reflects different expression levels and activities at the limit of detection of the assay. These results are in line with *in vivo* experiments in mice that evidenced effective therapy with ceftazidime against OXA-48-producing Enterobacterales lacking ESBLs or AmpC-like β -lactamases, whereas the therapy with cefotaxime had little impact in reducing lethality of the rodents (Mimoz *et al.*, 2012; Wiskirchen *et al.*, 2013). Also, some carbapenemases were not detected because of their lack of expanded-spectrum hydrolysing activity (including cefotaxime) such as IMI-1/2/17, SME-1/2, AIM-1 and OXA-198, which are still relatively rare.

There are currently several other tests for the detection of ESC-hydrolysing BLs, such as the ESBL NDP test

(Nordmann *et al.*, 2012) and β -lacta test (Renvoisé *et al.*, 2013), which are sometimes difficult to interpret, MALDI-TOF-based assays, which require expensive equipment and kits, and UV spectrophotometry, which is highly complex and reserved for reference laboratories. These different assays have drawbacks that can be overcome by the LFIA-CTX test (Váradi *et al.*, 2017; Bernabeu *et al.*, 2020). Indeed, the LFIA-CTX test is fast, low-cost and easy to use in a routine workflow of a clinical microbiology laboratory for the detection of BLs that hydrolyse ESCs. Moreover, unlike tests based on a colour change (ESBL NDP test and β -lacta test), LFIA-CTX is based on the easily interpretable appearance of a signal. It can also be used in other fields such as the food industry, animal medicine and environmental studies.

Thus, this test is a new tool that further demonstrates the usefulness of LFIA for the detection of antibiotic resistance. This innovative test format will allow the development of tests with new features. Indeed, we observed that anti-cefotaxime antibodies did not recognize other antibiotics, and by producing antibodies specific to other antibiotics, we could therefore develop tests allowing simultaneous detection of different lactamase activities. It is also possible to carry out a test allowing the detection on the same strip of β -lactamase activity associated with the identification of enzymes responsible for this activity to have a unique test.

Experimental procedures

Ethics statement

All experiments were performed in compliance with French and European regulations on the care of laboratory animals (European Community Directive 86/609, French Law 2001-486, 6 June 2001) and with the agreements of the Ethics Committee of the Commissariat à l'Énergie Atomique (CEtEA 'Comité d'Éthique en Expérimentation Animale' n°44) nos. 12-026 and 15-055 delivered to S. S. by the French Veterinary Services and CEA agreement D-91-272-106 from the Veterinary Inspection Department of Essonne (France).

Methods

A brief description was given in the first part of the results. Full details of the methods used are available in Appendix S2.

Conflict of interest

A patent has been filed (B252171FR D41054) to protect this invention, in the name of three inventors: Dr. Hervé Volland, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé

(DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France; M. Christian Moguet, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France; and Dr. Thierry Naas, Team Resist, UMR1184, Université Paris-Saclay-INSERM-CEA, LabEx Lermite, Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance: Carbapenemase-producing Enterobacterales, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Author contributions

H.V., S.S. and T.N. conceptualized the study. A.S., S.G., C.G. and C.M. contributed to methodology. C.G. and C.M. performed validation. C.G., T.N. and C.M. performed formal analysis. H.V., T. N., C.G. and C.M. performed investigation. T.N., H.V. and S.S. provided resources. H.V., T.N. and C.M. wrote the original draft preparation. T.N., H.V., S.S. and X.X. underwent supervision. H.V., S.S. and T.N. contributed to project administration. H.V., S.S. and T.N. performed funding acquisition. All authors wrote, reviewed and edited the manuscript, and have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

- Awad, H., El-Shahed, K.Y.I., Aziz, R., Sarmidi, M., and El Enshasy, H. (2012) Antibiotics as microbial secondary metabolites: production and application. *J Tekologi* **59**: 101–111.
- Bauefmeind, A., Casellas, J.M., Goldberg, M., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., *et al.* (1992) A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* **20**: 158–163.
- Bbosa, G., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D., and Ntale, M. (2014) Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health* **4**: 410–425.
- Benkova, M., Soukup, O., and Marek, J. (2020) Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *J Appl Microbiol* **129**: 806–822.
- Bernabeu, S., Ratnam, K.C., Boutal, H., Gonzalez, C., Vogel, A., Devilliers, K., *et al.* (2020) A lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-M-producing Enterobacterales from culture plates and positive blood cultures. *Diagnostics* **10**: 764.
- Bevan, E.R., Jones, A.M., and Hawkey, P.M. (2017) Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* **72**: 2145–2155.
- Bonomo, R.A. (2017) β -Lactamases: a focus on current challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**: a025239.
- Boutal, H., Vogel, A., Bernabeu, S., Devilliers, K., Creton, E., Cotellon, G., *et al.* (2018) A multiplex lateral flow

- immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* **73**: 909–915.
- Bush, K., and Bradford, P.A. (2016) β -Lactams and β -Lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**: a025247.
- Cantón, R., González-Alba, J.M., and Galán, J.C. (2012) CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* **3**: 110.
- Centers for Disease Control and Prevention (2013) *Antibiotic resistance threats in the United States [Internet]*. Centers for Disease Control and Prevention. URL <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- van Dijk, K., Voets, G.M., Scharringa, J., Voskuil, S., Fluit, A.C., Rottier, W.C., et al. (2014) A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect* **20**: 345–349.
- Docquier, J.-D., Calderone, V., De Luca, F., Benvenuti, M., Giuliani, F., Bellucci, L., et al. (2009) Crystal structure of the OXA-48 β -Lactamase reveals mechanistic diversity among Class D carbapenemases. *Chem Biol* **16**(5): 540–547.
- Feraudet-Tarisse, C., Goulard-Huet, C., Yacine, N., Devillers, K., Marcé, D., Chloé, D., et al. (2021) Highly sensitive and specific detection of Staphylococcal Enterotoxins SEA, SEG, SEH, and SEI by immunoassay. *Toxins* **9**: 13.
- Govinden, U., Mocktar, C., Moodley, P., Sturm, A.W., and Essack, S.Y. (2007) Geographical evolution of the CTX-M-lactamase an update. *Afr J Biotechnol* **6**: 831–839.
- Grassi, J., Frobert, Y., Lamourette, P., and Lagoutte, B. (1988) Screening of monoclonal antibodies using antigens labeled with acetylcholinesterase: application to the peripheral proteins of photosystem 1. *Anal Biochem* **168**: 436–450.
- Jacoby, G.A. (2006) β -Lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1123–1129.
- Jacoby, G.A. (2009) AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* **22**: 161–182. Table of Contents.
- Li, B., and Webster, T.J. (2018) Bacteria antibiotic resistance: new challenges and opportunities for implant-associated orthopaedic infections. *J Orthop Res* **36**: 22–32.
- Lupo, A., Haenni, M., and Madec, J.-Y. (2018) Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol Spectr* **6**. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017>.
- Mimoz, O., Grégoire, N., Poirel, L., Marliat, M., Couet, W., and Nordmann, P. (2012) Broad-Spectrum β -Lactam antibiotics for treating experimental peritonitis in mice due to *Klebsiella pneumoniae* producing the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 2759–2760.
- Munita, J.M., and Arias, C.A. (2016) Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr* **4**: 1–35.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnain, R.A., Dabos, M.L., Zavala, A., Dortet, L., et al. (2017) Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem* **32**: 917–919.
- Naas, T., Poirel, L., and Nordmann, P. (2008) Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* **14**(Suppl. 1): 42–52.
- Nordmann, P., Dortet, L., and Poirel, L. (2012) Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* **50**: 3016–3022.
- O'Neill, J. (2014) Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. In *Review on Antimicrobial Resistance*, pp. 1–20.
- Oueslati, S., Nordmann, P., and Poirel, L. (2015) Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* **70**: 1059–1063.
- Oueslati, S., Retailliau, P., Marchini, L., Berthault, C., Dortet, L., Bonnain, R.A., et al. (2020) Role of Arginine 214 in the substrate specificity of OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* **64**: 1–11.
- Oviano, M., Rodicio, M.R., Heinisch, J.J., Rodicio, R., Bou, G., and Fernández, J. (2019) Analysis of the degradation of broad-spectrum Cephalosporins by OXA-48-producing Enterobacteriaceae using MALDI-TOF MS. *Microorganisms* **7**: 614.
- Paterson, D.L. (2006) Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control* **34**(5 Suppl. 1): S20–S28; discussion S64–S73.
- Potron, A., Poirel, L., Croizé, J., Chantepedrix, V., and Nordmann, P. (2009) Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type beta-lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3010–3016.
- Renvoisé, A., Decré, D., Amarsy-Guerle, R., Huang, T.-D., Jost, C., Podglajen, I., et al. (2013) Evaluation of the β Lacta Test, a rapid test detecting resistance to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Strains of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* **51**: 4012–4017.
- ResearchGate. *Molecular detection of extended-spectrum beta-lactamases producing enterobacteria: Advantages and limits [Internet]*. ResearchGate. URL https://www.researchgate.net/publication/287470735_Molecular_detection_of_extended-spectrum_beta-lactamases_producing_enterobacteria_Advantages_and_limits
- Rood, I.G.H., and Li, Q. (2017) Review: Molecular detection of extended spectrum- β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a clinical setting. *Diagn Microbiol Infect Dis* **89**: 245–250.
- Shanmugakani, R.K., Srinivasan, B., Glesby, M.J., Westblade, L.F., Cárdenas, W.B., Raj, T., et al. (2020) Current state of the art in rapid diagnostics for antimicrobial resistance. *Lab Chip* **20**: 2607–2625.
- Silver, L.L. (2011) Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev* **24**: 71–109.
- Takissian, J., Bonnain, R.A., Naas, T., and Dortet, L. (2019) NG-Test Carba 5 for rapid detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriales from positive blood cultures. *Antimicrob Agents Chemother* **63**: 19.
- Thomson, K.S. (2010) Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* **48**: 1019–1025.
- Tian, G.-B., Adams-Haduch, J.M., Bogdanovich, T., Wang, H.-N., and Doi, Y. (2011) PME-1, an extended-spectrum β -lactamase identified in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 2710–2713.
- Váradí, L., Luo, J.L., Hibbs, D.E., Perry, J.D., Anderson, R.J., Oregna, S., and Groundwater, P.W. (2017) Methods

- for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chem Soc Rev* **46**: 4818–4832.
- Villegas, M.V., Correa, A., Perez, F., Miranda, M.C., Zuluaga, T., Quinn, J.P., *et al.* (2004) Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **49**: 217–222.
- Weldhagen, G.F. (2006) GES: an emerging family of extended spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Newslett* **28**: 145–149.
- Wiskirchen, D., Nordmann, P., Crandon, J., and Nicolau, D. (2013) Efficacy of humanized carbapenem and ceftazidime regimens against Enterobacteriaceae producing

OXA-48 carbapenemase in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 1678–1683.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Appendix S1. Results for 348 isolates in the validation of the LFIA-CTX-test.

Appendix S2. Steps for the test development.

II.4. La comparaison du test LFIA-CTX à d'autres tests phénotypiques

Pour évaluer les performances du test d'activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu à partir de colonies bactériennes, le test LFIA-CTX (NG Biotech, Guipry, France) est comparé à trois autres tests phénotypiques que sont le test β -LACTA™ (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France), le test NDP BLSE « fait maison » et le NG-Test® CTX-M MULTI (NG Biotech, Guipry, France). Cette étude a été réalisée au CNR de la résistance aux antibiotiques (Service de bactériologie-Hygiène, Hôpital Bicêtre AP-HP, France).

II.4.1. Les tests phénotypiques

II.4.1.1. Le test LFIA-CTX

Le test LFIA-CTX est basé sur la détection de l'hydrolyse du céfotaxime à l'aide d'un anticorps qui est spécifique du céfotaxime non-hydrolysé. Pour ce faire, 150 μ L de tampon de migration ont été ajoutés à un tube Eppendorf de 1,5 mL contenant du céfotaxime lyophilisé pour une concentration finale de 30 ng/mL, et une seule colonie a été remise en suspension. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, 100 μ L sont déposés sur la cassette plastique et les résultats sont lus après 10 minutes de migration à l'œil nu.

II.4.1.2. Le test β -LACTA™

Le test β -Lacta™ est une technique biochimique qui utilise une céphalosporine chromogénique pour détecter l'activité BLSE des colonies bactériennes. L'hydrolyse du noyau β -lactame du substrat induit un changement de coloration du milieu passant du jaune à l'orange/rouge/violet selon l'activité hydrolytique de l'enzyme. Ce substrat n'est pas hydrolysé par les pénicillinases acquises de type SHV et TEM. Il est hydrolysé par les CTX-M, par les carbapénémases (KPC, métallo- β -lactamases) et faiblement par les AmpC plasmidiques. Les colonies bactériennes à tester sont prélevées à partir d'une culture récente

et ajoutées au milieu réactionnel supplémenté du substrat chromogénique. En parallèle, un témoin négatif est également préparé. Les tubes sont incubés à température ambiante. La lecture visuelle s'effectue après 15 minutes et l'analyse de la couleur obtenue est la suivante :

- La couleur du milieu est jaune : absence de BLSE ou carbapénémases ;
- La couleur du milieu est orange : non-interprétable ;
- La couleur du milieu est rouge : présence de BLSE ou carbapénémases.

II.4.1.3. Le test NDP BLSE

Le test ESBL NDP est une technique biochimique de détection des β -lactamases à spectre élargi. Il met en évidence l'acidification du milieu suite à l'activité hydrolytique d'une β -lactamase sur une céphalosporine, le céfotaxime. L'indicateur de pH (rouge de phénol) vire progressivement du rouge au jaune à mesure que le milieu s'acidifie. Pour réaliser ce test, la souche bactérienne est lysée et le lysat obtenu est divisé dans trois tubes distincts :

- Tube 1 : Milieu réactionnel seul ;
- Tube 2 : Milieu réactionnel supplémenté de céfotaxime ;
- Tube 3 : Milieu réactionnel additionné de céfotaxime + tazobactame (inhibiteur des β -lactamines).

L'ensemble est incubé à 37 °C pendant 30 minutes, puis une lecture visuelle est faite pour évaluer le changement de couleur du milieu. Un test est considéré positif lorsque la couleur du milieu du tube 2 vire du rouge au jaune, et que la couleur des tubes 1 et 3 reste rouge.

II.4.1.4. Le test NG-Test[®] CTX-M MULTI

Le NG-Test[®] CTX-M MULTI est un test LFIA qui détecte toutes les enzymes de type CTX-M. Ce test ne nécessite qu'une seule colonie, remise en suspension dans 100 μ L de tampon de migration. Cette solution est ensuite déposée sur une cassette plastique. Cependant, ce test ne permet pas de détecter d'autres β -lactamases hydrolysant les

céphalosporines à spectre étendu, comme les AmpC chromosomiques, les AmpC plasmidiques, les BLSE mineures et certaines carbapénémases.

II.4.2. L'étude comparative

Les résultats de cette étude sont décrits dans l'article qui suit (259).

Article II

Article

Comparison of Three Expanded-Spectrum Cephalosporin Hydrolysis Assays and the NG-Test CTX-M Multi Assay That Detects All CTX-M-Like Enzymes

Camille Gonzalez ^{1,2}, Christian Moguet ³, Arnaud Chalin ⁴, Saoussen Oueslati ^{1,2}, Laurent Dortet ^{1,2,5}, Stéphanie Simon ³, Hervé Volland ³ and Thierry Naas ^{1,2,5,*}

- ¹ Team “Resist” UMR1184 Immunology of Viral, Auto-Immune, Hematological and Bacterial Diseases (IMVA-HB), INSERM, Faculty of Medicine, Université Paris-Saclay, CEA, LabEx LERMIT, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France; gonzalezcamille0405@gmail.com (C.G.); Oueslati.saoussen@gmail.com (S.O.); Laurent.dortet@aphp.fr (L.D.)
 - ² Bacteriology-Hygiene Unit, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, AP-HP Paris-Saclay, Bicêtre Hospital, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France
 - ³ Département Médicaments et Technologies pour la Santé, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, 91191 Gif-sur-Yvette, France; christian.moguet@cea.fr (C.M.); Stéphanie.SIMON@cea.fr (S.S.); Herve.VOLLAND@cea.fr (H.V.)
 - ⁴ Research and Development Department, NG Biotech, 35480 Guipry, France; a.chalin@ngbiotech.com
 - ⁵ Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance: Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France
- * Correspondence: Thierry.naas@aphp.fr; Tel.: +33-145-21-29-86



Citation: Gonzalez, C.; Moguet, C.; Chalin, A.; Oueslati, S.; Dortet, L.; Simon, S.; Volland, H.; Naas, T. Comparison of Three Expanded-Spectrum Cephalosporin Hydrolysis Assays and the NG-Test CTX-M Multi Assay That Detects All CTX-M-Like Enzymes. *Diagnostics* **2022**, *12*, 197. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12010197>

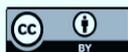
Academic Editor: Anna Baraniak

Received: 22 December 2021

Accepted: 12 January 2022

Published: 14 January 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Rapid detection of expanded-spectrum cephalosporins (ESC) hydrolysing enzymes is crucial to implement infection control measures and antibiotic stewardship. Here, we have evaluated three biochemical ESC hydrolysis assays (ESBL NDP test, β -LACTA™ test, LFIA-CTX assay) and the NG-Test® CTX-M MULTI that detects CTX-M enzymes, on 93 well-characterized Gram-negative isolates, including 60 *Enterobacteriales*, 21 *Pseudomonas* spp. and 12 *Acinetobacter* spp. The performances were good for all three hydrolysis assays, with the LFIA-CTX being slightly more sensitive and specific on the tested panel of isolates especially with *Enterobacteriales*, without ambiguous results. This study showed that LFIA-CTX may be used for the detection of ESC hydrolysis as a competitive alternative to already available assays (β -LACTA™ test and ESBL NDP test) without any specific equipment and reduced hands-on-time. The lateral flow immunoassay NG-Test® CTX-M MULTI has proven to be a useful, easy, rapid, and reliable confirmatory test in *Enterobacteriales* for detection of CTX-M-type ESBLs, which account for most of the resistance mechanisms leading to ESC resistance in *Enterobacteriales*, but it misses rare ESC hydrolysing β -lactamases (AmpC, minor ESBLs, and carbapenemases). Combining it with the LFIA-CTX assay would yield an assay detecting the most frequently-encountered ESBLs (CTX-M-like β -lactamases) together with ESC hydrolysis.

Keywords: biochemical assay; CTX-M; ESBL detection; expanded-spectrum cephalosporin hydrolysis; lateral flow immunoassay; LFIA; rapid diagnostics

1. Introduction

The fight against infectious diseases is one of the greatest public health challenges, especially with the emergence of Multi-Drug Resistant (MDR) Gram-Negative Bacteria (GNB) [1]. The emergence of resistant bacteria has accelerated in recent years, mainly as a result of increased selective pressure. MDR gram-negative pathogens, and especially *Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*, are emerging worldwide, and are in some cases resistant to all available drugs [2,3]. β -Lactams are among the most frequently prescribed antibiotics used to treat bacterial infections, but β -lactamase-mediated resistance does not spare even the most powerful β -lactams (i.e., expanded-spectrum

cephalosporins (ESCs) and carbapenems), whose activity is compromised by extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), plasmid and hyperproducing chromosomally-encoded cephalosporinases, and carbapenemases (KPC, OXA-48, NDM). ESBLs are by far the most prevalent ESC resistance mechanism in *Enterobacterales*, with CTX-Ms representing the most prevalent ESBLs worldwide. The dissemination of these enzymes is a matter of great clinical concern given the major role of these pathogens as causes of nosocomial infections (and, for *E. coli*, also of community-acquired infections), and the major role of expanded-spectrum cephalosporins and carbapenems in the treatment of those infections [4]. The CDC has estimated that ESBL-producing *Enterobacterales* (ESBL-E) account for 19% of health care-related infections annually and that infections involving ESBL-E are also associated with increased mortality and cost of care [5]. Thus, the rapid detection of ESC hydrolysis is a critical step to guide treatments of infected patients and prevent their dissemination by implementing proper infection control measures [5].

Detection of MDR GNB relies on phenotypic approaches such as antimicrobial susceptibility, which require at least 24 h [6]. Rapid diagnostic tests have been developed to reduce the time to results from more than 24 h to only a few hours [6]. These tests are based on molecular biology approaches [6], on biochemical evidence of ESC hydrolysis, such as the home-made ESBL NDP (Nordmann–Dortet–Poirel) test [7], or the commercially available β -LACTA™ test [8] (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France), or on the detection of an enzyme known to hydrolyse ESCs such as the commercially available NG-Test® CTX-M MULTI (NG-Biotech, Guipry, France) [9], an easy, rapid and reliable lateral flow immunoassay (LFIA) for CTX-M-like enzyme detection. Very recently, a research-use-only (RUO) LFIA-CTX test (NG-Biotech) combining a hydrolysis test with LFIA detection using monoclonal antibodies recognizing only the non-hydrolysed cefotaxime was developed [10]. This assay is able to detect the presence of β -lactamases that are capable of hydrolysing cefotaxime, such as hyper-producers of the chromosomally-encoded cephalosporinases (cAmpC), plasmid-encoded cephalosporinases (pAmpC), ESBLs, and some carbapenemases [10].

The aim of this study was to compare the analytical performances of the LFIA-CTX assay with those of three assays widely used for revealing ESC hydrolysis or CTX-M-type β -lactamase detection on a collection of 93 isolates possessing well-characterized β -lactam-resistance mechanisms.

2. Materials and Methods

2.1. Strain Collection

We examined 93 isolates possessing β -lactam-resistance mechanisms that have previously been well-characterized using extensive PCR approaches, or whole genome sequencing [11,12]. Thus, 60 *Enterobacterales*, 21 *Pseudomonas* spp., and 12 *Acinetobacter* spp., harbouring single or multiple β -lactamase genes (carbapenemases, ESBLs, and plasmid- or chromosome-encoded AmpCs) were used in this study. Isolates lacking significant ESC hydrolytic activity were also included as negative controls in this study. For a complete list of isolates see Supplementary Table S1.

2.2. The ESBL NDP Test

The ESBL NDP test, which is based on the colour change of a pH indicator upon acidification related to the hydrolysis of the ESC cefotaxime, was performed as previously described [7]. This assay detects ESC hydrolytic activity and can differentiate between ESBL producers and non-ESBL producers, as it also tests susceptibility to tazobactam (Table 1). Indeed, most ESBLs are inhibited by the addition of tazobactam, which is not the case with cephalosporinases, oxacillinases, and most carbapenemases. Roughly, three 10 μ L calibrated loops (loaded to the 1/3) of bacterial colonies were resuspended in 100 μ L of lysis buffer (B-PERII, Pierce, Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) in three 1.5 mL Eppendorf tubes (labelled A, B, and C). Then, 10 μ L of a concentrated tazobactam solution (40 mg/mL) were added to tube C. In tube A (internal control), 100 μ L of the

revealing solution containing a pH indicator (phenol red) were added. In tubes B and C (test tubes), 100 µL of an extemporaneously prepared revealing solution supplemented with cefotaxime at 6 mg/mL were added. Tubes A, B, and C were incubated at 37 °C for a maximum of 15 min [7]. The results were considered negative when all tubes remained red and interpreted as non-ESC hydrolysing and non-ESBL. When tube B and C were yellow/orange and tube A was red, the result was interpreted as ESC-hydrolysis; when tube B was yellow/orange and both tubes A and C were red, the test result was considered positive for ESBL-producing isolate; and when tube A turned yellow/red, the test result was considered noninterpretable, regardless of any colour change for tubes B and C [7].

Table 1. Comparison of the three biochemical hydrolysis assays and the NG-Test CTX-M MULTI assay that detects all CTX-M-like enzymes.

	ESBL NDP	β-LACTA™	LFIA-CTX	NG-Test® CTX-M MULTI
Origin Manufacturer	Home-made [7]	Commercial Bio-Rad (France) [8]	RUO device NG-Biotech (France) [10]	Commercial NG-Biotech (France) [9]
Substrate used	Cefotaxime	HMRZ-86: chromogenic cephalosporin	Cefotaxime	NA ^a
Detection	Colour change due to acidification of the media as a consequence of hydrolysis	Colour change due to hydrolysis of the chromogenic cephalosporin (HMRZ-86)	Antibodies detecting non-hydrolysed cefotaxime	Antibodies detecting CTX-M enzymes
Hands-on time	15'	2'	2'	2'
Time to results	15' incubation	15' incubation	30' hydrolysis and 10' migration on the strip	15' migration on the strip
Incubation Temperature	37 °C	RT ^b	RT	RT
Bacterial matrix	3 × 10 µL loop full with 1/3 of bacteria to be tested	One 1 µL loop full of bacteria	One colony	One colony
Negative test	Red	Yellow	Absence of a band	Absence of a band
Positive test	Orange to Yellow	Red	Presence of a band	Presence of a band
Non-Interpretable		Orange		
Required reagents	Tazobactam, cefotaxime, and phenol red solutions needed to be prepared extemporaneously 3 different tubes needed/test	None (everything is provided) 1 tube needed/test	None (everything is provided in the kit) 1 tube needed/test	None (everything is provided in the kit) 1 tube needed/test
Storage	2–8 °C	2–8 °C	RT	RT
Interpretation	Ambiguous Hydrolysis of CTX Inhibition by Tazobactam (ESBL)	Ambiguous Hydrolysis of HMRZ-86	Unambiguous Hydrolysis of CTX	Unambiguous Detection of CTX-M-like enzymes

^a NA: not applicable; ^b RT: room temperature.

2.3. LACTA™ Test

The β-LACTA™ test, which is based on a colour change upon hydrolysis of the chromogenic cephalosporin HMRZ-86 [12], was performed according to the manufacturer's instructions [8]. The β-LACTA™ test detects ESC hydrolysing activity but cannot differentiate between ESBL production, overproduced or plasmid-encoded cephalosporinases,

and/or carbapenemases [8]. A single 1 μ L loop full of bacterial colonies was resuspended in a 1.5 mL microtube containing 1 drop of reagent R1 and 1 drop of reagent R2, and subsequently incubated at room temperature for 15 min, prior to visual reading of the test result. No change in colour was considered a negative result (no hydrolysis of HMRZ-86), a purple-red colour was considered a positive result, and an orange colour was considered a non-interpretable (NI) result (Table 1). For the β -LACTA™ test two separate calculations of test performances were performed, one with the NIs considered positive, and one with the NIs considered negative [8].

2.4. NG-Test® CTX-M MULTI

The NG-Test® CTX-M MULTI is a LFIA that detects all CTX-M-like enzymes, on pure isolates grown on agar plates [9]. This assay requires only one colony resuspended in 100 μ L of extraction buffer and loaded on the LFIA cassette (Table 1). However, this assay is not able to detect other ESC hydrolysing β -lactamases such as hyper-producers of the chromosomally-encoded cephalosporinases (cAmpC), plasmid-encoded cephalosporinases (pAmpC), minor ESBLs and some of the carbapenemases [9].

2.5. LFIA-CTX Test

The recently developed RUO LFIA-CTX test, which is based on the detection of cefotaxime-hydrolysis using monoclonal antibodies that discriminate between cefotaxime and its hydrolysed products, was performed as previously described [10]. 150 μ L of extraction buffer was added to a 1.5 mL Eppendorf tube containing lyophilised cefotaxime for a final concentration of 30 ng/mL, and one single colony was resuspended. After a 30 min incubation at room temperature, 100 μ L were loaded on the cassette and the results were read after 10 min of migration by the naked eye [10].

2.6. Statistical Analysis

The sensitivity and specificity values of evaluated assays were calculated with their respective confidence intervals (95% CI) using the free software VassarStats [13].

3. Results

3.1. The ESBL NDP Test

The performances of the ESBL NDP test were similar for the three tested species, however with slightly better results in *Enterobacterales* with specificity and sensitivity of 93% and 89%, respectively (Table 2). The ESBL NDP test failed to detect in *Enterobacterales* seven ESBL producers (five CTX-Ms, one TEM-24, and one GES-6) and an overexpressed AmpC in *E. cloacae*. Similarly, three ESBL-*P. aeruginosa* isolates (SHV-2A, SHV-5, TEM-4) and two ESBL-*Acinetobacter* spp. (CTX-M-15 and VEB-1) were not detected, likely due to low levels of β -lactamase expression. In addition, an OXA-13 producing *P. aeruginosa* was missed, which could be explained by the low level of cefotaxime hydrolysis conferred by OXA-13 oxacillinase [14].

Table 2. Global performances of the β -LACTA™, ESBL NDP, LFIA-CTX, and NG-Test® CTX-M MULTI tests on different isolates of *Enterobacteriales*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*. Values in brackets are the 95% confidence interval with alpha = 0.05.

	<i>Enterobacteriales</i> (n = 60)		<i>P. aeruginosa</i> (n = 21)		<i>A. baumannii</i> (n = 12)		Global (n = 93)	
	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity
β -LACTA™ with NI(+) ^a	93% (66; 99)	89% (76; 95)	80% (63; 98)	89% (30; 99)	100% (5; 100)	100% (68; 100)	90% (65; 98)	90% (79; 95)
β -LACTA™ with NI(-) ^b	93% (66; 99)	77% (63; 87)	80% (30; 99)	66% (41; 86)	100% (5; 100)	72% (39; 93)	90% (65; 98)	72% (60; 81)
ESBL NDP	93% (66; 99)	89% (76; 95)	80% (30; 99)	80% (56; 93)	100% (5; 100)	82% (48; 97)	89% (65; 98)	84% (73; 91)
LFIA-CTX	100% (72; 100)	100% (91; 100)	100% (60; 100)	69% (39; 90)	100% (6; 100)	100% (68; 100)	100% (82; 100)	94% (87; 98)
NG-Test® CTX-M MULTI (CTX-M-detection) ^c	33/33		1/1		1/1		35/35	

^a Calculations with all 13 Non-Interpretable (NI) results considered positive; ^b calculations with all the 13 Non-Interpretable (NI) results considered negative; ^c numbers of detected CTX-M producers among the total CTX-M-producers.

3.2. The β -LACTA™ Test

As previously shown, the detection of ESC hydrolysing activity in *Enterobacteriales* using the β -LACTA™ test displays a good specificity (93%) and sensitivity that varies between 89% and 77% depending on whether the NIs are considered positive or negative, respectively (Table 2). Four ESBL producers were not detected (CTX-M-37, -17, -10, and GES-6 together with a plasmid-encoded cephalosporinase (CMY-136)). Even though the β -LACTA™ test was not validated for *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, we tested it on our collection of isolates [7,8]. For *P. aeruginosa* a lower specificity (80%) and sensitivity (89% and 66%) were observed. Three ESBL producers were not detected (GES-5, SHV-2a, and TEM-4). For *Acinetobacter* spp. excellent specificity (100%) and sensitivity (100–72%) were observed. As the number of tested isolates was low, especially for *Acinetobacter* spp., these results need to be confirmed on a larger panel of isolates. The main challenge with the β -LACTA™ test is the interpretation of the NI results, which represent 13 cases out of 93, which if considered as negative will result in an increase of false negative results, which significantly decreases the sensitivity in every tested species.

3.3. The NG-Test® CTX-M MULTI

Thus, the test performances for CTX-M detection were 100% for both specificity and sensitivity, but if ESC hydrolysis detection is considered, lower performances were observed (Table 2). Indeed, the specificity and sensitivity for the tested panel of isolates were 100% and 62%, respectively, for *Enterobacteriales*, and even lower for *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, as only a few CTX-M producers were included in the study. These values have to be put into balance with the fact that ESBLs are by far the most prevalent ESC resistance mechanism in *Enterobacteriales*, with CTX-Ms representing the most prevalent ESBLs worldwide. In a recent study, CTX-M enzymes were responsible for 98% of ESC resistance in 100 consecutive ESC-resistant clinical *Enterobacteriales* identified in a clinical setting in France, either from colonies or from positive blood cultures [9]. For *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, this assay is less relevant, as CTX-M enzymes are still rare.

3.4. The LFIA-CTX Test

The analytic performances of the LFIA-CTX test were similar to those of the β -LACTA™ test and the ESBL NDP test (Table 2). Indeed, 100% specificity was observed for all species while sensitivity was 100%, 75%, and 100% for *Enterobacteriales*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*, respectively (Table 2). The sensitivity for *P. aeruginosa* was comparable

to those of the β -LACTA™ test and the ESBL NDP test, as the same three ESBLs producers (GES-5, SHV-2a, TEM-4) plus PME-1 producing *P. aeruginosa* were not detected. The presence of the genes in these isolates was confirmed by PCR (data not shown). Finally, the LFIA-CTX test detected cefotaxime hydrolysing enzymes efficiently in the 12 *Acinetobacter* spp. isolates tested.

4. Discussion

The rapid and effective detection of antibiotic resistant bacteria is a critical step for antibiotic stewardship and infection control. Despite technological improvements, the identification of pathogenic bacteria, as well as the detection of antibiotic resistance, remains complex and time-consuming, with time to results often above 24 h [6,15]. Lateral flow immunoassays (LFIA) have proven to be useful, easy, rapid, and reliable confirmatory tests for detection of β -lactamases, especially for CTX-M-type ESBLs in gram-negatives [9,16,17]. This assay detects the presence of CTX-Ms that account for most of the resistance mechanisms leading to ESC resistance in *Enterobacterales* but misses some rare ESC hydrolysing β -lactamases (AmpC, minor ESBLs, and carbapenemases). Biochemical-based confirmatory tests evaluate the enzyme's ability to hydrolyse ESCs. The β -LACTA™, the ESBL NDP, and the LFIA-CTX tests are well-adapted for the detection of *Enterobacterales* isolates expressing enzymes hydrolysing cefotaxime. The ESBL NDP test and β -LACTA™ test, even though displaying good analytical performances, are sometimes difficult to interpret, and need large amounts of bacteria [8]. The LFIA-CTX results are obtained with one single colony as compared to the β -LACTA™ and ESBL NDP tests, which require a 1 μ L a loop and a full 10 μ L calibrated loop (loaded to the 1/3), respectively. The LFIA-CTX was highly specific, with global performances close to 100%, for *Enterobacterales* but also for *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. isolates hydrolysing cefotaxime. Indeed, despite the natural resistance to cefotaxime by *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., acquired enzymatic activity could be detected. The LFIA-CTX test is slightly longer as, unlike the two other tests that require only 15 min, it needs a preincubation of 30 min incubation with cefotaxime and a 10 min migration. On the other hand, for the LFIA-CTX test and the β -LACTA™ test, incubation is performed at room temperature, while for the ESBL NDP test a 37 °C incubation is required (Table 1).

With some isolates, discrepant results were obtained among the three tests. Indeed, for SME-1-producing *S. marcescens* and a CARB-4 producing *P. aeruginosa* isolates, positive results were obtained with the β -LACTA™ test and the ESBL NDP test, but with the LFIA-CTX assay the result was negative [18,19]. SME-1, a class A carbapenemase, and CARB-4, a broad-spectrum penicillinase, are devoid of significant cefotaxime hydrolysing activity [20,21]. Thus, the results of LFIA-CTX are in agreement with the literature. These differences might be explained by the number of bacteria used for these tests. Indeed, the LFIA uses one colony, while the other tests use a 1 μ L or 1/3 of a 10 μ L loop full of bacteria. Similarly, the β -LACTA™ test was positive for the RTG-4 producing *A. baumannii*, whereas the LFIA-CTX and the ESBL NDP tests were negative. RTG-4 is a penicillinase (carbenicillinase or CARB) that has broadened its spectrum of hydrolysis to include cefepime and ceftipime but has no detectable cefotaxime hydrolytic activity [20].

5. Conclusions

This study showed that LFIA-CTX may be used for the detection of ESC hydrolysis as a competitive alternative to already available assays (β -LACTA™ test and ESBL NDP test) without any specific equipment and reduced hands-on time. The ESBL NDP test is a home-made assay that allows distinction between ESBL and other ESC hydrolysing enzyme producers. Combining the LFIA-CTX test with the already commercially available NG-Test® CTX-M MULTI would allow detection of ESC hydrolytic activity together with the most prevalent ESC-resistance mechanism in *Enterobacterales* (CTX-X-M-like β -lactamases).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics12010197/s1>, Table S1: Detailed results for the 93 bacterial isolates studied with each tested method.

Author Contributions: Conceptualization, H.V., A.C. and T.N.; methodology, T.N.; validation, L.D., H.V., S.S. and T.N.; formal analysis, C.G., C.M., and S.O.; investigation, C.G., C.M. and S.O.; resources, A.C.; data curation, L.D. and T.N.; writing—original draft preparation, C.G. and T.N.; writing—review and editing, all authors; supervision, T.N.; project administration, T.N.; funding acquisition, H.V. and T.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, the University Paris-Saclay, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and grants from the French National Research Agency for the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT) (ANR-10-LABX-33), the Innovantibio project (ANR-17-ASTR-0018-03) and by the EIT Health AMR-Detectool project.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We acknowledge NG Biotech for providing the NG-Test[®] CTX-M MULTI and RUO LFIA-CTX tests for free.

Conflicts of Interest: L.D. is a coinventor of the ESBL NDP test. A.C. is an employee of NG Biotech and was involved in the LFIA manufacturing but not in the data analysis.

References

1. Bevan, E.R.; Jones, A.M.; Hawkey, P.M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 2145–2155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hawkey, P.M. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: A product of globalization. *J. Hosp. Infect.* **2015**, *89*, 241–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.; Wertheim, H.F.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis* **2013**, *13*, 1057–1098. [[CrossRef](#)]
4. Bassetti, M.; Peghin, M.; Pecori, D. The management of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2016**, *29*, 583–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013–CDC. Available online: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (accessed on 12 December 2021).
6. Noster, J.; Thelen, P.; Hamprecht, A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacteriales-From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Dortet, L.; Poirel, P.; Nordmann, P. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing enterobacteriaceae from urine samples by use of the ESBL NDP test. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 3701–3706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Renvoisé, A.; Decré, D.; Amarsy-Guerle, R.; Huang, T.D.; Jost, C.; Podglajen, I.; Raskine, L.; Genel, N.; Bogaerts, P.; Jarlier, V.; et al. Evaluation of the β LACTA[™] test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 4012–4017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Bernabeu, S.; Ratnam, K.C.; Boutal, H.; Gonzalez, C.; Vogel, A.; Devilliers, K.; Plaisance, M.; Oueslati, S.; Malhotra-Kumar, S.; Dortet, L.; et al. A Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Identification of CTX-M-Producing Enterobacteriales from Culture Plates and Positive Blood Cultures. *Diagnostics* **2020**, *10*, 764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Moguet, C.; Gonzalez, C.; Sallustrau, A.; Gelhay, S.; Naas, T.; Simon, S.; Volland, H. Detection of expanded-spectrum cephalosporin hydrolysis by lateral flow immunoassay. *Microb. Biotechnol.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Girlich, D.; Bogaerts, P.; Bouchahrouf, W.; Bernabeu, S.; Langlois, I.; Begasse, C.; Arangia, N.; Dortet, L.; Huang, T.D.; Glupczynski, Y.; et al. Evaluation of the Novodiag CarbaR+, a Novel Integrated Sample to Result Platform for the Multiplex Qualitative Detection of Carbapenem and Colistin Resistance Markers. *Microb. Drug Resist.* **2021**, *27*, 170–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Girlich, D.; Oueslati, S.; Bernabeu, S.; Langlois, I.; Begasse, C.; Arangia, N.; Creton, E.; Cotellon, G.; Sauvadet, A.; Dortet, L.; et al. Evaluation of the BD MAX Check-Points CPO Assay for the Detection of Carbapenemase Producers Directly from Rectal Swabs. *J. Mol. Diagn.* **2020**, *22*, 294–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Available online: <http://vassarstats.net/> (accessed on 14 December 2021).
14. Mugnier, P.; Podglajen, I.; Goldstein, F.W.; Collatz, E. Carbapenems as inhibitors of OXA-13, a novel, integron-encoded β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **1998**, *144*, 1021–1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Shanmugakani, R.K.; Srinivasan, B.; Glesby, M.J.; Westblade, L.F.; Cárdenas, W.B.; Raj, T.; Erickson, D.; Mehta, S. Current state of the art in rapid diagnostics for antimicrobial resistance. *Lab. Chip.* **2020**, *20*, 2607–2625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Bianco, G.; Boattini, M.; Iannaccone, M.; Cavallo, R.; Costa, C. Evaluation of the NG-Test CTX-M MULTI immunochromatographic assay for the rapid detection of CTX-M extended-spectrum- β -lactamase producers from positive blood cultures. *J. Hosp. Infect.* **2020**, *105*, 341–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Torres, I.; Albert, E.; Giménez, E.; Olea, B.; Valdivia, A.; Pascual, T.; Huntley, D.; Sánchez, D.; Costa, R.M.; Pinto, C.; et al. Performance of a MALDI-TOF mass spectrometry-based method for rapid detection of third-generation oxymino-cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from blood cultures. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *40*, 1925–1932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hanaki, H.; Kubo, R.; Nakano, T.; Kurihara, M.; Sunagawa, K. Characterization of HMRZ-86: A novel chromogenic cephalosporin for the detection of extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 888–889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Potron, A.; Poiriel, L.; Croizé, J.; Chantepedrix, V.; Nordmann, P. Genetic and Biochemical Characterization of the First Extended-Spectrum CARB-Type β -Lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3010–3016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Philippon, A.M.; Paul, G.C.; Thabaut, A.P.; Jacoby, G.A. Properties of a novel carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase (CARB-4) specified by an IncP-2 plasmid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *29*, 519–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Naas, T.; Dortet, L.; Iorga, B.I. Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17*, 1006–1028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

II.5. Le multiplexage de la détection de l'activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu et de la détection des CTX-M

II.5.1. Le développement du test immunochromatographique à flux latéral

Les CTX-M représentent la grande majorité des enzymes conduisant à la résistance aux céphalosporines à spectre étendu chez les entérobactéries. Le test LFIA NG-Test® CTX-M MULTI s'est avéré être un test de confirmation utile, facile, rapide et fiable chez les entérobactéries pour la détection des BLSE de type CTX-M (254). Néanmoins, il ne détecte pas les autres β -lactamases hydrolysant les céphalosporines à spectre étendu telles que les AmpC, les BLSE mineures et certaines carbapénémases. Ainsi, en l'associant avec le test LFIA-CTX (258) sur une même bandelette, ceci a permis de détecter les BLSE de type CTX-M ainsi que les autres β -lactamases capables d'hydrolyser les céphalosporines à spectre étendu.

II.5.2. La validation du test Rapid LFIA ESC

Les résultats de la validation de ce multiplexe, dénommé le test Rapid LFIA ESC, sur le souchier du CNR sont décrits dans l'article suivant (260).

Article III

Article

Multiplex Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Expanded-Spectrum Hydrolysis and CTX-M Enzymes

Christian Moguet ¹, Camille Gonzalez ², Thierry Naas ^{2,3,4}, Stéphanie Simon ¹ and Hervé Volland ^{1,*}

¹ Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France; christian.moguet@cea.fr (C.M.); stephanie.simon@cea.fr (S.S.)

² Bacteriology-Hygiene Unit, APHP, Hôpital Bicêtre, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France; gonzalezcamille0405@gmail.com (C.G.); thierry.naas@aphp.fr (T.N.)

³ Team Resist, UMR1184, Université Paris-Saclay—INSERM—CEA, LabEx Lermite, 92296 Châtenay-Malabry CEDEX, France

⁴ Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance: Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

* Correspondence: herve.volland@cea.fr; Tel.: +33-1-69-08-78-98; Fax: +33-1-69-08-59-07

Abstract: Background: Early detection of expanded-spectrum cephalosporinase (ESC) hydrolyzing β -lactamases is essential for antibiotic stewardship. Here we have developed a multiplex lateral flow immunoassay (LFIA) that detects cefotaxime-hydrolyzing activity as well as the most prevalent ESC-hydrolyzing β -lactamases: the CTX-M-like. Methods: The Rapid LFIA ESC test was evaluated retrospectively on 188 (139 Enterobacterales, 30 *Pseudomonas* spp. and 14 *Acinetobacter* spp.) agar-grown bacterial isolates with well-characterized β -lactamase content. One single colony was resuspended in 150 μ L extraction buffer containing cefotaxime, incubated at room temperature for 30 min prior to loading on the LFIA for reading within 10 min. Results: Out of the 188 isolates, all 17 that did not express a β -lactamase hydrolyzing cefotaxime gave negative results, and all 171 isolates expressing a β -lactamase known to hydrolyze cefotaxime, gave a positive test result. In addition, all 86 isolates expressing a CTX-M-variant belonging to one of the five CTX-M-subgroups were correctly identified. The sensitivity and specificity was 100% for both tests. Conclusions: The results showed that the multiplex LFIA was efficient, fast, low cost and easy to implement in routine laboratory work for the confirmation of ESC hydrolyzing activity and the presence of CTX-M enzymes.

Keywords: lateral flow immunoassay; β -lactamase detection; CTX-M enzymes; cephalosporin hydrolysis



Citation: Moguet, C.; Gonzalez, C.; Naas, T.; Simon, S.; Volland, H.

Multiplex Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Expanded-Spectrum Hydrolysis and CTX-M Enzymes. *Diagnostics* **2022**, *12*, 190. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12010190>

Academic Editor: Anna Baraniak

Received: 21 December 2021

Accepted: 11 January 2022

Published: 13 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The fight against bacterial resistance to antibiotics is becoming one of the greatest challenges facing our society, especially with the spread of multidrug-resistant strains [1]. β -Lactams are among the most frequently prescribed antibiotics to treat bacterial infections due to their safety and clinical efficacy. However, with the global proliferation of β -lactamases (BL), a resistance mechanism commonly found in Gram-negative bacteria (GNB), particularly Enterobacterales, their usefulness is under threat [2,3]. In healthcare settings, Enterobacterales producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL) are a particular concern. The CDC has estimated that these Enterobacterales account for 19% of healthcare-associated infections each year and that infections caused by these bacteria are also associated with increased mortality and cost of care [4]. ESBLs have limited treatment options because they hydrolyse most β -lactams, including penicillin and extended-spectrum cephalosporins (ESCs) (e.g., cefotaxime [CTX] and ceftazidime [CAZ]), and carry many other resistance determinants leading to a multidrug-resistant phenotype [2]. Their spread is of great clinical concern given the importance of these pathogens as causes of

hospital-acquired and community-acquired infections, resulting in difficult-to-treat infections associated with high mortality rates and increased costs [5].

Within the ESBLs, the CTX-M family emerged in the early 1980s and now represents the most common ESBLs in the world. It is divided into five groups based on amino acid sequence identity: the CTX-M groups 1; 2; 8; 9 and 25 [6,7]. Each group comprises allelic variants that differ from each other by one or more amino acid substitutions [5,8]. The CTX-M-15 variant of CTX-M Group 1 is considered the most common in many parts of the world. However, it is supplanted by CTX-M Group 9 variants in China, Japan, South-East Asia and Spain, and in particular the CTX-M-14 variant [7]. Infections caused by CTX-M-producing bacteria must be treated by carbapenems. This has led to the increasing use of carbapenems, followed by the emergence and spread of carbapenemase-producing strains [7,9]. CTX-M expressing Enterobacteriaceae are associated with higher rates of healthcare costs, morbidity and mortality [10,11].

Rapid and efficient detection of antibiotic-resistant bacteria is an essential step for responsible antibiotic stewardship and infection control, and there are currently several diagnostic tests available for the identification of CTX-M carriers in the clinical setting.

They are either based on genotypic or phenotypic approaches [12,13]. Genotypic methods mainly use nucleic acid amplification, which remains the reference method for the detection of ESBLs including CTX-Ms [14–18]. Many of these tests are home-made PCR tests [14,16], but several tests are commercially available for the detection of CTX-M-like [15]. However, these methods require specific equipment, trained personnel and are usually expensive. In addition, the appearance of new variants may not be detected by these techniques due to changes in nucleotide sequences [12].

In contrast to genotypic methods, which are based on the identification of the resistance gene, phenotypic methods reveal the presence of enzymatic activity and in some cases its identification for immunochromatographic lateral flow immunoassay (LFIA) testing. There are many phenotypic methods, each with its own drawbacks: disc diffusion tests which require 24 h of incubation [13]; colorimetric tests (β -Lacta [19]; ESBL NDP [20]) where the interpretation of the colour change can make it difficult to read the results; matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) requiring expensive equipment and significant expertise [21,22]; UV spectrophotometry, reserved for reference laboratories due to its complexity [23]; and direct β -lactam inactivation method (dBLIM), which allows the detection of extended-spectrum cephalosporinase activity directly from Enterobacterales under inactivation conditions, but is often limited by the time required to obtain results and undetermined complementary mechanisms [24]. Indeed, despite technological improvements, the identification of pathogenic bacteria and the detection of antibiotic resistance remains complex and time consuming [25]. However, in the past decade, the development of LFIA for antibiotic resistance has improved diagnosis in the identification of BLs.

LFIA have proven useful as easy, rapid and reliable confirmatory tests for the detection of antibiotic resistance mechanisms, particularly for BLs in Gram-negative bacteria [26–28]. The NG-Test CTX-M MULTI showed 100% sensitivity and specificity with isolates grown on agar plates and was able to detect 98% of ESBL producers identified in a clinical setting in France, either from colonies or from positive blood cultures [27]. These tests detect the presence of enzymes that confer resistance to ESBLs, and although CTX-Ms represent most of the resistance mechanisms leading to ESC resistance, some rare enzymes may be missed (plasmid-encoded AmpC, hyper AmpCs and some carbapenemases). In parallel, the LFIA-CTX test showed 99.1% sensitivity and 100% specificity for the detection of ESC hydrolytic activity from colonies [29]. Recently, an evaluation was carried out on three biochemical tests for ESC hydrolysis: the ESBL NDP test, the β -LactaTM test and the LFIA-CTX test, combined with the NG-test CTX-M-Multi. The LFIA-CTX test showed better sensitivity and specificity than the other tests, particularly for Enterobacterales. Furthermore, unlike the ESBL NDP test, the LFIA-CTX is not limited to detection of ESBL.

Thus, it was concluded that the combination of LFIA-CTX with NG-CTX-M-Multi would detect hydrolysis of ECS as well as the most frequently encountered ESBLs.

In this study, we have developed a single LFIA strip, named LFIA Rapid ESC, which combines the LFIA-CTX and NG-CTX-M-Multi tests, and allows the identification of CTX-M-like (98% of ESBLs) and the detection of ESC hydrolysis directly from colonies grown on different culture media widely used in clinical microbiology laboratories.

2. Experimental Section

2.1. Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibodies (mAbs) were obtained as described in two previous articles by this group [27,29] and were adapted into a single LFIA strip.

2.2. Manufactured Test

The required mAbs were produced on a large scale for the development of the LFIA Rapid ESC test. The manufacture of the strips has been described previously [29].

The LFIA Rapid ESC test has three capture lines present on the nitrocellulose membrane. The first line (LT1) was prepared by immobilizing cefotaxime-BSA (0.1 mg/mL). For the second line (LT2), the three capture mAbs for CTX-M were pooled and immobilized (0.5 mg/mL for each mAb). These mAbs allow the detection of all 5 CTX-M groups due to the cross-reactivity of some mAbs with the other two groups (Groups 8 and 25). The third line, the control (LC), was prepared with goat anti-mouse mAbs (1 mg/mL).

The detection mAbs were coupled to colloidal gold. The amounts of tracer before deposition on the conjugate paper for the anti-cefotaxime mAb was OD_{600nm} 0.9 and for the anti-CTX-Ms the OD_{600nm} was 1.2. The minimum amount of intact cefotaxime used to inhibit any signal on LT1 was 15 ng/mL.

The strips were then enclosed in a plastic cassette to facilitate test execution. The structure of the strip is illustrated in Figure 1, and the test procedure in Figure 2.

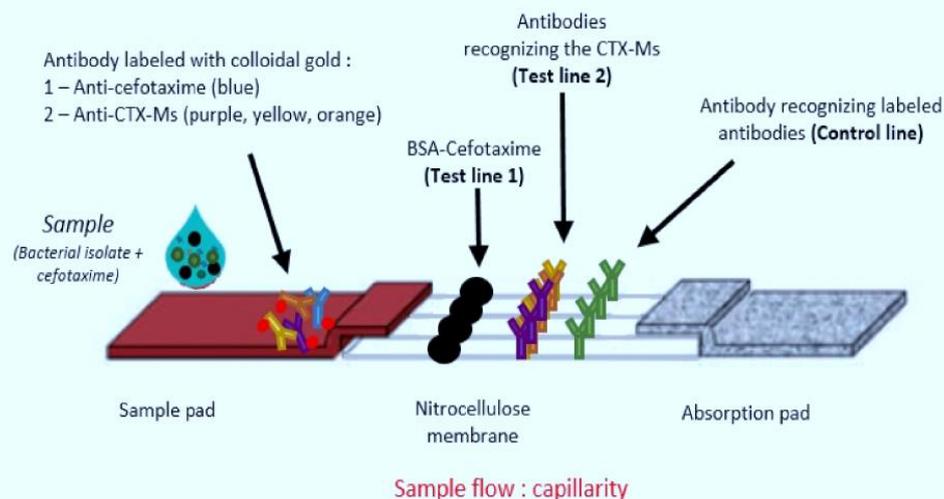


Figure 1. Structure of the strips. The strip consists of the sample pad with dried gold-labelled mAbs (anti-cefotaxime + anti-CTX-Ms); the nitrocellulose membrane with a Test Line 1 consisting of intact CTX coupled with BSA; a Test Line 2 consisting of mAbs recognizing CTX-Ms; a control line consisting of mAbs recognizing the colloidal gold-labelled mAbs; and the absorption pad which allows the sample to migrate along the strip.

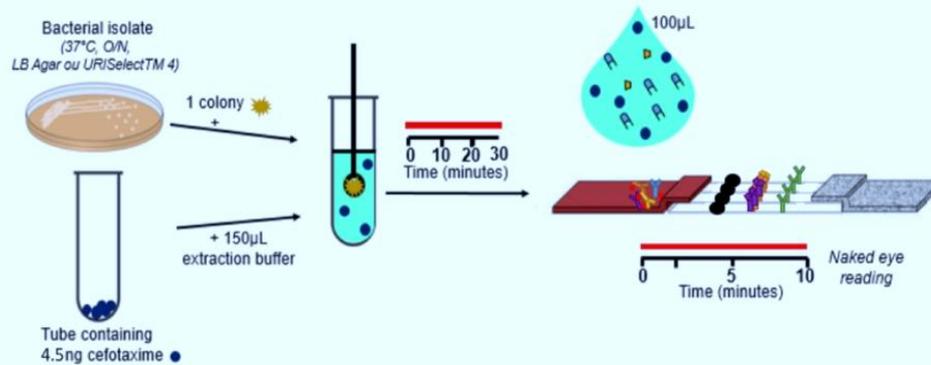


Figure 2. Test procedure. One colony is resuspended in 150 µL of extraction buffer with 15 ng/mL of CTX. After a 30-min incubation at room temperature (RT), 100 µL are loaded on the cassette. The results are obtained after 10 min of migration. Data acquisition is by naked eye readings.

2.3. Assay Protocol for Test Validation

The strains to be tested were grown overnight at 37 °C on URISelect™ 4 (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). One single isolated colony was collected from the plate with a 1 µL inoculation loop and suspended in 150 µL of extraction buffer (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, NaCl 0.15 M, BSA 0.1%, Tween 20 0.5%, CHAPS 1%, sodium azide 0.01%) containing 15 ng/mL of CTX. The extraction buffer allowed bacterial lysis. After 30 min incubation, 100 µL of this extract was loaded on the strip and allowed to migrate for 10 min.

2.4. Data Acquisition

Data were acquired by naked eye readings. The CTX-M BL activities that hydrolyzed CTX were identified when a signal appeared on Test Line 1 and 2. Other BL activities that hydrolyzed CTX were identified with a signal only on Test Line 1 (see Figure 2). The control line had to be present to validate the LFIA test.

2.5. Strains Tested

A total of 188 isolates with PCR-characterized BL content were used to validate the LFIA test, which included a variety of bacterial species: Enterobacterales (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. asburiae*, *C. freundii*, *C. koserii*, *M. morgani*, *Salmonella* spp., and *S. marcescens*) and non-fermenters (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*). This collection included 17 isolates unable to hydrolyze cefotaxime including one strain that expressed CTX-M-93 and a CTX-M-variant lacking CTX activity, and 171 isolates known to express CTX hydrolyzing enzymes including 85 CTX-M-producing isolates.

3. Results

3.1. Test Interpretation

Depending on the BL(s) involved in the enzymatic reaction, the test lines and their interpretation differ. These are described in Figure 3, with examples of results obtained from a cassette.

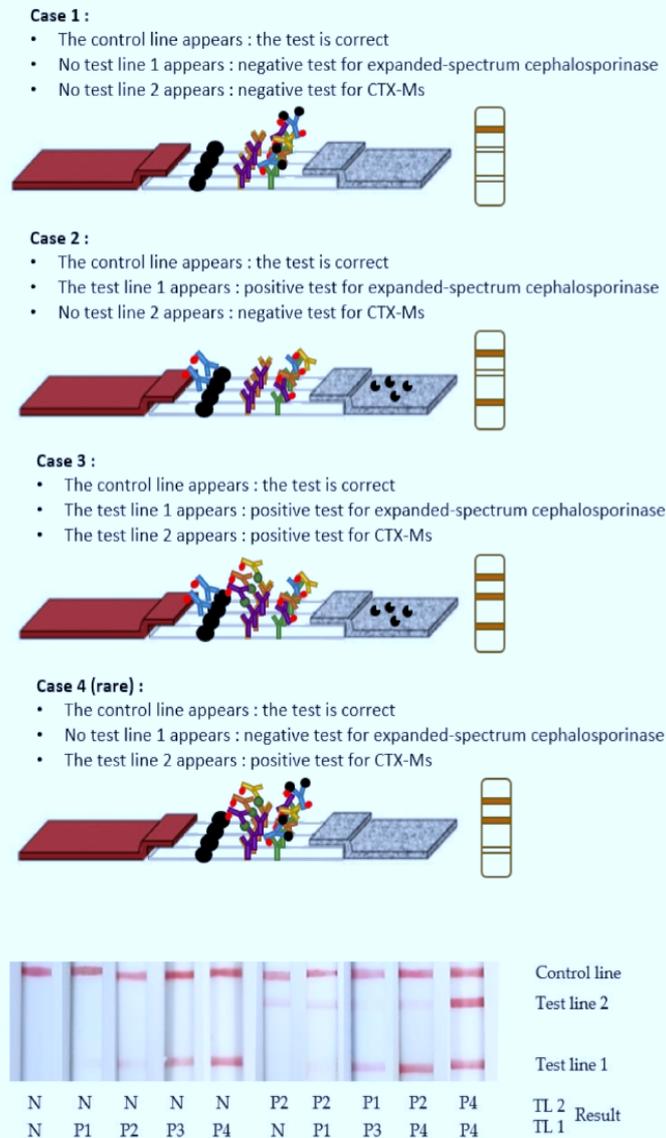


Figure 3. Test interpretation. Case 1: In the absence of enzymatic activity, all the anti-cefotaxime mAb’s paratopes are occupied by the CTX added to the sample before the test. On both tests lines, the results are negative: “N”. The control line is positive: “P”. Case 2: In the presence of enzymatic activity other than CTX-Ms, the hydrolysed CTX is not recognized by the anti-cefotaxime mAbs, which are able to react with the CTX immobilized on the Test Line 1. A signal appears only on the Test Line 1 and the control line “P”, when cephalosporinase expressing strains, other than CTX-Ms, are present. Case 3: In the presence of CTX-Ms, the hydrolysed CTX is not recognized by the anti-cefotaxime mAbs, which are able to react with the CTX immobilized on the Test Line 1. The labelled anti-CTX-Ms mAbs fix CTX-Ms and react with the anti-CTX-Ms mAbs on the Test Line 2. A signal appears on the Test Line 1, the Test Line 2 and the control line “P”. Case 4: In rare cases with some cephalosporinase-expressing strains such as CTX-M-93, the CTX is not hydrolysed. All the paratopes of anti-cefotaxime mAbs are then occupied by the CTX added to the sample before the test. The labelled anti-CTX-Ms mAbs fix CTX-Ms and react with the mAbs on the Test Line 2. A signal appears only on the Test Line 2 and the control line “P”. The associated number of “P” is relative to the intensities observed on the test lines.

3.2. Test Validation

For the LFIA validation, 188 isolates with PCR-characterized BLs content were tested (Tables 1 and 2). Detailed results are available in Supplementary Table S1.

Table 1. LFIA Rapid ESC test results for the 17 isolates with no CTX hydrolyzing activity.

	Acquired Enzymes	Positive Results (LT1)	Positive Results (LT2)
Enterobacterales (n = 12)		0/12	1/12
<i>Escherichia coli</i> (n = 3)	WT (2); CTX-M-93	0/3	1/3 *
<i>Klebsiella pneumonia</i> (n = 1)	WT	0/1	0/1
<i>Citrobacter freundii</i> (n = 1)	WT	0/1	0/1
<i>Enterobacter</i> spp. (n = 3)	IMI-1/2/17 (3)	0/3	0/3
<i>Salmonella</i> spp. (n = 3)	WT (3)	0/4	0/4
<i>Morganella morganii</i> (n = 1)	WT	0/2	0/2
<i>Pseudomonas</i> spp. (n = 4)	WT; Overexpressed efflux pumps (2); OXA-198	0/4	0/4
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n = 1)	OXA-21	0/1	0/1

* A bacterial isolate containing CTX-M-93.

Table 2. LFIA Rapid ESC test results with 171 isolates with CTX-hydrolyzing activity.

	Acquired Enzymes	Positive Results (LT1)	Positive Results (LT2)
Enterobacterales (n = 127)		127/127	83/127
AmpCs (n = 8)	Overexpressed AmpC (4); DHA-1/2 (2); ACC-1; CMY-136	8/8	0/8
ESBLs (n = 81)	TEM-3/24 (3); GES-6; SHV-2a/11/12 (3); CTX-M-1/2/3/8/10/14/15/17/18/19/24/27/32/37/55/57/65/71/82/100/101/182 (68); TEM + SHV (2); TEM-52 + CTX-M-15; SHV-2a + CTX-M-15; OXA-48-like (2)	81/81	70/81
Carbapenemases (n = 16)	KPC-2/3 (5); IMP-1/8/14 (3); VIM-2; OXA-48-like (3); NDM-1; TMB-1; GIM-1; FRI-1	16/16	0/16
AmpCs + ESBLs (n = 1)	Overexpressed AmpC + CTX-M-15	1/1	1/1
AmpCs + carbapenemases (n = 3)	CMY-13 + VIM-1; CMY-4 + OXA-204; Overexpressed AmpC + SME-1	3/3	0/3
ESBLs + carbapenemases (n = 16)	SHV-5/12 + IMP-1/8 (3); SHV-5 + VIM-1; SHV-5/11 + OXA-48-like (2); CTX-M-15 + KPC-3; CTX-M-15 + NDM-7/19 (2); TEM-3 + CTX-M-15 + NDM-19; CTX-M-1/9/15 + OXA-48-like (5); SHV-12 + CTX-M-15 + GES-5	16/16	10/16
AmpCs + ESBLs + carbapenemases (n = 2)	CTX-M-15 + CMY-4 + OXA-48-like; CTX-M-15 + CMY-6 + NDM-4	2/2	2/2
<i>Pseudomonas</i> spp. (n = 26)		26/26	1/26
ESBLs (n = 8)	TEM-4; SHV-2a; GES-2/9 (2); PER-1/2 (2); OXA-14; CTX-M-2	8/8	1/8
Carbapenemases (n = 16)	GES-5; KPC-2; NDM-1; IMP-1/2/13/15/19/26/31/56/63/71 (10); VIM-1/2/4 (3)	16/16	0/16
Broad spectrum penicillinases + AmpCs (n = 2)	Overexpressed AmpC + OXA-13/32 (2)	2/2	0/2

Table 2. Cont.

	Acquired Enzymes	Positive Results (LT1)	Positive Results (LT2)
<i>Acinetobacter</i> spp. (n = 18)		18/18	1/18
AmpCs (n = 1)	Overexpressed AmpC	1/1	0/1
ESBLs (n = 7)	SHV-5 (2); GES-11/12/14 (3); PER-1; CTX-M-15	7/7	1/7
Carbapenemases (n = 4)	NDM-1/2 (2); IMP-1/4 (2)	4/4	0/4
AmpCs + carbapenemases (n = 6)	Overexpressed AmpC + OXA-23/51/58/97/143/253 (6)	6/6	0/6

The 17 isolates unable to hydrolyze CTX gave negative results for CTX hydrolysis activity (see Table 1). The majority of these isolates either did not express any β -lactamase, expressed a narrow spectrum β -lactamase or a basal chromosome-encoded AmpC that did not hydrolyze CTX significantly. OXA-21 is a penicillinase with no or very low enzyme activity for ESC including CTX. IMI-1/-2/-7 and OXA-198 are Class A and D carbapenemases, respectively, that do not hydrolyze ESCs. As expected, CTX-M-93, that is unable to hydrolyze CTX, gave a positive signal only on Test Line 2, which reveals the presence of a CTX-M-like β -lactamase.

All of the 171 strains able to hydrolyze CTX (Table 2) gave a positive signal on Test Line 1 (see Table 2). All overexpressed-AmpCs, ESBLs (SHV, TEM, CTX-Ms, etc.) and the majority of carbapenemases (KPC, NDM, VIM, IMP and OXA) could be detected by the test, as has been described previously [29]. In addition, irrespective of species, the 86 strains expressing CTX-M gave a positive signal on Test Line 2. One *E. coli* isolate expressing CTX-M-93 was unable to hydrolyze CTX, but 85/86 isolates that expressed CTX-M enzymes displayed a CTX-hydrolytic activity.

3.3. Overall Performance

The results obtained during this validation showed that our LFIA Rapid ESC has a sensitivity and specificity of 100% for the detection of CTX hydrolytic activity and for the identification of CTX-M-like enzymes. This allows the detection of ESC hydrolytic activity at the same time as the most prevalent resistance mechanism responsible for ESC hydrolysis.

4. Discussion

The spread of GNB isolates expressing BLs capable of hydrolysing ESC is a major public health concern [7] leading to increased morbidity and mortality rates in humans and escalating financial costs. Rapid identification of these isolates is essential to adapt treatment in case of infection, but also to prevent their spread in the hospital environment by implementing infection control measures. The earlier the enzyme activity is detected, the more effective the treatment and the lower the probability of nosocomial spread [30]. Among GNB with BL ESC activity, CTX-M enzymes currently represent the most widespread group of ESBLs, with more than 246 CTX-M variants described [7,31]. CTX-Ms displays significant enzymatic activity against ESC that result in therapeutic treatment failure, and are the main source of ESC resistance in Enterobacterales isolated from humans.

The LFIA Rapid ESC multiplex assay was able to identify CTX-M enzymes, which represent a large proportion of ESBLs (e.g., 98% of ESBLs in France [27]), as well as detect most ESC hydrolysing enzymes (other ESBLs, chromosomally and plasmid encoded-AmpCs and most carbapenemases). This wide detection spectrum is due to the use of CTX, which is hydrolyzed by the vast majority of ESBLs, plasmid-encoded or hyper AmpCs, and carbapenemases; ceftazidime, in contrast, is only weakly hydrolysed by these enzymes. Thus, the few enzymes that might be missed by the NG-Test CTX-M-multi will be revealed by the detection of enzymatic activity on CTX.

After a 30-min incubation, positive results were interpretable within 10 min of migration. The LFIA Rapid ESC test was validated on Enterobacterales ($n = 139$), *Pseudomonas* spp. ($n = 30$) and *Acinetobacter* spp. ($n = 19$). All known CTX hydrolyzing BLs in this study as well as those belonging to CTX-M groups were correctly detected and identified within 10 min. In our study, 45.7% of the isolates contained CTX-M enzymes, 6.3% SHV enzymes, 2.12% TEM enzymes, 3.1% GES enzymes, 4.7% chromosomal or plasmid AmpCs, and 19.1% carbapenemases. The remaining isolates tested contained at least two BLs (combination of AmpC, ESBL and/or carbapenemases). No false positive or negative results were obtained. Therefore, the analytical performance of the LFIA Rapid ESC test reached a sensitivity of 100% and a specificity of 100%. These results are consistent with previous studies conducted on both LFIA tests independently, namely the LFIA-CTX and the commercially available NG-Test CTX-M-multi [27,29].

The possibility of enzyme extraction at one of the steps in the test allows their activity to be detected even if, as in some bacteria (e.g., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.), the presence of complementary mechanisms [32] (e.g., reduced outer membrane permeability, production of efflux systems), may decrease the hydrolysis of the antibiotic and thus its detection under normal conditions.

A further advantage of the test is that it can distinguish between susceptible bacteria that naturally produce AmpC and resistant bacteria that overproduce AmpC [33]. AmpCs are usually expressed at an inducible but basal level, which does not lead to significant CTX hydrolysis, but in case of overexpression, they may lead to ESC such as CTX. AmpCs may also be plasmid-encoded (pAmpCs, e.g., DHA and CMY), which results in increased copy number and may also lead to ESC resistance. The prevalence of pAmpCs is still low in many countries compared to ESBL [33]. The BLs of greatest clinical concern are the ESBLs and carbapenemases. ESBLs can be divided into two groups based on their prevalence: major ESBLs (TEM, SHV, and CTX-M) and minor ESBLs (GES, PER, VEB, etc.) [34]. CTX-M ESBLs are now the most prevalent ESBLs worldwide. More than 246 variants have been described belonging to five distinct subgroups of enzymes, with CTX-M-15 and to a lesser extent CTX-M-14 being the most common [31]. For carbapenemases, all five major enzymes (e.g., NDM; IMP; VIM; KPC and OXA) have been detected, even OXA-48 variants which have very low hydrolytic activity on CTX [22,35–37]. In a previous study [29], 14/17 (82.3%) OXA-48 producing strains were detected. It should be noted that in 80% of cases, OXA-48 is associated with ESBLs that efficiently hydrolyse CTX (https://maquette.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_2018v1.pdf, accessed on 1 January 2022), T. Naas personal comm).

Thus, the LFIA Rapid ESC test allows the detection of ESC hydrolysis linked to a broad range of BLs (overexpressed AmpCs, plasmid-encoded AmpCs, ESBLs and carbapenemases), expressed in a wide variety of bacteria, as well as the presence of CTX-M enzymes. There are currently several other tests available for the detection of ESBLs at the genetic (PCR, sequencing) and phenotypic level (MALDI-TOF MS, β -Lacta, Rapid ESBL NDP test, dBLIM), as described in the first part of the article. The LFIA Rapid ESC test overcomes some of the drawbacks associated with these tests, allowing reliable and rapid identification of CTX-M enzymes (representing 98% of ESBLs currently circulating in France) and detection of hydrolytic activity on ESCs, with results delivered in 40 min. The test is inexpensive and easy to implement in the routine laboratory setting. In addition, the performance of the test has demonstrated very good sensitivity and specificity, making it a preferred tool for resistance diagnosis in bacterial colonies.

5. Conclusions

The LFIA Rapid ESC test is fast and easy to use in a clinical microbiology laboratory setting for the routine detection of BLs hydrolyzing third generation cephalosporins and the detection of CTX-M enzymes. It could replace existing tests in countries with limited resources and/or a high prevalence of BLs. The low cost of the test will also allow it to be used in other industries such as food, animal medicine, and the environment. The

next steps will be to use it for the detection of expanded-spectrum hydrolysis and CTX-M enzymes in biological matrices (e.g., urine, feces, and blood culture).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics12010190/s1>, Table S1: Results of 188 isolates for validation of the LFIA Rapid ESC test.

Author Contributions: Conceptualization, H.V., S.S. and T.N.; methodology, C.G. and C.M.; validation, C.G. and C.M.; formal analysis, C.G., T.N. and C.M.; investigation, H.V., T.N., C.G. and C.M.; resources, T.N., H.V. and S.S.; writing—original draft preparation, H.V., T.N. and C.M.; supervision, T.N., H.V. and S.S.; project administration, H.V., S.S. and T.N.; funding acquisition, H.V., S.S. and T.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), the University Paris-Saclay, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the French Alternative Energies and Atomic Energy Commission (CEA). In the framework of a thesis, was financed by the CEA.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: For details on the data leading to the results, refer to the supplementary data, Table S1: results of 188 isolates for validation of the LFIA Rapid ESC test.

Acknowledgments: We acknowledge CEA for providing the facilities to build the LFIA Rapid ESC.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. O'Neill, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. *Rev. Antimicrob. Resist.* **2014**, 1–20.
2. Paterson, D.L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *Am. J. Infect. Control* **2006**, *34*, S20–S28. [[CrossRef](#)]
3. Bush, K.; Bradford, P.A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a025247. [[CrossRef](#)]
4. Frieden, T. Antibiotic resistance threats in the United States. *Cent. Dis. Control Prev. US Dep. Health Hum. Serv.* **2013**, *23*, 11–28.
5. Bonnet, R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cantón, R.; González-Alba, J.M.; Galán, J.C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bevan, E.R.; Jones, A.M.; Hawkey, P.M. Global Epidemiology of CTX-M β -Lactamases: Temporal and Geographical Shifts in Genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 2145–2155. [[CrossRef](#)]
8. Cantón, R.; Coque, T.M. The CTX-M Beta-Lactamase Pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 466–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.M.; Wertheim, H.F.L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic Resistance—The Need for Global Solutions. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 1057–1098. [[CrossRef](#)]
10. Hawkey, P.M. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: A Product of Globalization. *J. Hosp. Infect.* **2015**, *89*, 241–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Tacconelli, E.; Cataldo, M.A.; Dancer, S.J.; De Angelis, G.; Falcone, M.; Frank, U.; Kahlmeter, G.; Pan, A.; Petrosillo, N.; Rodríguez-Baño, J.; et al. ESCMID Guidelines for the Management of the Infection Control Measures to Reduce Transmission of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria in Hospitalized Patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20* (Suppl. S1), 1–55. [[CrossRef](#)]
12. Anjum, M.F.; Zankari, E.; Hasman, H. Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5*, 1–17. [[CrossRef](#)]
13. Drieux, L.; Brossier, F.; Sougakoff, W.; Jarlier, V. Phenotypic Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production in Enterobacteriaceae: Review and Bench Guide. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14* (Suppl. S1), 90–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Naas, T.; Oxacelay, C.; Nordmann, P. Identification of CTX-M-Type Extended-Spectrum-Beta-Lactamase Genes Using Real-Time PCR and Pyrosequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 223–230. [[CrossRef](#)]
15. Girlich, D.; Bernabeu, S.; Fortineau, N.; Dortet, L.; Naas, T. Evaluation of the CRE and ESBL ELITE MGB[®] Kits for the Accurate Detection of Carbapenemase- or CTX-M-Producing Bacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *92*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Oxacelay, C.; Ergani, A.; Naas, T.; Nordmann, P. Rapid Detection of CTX-M-Producing Enterobacteriaceae in Urine Samples. *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, 986–989. [[CrossRef](#)]
17. Peker, N.; Couto, N.; Sinha, B.; Rossen, J.W. Diagnosis of Bloodstream Infections from Positive Blood Cultures and Directly from Blood Samples: Recent Developments in Molecular Approaches. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 944–955. [[CrossRef](#)]

18. Cuzon, G.; Naas, T.; Bogaerts, P.; Glupczynski, Y.; Nordmann, P. Evaluation of a DNA Microarray for the Rapid Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases (TEM, SHV and CTX-M), Plasmid-Mediated Cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and Carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 1865–1869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Vrioni, G.; Mamali, V.; Zarkotou, O.; Voulgari, E.; Dimitroulia, E.; Themeli-Digalaki, K.; Pournaras, S.; Tsakris, A. Performance of the β LACTATM Test for Rapid Detection of Expanded-Spectrum Cephalosporin-Non-Susceptible Enterobacteriaceae. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2017**, *10*, 285–288. [[CrossRef](#)]
20. Nordmann, P.; Dortet, L.; Poirel, L. Rapid Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 3016–3022. [[CrossRef](#)]
21. Sparbier, K.; Schubert, S.; Weller, U.; Boogen, C.; Kostrzewa, M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β -Lactam Antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 927–937. [[CrossRef](#)]
22. Oviaño, M.; Rodicio, M.R.; Heinisch, J.J.; Rodicio, R.; Bou, G.; Fernández, J. Analysis of the Degradation of Broad-Spectrum Cephalosporins by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae Using MALDI-TOF MS. *Microorganisms* **2019**, *7*, 614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Takeuchi, D.; Akeda, Y.; Sugawara, Y.; Sakamoto, N.; Yamamoto, N.; Shanmugakani, R.K.; Ishihara, T.; Shintani, A.; Tomono, K.; Hamada, S. Establishment of a Dual-Wavelength Spectrophotometric Method for Analysing and Detecting Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15689. [[CrossRef](#)]
24. Bianco, G.; Boattini, M.; Iannaccone, M.; Fossati, L.; Cavallo, R.; Costa, C. Direct β -Lactam Inactivation Method: A New Low-Cost Assay for Rapid Detection of Carbapenemase- or Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriales Directly from Positive Blood Culture Bottles. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *58*, e01178-19. [[CrossRef](#)]
25. Shanmugakani, R.K.; Srinivasan, B.; Glesby, M.J.; Westblade, L.F.; Cárdenas, W.B.; Raj, T.; Erickson, D.; Mehta, S. Current State of the Art in Rapid Diagnostics for Antimicrobial Resistance. *Lab Chip* **2020**, *20*, 2607–2625. [[CrossRef](#)]
26. Boutal, H.; Vogel, A.; Bernabeu, S.; Devilliers, K.; Creton, E.; Cotellon, G.; Plaisance, M.; Oueslati, S.; Dortet, L.; Jousset, A.; et al. A Multiplex Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-Type and OXA-48-like Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 909–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bernabeu, S.; Ratnam, K.; Boutal, H.; Gonzalez, C.; Vogel, A.; Devilliers, K.; Plaisance, M.; Oueslati, S.; Malhotra-Kumar, S.; Dortet, L.; et al. A Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Identification of CTX-M-Producing Enterobacteriales from Culture Plates and Positive Blood Cultures. *Diagnostics* **2020**, *10*, 764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Han, R.; Guo, Y.; Peng, M.; Shi, Q.; Wu, S.; Yang, Y.; Zheng, Y.; Yin, D.; Hu, F. Evaluation of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5, RESIST-5 O.O.K.N.V., and IMP K-SeT for Rapid Detection of KPC-, NDM-, IMP-, VIM-Type, and OXA-48-like Carbapenemase Among Enterobacteriales. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 3296. [[CrossRef](#)]
29. Moguet, C.; Gonzalez, C.; Sallustrau, A.; Gelhay, S.; Naas, T.; Simon, S.; Volland, H. Detection of Expanded-Spectrum Cephalosporin Hydrolysis by Lateral Flow Immunoassay. *Microb. Biotechnol.* **2021**, 1–10. [[CrossRef](#)]
30. Thomson, K.S. Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 1019–1025. [[CrossRef](#)]
31. Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R.A.; Dabos, M.L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B.I. Beta-Lactamase Database (BLDB)—Structure and Function. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 917–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lupo, A.; Haenni, M.; Madec, J.-Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* Spp. and *Pseudomonas* Spp. *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*. [[CrossRef](#)]
33. Jacoby, G.A. AmpC Beta-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 161–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Naas, T.; Poirel, L.; Nordmann, P. Minor Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14* (Suppl. S1), 42–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Nordmann, P.; Gniadkowski, M.; Giske, C.G.; Poirel, L.; Woodford, N.; Miriagou, V. Identification and Screening of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 432–438. [[CrossRef](#)]
36. Oueslati, S.; Retailleau, P.; Marchini, L.; Berthault, C.; Dortet, L.; Bonnin, R.A.; Iorga, B.I.; Naas, T. Role of Arginine 214 in the Substrate Specificity of OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e02329-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Docquier, J.-D.; Calderone, V.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Giuliani, F.; Bellucci, L.; Tafi, A.; Nordmann, P.; Botta, M.; Rossolini, G.M.; et al. Crystal Structure of the OXA-48 β -Lactamase Reveals Mechanistic Diversity among Class D Carbapenemases. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 540–547. [[CrossRef](#)]

II.6. Les détections directes de l'activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu et des enzymes CTX-M dans les échantillons biologiques

II.6.1. Le SPID, un dispositif de détection en échantillon biologique

Un nouveau dispositif intégrant les étapes de traitement de l'échantillon et de détection par test LFIA a été développé et breveté par le CEA : le SPID. Ce dispositif, décrit dans la stratégie générale (*voir I.4.*), a été appliqué avec succès à la détection directe des BLSE et des carbapénémases dans des échantillons biologiques (urines, hémoculture et écouvillons rectaux) (261). L'utilisation du SPID permet une diminution du délai de la réponse de 16-24 heures à 30 minutes.

Un nouveau transfert industriel a été réalisé où cette fois-ci le dispositif SPID est utilisé par la société NG Biotech pour permettre les détections simultanées d'une activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu (LT1) et des enzymes CTX-M (LT2), directement à partir d'urine, de milieu de transport d'écouvillon rectal et d'hémoculture.

II.6.2. La détection en échantillon biologique à l'aide du SPID

II.6.2.1. Le matériel et les méthodes

Afin d'évaluer les différentes limites de détection obtenues dans différents échantillons biologiques, plusieurs inoculations ont été réalisées en urine, en milieu de transport d'écouvillon rectal et en hémoculture, à différentes concentrations (10^9 UFC (Unité formante colonie)/mL à 10^1 UFC/mL) et avec différentes bactéries résistantes : BLSE (TEM-21, *E. coli* ; CTX-M-2, *E. coli* ; CTX-M-15, *E. coli* ; SHV-2a + CTX-M-9, *E. coli* ; GES-1, *K. pneumoniae* ; CMY-2, *K. pneumoniae*) ; Carbapénémases (OXA-48, *C. freundii* ; VIM-1, *K. pneumoniae* ; OXA-244, *K. pneumoniae*) ; WT (*E. coli*).

Pour ce faire, la $DO_{600\text{ nm}}$ d'une culture en LB incubée à 37 °C une nuit sous agitation (200 rotations par minute) contenant la souche à tester est mesurée. La mesure est utilisée pour évaluer la concentration en bactéries : $1 DO_{600\text{ nm}} = 5.10^8$ UFC/mL pour *E. coli*. Pour

chaque culture, le volume correspondant à 10^9 UFC est prélevé et centrifugé 10 minutes à 5200 g. Le surnageant est éliminé et le culot est suspendu avec 1 mL de l'échantillon biologique à tester. Ensuite, des dilutions au $1/10^{\text{ième}}$ sont faites dans le même échantillon biologique que précédemment jusqu'à obtenir une concentration de 10^1 UFC/mL. Un témoin de l'échantillon biologique (sans bactérie) est également réalisé. Ces solutions sont pré-incubées à 37 °C pendant 2 heures sous agitation pour acclimater les bactéries à l'échantillon biologique. Après cette incubation, un dénombrement est réalisé. Puis, selon l'échantillon biologique, les volumes prélevés sont différents :

- En urine : 3 mL sont prélevés et la filtration avec le SPID est réalisée.
- En milieu de transport d'écouvillon rectal : 0,5 mL sont prélevés et la filtration avec le SPID est réalisée.
- En hémoculture : 1 mL est prélevé et mis au contact avec 2 mL de tampon de lyse (Tris HCl 0,1 M pH 8,0 + BSA 0,1 % + NaCl 0,15 M + Tween 20 0,5 % + Brij-O10 0,6 % (dans CAPS 0,4 M pH = 11,7) + azide de sodium 0,01 %) pendant 2 minutes. Puis, 0,5 mL de cette solution sont utilisés pour la filtration avec le SPID.

La Figure 71 ci-dessous rappelle les étapes du SPID. Pour chaque échantillon biologique, 300 µL de tampon de migration sont ajoutés dans une fiole contenant du céfotaxime lyophilisé (quantité de 4,5 ng). Ces 300 µL sont déposés dans la cupule, puis le capuchon est vissé sur le réservoir ce qui induit la filtration et le passage de la solution dans le réservoir. Une incubation de 30 minutes à température ambiante est réalisée, puis l'échantillon est déposé sur la bandelette en percutant le réservoir sur la cassette. Après 30 minutes de migration, une lecture à l'œil nu est réalisée.

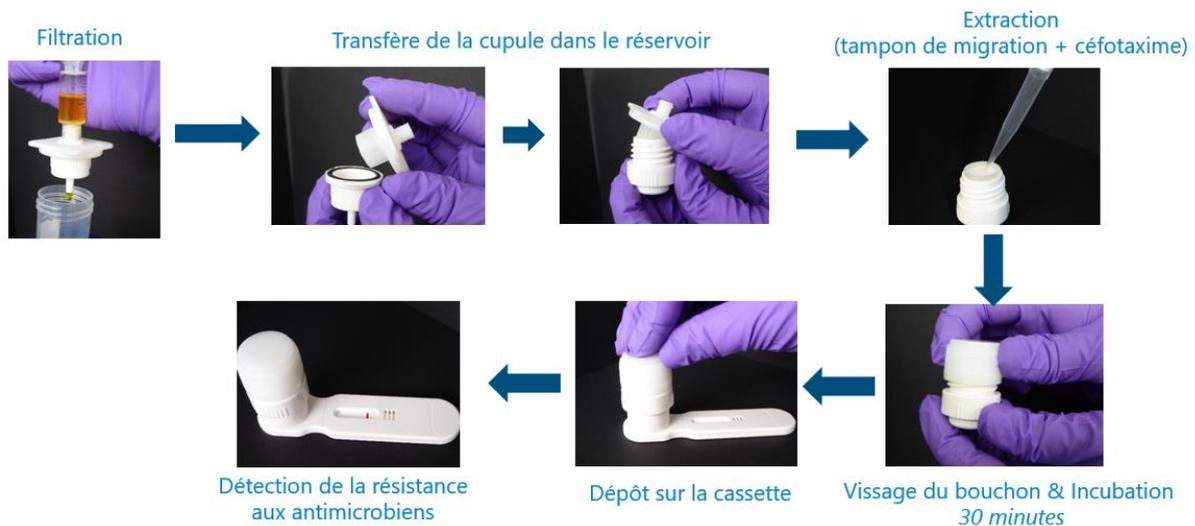


Figure 71 : Les différentes étapes du SPID associées à une détection en test rapide.

Protocole : L'utilisation du SPID (dispositif de préparation d'échantillon et une cassette de détection par un test immunochromatographique à flux latéral) nécessite cinq étapes: **1-** La filtration de l'échantillon à travers un filtre (le volume dépend de la matrice) ; **2-** Le transfert du filtre contenant l'échantillon dans un incubateur ; **3-** Le dépôt du tampon de migration et de l'antibiotique (300 μ l) sur l'échantillon. Lorsque l'incubateur est fermé, un piston pousse la solution à travers le filtre vers la partie basse de l'incubateur. ; **4-** Après 30 minutes d'incubation le réservoir est percuté sur la cassette ce qui permet à l'échantillon de migrer sur la bandelette. ; **5-** Interprétation du test après 30 minutes de migration ; (SPID (Sampling, Processing, Incubation, Detection) : Échantillonnage, Traitement, Incubation, Détection).

II.6.2.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats obtenus avec chaque souche, chaque concentration et chaque échantillon biologique sont regroupés dans les tableaux ci-dessous (Urine, Tableau 19 ; Hémoculture, Tableau 20 ; Milieu de transport d'écouvillon rectal, Tableau 21).

Urine						
LD	BLSE					
	TEM-21	CTX-M-2	CTX-M-15	SHV-2a + CTX-M-9	GES-1	CMY-2
LT2	Φ	2,35.10 ⁵	7,90.10 ³	7,75.10 ³	Φ	Φ
LT1	1,11.10 ⁶	2,35.10 ⁵	7,90.10 ⁴	7,75.10 ⁴	9,70.10 ⁶	5,35.10 ⁵
LD	Carbapénémases					
	OXA-48		VIM-1		OXA-244	
LT2	Φ		Φ		Φ	
LT1	1,48.10 ⁸		2,46.10 ⁶		4,50.10 ⁸	
LD	Souches WT					
LT2	Φ					
LT1	Φ (up to 10 ⁹)					

LT2 : Détection des enzymes CTX-M

LT1 : Détection de l'activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu

Φ : aucun signal

Tableau 19 : Les limites de détection de différentes souches sur le test d'activité enzymatique sur le céfotaxime et test de détection des CTX-M en urine avec le SPID.

Protocole : Le système SPID a été utilisé avec un volume de filtration de l'urine de 3 mL. 300 µL de céfotaxime non-hydrolysé (quantité de 4,5 ng) dans du tampon d'extraction ont été déposés dans le réservoir pour 30 minutes d'incubation. Puis, la totalité a été déposée sur une cassette SPID ; (LT1 : Ligne test 1 ; LT2 : Ligne test 2 ; Souche WT : Souche sauvage ; LD : Limite de détection ; SPID (Sampling, Processing, Incubation, Detection) : Échantillonnage, Traitement, Incubation, Détection).

Selon la β-lactamase impliquée, la limite de détection de l'activité enzymatique en terme d'UFC/ml est différente. En effet, cette limite de détection dépend de l'activité spécifique de l'enzyme impliquée et de sa concentration au sein des bactéries. Pour les bactéries contenant un gène de résistance lié à une BLSE, la limite de détection est d'environ 10⁵-10⁶ UFC/mL ; pour les enzymes CTX-M une limite de détection jusqu'à 10⁴ UFC/mL est possible. Pour les bactéries contenant une carbapénémase, la limite de détection est comprise entre 10⁶ UFC/mL et 10⁸ UFC/mL. Pour la souche WT, même à une concentration de 10⁹ UFC/mL, aucun signal n'est observé sur la LT1.

La meilleure limite de détection des CTX-M (environ 10⁴ UFC/mL) est obtenue avec une *E. coli* produisant du CTX-M-15 ou CTX-M-9.

Hémoculture						
LD	BLSE					
	TEM-21	CTX-M-2	CTX-M-15	SHV-2a + CTX-M-9	GES-1	CMY-2
<i>LT2</i>	Φ	3,80.10 ⁵	3,10.10 ⁴	3,00.10 ⁴	Φ	Φ
<i>LT1</i>	2,75.10 ⁷	3,80.10 ⁵	3,10.10 ⁵	3,00.10 ⁵	2,70.10 ⁷	3,05.10 ⁶
LD	Carbapénémases					
	OXA-48			VIM-1		
<i>LT2</i>	Φ			Φ		
<i>LT1</i>	2,20.10 ⁷			2,75.10 ⁶		
LD	WT					
<i>LT2</i>	Φ					
<i>LT1</i>	Φ (up to 10 ⁹)					

LT2 : Détection des enzymes CTX-M

LT1 : Détection de l'activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu

Φ : aucun signal

Tableau 20 : Les limites de détection de différentes souches sur le test d'activité enzymatique sur le céfotaxime et test de détection des CTX-M en hémoculture avec le SPID.

Protocole : 0,5 mL d'hémoculture ont été mis au contact de 0,25 mL de tampon de lyse pendant 2 minutes. Puis, le système SPID a été utilisé avec un volume de 0,5 mL de la solution. 300 µL de céfotaxime non-hydrolysé (quantité de 4,5 ng) dans du tampon d'extraction ont été déposés dans le réservoir pour 30 minutes d'incubation. Puis, la totalité a été déposée sur une cassette SPID contenant une bandelette (*LT1* : Ligne test 1 ; *LT2* : Ligne test 2 ; Souche WT : Souche sauvage ; LD : Limite de détection ; SPID (Sampling, Processing, Incubation, Detection) : Échantillonnage, Traitement, Incubation, Détection).

Pour les bactéries contenant un gène de résistance lié à une BLSE, la limite de détection varie entre 10⁵ UFC/mL et 10⁷ UFC/mL pour le test de l'activité enzymatique. Pour les bactéries contenant une carbapénémase, la limite de détection se situe entre 10⁷-10⁸ UFC/mL. Pour la WT, même à une concentration de 10⁸ UFC/mL, aucun signal n'est observé sur la *LT1*.

Comme pour l'urine, la meilleure limite de détection des CTX-M (environ 10⁴ UFC/mL) est obtenue avec une *E. coli* produisant du CTX-M-15 ou CTX-M-9.

Milieu de transport d'écouvillon rectal						
LD	BLSE					
	TEM-21	CTX-M-2	CTX-M-15	SHV-2a + CTX-M-9	GES-1	CMY-2
<i>LT2</i>	Φ	3,10.10 ⁸	3,50.10 ⁶	8,00.10 ⁶	Φ	Φ
<i>LT1</i>	3,35.10 ⁸	3,10.10 ⁸	3,50.10 ⁷	8,00.10 ⁷	1,20.10 ⁸	2,85.10 ⁸
LD	Carbapénémases					
	OXA-48			VIM-1		
<i>LT2</i>	Φ			Φ		
<i>LT1</i>	1,55.10 ⁸			2,80.10 ⁸		
LD	WT					
<i>LT2</i>	Φ					
<i>LT1</i>	Φ (up to 10 ⁹)					

LT2 : Détection des enzymes CTX-M

LT1 : Détection de l'activité enzymatique sur les céphalosporines à spectre étendu

Φ : aucun signal

Tableau 21 : Les limites de détection de différentes souches sur le test d'activité enzymatique sur le céfotaxime en milieu de transport d'écouvillon rectal avec le SPID.

*Protocole : Le système SPID a été utilisé avec un volume de filtration du milieu de transport d'écouvillon rectal de 0,5 mL. 300 µL de céfotaxime non-hydrolysé (quantité de 4,5 ng) dans du tampon d'extraction ont été déposés dans le réservoir pour 30 minutes d'incubation. Puis, cette solution est déposée sur une cassette SPID (*LT1* : Ligne test 1 ; *LT2* : Ligne test 2 ; Souche *WT* : Souche sauvage ; *LD* : Limite de détection ; *SPID* (Sampling, Processing, Incubation, Detection) : Échantillonnage, Traitement, Incubation, Détection).*

Pour les bactéries contenant un gène de résistance lié à une BLSE, la limite de détection varie entre 10⁷ UFC/mL et 10⁸ UFC/mL pour le test de l'activité enzymatique. Pour les bactéries contenant une carbapénémase, la limite de détection est de 10⁸ UFC/mL. Pour la *WT*, même à une concentration de 10⁹ UFC/mL, aucun signal n'est observé sur la *LT1*.

La meilleure limite de détection des CTX-M (environ 10⁶ UFC/mL) est obtenue avec une *E. coli* produisant du CTX-M-15.

II.6.3. Le « clip », un nouvel adaptateur SPID pour cassette

II.6.3.1. Le matériel et les méthodes

A l'origine, une cassette plastique spécifique au SPID avait été conçue et produite afin de permettre le dépôt de l'échantillon sur la bandelette sans ouverture du réservoir (source de contamination). Cette cassette nécessitait également l'utilisation de bandelettes d'une longueur supérieure. Pour simplifier la gestion des réactifs et la production des tests, un adaptateur a été développé et produit. Cet adaptateur se clipse sur la zone de dépôt d'une cassette plastique classique et permet le dépôt de l'échantillon sur la bandelette sans ouverture du réservoir. Même si l'utilisation de cet adaptateur n'entraîne aucune modification du protocole du SPID, il faut noter que l'utilisation de bandelettes plus courtes (cassette classique) a permis de diminuer le volume de l'échantillon déposé à 200 µL.

Pour valider l'utilisation de ce « clip », plusieurs inoculations ont été réalisées en urine (10^6 UFC/mL et 10^4 UFC/mL) et en hémoculture (10^8 UFC/mL), avec soixante isolats bactériens différents. Après 2 heures de pré-incubation pour mimer les conditions physiologiques, un dénombrement est réalisé. Puis, selon l'échantillon biologique, les volumes prélevés sont différents :

- En urine : 3 mL sont prélevés et la filtration avec le SPID est réalisée ;
- En hémoculture : 1 mL est prélevé et mis au contact avec 2 mL de tampon de lyse pendant 2 minutes. Puis, 0,5 mL de cette solution sont utilisés pour la filtration avec le SPID.

Comme présenté en Figure 71 pour les étapes du SPID, pour chaque échantillon biologique, 200 µL de tampon de migration sont ajoutés dans une fiole contenant du céfotaxime lyophilisé (quantité de 4,5 ng). Ces 200 µL sont déposés dans la cupule après vissage du capuchon sur le réservoir qui induit la filtration et le passage de la solution dans le réservoir. Une incubation de 30 minutes à température ambiante est réalisée, puis l'échantillon est déposé en percutant le réservoir sur la cassette. Après 30 minutes, une lecture à l'œil nu est réalisée.

II.6.3.2. Les résultats et l'interprétation

Cette étude a été réalisée sur soixante isolats bactériens en urine et en hémoculture.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 22.

60 isolats bactériens	Urine				Hémoculture	
	10 ⁶ UFC/mL		10 ⁴ UFC/mL		10 ⁸ UFC/mL	
Résultats	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif
WT	3/3		1/1		3/3	
AmpC		7/7		1/1		7/7
Pénicillinases à spectre élargi		1/1				0/1
BLSE		24/24		3/5		24/24
Carbapénémases	1/1	14/14	1/1	3/6	1/1	14/14
Multiple β-lactamases		10/10		2/4		10/10
Total	4/4	56/56	2/2	9/16	4/4	55/56
Sensibilité		100%		56%		98,2%
Spécificité	100%		100%		100%	

Tableau 22 : Les détections de l'activité enzymatique sur le céfotaxime en urine et hémoculture de différentes souches avec le nouvel adaptateur SPID pour cassette.

Protocole : Les urines et les hémocultures ont été spikées à des concentrations bactériennes connues (10⁶ UFC/mL ou 10⁴ UFC/mL). Pour l'urine, le système SPID a été utilisé avec un volume de filtration de 3 mL. Pour l'hémoculture, 0,5 mL ont été mis au contact de 0,25 mL de tampon de lyse pendant 2 minutes. Puis, le système SPID a été utilisé avec un volume de filtration de 0,5 mL de la solution. Pour les deux échantillons biologiques, 200 µL de céfotaxime non-hydrolysé (quantité de 4.5 ng) ont été déposés dans le réservoir pour 30 minutes d'incubation. Puis, la totalité a été déposée sur une cassette classique contenant une bandelette avec l'aide d'un adaptateur ; (UFC : Unité formante colonie ; SPID (Sampling, Processing, Incubation, Detection) : Échantillonnage, Traitement, Incubation, Détection).

En hémoculture, la totalité des souches capables d'hydrolyser le céfotaxime ont été détectées, à l'exception d'une pénicillinase à spectre élargi qui possède une très faible activité sur le céfotaxime. En urine, la totalité des souches capable d'hydrolyser le céfotaxime a été détectée à 10⁶ UFC/mL alors qu'à 10⁴ UFC/mL, seules neuf souches sur seize ont été détectées. Une incubation supplémentaire semble être nécessaire pour une détection à 10⁴ UFC/mL en urine, concentration pouvant être retrouvée dans des échantillons cliniques.

Pour évaluer les performances du système SPID, un comparatif a été réalisé entre le système SPID associé au clip pour la cassette et le système par centrifugation où les bactéries sont culotées par centrifugation et resuspendues dans 200 µL de tampon de migration contenant le céfotaxime. Les résultats obtenus sont similaires à ceux présentés ci-dessus pour les protocoles utilisant le système SPID associé au clip et la centrifugation.

II.6.4. La discussion

Avec le SPID, la détection de l'activité enzymatique et la détection des enzymes CTX-M ont été possibles pour les trois échantillons biologiques. Pour la souche WT, quel que soit l'échantillon biologique et la concentration de cette dernière, les résultats ont été négatifs pour les deux détections (activité enzymatique et CTX-M). Pour les bactéries résistantes, selon la β -lactamase impliquée et l'échantillon biologique, la limite de détection a été différente. Cette limite de détection nécessite d'être améliorée en urine et en milieu de transport d'écouvillon rectal car les concentrations de bactéries dans ces échantillons cliniques peuvent descendre jusqu'à 10^4 UFC/mL. Ainsi, une incubation supplémentaire en LB, de 1 heure à 2 heures, pourrait être envisagée afin de bénéficier de l'amplification de la quantité d'enzyme due à la multiplication bactérienne. Pour l'hémoculture, les limites de détection obtenues sont suffisantes étant donné que les concentrations bactériennes présentes dans les échantillons cliniques positifs sont supérieures à 10^8 UFC/mL.

La combinaison des deux détections pour une détection directe à partir des échantillons biologiques du patient en moins d'une heure est un outil performant et fort utile car il détecte la totalité des résistances aux céphalosporines à spectre étendu. En effet, les enzymes CTX-M sont les plus répandues (à hauteur de 98 %) dans les hôpitaux français. Grâce à la détection de l'activité d'hydrolyse sur les céphalosporines à spectre étendu, les 2 % restant sont détectées. De plus, alors que les autres méthodes nécessitent un temps de rendu de résultat bien supérieur (16 à 30 heures), ce test LFIA permet d'augmenter l'efficacité du traitement du patient en réduisant le délai de la mise en place d'une thérapie adaptée.

L'utilisation du nouveau clip pour adapter le SPID sur la cassette classique permet de simplifier davantage la production et la commercialisation de l'outil de détection tout en

gardant une efficacité de détection de la résistance. De plus, les résultats obtenus avec ce test sont similaires aux performances obtenues avec le SPID ancienne version et à la méthode de centrifugation.

Dans un avenir proche, des études à plus grande échelle sont à mener pour évaluer précisément la sensibilité et la spécificité du test avec le clip sur des échantillons réels, et pour définir la période d'incubation nécessaire en urine et en milieu de transport d'écouvillon rectal afin d'atteindre une limite de détection qui permette d'obtenir une sensibilité proche de 100%.

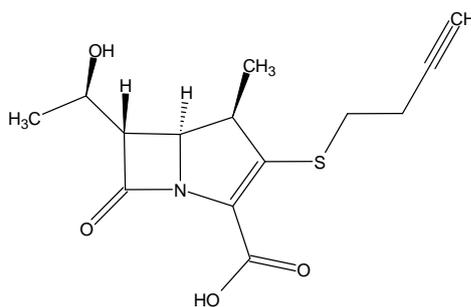
In fine, grâce à ce test, la détection directe en échantillon biologique est peu coûteuse et facile à mettre en œuvre en routine comme tests de première ligne sur des échantillons biologiques.

Chapitre III : Le test de détection de l'activité carbapénémase

Sauf précision, tous les réactifs chimiques proviennent de chez Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier Cedex, France).

III.1. La production de l'immunogène

Le carbapénème est une petite molécule incapable d'induire une réponse immunitaire indispensable à l'obtention d'anticorps. Comme le céfotaxime, il a donc été nécessaire de coupler cet antibiotique à une plus grosse molécule immunogénique, la BSA. Un carbapénème ayant des fonctions réactives, a été fourni par le CNRS (UMR 8601, LCBPT, Université Paris Cité) : l'alcyne-carbapénème (Figure 72) (262).



Carbapénème-alcyne

Figure 72 : La structure chimique du carbapénème-alcyne.

Ce carbapénème a la particularité de partager une structure commune aux carbapénèmes commerciaux qui eux ne possèdent pas de fonctions réactives. Ainsi, de fortes réactions croisées sont attendues avec les cinq carbapénèmes (imipénème, ertapénème, doripénème, tébipénème, méropénème) présentés en Figure 73, pour la reconnaissance par les anticorps produits.

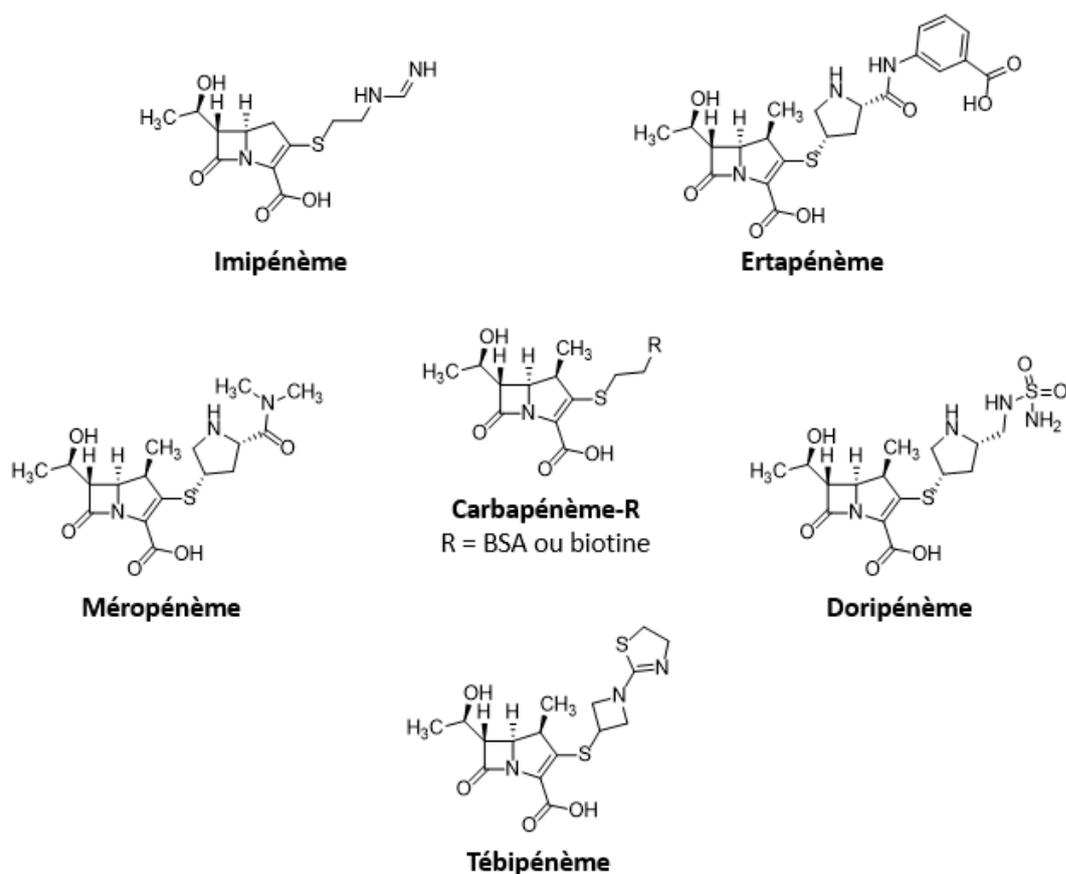
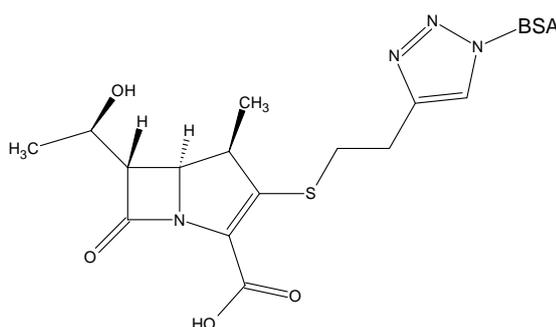


Figure 73 : La comparaison des différentes structures de carbapénèmes commerciaux avec le carbapénème-R.

La synthèse de cet immunogène s'est déroulée en deux étapes : l'étape 1 est de produire de la BSA-azide ; l'étape 2 est de coupler la BSA-azide avec le carbapénème-alcyne.

Dans un premier temps, de l'acide 5-azidopentanoïque (0,35 mg, $2,42 \cdot 10^{-6}$ mol, 40 équivalents/BSA) est pesé et dissous dans 50 μ L de DMF. Puis, du NHS (0,42 mg, $3,63 \cdot 10^{-6}$ mol, 1,5 équivalents/acide 5-azidopentanoïque) et du N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (0,75 mg, $3,63 \cdot 10^{-6}$ mol, 1,5 équivalents/acide 5-azidopentanoïque) sont ajoutés au DMF. La solution de DMF est incubée à température ambiante pour 30 minutes sous agitation. Cette dernière est ajoutée à la BSA (4 mg, $6,06 \cdot 10^{-8}$ mol) a été solubilisée dans 0,5 mL de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4. Le mélange est incubé pendant 60 minutes à température ambiante sous agitation. L'acide 5-azidopentanoïque n'ayant pas réagi est séparé de la BSA par gel d'exclusion (Zeba Spin Desalting Column 40K MWCO, Thermo Fisher Scientific) avec un seuil de coupure de 40 000 Da, en tampon Tris/HCl 50 mM pH 8,0. En parallèle, du sulfate de cuivre (0,29 mg, $1,82 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 équivalent/carbapénème-alcyne)

et du Tris((1-benzyl-4-triazolyl)methyl)amine (TBTA) (0,96 mg, $1,82 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 équivalent/carbapénème-alcyne) sont dissous dans 50 μ L de Tris/HCl 50 mM pH 8,0. Le carbapénème-alcyne (0,43 mg, $1,82 \cdot 10^{-6}$ mol, 30 équivalents/BSA) est solubilisé dans 50 μ L de DMF et mélangé à la solution de sulfate de cuivre/TBTA, puis la BSA-azide est ajoutée. Enfin, la BSA-azide et l'acide ascorbique (0,32 mg, $1,82 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 équivalent/carbapénème-alcyne) sont ajoutés au mélange. Ce dernier permet de déclencher la réaction entre la fonction alcyne du carbapénème-alcyne et la fonction azide de la BSA pour former un cycle 1,5-triazole entre les deux molécules. Une incubation de 30 minutes à température ambiante sous agitation est réalisée. Un changement de couleur vers l'orange est synonyme de réaction terminée. Une dialyse a été effectuée en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 avec une cassette de dialyse (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, Thermo Fisher Scientific) avec un seuil de coupure de 3 500 Da. Ensuite, la concentration du carbapénème-BSA (structure chimique en Figure 74) a été déterminée par réaction BCA.



Carbapénème-BSA

Figure 74 : La structure chimique du carbapénème-BSA, utilisé comme immunogène.

III.2. L'obtention des anticorps monoclonaux : première sélection

Pour obtenir des anticorps dirigés uniquement contre le carbapénème non-hydrolysé, plusieurs étapes doivent être réalisées afin d'atteindre les spécifications souhaitées :

- Immunisation des souris avec le carbapénème-BSA obtenu préalablement ;
- Purifier les différentes formes de carbapénèmes marquées et non marquées ayant pour but *in fine* de sélectionner les anticorps d'intérêts issus des hybridomes. Le choix s'est porté sur le méropénème car sa structure est stable et est généralement utilisé dans les tests de détection des résistances aux carbapénèmes ;

- Suivre la réponse immunitaire chez les souris ayant reçu l'immunogène pour initier la fusion sur les souris avec les meilleurs signaux ;
- Sélectionner les hybridomes produisant les anticorps monoclonaux ayant un maximum de reconnaissance pour la forme non-hydrolysée et un minimum de reconnaissance pour la forme hydrolysée du méropénème et caractériser les anticorps selon leur spécificité, leur affinité et leurs réactions croisées.

III.2.1. La purification des deux formes d'antibiotique marquées et non marquées

Pour sélectionner les anticorps ayant une reconnaissance maximale pour la forme non-hydrolysée et minimale pour la forme hydrolysée du méropénème, il a fallu disposer de ces deux formes marquées (couplage du carbapénème avec de la biotine) afin de détecter les anticorps spécifiques. Ces molécules biotinylées peuvent ainsi être détectées par réaction avec de la streptavidine-acétylcholinestérase. D'autre part, il a également été nécessaire de purifier le méropénème non-hydrolysé commercial et d'obtenir du méropénème hydrolysé afin de différencier l'affinité des anticorps pour la forme non-hydrolysée de la forme hydrolysée du méropénème.

III.2.1.1. Le matériel et les méthodes

Le carbapénème-biotine non-hydrolysé a été obtenu par couplage d'un ester NHS de l'acide biotinamidohexanoïque (NHS-LC-biotine) et d'un carbapénème-amine fourni également par le CNRS (UMR 8601, LCBPT, Université Paris Cité) : le carbapénème-amine (Figure 75) (263).

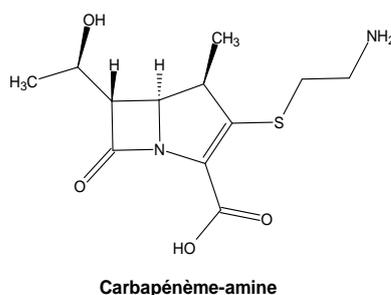


Figure 75 : La structure chimique du carbapénème-amine.

Tout comme le carbapénème-alcyne, il a la particularité de partager une structure commune aux carbapénèmes commerciaux qui eux ne possèdent pas de fonctions réactives. Le choix d'un carbapénème possédant une fonction réactive différente de l'alcyne a été pris car il ne fallait pas sélectionner des hybridomes produisant des anticorps dont l'épitope comportait la structure formée par la réaction de l'alcyne et l'azide (Figure 76).

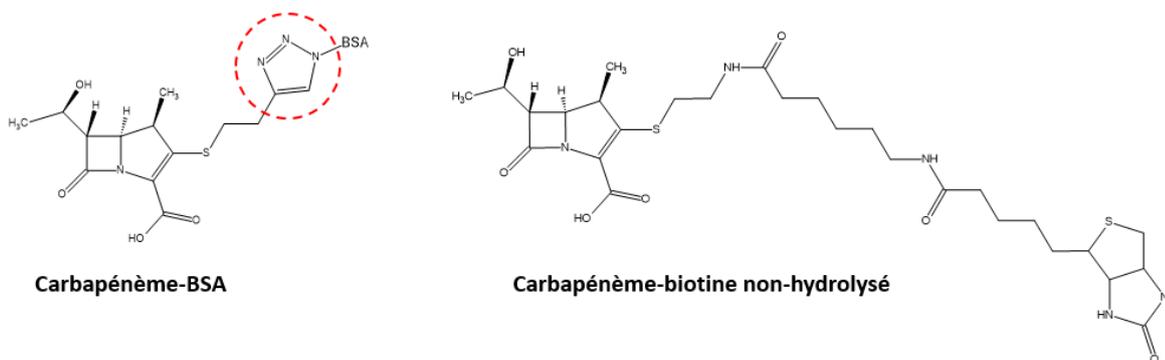


Figure 76 : La comparaison de structure entre le carbapénème-BSA et le carbapénème-biotine non-hydrolysé.

Descriptif : Le cercle rouge représente le cycle formé par l'alcyne et l'azide.

Dans cette réaction, le groupement $-NH_2$ du carbapénème-amine réagit avec le groupement $-NHS$ de la NHS-LC-biotine. Pour ce faire, 1 mg du carbapénème-amine est solubilisé dans 1,35 mL de tampon borate 0,1 M pH 9,0. Puis, 7 mg de NHS-LC-biotine sont dissous dans 150 μ L de DMF pour être ajoutés à la solution de carbapénème-amine. Après 30 minutes à température ambiante, 100 μ L de tampon Tris/HCl 1 M pH 8,0 sont ajoutés. Après 15 minutes à température ambiante, la solution est complétée jusqu'à 2 mL avec de l'eau distillée. Le produit résultant est purifié par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile de 0 à 80 % sur un appareil de chromatographie AKTA (AKTA Purifier, GE Healthcare). La masse moléculaire de cette molécule a été mesurée par SM (Q-Exacte, Thermo Fisher Scientific) (Figure 77). Le carbapénème-biotine hydrolysé a été obtenu par réaction enzymatique avec des billes couplées à KPC-2 à l'aide du même protocole que celui précédemment utilisé (voir II.2.1.1.). 50 μ L de solution de billes- β -lactamase à 20 mg/mL sont ajoutés à 1 mL d'une solution de carbapénème biotine non-hydrolysé concentrée à 2 mg/mL. Après une réaction de 16 heures à 25°C, les billes- β -lactamases ont été récupérées à l'aide d'un aimant et la solution est récupérée. Le même

protocole d'hydrolyse a été réalisé sur le méropénème non-hydrolysé commercial pour obtenir le méropénème hydrolysé.

Ces molécules sont purifiées par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile de 0 à 80 % sur un appareil de chromatographie AKTA (AKTA Purifier, GE Healthcare). La mesure de l'absorbance à 300 nm est représentative du cycle β -lactame. En cas d'hydrolyse de la β -lactamine, une perte d'absorbance est visible. Le poids moléculaire est vérifié par chromatographie liquide couplée à la SM (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific), où un cycle de séparation de 15 minutes sur colonne C18 est réalisé. Puis, l'échantillon est ionisé à l'aide d'une source électrospray et les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge au sein du quadripôle (Figure 77).

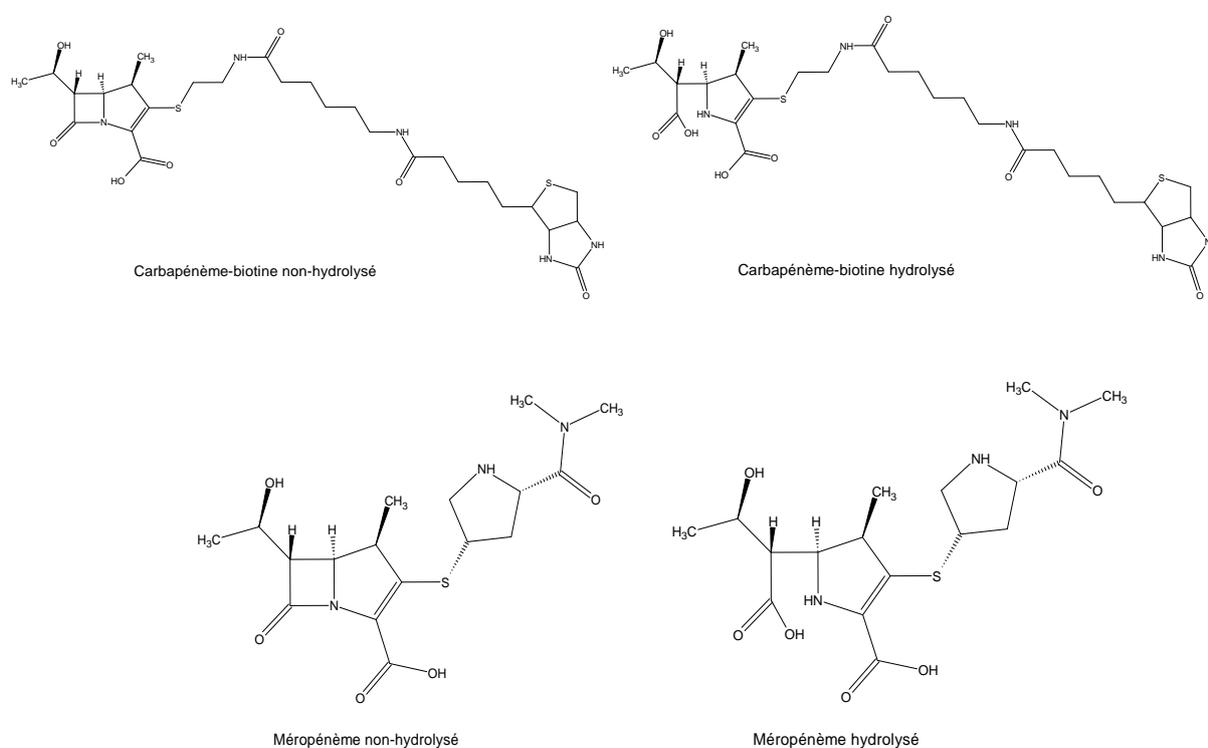


Figure 77 : Les différentes structures utilisées pour la sélection et la caractérisation des anticorps anti-carbapénème.

III.2.1.2. Les résultats et l'interprétation

Pour le carbapénème-biotine non-hydrolysé, la forme non-hydrolysée est apparue à 13,1 % d'acétonitrile (Figure 78) avec une masse moléculaire en SM de 626,27 Da. La forme hydrolysée est, quand-à-elle, obtenue à 10 % d'acétonitrile (Figure 78) avec une masse

moléculaire en SM de 644,27 Da. Cette masse correspond bien au carbapénème avec le cycle β -lactame ouvert.

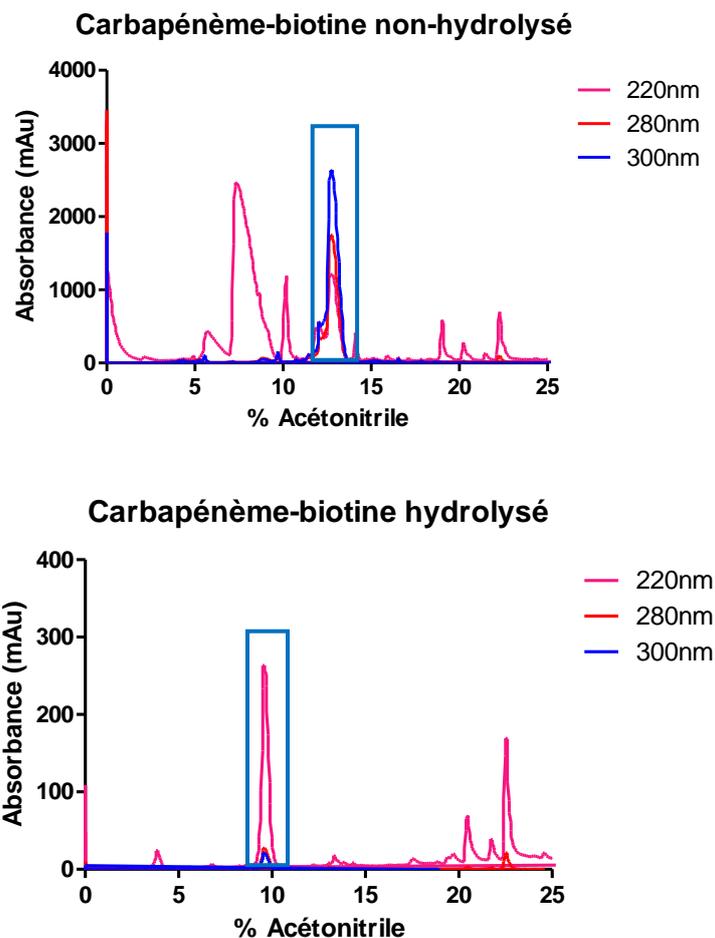


Figure 78 : Les profils d'éluion du carbapénème-biotine non-hydrolysé et du carbapénème-biotine hydrolysé en phase inverse.

Protocole : Le carbapénème-biotine non-hydrolysé et le carbapénème-biotine hydrolysé ont été purifiés par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile (0 à 80 %) sur une colonne C18. Le volume d'injection sur la colonne est de 2 mL. Le poids moléculaire est vérifié par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse où un cycle de séparation de 15 minutes sur colonne C18 est réalisé. Puis, l'échantillon est ionisé à l'aide d'une source électrospray et les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge au sein du quadripôle. Pour le carbapénème-biotine non-hydrolysé, le pic d'intérêt est à 13,1 %. Pour le carbapénème-biotine hydrolysé, le pic d'intérêt est à 10 %.

Pour le méropénème non-hydrolysé, le pic d'intérêt se situe à 8 % d'acétonitrile (Figure 79). La masse moléculaire obtenue en SM est de 384,16 Da. Après l'étape d'hydrolyse, le pic d'intérêt est à 3 % d'acétonitrile (Figure 79). Deux masses moléculaires sont obtenues en SM, avec une masse à 402,17 Da correspondant à une ouverture du cycle β -lactame uniquement et une masse à 358,18 Da représentative d'une ouverture du cycle β -lactame associé à une décarboxylation.

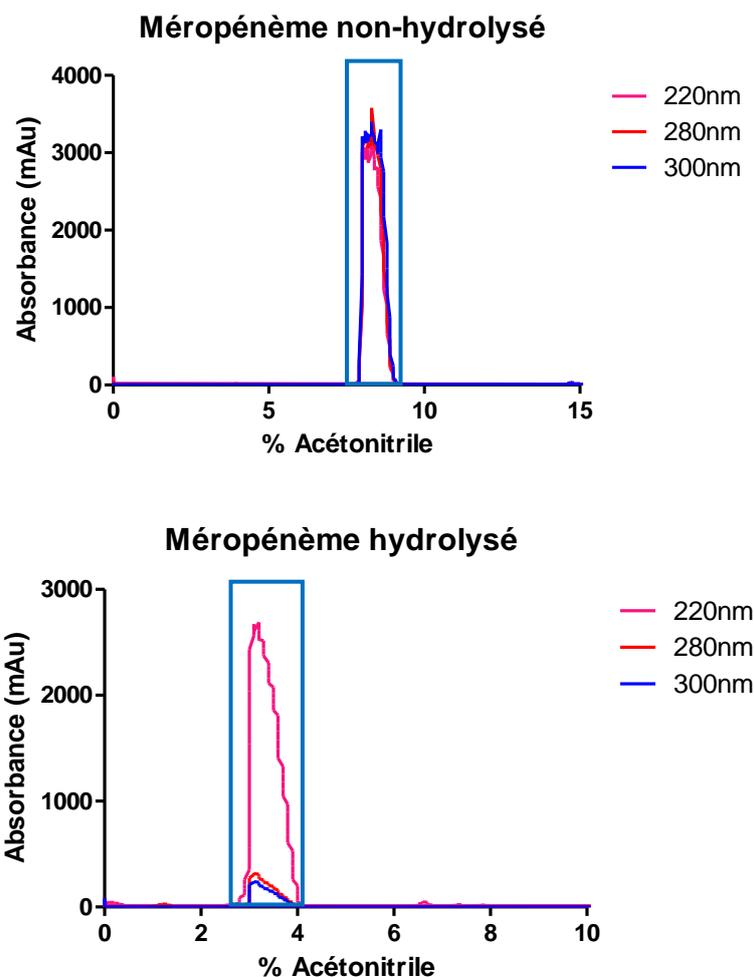


Figure 79 : Les profils d'élution du méropénème non-hydrolysé et du méropénème hydrolysé en phase inverse.

Protocole : Le méropénème non-hydrolysé et le méropénème hydrolysé ont été purifiés par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile (0 à 80 %) sur une colonne C18. Le volume d'injection sur la colonne est de 2 mL. Le poids moléculaire est vérifié par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse où un cycle de séparation de 15 minutes sur colonne C18 est réalisé. Puis, l'échantillon est ionisé à l'aide d'une source électrospray et les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge au sein du quadripôle. Pour le méropénème non-hydrolysé, le pic d'intérêt est à 8 %. Pour le méropénème hydrolysé, le pic d'intérêt est à 3 %.

L'absence de pics résiduels de carbapénème-biotine et de méropénème non-hydrolysés après hydrolyse montre que celle-ci, contrairement à celle du céfotaxime réalisée dans les mêmes conditions, est complète.

III.2.2. Le suivi de la réponse immunitaire sur les souris

III.2.2.1. Le matériel et les méthodes

Comme décrit précédemment, des injections par voie sous-cutanée de 50 µg de l'immunogène/souris ont été réalisées toutes les trois semaines pendant trois mois, à raison de quatre souris par immunogène. Deux semaines après chaque immunisation, des prélèvements sanguins, sont réalisées (Figure 47) et les anticorps spécifiques du carbapénème sont dosés par réaction immuno-enzymatique.

Le test utilisé est identique à celui réalisé pour les saignées anti-céfotaxime (voir II.2.2.1.). Seul le céfotaxime-biotine a été remplacé par le carbapénème-biotine (Figure 80).

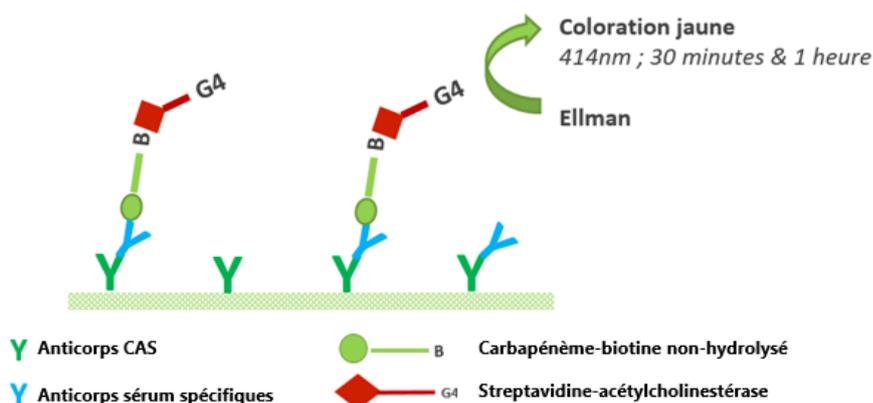


Figure 80 : Le dosage immuno-enzymatique pour suivre les anticorps spécifiques du carbapénème.

Protocole : Les anticorps présents dans les prélèvements sanguins sont capturés par un premier anticorps CAS immobilisé sur la paroi des puits d'une plaque de microtitration 96 puits. Du carbapénème-biotine non-hydrolysé est ajoutée dans chaque puits. L'incubation est faite sur une nuit à 4°C. Puis, après lavage des plaques, de la streptavidine-acétylcholinestérase est déposée et incubée pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, du réactif d'Ellmann (DTNB + acétylthiocholine iodide) est ajouté. Les plaques sont lues à $DO_{414\text{ nm}}$ au bout de 30 minutes et 1 heure. L'intensité des signaux obtenus lors de ce test est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques du carbapénème non-hydrolysé ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris ; DTNB : acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)).

Pour la sélection des anticorps et l'évaluation de la spécificité de ces mêmes anticorps, les mêmes tests que pour les anticorps anti-céfotaxime ont été utilisés en remplaçant le céfotaxime-biotine par du carbapénème-biotine et le céfotaxime hydrolysé ou non par du méropénème hydrolysé ou non. Ces derniers sont rappelés en Figure 81.

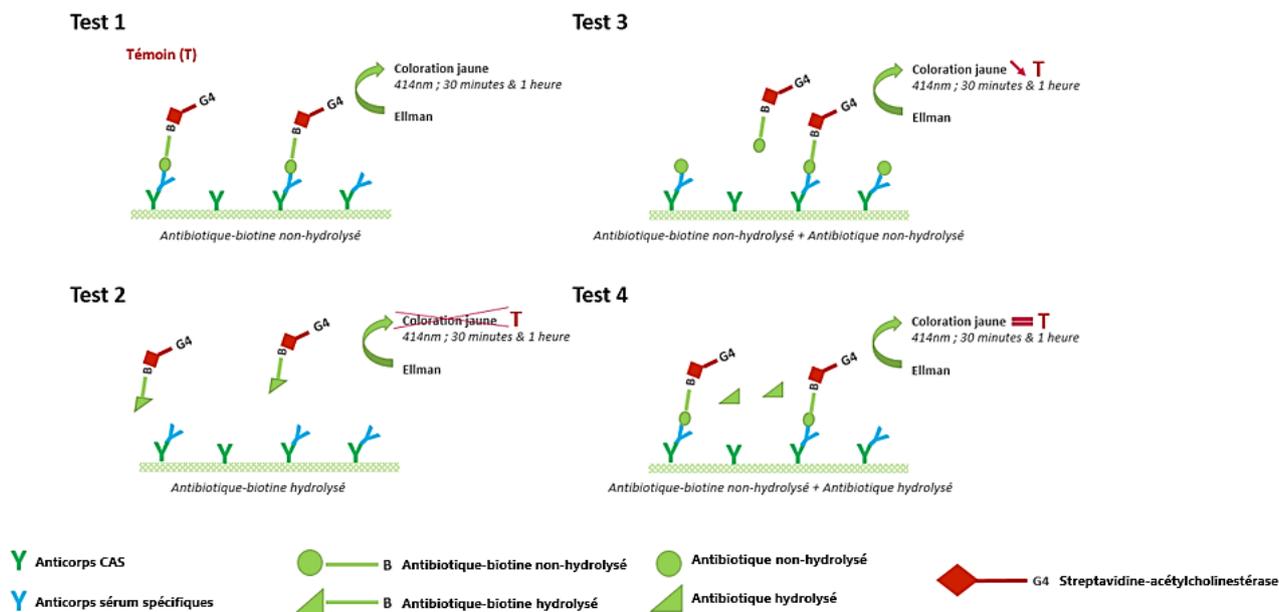


Figure 81 : Les dosages immuno-enzymatiques pour suivre les anticorps spécifiques d'un antibiotique dans les prélèvements sanguins, pour la sélection des hybridomes et la caractérisation des anticorps.

Protocole : **Test 1** : Dans ce test, les anticorps présents dans les prélèvements sanguins sont capturés par un premier anticorps CAS immobilisé sur la paroi des puits d'une plaque de microtitration 96 puits. De l'antibiotique-biotine non-hydrolysé est ajouté dans chaque puits. Après une incubation à 4°C pendant une nuit et après lavage, de la streptavidine-acétylcholinestérase est déposée et incubée pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, du réactif d'Ellman (DTNB + acétylthiocholine iodide) est ajouté. Les plaques sont lues à $DO_{414\text{ nm}}$ au bout de 30 minutes et 1 heure. L'intensité des signaux obtenus lors de ce test est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques de l'antibiotique non-hydrolysé. **Test 2** : Le même principe que le test 1 est réalisé. L'antibiotique-biotine non-hydrolysé est remplacé par l'antibiotique-biotine hydrolysé. **Test 3** : Le même principe que le test 1 est réalisé. L'antibiotique non-hydrolysé est ajouté avec l'antibiotique-biotine non-hydrolysé. **Test 4** : Le même principe que le test 1 est réalisé. L'antibiotique hydrolysé est ajouté avec l'antibiotique-biotine non-hydrolysé ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris ; DTNB : acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)).

Pour les tests 1 et 2, l'apparition d'un signal dans les puits indique la présence d'anticorps anti-carbapénème non hydrolysé et anti-carbapénème hydrolysé respectivement. Les souris sélectionnées seront celles pour lesquelles les saignées ont donné un signal maximal dans le test 1 et minimal dans le test 2.

Pour les tests 3 et 4, une baisse des signaux à $DO_{414\text{ nm}}$ proportionnelle à la concentration en compétiteur révèle la présence d'anticorps reconnaissant le compétiteur : méropénème non-hydrolysé (test 3) ou méropénème hydrolysé (test 4). Ces tests permettent d'évaluer la spécificité relative des anticorps pour le méropénème non-hydrolysé et le méropénème hydrolysé. Ainsi, si la baisse du signal est similaire pour les deux formes de

méropénème alors les anticorps possèdent la même affinité pour ces deux molécules. Si la baisse du signal est plus faible pour l'une des deux formes de méropénème alors l'anticorps possède une affinité plus faible pour cette forme.

Les graphiques obtenus sont $f(\text{[dilution saignée]}) = \text{Absorbance (mAu)}$ pour le test 1 et $f(\text{[Antibiotique]}) = B/B_0 (\%)$ pour le test 3. Pour rappel, le signal B_0 correspond à l'absorbance obtenue en absence de compétiteur (Absorbance maximale). Le signal B est l'absorbance obtenue lorsque le compétiteur et le marqueur sont en compétition pour leur fixation sur les paratopes de l'anticorps. Le $B/B_0 (50 \%)$ correspond au déplacement de 50 % du signal issu du marqueur par le compétiteur (exemple de courbe rappelé en Figure 82).

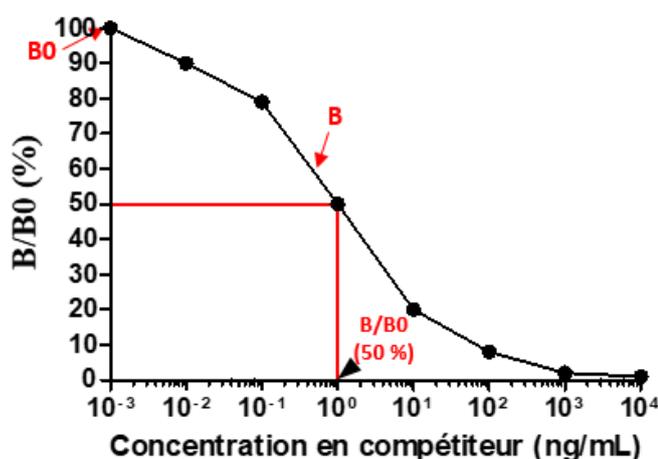


Figure 82 : Exemple de courbe d'étalonnage pour un dosage par compétition.

Descriptif : Dans cet exemple, le signal B_0 correspond à l'absorbance obtenue en absence de compétiteur (100 %). Le signal B est l'absorbance obtenue lorsque le compétiteur et le marqueur sont en interaction avec l'anticorps. Le $B/B_0 (50 \%)$ correspond à la concentration en compétiteur où 50 % du signal issu du marqueur est déplacé par le compétiteur.

III.2.2.2. Les résultats et l'interprétation

Dans un premier temps, la concentration optimale à utiliser pour le carbapénème-biotine non-hydrolysé est définie. Avec le test 1, les concentrations suivantes ont été testées : 1 $\mu\text{g/mL}$; 100 ng/mL ; 10 ng/mL , sur la saignée n°4 de la souris Biozzi 4881. La dilution avec le moins de non-spécifique et sans perte significative de signal à $\text{DO}_{414 \text{ nm}}$ a été sélectionnée. Ainsi, la concentration à 100 ng/mL est gardée.

Puis, à partir des différentes saignées récupérées, un dosage est réalisé sur chacune d'entre elles avec le test 1. Après 1 heure de révélation avec le réactif d'Ellmann, les plaques sont lues et les résultats sont présentés en Figure 83.

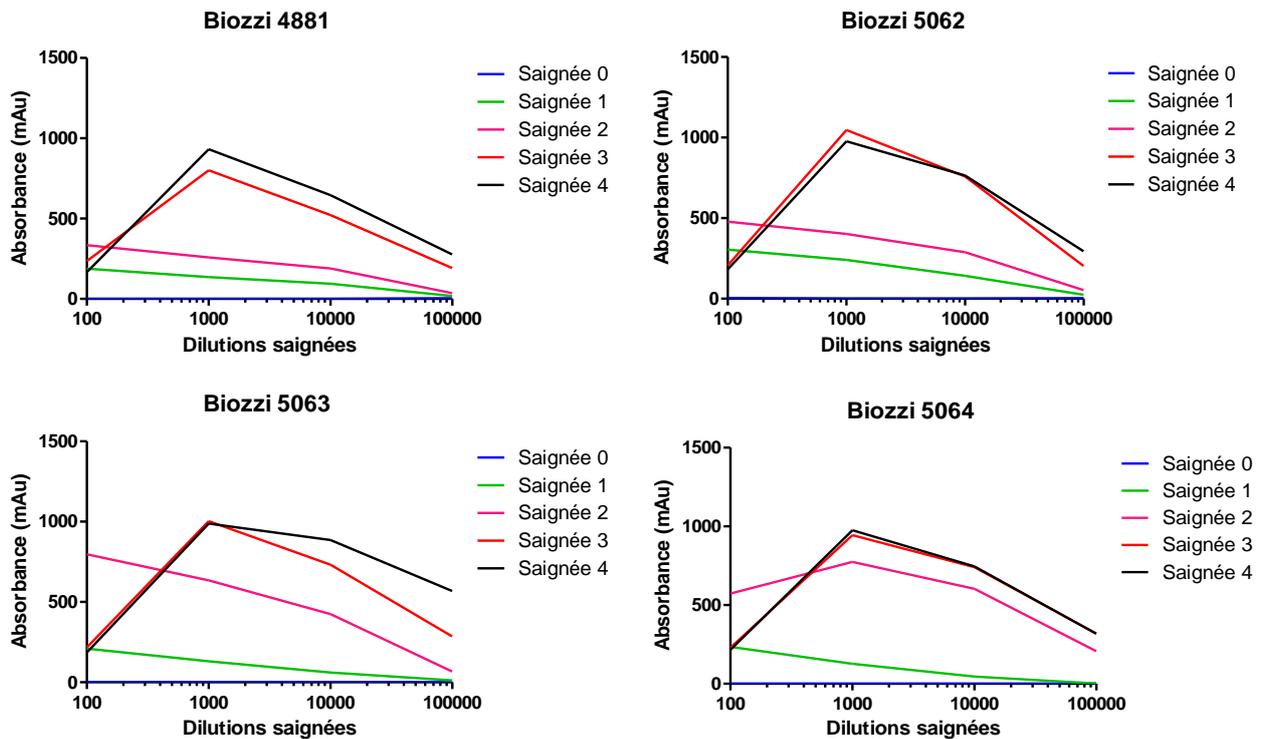


Figure 83 : Le suivi des réponses immunitaires sur les saignées des souris immunisées avec du carbapénème-BSA.

Protocole : Les prélèvements sanguins sont dilués aux $1/100^{\text{ième}}$; $1/1\ 000^{\text{ième}}$; $1/10\ 000^{\text{ième}}$; $1/100\ 000^{\text{ième}}$. Sur les plaques où du CAS a été immobilisé, $50\ \mu\text{L}$ de chaque dilution sont déposés en double sur une plaque de microtitration, et $50\ \mu\text{L}$ du carbapénème-biotine non-hydrolysé ($100\ \text{ng/mL}$) sont déposés dans chacun des puits. L'incubation est faite sur une nuit à 4°C . Puis, la révélation des puits à l'aide de la streptavidine-acétylcholinestérase et du réactif d'Ellmann est réalisée. L'absorbance à $\text{DO}_{414\ \text{nm}}$ est lue à 1 heure d'incubation (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris).

Il est observé sur la Figure 83 que l'ensemble des souris Biozzi produisent des anticorps spécifiques. En effet, à partir des saignées n°2 des signaux positifs sont obtenus pour toutes les souris. Ces signaux augmentent pour les saignées n°3 et n°4. L'intensité des signaux obtenus pour les saignées n°4 sont similaires entre les quatre souris Biozzi. Pour sélectionner les deux souris dont les rates seront utilisées pour l'étape de fusion cellulaire, des compétitions en ELISA sont réalisées sur les différentes saignées n°4 avec le test 3. Pour cette étude, la concentration en carbapénème-biotine non-hydrolysé et les dilutions des saignées n°4 sont de nouveau optimisées. Le but est d'utiliser ces réactifs en quantité limitante (autour d'une $\text{DO}_{414\ \text{nm}}$ de 0,5, après 1 heure de révélation). Ces études ont permis de sélectionner les conditions suivantes :

- Souris Biozzi 4881 ; Saignée n°4 : $1/25\ 000$ – Carbapénème-biotine non-hydrolysé : $20\ \text{ng/mL}$;

- Souris Biozzi 5062 ; Saignée n°4 : 1/25 000 – Carbapénème-biotine non-hydrolysé : 20 ng/mL ;
- Souris Biozzi 5063 ; Saignée n°4 : 1/25 000 – Carbapénème-biotine non-hydrolysé : 20 ng/mL ;
- Souris Biozzi 5064 ; Saignée n°4 : 1/25 000 – Carbapénème-biotine non-hydrolysé : 100 ng/mL.

Le test 3 est réalisé en utilisant une gamme de méropénème non hydrolysé dilué en tampon EIA-PVP : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL ; 0 ng/mL. Les résultats sont représentés sur la Figure 84.

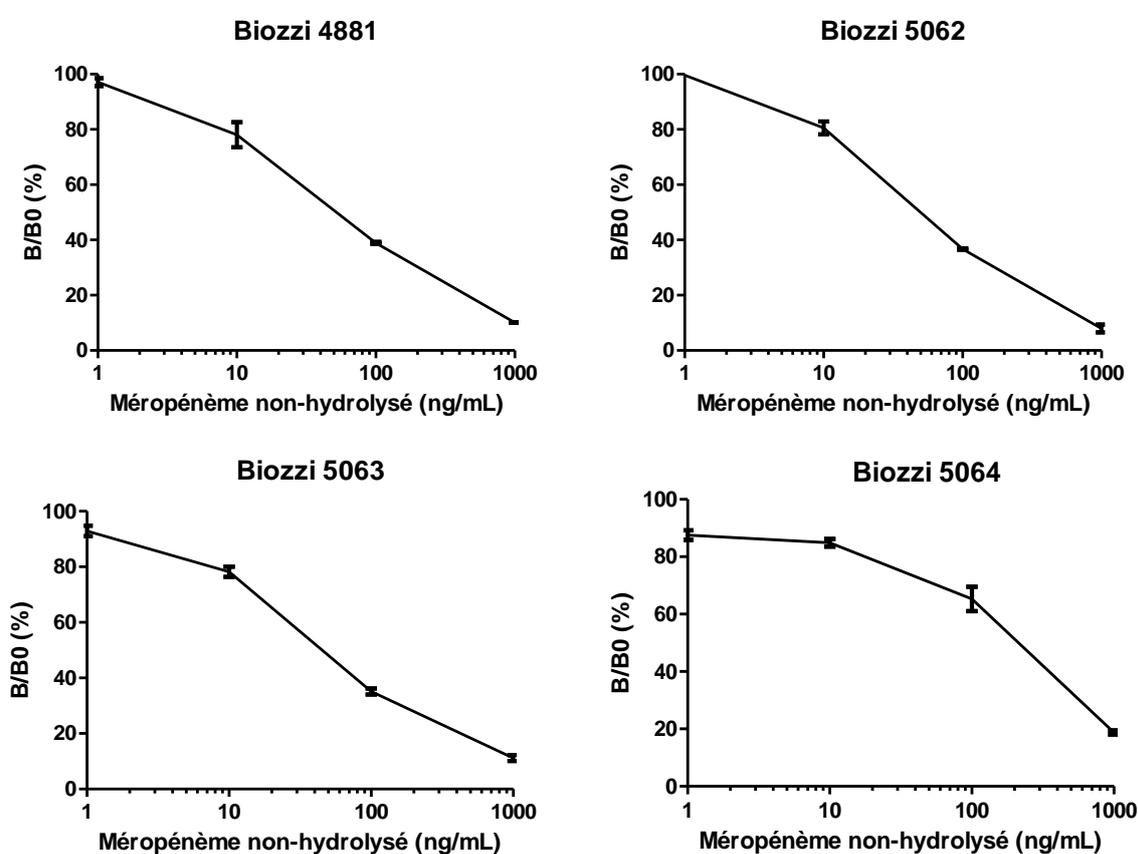


Figure 84 : Les courbes de compétition avec le méropénème non-hydrolysé sur les saignées des souris immunisées avec du carbapénème-BSA.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, 50 μ L d'anticorps du dernier prélèvement sanguin de chaque souris sont mis en compétition avec 50 μ L de carbapénème-biotine non-hydrolysé (100 ng/mL pour la souris Biozzi 5064, sinon 20 ng/mL) et 50 μ L de méropénème non-hydrolysé (différentes concentrations testées : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL ; 0 ng/mL). Pour chaque concentration de méropénème non-hydrolysé, le pourcentage de déplacement du carbapénème-biotine non-hydrolysé est déterminé.

Un déplacement du signal avec le méropénème non-hydrolysé pour l'ensemble des saignées n°4 des souris est observé sur la Figure 84. Plus le B/B0 (50 %) est faible et plus les anticorps polyclonaux sont considérés comme affins. Les valeurs obtenues pour les différentes saignées sont : :

- Souris Biozzi 4881 ; B/B0 (50 %) : 0,063 µg/mL ;
- Souris Biozzi 5062 ; B/B0 (50 %) : 0,077 µg/mL ;
- Souris Biozzi 5063 ; B/B0 (50 %) : 0,049 µg/mL ;
- Souris Biozzi 5064 ; B/B0 (50 %) : 0,135 µg/mL.

Au vu des résultats obtenus sur les saignées, les souris Biozzi 4881 et 5063 sont sélectionnées pour réaliser la fusion et obtenir des hybridomes.

III.2.3. La sélection des hybridomes et la caractérisation des anticorps

III.2.3.1. La sélection des hybridomes

III.2.3.1.1. Le matériel et les méthodes

L'obtention des hybridomes s'est faite selon le même protocole que celui utilisé pour l'obtention des anticorps anti-céfotaxime (*voir II.2.3.1.1*). Après sept à dix jours, les milieux de cultures des hybridomes sont récupérés et la sécrétion d'anticorps spécifiques est évaluée par les tests immuno-enzymatiques décrits précédemment.

Pour effectuer les différents tests, les dilutions du carbapénème-biotine non-hydrolysé et du carbapénème-biotine hydrolysé ont été fixées à 100 ng/ml. Les concentrations du méropénème non-hydrolysé et du méropénème hydrolysé pour la sélection des hybridomes est de 0,5 µg/mL (tests 3 et 4).

Une pré-sélection de cent hybridomes est réalisée avec les tests 1 et 2. L'objectif est d'obtenir les plus fortes absorbances à DO_{414 nm} pour le test 1 et les plus faibles voire inexistantes pour le test 2. Puis, les surnageants des cent hybridomes sont évalués, avec les tests 1 à 4, le but étant de sélectionner les vingt hybridomes présentant les signaux les plus

élevés pour ces tests 1 et 4, et les plus faibles (voire inexistantes) pour les tests 2 et 3. Ces vingt hybridomes sont clonés par la méthode de dilution limite afin d'obtenir une lignée cellulaire pure, sécrétant un anticorps monoclonal issu d'un hybridome. Pour ce faire, une quantité connue de cellules est diluée dans un grand volume de culture et réparti sur une plaque 96 puits, avec pour but d'avoir une population homogène (résultats équivalents avec les différents tests immuno-enzymatiques).

Les vingt anticorps monoclonaux obtenus, sont produits en grande quantité par culture *in vitro* en milieu RPMI + sérum de veau fœtal « Low IgG » 10 % (Gibco, Life Technologies). La purification s'effectue par chromatographie d'affinité à l'aide d'un appareil de chromatographie AKTA (AKTExpress, GE Healthcare) et à des colonnes contenant de la protéine G greffée sur un gel (GE Healthcare). Chaque surnageant est injecté dans l'appareil de purification, puis un lavage avec du tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,4 est réalisé. Un tampon glycine 100 mM pH 2,5 est ajouté pour élué les anticorps fixés sur les protéines G. L'appareil collecte les fractions en fonction de l'absorbance à DO_{280nm} . Les fractions contenant l'anticorps purifié sont regroupées, puis dialysées en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4. Après dialyse, la concentration des anticorps monoclonaux est calculée à partir de l'absorbance des solutions à 280nm, 1 mg d'anticorps correspondant à $1,4 * DO_{280nm}$. Enfin, un gel SDS-Page à 13,4 % est réalisé pour déterminer la pureté des anticorps, en conditions non réduite et réduite.

L'isotypage de l'anticorps monoclonal présent dans le milieu de culture est déterminé avec le kit « Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping » (Thermo Fisher Scientific).

III.2.3.1.2. Les résultats et l'interprétation

Sur les 661 hybridomes obtenus, une première sélection a été réalisée avec les tests 1 et 2 ; 47 hybridomes ont été sélectionnés avec une reconnaissance maximale pour le carbapénème-biotine non-hydrolysé et minimale pour le carbapénème-biotine hydrolysé. Les autres hybridomes n'ont pas donné de signal ou des signaux trop faibles. Une seconde sélection a été faite avec les tests 1, 2 3 et 4. Les vingt hybridomes correspondant aux surnageants pour lesquels les meilleurs déplacements de signal étaient obtenus avec le

méropénème non-hydrolysé et pas de déplacement de signal pour le méropénème hydrolysé sont sélectionnés.

Après les étapes de clonage par la méthode des dilutions, les hybridomes ont été mis en culture pour produire ces anticorps. La pureté et l'isotypage de chaque anticorps ont été déterminés.

III.2.3.2. L'évaluation de la spécificité

III.2.3.2.1. Le matériel et les méthodes

Pour évaluer la spécificité de chaque anticorps monoclonal, les tests 3 et 4 décrits précédemment sont réalisés, cette fois-ci, avec différentes concentrations de méropénème non-hydrolysé et hydrolysé, utilisés comme compétiteur. Pour déterminer les concentrations optimales en anticorps, les concentrations suivantes ont été testées : 1 000 ng/mL ; 300 ng/mL ; 100 ng/mL ; 30 ng/mL ; 10 ng/mL ; 3 ng/mL ; avec le carbapénème-biotine non-hydrolysé à une concentration de 100 ng/mL. La concentration en anticorps permettant l'obtention d'un signal à environ $DO_{414\text{ nm}}$ de 0,5 après une heure de révélation en absence de compétiteur, est sélectionnée. Les concentrations des compétiteurs utilisées sont les suivantes : 2 nmol/mL, 0,2 nmol/mL, 0,02 nmol/mL, 0,02 nmol/mL, 0,002 nmol/mL et 0 nmol/mL.

Les différents réactifs sont déposés en microplaque 96 puits, sur la paroi où du CAS a été préalablement immobilisé, à raison de 50 μL de marqueur (carbapénème-biotine non-hydrolysé), de 50 μL de compétiteur (méropénème non hydrolysé ou hydrolysé) et de 50 μL de la solution d'anticorps. Après un lavage avec du tampon de lavage, 100 μL de streptavidine-acétylcholinestérase sont ajoutés pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation. Après le lavage des puits avec du tampon de lavage, 200 μL de réactif d'Ellmann sont déposés. La lecture de l'absorbance est effectuée après 1 heure d'incubation sous agitation, à $DO_{414\text{ nm}}$ au spectrophotomètre (Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific).

Les graphiques obtenus par superposition des différentes courbes, sont $f([\text{Antibiotique}]) = B/B_0$ (%). Pour rappel, le signal B_0 correspond à l'absorbance obtenue en

absence de compétiteur (Absorbance maximale). Le signal B est l'absorbance obtenue lorsque le compétiteur et le marqueur sont en compétition pour leur fixation sur les paratopes de l'anticorps. Le B/B0 (50 %) correspond au déplacement de 50 % du signal issu du marqueur, par le compétiteur (exemple de courbe rappelé en Figure 60).

III.2.3.2.2. Les résultats et l'interprétation

Pour une plus grande clarté, seuls les résultats obtenus pour quatre anticorps sont représentés. Les courbes de compétition avec le méropénème non-hydrolysé (trait plein) et celles avec le méropénème hydrolysé (trait pointillé) sont présentés sur la Figure 85.

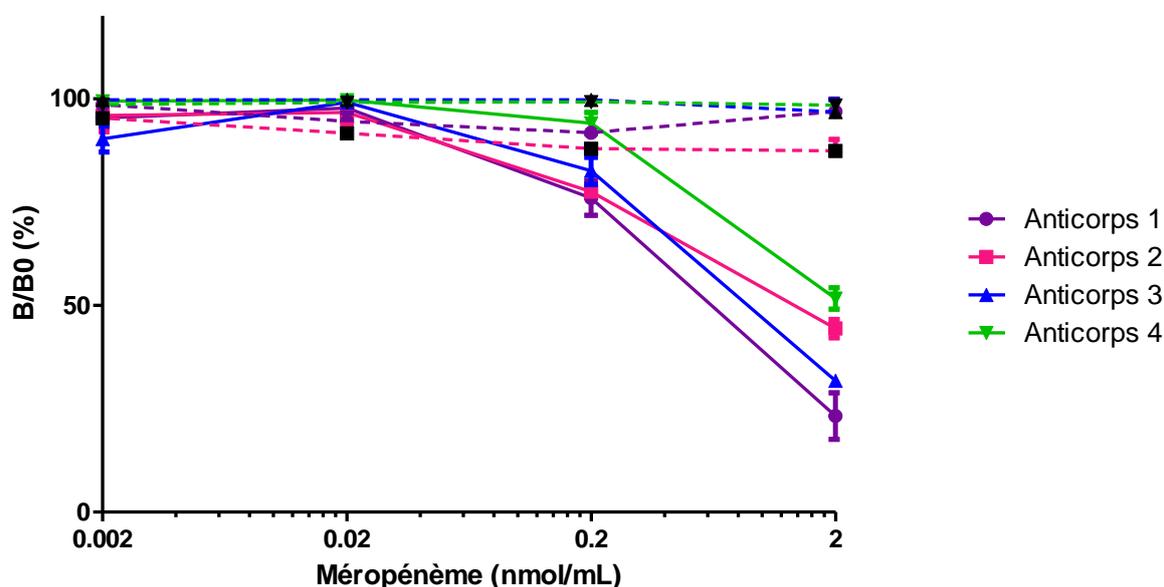


Figure 85 : Les courbes de compétition avec le méropénème sur quatre anticorps.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, quatre anticorps monoclonaux sont mis en compétition avec 50 μ L de carbapénème-biotine non-hydrolysé (100 ng/mL) et 50 μ L de méropénème non-hydrolysé (trait plein) ou hydrolysé (trait pointillé) (différentes concentrations testées : 2 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0 nmol/mL). Pour chaque concentration de méropénème, le pourcentage de déplacement du carbapénème-biotine non-hydrolysé est déterminé.

Les courbes de compétition sont relativement identiques avec le méropénème non-hydrolysé. Les B/B0 (50 %) varient de 0,89 nmol/mL pour l'anticorps 1 à 4,95 nmol/mL pour l'anticorps 4. Pour ces quatre anticorps, aucun déplacement n'est observé avec le méropénème hydrolysé ce qui démontre la spécificité de ces anticorps vis-à-vis de la forme non-hydrolysée de l'antibiotique.

Sur la Figure 86, des courbes de compétition correspondant à deux anticorps possédant des spécificités différentes ont été représentées.

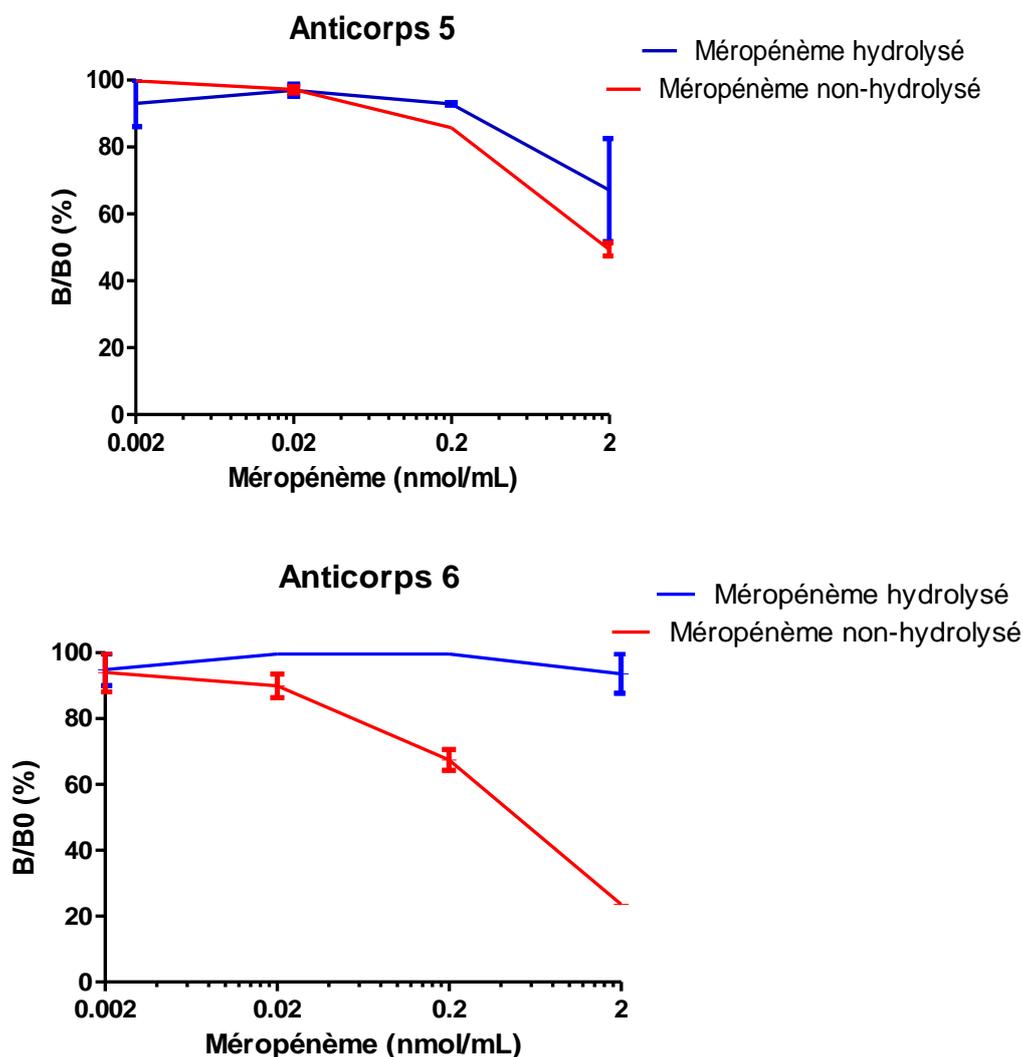


Figure 86 : Les courbes de compétition avec le méropénème sur deux anticorps.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, deux anticorps obtenus sont mis en compétition avec 50 μ L de carbapénème-biotine non-hydrolysé (100 ng/mL) et 50 μ L de méropénème non-hydrolysé ou hydrolysé (différentes concentrations : 2 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0 nmol/mL). Pour chaque concentration de méropénème, le pourcentage de déplacement du carbapénème-biotine non-hydrolysé est déterminé.

Contrairement à l'anticorps 6, l'anticorps 5 reconnaît les deux formes de méropénème. Le résultat obtenu avec l'anticorps 5 (courbes similaires) est dû à une mauvaise reconnaissance de la forme non-hydrolysée plutôt qu'à une meilleure reconnaissance de la forme hydrolysée. Cela démontre la nécessité de réaliser ces tests de spécificité le plus tôt possible dans la sélection afin d'obtenir un maximum d'anticorps possédant les caractéristiques désirées.

Pour les vingt anticorps obtenus, les concentrations en B/B0 (50 %) avec le méropénème non-hydrolysé ainsi que les pourcentages de réactions croisées obtenus entre les deux formes de méropénème sont répertoriés dans le Tableau 23.

Anticorps monoclonaux obtenus	Concentrations en B/B0 (50 %) du méropénème non-hydrolysé (nmol/mL)	Réactions croisées entre les deux formes de méropénème (%)
Anticorps 1	0,89	Non déterminé
Anticorps 2	1,13	Non déterminé
Anticorps 3	3,48	Non déterminé
Anticorps 4	4,95	Non déterminé
Anticorps 5	1,64	12,21%
Anticorps 6	0,45	Non déterminé
Anticorps 7	0,55	Non déterminé
Anticorps 8	1,63	Non déterminé
Anticorps 9	1,09	0,49%
Anticorps 10	0,73	Non déterminé
Anticorps 11	13,39	Non déterminé
Anticorps 12	0,51	0,14%
Anticorps 13	9,31	Non déterminé
Anticorps 14	6,80	1,71%
Anticorps 15	0,76	Non déterminé
Anticorps 16	0,62	Non déterminé
Anticorps 17	0,89	Non déterminé
Anticorps 18	0,82	Non déterminé
Anticorps 19	1,17	Non déterminé
Anticorps 20	3,74	0,93%

Tableau 23 : Les pourcentages de réactions croisées des dix-neuf anticorps obtenus entre les deux formes de méropénème ainsi que les concentrations B/B0 (50 %) du méropénème non-hydrolysé.

Descriptif : Le B/B0 (50 %) correspond à la concentration en compétiteur où 50 % du signal issu du marqueur est déplacé par le compétiteur. Les pourcentages de réactions croisées sont déterminés de la manière suivante : pour une baisse de signal similaire, la concentration de méropénème non-hydrolysé est divisée par la concentration de méropénème hydrolysé, et ce résultat est multiplié par 100 pour être exprimé en pourcentage. Dans le cas où aucune baisse de signal n'a été observée pour le méropénème hydrolysé (même à la plus forte concentration), les réactions croisées n'ont pas pu être déterminées.

Les concentrations en B/B0 (50 %) varient de 0,45 nmol/mL pour l'anticorps 6 à 13,39 nmol/mL pour l'anticorps 11. De même, les réactions croisées entre les deux formes de méropénème sont très faibles, sauf pour l'anticorps 5 avec 12,21 % (mauvaise reconnaissance du méropénème non-hydrolysé) (Tableau 23). Dans le cas où aucune baisse de signal n'a été observée pour le méropénème hydrolysé (même à la plus forte

concentration), les réactions croisées n'ont pas pu être déterminées. Ainsi, la grande majorité des anticorps présente une bonne spécificité pour le méropénème non-hydrolysé.

III.2.3.3. L'évaluation de l'affinité par l'OCTET

III.2.3.3.1. Le matériel et les méthodes

Comme pour les anticorps anti-céfotaxime, l'OCTET est utilisé pour évaluer l'affinité des anticorps vis-à-vis du carbapénème (voir II.2.3.3.1.). Pour chaque anticorps d'intérêt, le KD (k_d/k_a) est mesuré respectivement pour le carbapénème-biotine non-hydrolysé et le carbapénème-biotine hydrolysé. Plus le KD est faible, plus l'affinité de l'anticorps est forte. Pour ce faire, les deux molécules de carbapénème biotinylées ont été utilisées à 0,1 µg/mL avec des fibres optiques sur lesquelles a été immobilisée de la streptavidine (Sartorius). Une gamme de concentration pour chaque anticorps est réalisée : 100 nM ; 33,3 nM ; 11,1 nM ; 3,7 nM ; 1,23 nM ; 0,41 nM ; 0,137 nM ; 0 nM. Chaque solution a été préparée dans le tampon OCTET. Les fibres doivent être immergées dans 200 µL de solution pour chaque étape du test, rappelée en Figure 87.

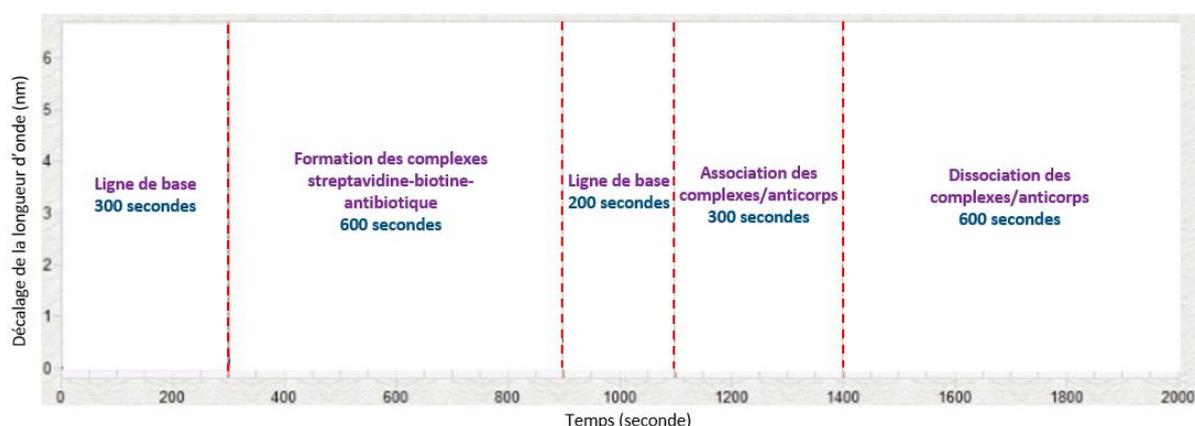


Figure 87 : Les différentes étapes du test d'interférométrie pour évaluer l'affinité des anticorps pour l'antibiotique-biotine.

Descriptif : Pour évaluer l'affinité des anticorps pour l'antibiotique-biotine par interférométrie, cinq étapes sont réalisées : **1-** Définir une ligne de base : les fibres streptavidine sont plongées pendant 300 secondes dans du tampon OCTET (phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 + PVP 0,1 % + NaCl 0,15 M + Azide de sodium 0,01 % + Tween 20 0,02 %) ; **2-** Former les complexes streptavidine-biotine-antibiotique : les fibres sont immergées pendant 600 secondes dans du tampon OCTET ; **3-** Définir à nouveau une ligne de base : les fibres sont placées pendant 200 secondes dans du tampon OCTET ; **4-** Association des anticorps avec l'antibiotique : les fibres sont plongées dans les solutions d'anticorps pendant 300 secondes afin de former les complexes anticorps/antibiotiques ; **5-** Dissociation des complexes des anticorps : les fibres sont à nouveau plongées dans du tampon OCTET pendant 600 secondes afin de visualiser une dissociation du complexe antibiotique/anticorps.

Pour chaque concentration, le décalage de longueur d'onde est mesuré. Les valeurs de ce décalage permettent de calculer les k_d et k_a et donc le KD de l'anticorps vis-à-vis des deux formes de carbapénème-biotine.

III.2.3.3.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats obtenus à l'OCTET sur les différentes étapes du test sont présentés en Figure 88 pour l'anticorps 5 avec le carbapénème-biotine non-hydrolysé.

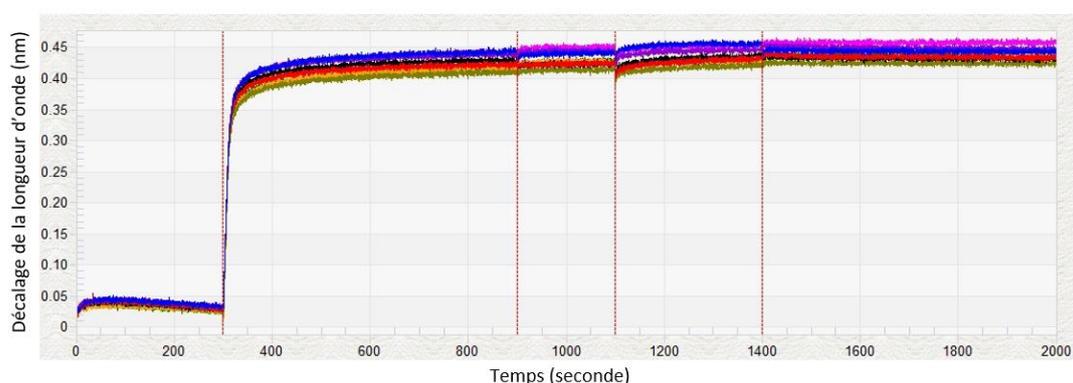


Figure 88 : Le graphique obtenu en OCTET sur l'affinité du carbapénème-biotine non-hydrolysé sur l'anticorps 5.

Descriptif : Les graphiques obtenus sont constitués de différentes phases qui sont : 1- Une ligne de base pendant 300 secondes effectuée dans le tampon ; 2- Une association entre le senseur streptavidine et le carbapénème-biotine non-hydrolysé ou hydrolysé (concentration définie précédemment à 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 600 secondes. Chaque courbe correspond à une concentration d'anticorps ; 3- Une ligne de base pendant 200 secondes effectuée dans le tampon ; 4- Une association entre les anticorps et le carbapénème -biotine-streptavidine pendant 300 secondes ; 5- Une dissociation des complexes anticorps/ carbapénème -biotine-streptavidine pendant 600 secondes effectuée dans du tampon. L'association ou la dissociation sont mesurées par un décalage de longueur d'onde. Les courbes de couleur verte, violet clair, jaune, violet foncée, verte kaki, rose, noire et rouge correspondent respectivement aux concentrations d'anticorps à 100 nM, 33,3 nM, 11,1 nM, 3,7 nM, 1,23 nM, 0,41 nM, 0,137 nM, 0 nM.

Sur cette figure, aucun décalage de la longueur d'onde n'est observé au cours de la phase d'association ce qui traduit une absence de formation de complexes anticorps/antibiotique. Ce résultat a été également observé pour chaque anticorps et pour les deux formes de carbapénème-biotine.

L'affinité des anticorps pour la molécule de carbapénème-biotine semble donc trop faible pour être visible sur l'OCTET, alors que les signaux obtenus en ELISA démontrent la formation de ces complexes. L'une des hypothèses émises est le temps de contact entre

l'anticorps et la molécule cible qui est relativement élevé en ELISA (plusieurs heures) et faible en OCTET (quelques minutes). Ainsi, une évaluation de la formation des complexes anticorps/antibiotiques au cours du temps a été réalisée en ELISA pour observer l'effet de la durée d'incubation.

III.2.3.4. L'évaluation de la formation des complexes anticorps/antibiotique au cours du temps en ELISA

III.2.3.4.1. Le matériel et les méthodes

100 μ L d'une solution de carbapénème-BSA, concentrée à 1 μ g/mL dans du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4, ont été déposés dans l'ensemble des puits d'une plaque de microtitration. Après une incubation sur la nuit, les plaques ont été saturées à l'aide du tampon EIA-PVP. Après lavage des plaques en tampon de lavage, 100 μ L de chacun des anticorps à 1 μ g/mL dans du tampon EIA-PVP ont été déposés à des temps différents : 4 heures, 3 heures, 2 heures, 1 heure, 30 minutes, 15 minutes, 5 minutes et 0 minute. Ces incubations ont été réalisées à température ambiante sous agitation.

Une fois toutes les durées d'incubation atteintes, deux lavages successifs dans du tampon de lavage sont réalisés et des anticorps CAS couplés à de l'acétylcholinestérase ont été ajoutés à 2 UE/mL pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Puis, les plaques sont lavées en tampon de lavage et le réactif d'Ellmann est déposé pour la révélation. Ces dernières sont lues à $DO_{414\text{ nm}}$ après 1 heure d'incubation.

III.2.3.4.2. Les résultats et l'interprétation

La représentation graphique de l'absorbance à $DO_{414\text{ nm}}$ en fonction du temps d'incubation entre le carbapénème-BSA et l'anticorps est en Figure 89. Pour une plus grande clarté, les résultats obtenus pour cinq anticorps sur les vingt anticorps anti-carbapénème obtenus, sont représentés.

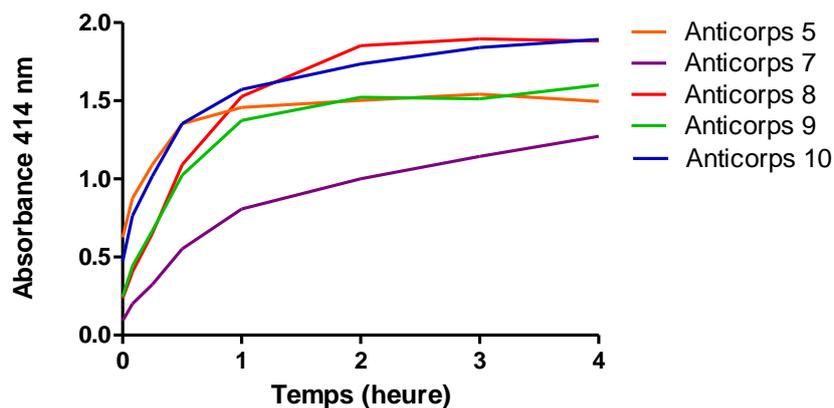


Figure 89 : L'évaluation de la capacité de fixation de cinq anticorps sur le carbapénème-BSA au cours du temps.

Protocole : 100 μ L d'une solution de carbapénème-BSA (1 μ g/mL) ont été immobilisés au fond des puits d'une microplaque 96 puits. Puis, pour cinq anticorps monoclonaux (concentrés à 1 μ g/mL), 100 μ L sont respectivement mis en contact avec du carbapénème-BSA pour plusieurs temps d'incubation : 0 minutes, 5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures et 4 heures. A l'issue de chaque incubation, la plaque est lavée et de l'anticorps CAS couplé à la streptavidine-acétylcholinestérase est déposé, puis incubé pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, du réactif d'Ellmann (DTNB + acétylthiocholine iodide) est ajouté. Les plaques sont lues à $DO_{414\text{ nm}}$ au bout de 1 heure. L'intensité des signaux obtenus lors de ce test est proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés sur le carbapénème-BSA ; (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris ; DTNB : acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)).

Malgré des signaux faibles à $DO_{414\text{ nm}}$ à 0 minute, une reconnaissance du carbapénème-BSA par les anticorps est visible. Par exemple, l'anticorps 5 affiche une $DO_{414\text{ nm}}$ de 0,3 à 0 minute pour atteindre une $DO_{414\text{ nm}}$ de 1,35 à 30 minutes. Ainsi, contrairement à ce que semblait montrer les résultats en OCTET, une formation de complexe anticorps/antibiotique se produit dès la mise en contact des deux partenaires. Au vu de ces résultats, le développement d'un test LFIA est initialisé.

III.2.4. Le développement du test immunochromatographique par flux latéral

Pour rappel, les bandelettes de LFIA sont composées de trois zones distinctes, fixées sur un support plastifié. La zone 1 est une zone de dépôt de l'échantillon. Cette dernière est souvent constituée de deux parties, une partie pour le dépôt de l'échantillon et une partie sur laquelle a été déposé et séché l'anticorps marqué. La zone 2 est une zone (MbN) où sont déposées une ou plusieurs lignes d'anticorps : la LT (cible recherchée) et la LC (anticorps

dirigés contre les anticorps marqués). La zone 3 est une zone d'absorption qui favorise la migration de l'échantillon à travers la bandelette (diffusion par capillarité).

Ces trois zones sont préalablement assemblées sur le support plastifié avant de découper des bandelettes de 0,5 cm de large à l'aide d'une guillotine automatique et assembler en cassette plastique.

III.2.4.1. Le matériel et les méthodes

Du fait de la faible taille des antibiotiques, le LFIA par compétition est employée. Pour le développement de ce test et au vu des résultats précédents, un premier test est réalisé sur les vingt anticorps obtenus. Ainsi, tous les anticorps sont couplés à l'or colloïdal et utilisés à l'absorbance $DO_{530\text{ nm}}$ de 8 (absorbance initiale après couplage). Pour le carbapénème-BSA non-hydrolysé sur la LT, la concentration employée est, par défaut, de 1 mg/mL. Aucun antibiotique n'est utilisé dans l'échantillon car l'objectif est de savoir s'il y a bien une fixation de l'anticorps marqué sur le carbapénème-BSA présent en LT. Une LC est réalisée pour s'assurer de la bonne migration des anticorps marqués avec des anticorps CAS concentrés à 0,5 mg/mL (pour la préparation des bandelettes, voir II.3.1).

Pour lancer un test, 10 μL d'anticorps marqué sous forme liquide ont été ajoutés à 100 μL de tampon de migration dans un puits de plaque de microtitration. La bandelette est déposée ensuite dans le puits. Après 15 minutes de migration, la lecture du résultat est effectuée à l'œil nu. Une valeur numérique à l'aide d'une carte comportant une échelle de couleur permet de juger de l'intensité de la ligne, allant de 1 (négatif) à 10. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

III.2.4.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats des LT et LC des vingt anticorps utilisés en tant qu'anticorps marqués sont présentés dans le Tableau 24.

DO_{530 nm} utilisée : 8	Intensité du signal	
	<i>Test : 1,0 mg/mL carbapénème-BSA</i>	<i>Contrôle : 0,5 mg/mL CAS</i>
<i>Lignes</i>		
<i>Anticorps 1</i>	1	9
<i>Anticorps 2</i>	1	8
<i>Anticorps 3</i>	1	8
<i>Anticorps 4</i>	1	8
<i>Anticorps 5</i>	1	8
<i>Anticorps 6</i>	1	7
<i>Anticorps 7</i>	1	8
<i>Anticorps 8</i>	1	8
<i>Anticorps 9</i>	1	8
<i>Anticorps 10</i>	1	7
<i>Anticorps 11</i>	1	8
<i>Anticorps 12</i>	1	7
<i>Anticorps 13</i>	1	8
<i>Anticorps 14</i>	1	9
<i>Anticorps 15</i>	1	8
<i>Anticorps 16</i>	1	7
<i>Anticorps 17</i>	1	8
<i>Anticorps 18</i>	1	8
<i>Anticorps 19</i>	1	8
<i>Anticorps 20</i>	1	8

Tableau 24 : L'évaluation de la capacité de fixation des anticorps sur le carbapénème-BSA présent en LT sur une bandelette (état liquide, migration verticale).

Protocole : Dans une microplaque 96 puits, 10 µL d'anticorps marqué (DO_{530 nm} : 8) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 µL de tampon de migration. Puis, une bandelette (ligne test : carbapénème-BSA à 1 mg/mL) est déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Ensuite, une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

Pour l'ensemble des anticorps testés, aucun signal n'est visible sur la LT. La même opération a été réalisée en doublant la concentration du carbapénème-BSA sur la LT et en doublant l'absorbance DO_{530 nm} des anticorps marqués mais les résultats obtenus sont identiques. L'une des hypothèses est la non-reconnaissance du carbapénème-BSA par les anticorps marqués lors de leur passage au niveau de la LT au cours de la migration de l'échantillon à travers la bandelette.

III.2.5. La discussion

Cette première production et sélection ont permis d'obtenir vingt anticorps monoclonaux capables de reconnaître le méropénème comme l'ont démontrées les différentes courbes de déplacement obtenues avec cette molécule. De plus, ces mêmes

courbes de déplacement ont également montré que certains de ces anticorps avait la capacité de différencier la forme non-hydrolysée de la forme hydrolysée du méropénème.

Néanmoins, dans un premier temps, lors de l'évaluation de l'affinité de ces anticorps par l'OCTET, aucune constante d'association et de dissociation n'ont pu être déterminées car les données n'indiquaient pas de fixation de l'anticorps sur le carbapénème-biotine. Dans un second temps, lors de l'évaluation de la formation des complexes anticorps/antibiotiques au cours du temps en ELISA, il a été montré que les anticorps fixaient le carbapénème-BSA même avec un temps d'incubation < 1 minute, et que le nombre de complexes formés augmentait avec le temps. Pour analyser ces résultats, il est important de prendre en compte que les quantités de carbapénème employées sont bien supérieures en ELISA (0,1 µg de carbapénème-BSA, où plusieurs carbapénèmes sont fixés par BSA) qu'en OCTET (0,02 µg de carbapénème-biotine). Ainsi, il a été mis en évidence que les affinités de ces anticorps pour le carbapénème-BSA ne sont pas suffisantes pour être mesurées en OCTET, mais assez pour obtenir un signal en ELISA. Le choix de tester ces anticorps en test LFIA a donc été fait.

Les résultats obtenus en test LFIA ont montré que les anticorps marqués ne se fixaient pas sur le carbapénème-BSA de la LT au cours de la migration. Ainsi, ces résultats semblent confirmer ceux obtenus en OCTET lors de l'évaluation de l'affinité des anticorps.

L'hypothèse mise en avant ici est un manque d'affinité des anticorps pour le carbapénème-BSA. Lors de la sélection des anticorps, il avait été choisi d'utiliser un carbapénème-biotine (réaction -NHS et -NH₃) en utilisant une fonction réactive différente de celle utilisée pour produire l'immunogène (réaction alcyne et azido) afin d'éviter la sélection d'anticorps reconnaissant l'antibiotique ainsi que la fonction créée par la réaction de l'alcyne avec l'azido. Cette stratégie a eu pour effet de sélectionner les anticorps reconnaissant une structure de petite taille (structure commune au carbapénème-biotine et à l'immunogène) comme montré en Figure 90. La taille de cette structure n'est probablement pas suffisante pour permettre un nombre d'interaction suffisant pour obtenir une bonne affinité.

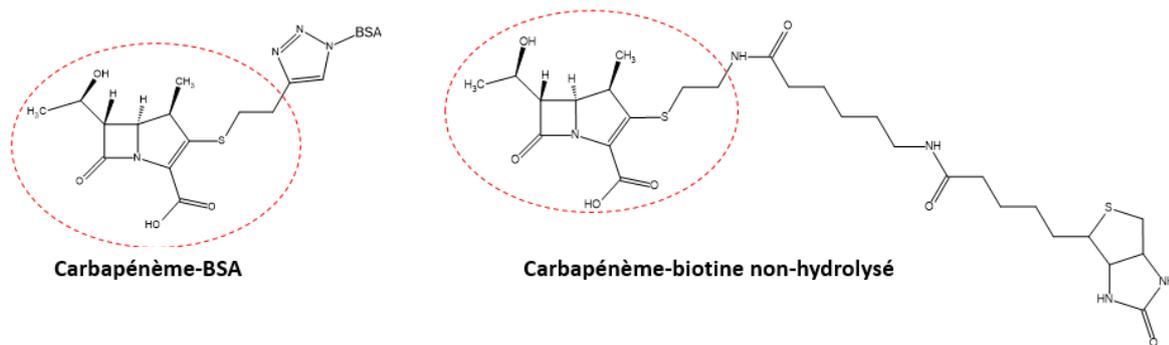


Figure 90 : La structure commune entre le carbapénème-biotine et l'immunogène.

Afin de confirmer notre hypothèse, une deuxième fusion est réalisée avec les splénocytes des deux souris restantes (souris Biozzi 5062 et Biozzi 5064). Pour sélectionner les hybridomes, un nouveau marqueur carbapénème-biotine, synthétisé par réaction du carbapénème-alcyne avec une biotine-azide, a été utilisé. Ainsi, la taille de la structure commune entre l'immunogène et le traceur est plus importante car elle comporte également le cycle 1,5-thiazole (réaction entre l'alcyne et l'azido).

III.3. L'obtention des anticorps monoclonaux : seconde sélection

Pour réaliser cette seconde sélection sur les deux dernières souris Biozzi, trois principales étapes sont nécessaires :

- Purifier les différentes formes de carbapénèmes marquées ayant pour but *in fine* de sélectionner les anticorps d'intérêt issus des hybridomes. Comme compétiteur, le méropénème est toujours utilisé ;
- Suivre la réponse immunitaire chez les deux souris restantes ayant reçues l'immunogène pour observer l'influence du changement de carbapénème-biotine et également pour initier la fusion ;
- Sélectionner les hybridomes produisant les anticorps monoclonaux ayant un maximum de reconnaissance pour la forme non-hydrolysée et un minimum de reconnaissance pour la forme hydrolysée du méropénème et caractériser les anticorps selon leur spécificité, leur affinité.

III.3.1. La purification des deux formes d'antibiotiques marquées et non marquées

III.3.1.1. Le matériel et les méthodes

L'immunogène utilisé est le même que celui utilisé lors des immunisations. Un rappel d'immunisation est réalisé avec les deux souris restantes (souris biozzi 5062 et biozzi 5064) afin de re-stimuler leur système immunitaire et ainsi augmenter le pourcentage de splénocytes sécrétant des anticorps anti-immunogène.

Pour cette seconde sélection, le nouveau carbapénème-biotine non hydrolysé a été obtenu par couplage du carbapénème-alcyne avec de la Biotine-dPEG®7-azide. Dans ce cas, cette molécule marquée permet la sélection des anticorps reconnaissant le carbapénème avec le cycle 1,5-triazole.

Pour ce faire, 1 mg du carbapénème-alcyne est solubilisé dans 0,9 mL de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4. En parallèle, du sulfate de cuivre ($1,36 \text{ mg}$, $8,48 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$, 1 équivalent/carbapénème-alcyne) et du TBTA ($2,25 \text{ mg}$, $4,24 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$, 1 équivalent/carbapénème-alcyne) sont dissous dans 50 μL de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4. Le carbapénème-alcyne est ajouté au sulfate de cuivre et au TBTA. Puis, la Biotine-dPEG®7-azide ($13,16 \text{ mg}$, $2,12 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$, 5 équivalents/carbapénème-alcyne) est pesée et dissoute dans 50 μL de DMF pour être ajoutée au carbapénème-alcyne. Enfin, de l'acide ascorbique (1 mg , $4,24 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$, 1 équivalent/carbapénème-alcyne) est ajouté au mélange. Ce dernier permet de déclencher la réaction entre la fonction alcyne du carbapénème et la fonction azoture de la biotine-dPEG®7-azide pour former un cycle 1,5-triazole entre les deux molécules. Une incubation de 60 minutes à température ambiante sous agitation est réalisée. Un changement de couleur vers l'orange est synonyme de réaction terminée. Le produit résultant est purifié par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile de 0 à 80 % sur un appareil de chromatographie AKTA (AKTA Purifier, GE Healthcare). La mesure de l'absorbance à 300 nm est représentative du cycle β -lactame. En cas d'hydrolyse de la β -lactamine, une perte d'absorbance est visible. Le poids moléculaire est vérifié par chromatographie liquide couplée à la SM (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific) où un cycle de séparation de 15 minutes sur colonne C18 est réalisé. Puis,

l'échantillon est ionisé à l'aide d'une source électrospray et les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge au sein du quadripôle (Figure 91). Le carbapénème-biotine hydrolysé est obtenu par réaction enzymatique avec des billes couplées à KPC-2, comme décrit précédemment (voir II.2.1.1.). Le produit a été purifié et son poids moléculaire vérifié (Figure 91).

Le méropénème non-hydrolysé et le méropénème hydrolysé, obtenus précédemment, ont été réutilisés pour cette nouvelle sélection (Figure 91).

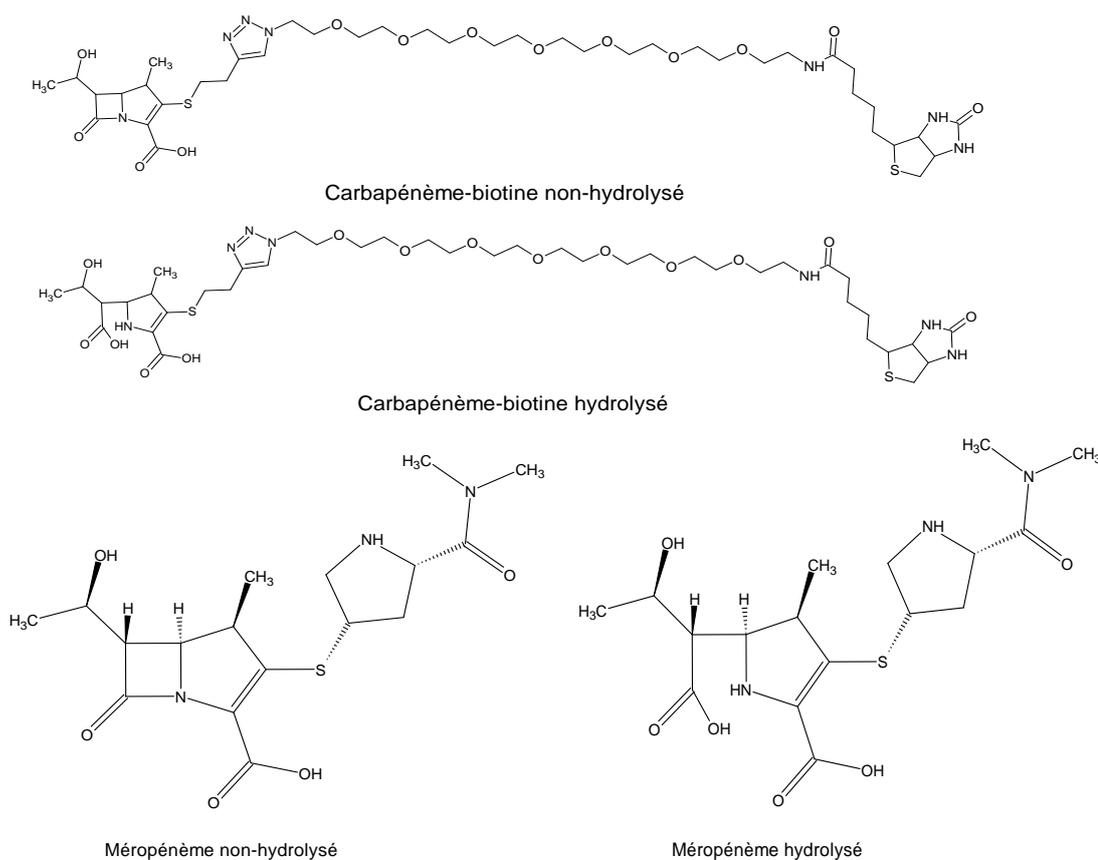


Figure 91 : Les différentes structures utilisées pour la sélection et la caractérisation des anticorps anti-carbapénème.

III.3.1.2. Les résultats et l'interprétation

Pour le carbapénème-biotine non-hydrolysé, la forme non-hydrolysée est apparue à 18,9 % d'acétonitrile (Figure 92) avec une masse moléculaire en SM de 916,21 Da.

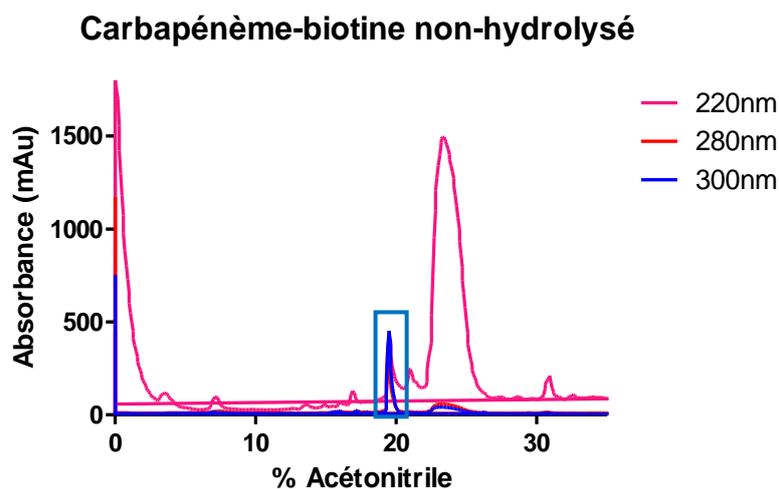


Figure 92 : Le profil d'éluion du carbapénème-biotine non-hydrolysé en phase inverse.

Protocole : Le carbapénème-biotine non-hydrolysé a été purifié par chromatographie en phase inverse sur un gradient eau/acétonitrile (0 à 80 %) sur une colonne C18. Le volume d'injection sur la colonne est de 2 mL. Le poids moléculaire est vérifié par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse où un cycle de séparation de 15 minutes sur colonne C18 est réalisé. Puis, l'échantillon est ionisé à l'aide d'une source électrospray et les ions sont séparés en fonction de leur ratio masse/charge au sein du quadripôle. Pour le carbapénème-biotine non-hydrolysé, le pic d'intérêt est à 18,9 %.

La quantité obtenue après l'étape de purification était trop faible pour effectuer l'hydrolyse du carbapénème-biotine. De plus, un nouveau couplage n'a pas pu être réalisé car la quantité restante en carbapénème-alcyne au laboratoire était insuffisante. De ce fait, l'ensemble de la sélection s'effectuera avec le carbapénème-biotine sous la forme non-hydrolysée, le méropénème non-hydrolysé et le méropénème hydrolysé.

III.3.2. Le suivi de la réponse immunitaire sur les souris

III.3.2.1. Le matériel et les méthodes

A partir des saignées obtenues précédemment avec l'immunogène carbapénème-BSA, les anticorps spécifiques du carbapénème sont dosés par réaction immuno-enzymatique en utilisant le nouveau carbapénème-biotine.

Pour ce faire, à partir de microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé et saturé, les plaques sont lavées en tampon de lavage. Les prélèvements sanguins sont dilués en tampon EIA-PVP à raison de dilutions aux 1/100^{ième} ; 1/1 000^{ième} ; 1/10 000^{ième} ; 1/100 000^{ième}.

A l'issue de l'incubation sur la nuit, 2*3 lavages en tampon de lavage sont réalisés puis 100 µL de streptavidine-acétylcholinestérase sont déposés et incubés pendant 1 heure à température ambiante. Après 2*5 lavages en tampon de lavage, 200 µL du réactif d'Ellmann sont ajoutés. Les plaques sont lues à DO_{414 nm} après 30 minutes et 1 heure d'incubation. L'intensité des signaux obtenus lors de ce test est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques du carbapénème non-hydrolysé.

Pour la sélection des anticorps et l'évaluation de la spécificité de ces mêmes anticorps, les tests décrits pour les sélections précédentes sont *utilisés* (voir II.2.3.).

III.3.2.2. Les résultats et l'interprétation

Comme précédemment, la dilution optimale à utiliser pour le carbapénème-biotine non-hydrolysé est définie. Les concentrations suivantes ont été testées : 250 ng/ml ; 25 ng/ml et 2,5 ng/ml. La concentration la plus faible et non limitante en terme de signal est 2,5 ng/ml.

Puis, à partir des différentes saignées, un dosage est réalisé sur chacune d'entre elles avec le test 1. Après 1 heure de révélation avec le réactif d'Ellmann, les plaques sont lues et les résultats obtenus sont présentés en Figure 93.

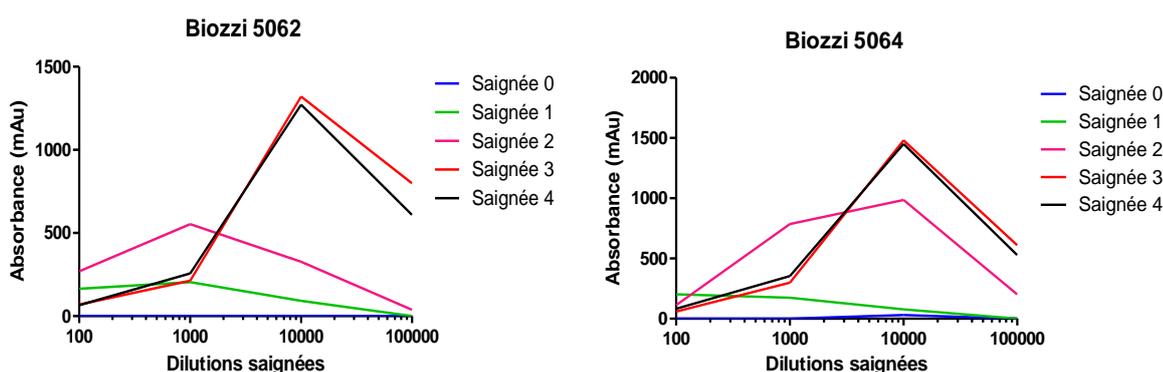


Figure 93 : Le suivi des réponses immunitaires sur les saignées des souris immunisées avec du carbapénème-BSA avec le nouveau carbapénème-biotine non-hydrolysé.

Protocole : Les prélèvements sanguins sont dilués aux 1/100^{ième} ; 1/1 000^{ième} ; 1/10 000^{ième} ; 1/100 000^{ième}. Sur les plaques où du CAS a été immobilisé, 50 µL de chaque dilution sont déposés en double sur une plaque de microtitration, et 50 µL de carbapénème-biotine non-hydrolysé (2,5 ng/ml) sont déposés dans chacun des puits. L'incubation est faite sur une nuit à 4°C. Puis, la révélation des puits à l'aide de la streptavidine-acétylcholinestérase et du réactif d'Ellmann est réalisée. L'absorbance à DO_{414 nm} est lue à 1 heure d'incubation (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris).

Pour les deux souris, l'apparition d'anticorps spécifiques est observée dès la saignée n°2. Ces signaux augmentent au cours du protocole d'immunisation. Les plus élevés correspondent à la dilution au 1/10 000^{ième} des saignées n°3 et n°4. Dans la Figure 94, une comparaison des courbes obtenues avec les deux marqueurs carabapénème-biotine non-hydrolysé et les différentes saignées est réalisée.

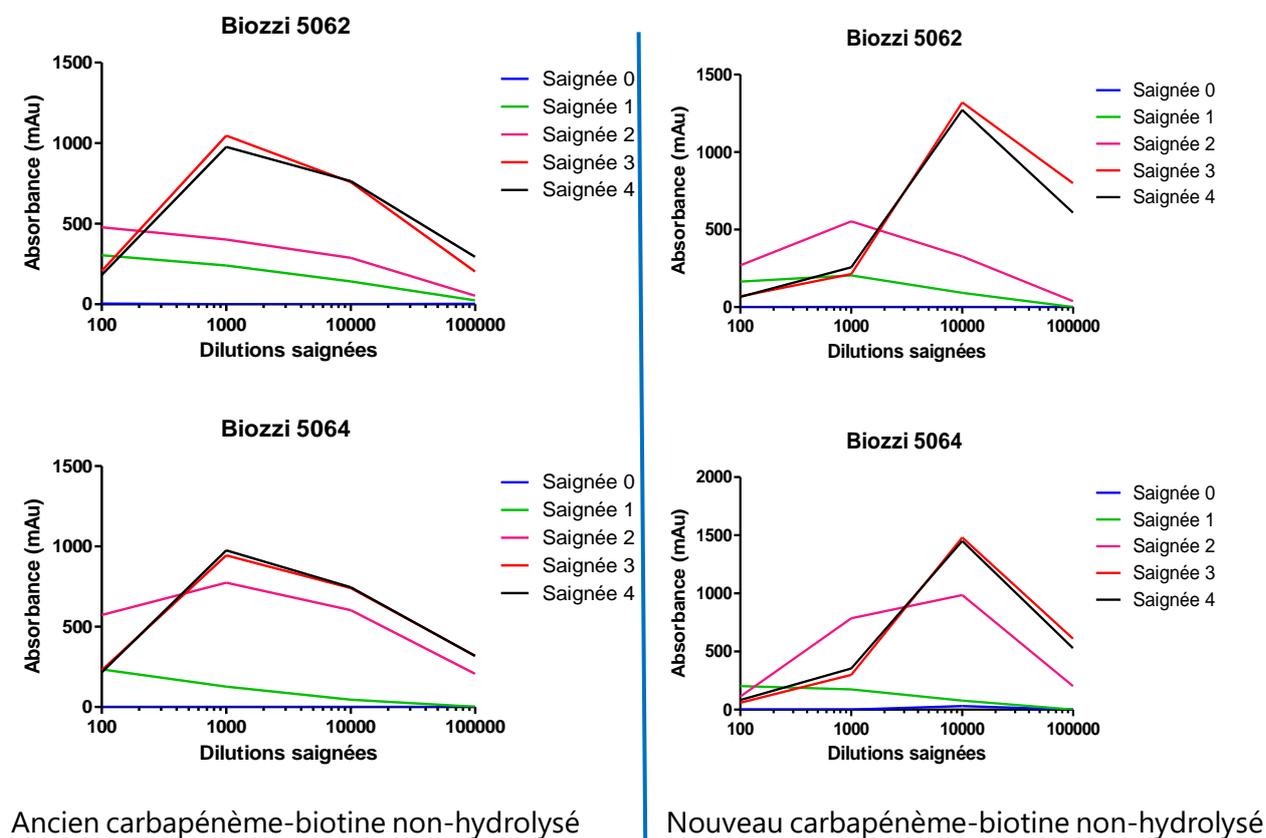


Figure 94 : La comparaison des réponses immunitaires sur les saignées des souris immunisées avec du carabapénème-BSA, avec l'ancien et le nouveau carabapénème-biotine non-hydrolysé.

Protocole : Les prélèvements sanguins sont dilués aux 1/100^{ième} ; 1/1 000^{ième} ; 1/10 000^{ième} ; 1/100 000^{ième}. Sur les plaques où du CAS a été immobilisé, 50 µL de chaque dilution sont déposés en double sur une plaque de microtitration, et 50 µL de carabapénème-biotine non-hydrolysé (ancien ou nouveau marqueur) (respectivement 100 ng/mL et 2,5 ng/mL) sont déposés dans chacun des puits. L'incubation est faite sur une nuit à 4°C. Puis, la révélation des puits à l'aide de la streptavidine-acétylcholinestérase et du réactif d'Ellmann est réalisée. L'absorbance à DO_{414 nm} est lue à 1 heure d'incubation (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris).

Il est à noter que sur la Figure 94, les signaux maximums sont plus élevés avec le nouveau marqueur et que ces signaux sont obtenus pour des dilutions plus élevées de ces saignées. Cela démontre que les anticorps spécifiques du nouveau marqueur sont en proportion et en quantité absolue plus importantes que les anticorps spécifiques de l'ancien

marqueur. Ainsi, comme attendu, l'augmentation de la taille de la structure commune entre l'immunogène et le carbapénème-biotine (Figure 95) permet de détecter une plus grande population d'anticorps, ce qui permettra possiblement de sélectionner des anticorps avec une plus grande affinité.

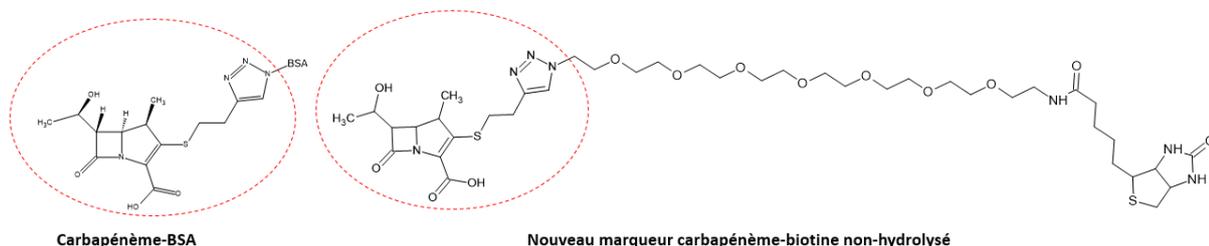


Figure 95 : La structure commune entre le nouveau marqueur et l'immunogène.

III.3.3. La caractérisation des saignées avec le nouveau marqueur

III.3.3.1. Le matériel et les méthodes

Pour compléter ces données, des compétitions en ELISA sont réalisées sur les différentes saignées. Comme précédemment, la dilution en carbapénème-biotine non-hydrolysé et la dilution des saignées n°4 sont optimisées. Les conditions sélectionnées sont les suivantes :

- Souris Biozzi 5062 ; Saignée n°4 : 1/100 000 – Carbapénème-biotine non-hydrolysé : 2,5 ng/mL ;
- Souris Biozzi 5064 ; Saignée n°4 : 1/100 000 – Carbapénème-biotine non-hydrolysé : 2,5 ng/mL.

Ensuite, le test 3 est réalisé pour chaque saignée n°4. Pour la compétition avec le méropénème non hydrolysé, la gamme de concentration est : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL ; 0 ng/mL.

III.3.3.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats des courbes de compétitions avec le méropénème sur les saignées des souris sont représentés en Figure 96.

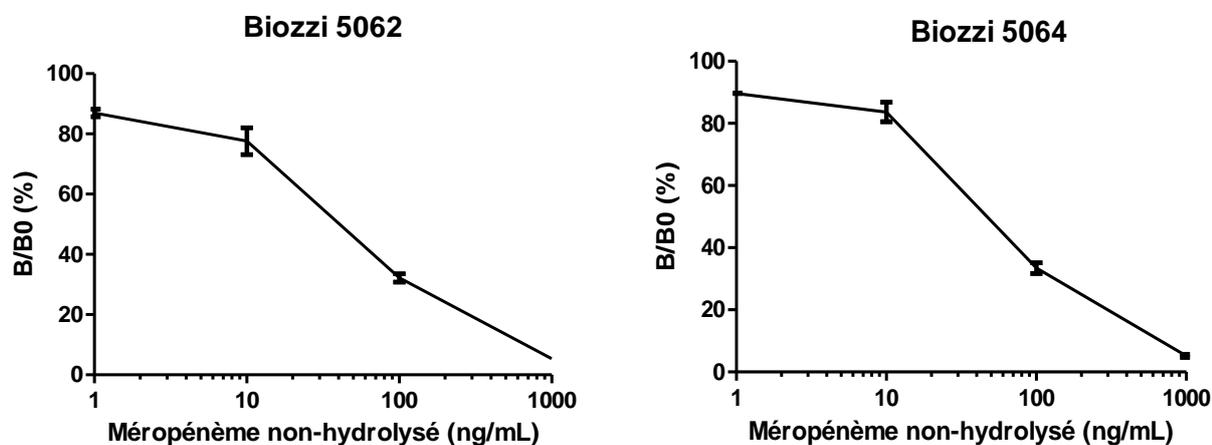


Figure 96 : Les courbes de compétition avec le méropénème sur les saignées des souris immunisées avec du carbapénème-BSA.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, 50 μ L d'anticorps du dernier prélèvement sanguin de chaque souris sont mis en compétition avec 50 μ L de carbapénème-biotine non-hydrolysé (2,5 ng/mL) et 50 μ L de méropénème non-hydrolysé (différentes concentrations testées : 1 000 ng/mL ; 100 ng/mL ; 10 ng/mL ; 1 ng/mL ; 0 ng/mL). Pour chaque concentration de méropénème non-hydrolysé, le pourcentage de déplacement du signal du carbapénème-biotine non-hydrolysé est déterminé.

Les courbes de compétitions présentées ci-dessus indiquent de bons déplacements du nouveau carbapénème-biotine non-hydrolysé par le méropénème non-hydrolysé :

- Souris Biozzi 5062 ; B/B0 (50 %) : 0,041 μ g/mL ;
- Souris Biozzi 5064 ; B/B0 (50 %) : 0,052 μ g/mL.

Avec l'ancien marqueur et les mêmes saignées, les B/B0 (50 %) étaient obtenus avec des concentrations légèrement plus élevées de méropénème non-hydrolysé :

- Souris Biozzi 5062 ; B/B0 (50 %) : 0,077 μ g/mL ;
- Souris Biozzi 5064 ; B/B0 (50 %) : 0,135 μ g/mL.

Les déplacements étant similaires entre les deux souris Biozzi, ces deux souris sont sélectionnées pour réaliser la fusion et obtenir des hybridomes.

III.3.4. La sélection des hybridomes et caractérisation des anticorps

III.3.4.1. La sélection des hybridomes

III.3.4.1.1. Le matériel et les méthodes

Comme précédemment, les rates sont récupérées pour être broyées. Une fois l'hybridation entre les splénocytes et les cellules NS-1 réalisée (voir II.2.3.1.1.), et après prolifération sur plusieurs jours, les milieux de cultures des hybridomes sont récupérés et la sécrétion d'anticorps spécifiques est évaluée par les tests immuno-enzymatiques décrits précédemment.

Après ré-évaluation pour effectuer les différents tests, la concentration du nouveau carbapénème-biotine non-hydrolysé a été fixée à 25 ng/ml. Cette augmentation de la concentration est sans doute due à une dégradation partielle de la molécule. Les concentrations du méropénème non-hydrolysé et du méropénème hydrolysé pour évaluer la spécificité des anticorps produits par les hybridomes est de 0,5 µg/mL.

De même, une pré-sélection sur cent hybridomes est réalisée avec les tests 1, 3 et 4. Le carbapénème-biotine hydrolysé n'ayant pas été produit, le test 2 classiquement utilisé n'a pas été réalisé. L'objectif est d'obtenir les plus fortes absorbances à DO_{414 nm} pour les tests 1 et 3, et les plus faibles (voire inexistantes) pour le test 4. Puis, les surnageants des cent hybridomes sont évalués, avec les tests 1, 3 et 4, le but étant de sélectionner les vingt hybridomes présentant toujours les signaux les plus élevés pour ces tests 1 et 4, et les plus faibles (voire inexistantes) pour le test 3. Ces vingt hybridomes sont clonés par la méthode de dilution limite. Les vingt anticorps monoclonaux obtenus sont produits en grande quantité par culture *in vitro*. La purification est réalisée suivant le protocole habituel (voir II.2.3.1.1.).

III.3.4.1.2. Les résultats et l'interprétation

Sur les 132 hybridomes obtenus après fusion, dix-neuf ont été sélectionnés avec les différents tests, où les meilleurs déplacements de signal étaient obtenus avec le

méropénème non-hydrolysé et pas de déplacement de signal pour le méropénème hydrolysé.

Après les étapes de clonage, les hybridomes ont été mis en culture pour produire et purifier les anticorps. La pureté et l'isotypage de chaque anticorps ont été déterminés.

III.3.4.2. L'évaluation de la spécificité

III.3.4.2.1. Le matériel et les méthodes

Dans un premier temps, afin de définir les quantités limitantes en molécule marquée et en anticorps, les concentrations suivantes ont été testées pour chaque anticorps : 1 000 ng/mL ; 300 ng/mL ; 100 ng/mL ; 30 ng/mL ; 10 ng/mL ; 3 ng/mL ; avec le carbapénème-biotine à une concentration de 5 ng/ml (optimisation de la concentration pour l'évaluation de la spécificité). La dilution permettant l'obtention d'un signal d'environ 0,5 à $DO_{414\text{ nm}}$ après une heure d'incubation avec le réactif d'Ellman est sélectionnée. Pour évaluer la spécificité de chaque anticorps monoclonal, les tests 3 et 4 décrits précédemment sont réalisés, cette fois-ci, avec différentes concentrations de méropénème non-hydrolysé et hydrolysé en tant que compétiteur : 0,2 nmol/mL, 0,02 nmol/mL, 0,002 nmol/mL, 0,0002 nmol/mL et 0 nmol/ml.

Les différents réactifs sont déposés en microplaque 96 puits, sur la paroi où du CAS a été préalablement immobilisé, à raison de 50 μL de marqueur (carbapénème-biotine non-hydrolysé), de 50 μL de compétiteur (méropénème non hydrolysé ou hydrolysé) et de 50 μL de la solution d'anticorps. Après un lavage avec du tampon de lavage, 100 μL de streptavidine-acétylcholinestérase sont ajoutés pendant une heure à température ambiante et sous agitation. Après le lavage des puits avec du tampon de lavage, 200 μL de réactif d'Ellmann sont déposés. La lecture de l'absorbance est effectuée après 1 heure d'incubation sous agitation à $DO_{414\text{ nm}}$ au spectrophotomètre (Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific).

Les graphiques obtenus par superposition des différentes courbes, sont $f([\text{Antibiotique}]) = B/B_0$ (%). Pour rappel, le signal B_0 correspond à l'absorbance obtenue en absence de compétiteur (Absorbance maximale). Le signal B est l'absorbance obtenue

lorsque le compétiteur et le marqueur sont en compétition pour leur fixation sur les paratopes de l'anticorps. Le B/B0 (50 %) correspond au déplacement de 50 % du signal issu du marqueur, par le compétiteur (exemple de courbe en Figure 60).

III.3.4.2.2. Les résultats et l'interprétation

Plusieurs profils de courbes de compétition ont été obtenus à partir des dix-neuf anticorps sélectionnés. Pour plus de clarté, seules les courbes obtenues pour quatre anticorps ont été représentées sur la Figure 97, avec le méropénème non-hydrolysé (trait plein) et le méropénème hydrolysé (trait pointillé).

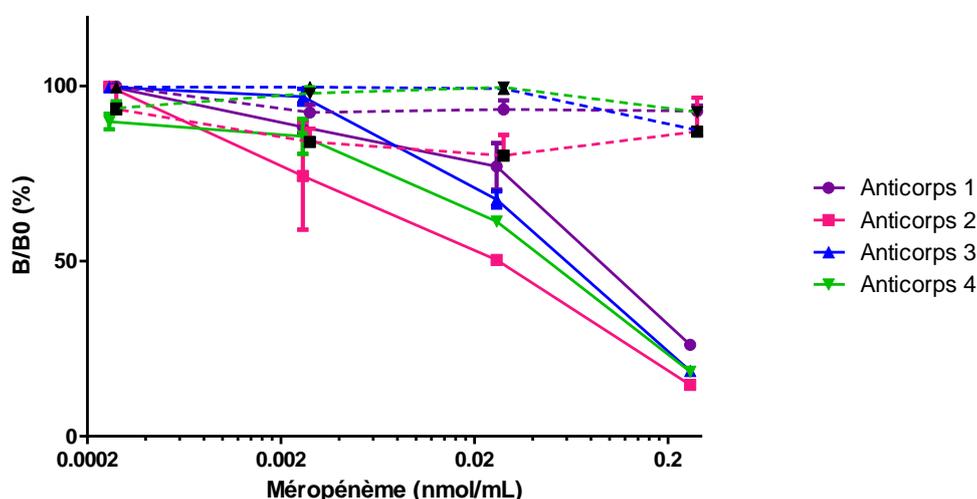


Figure 97 : Les courbes de compétition avec le méropénème sur quatre anticorps.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, quatre anticorps monoclonaux sont mis en compétition avec 50 μ L carbapénème-biotine non-hydrolysé (5 ng/mL) et 50 μ L de méropénème non-hydrolysé ou hydrolysé (différentes concentrations testées : 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL). Pour chaque concentration de méropénème, le pourcentage de déplacement du signal du carbapénème-biotine non-hydrolysé est déterminé.

Les courbes de compétition observées sont similaires pour les quatre anticorps pour le méropénème hydrolysé ou non. Les B/B0 (50 %) varient de 0,072 nmol/mL pour l'anticorps 1 à 0,039 nmol/mL pour l'anticorps 2 avec le méropénème non-hydrolysé. Pour ces quatre anticorps, aucun déplacement du signal n'est observé en présence du méropénème hydrolysé. Les concentrations en B/B0 (50 %) avec le méropénème non-hydrolysé ainsi que les pourcentages de réactions croisées des dix-neuf anticorps obtenus entre les deux formes de méropénème sont répertoriés dans le Tableau 25.

Anticorps monoclonaux obtenus	Concentrations en B/B0 (50 %) du méropénème non-hydrolysé (nmol/mL)	Réactions croisées entre les deux formes de méropénème (%)
Anticorps 1	0,055	Non déterminé
Anticorps 2	0,023	Non déterminé
Anticorps 3	0,050	Non déterminé
Anticorps 4	0,026	Non déterminé
Anticorps 5	0,62	40,17%
Anticorps 6	0,12	Non déterminé
Anticorps 7	0,11	Non déterminé
Anticorps 8	5,30	Non déterminé
Anticorps 9	0,12	14,89%
Anticorps 10	0,13	Non déterminé
Anticorps 11	0,12	Non déterminé
Anticorps 12	0,28	Non déterminé
Anticorps 13	0,089	Non déterminé
Anticorps 14	0,095	Non déterminé
Anticorps 15	0,070	Non déterminé
Anticorps 16	0,076	Non déterminé
Anticorps 17	0,089	Non déterminé
Anticorps 18	0,28	Non déterminé
Anticorps 19	0,23	Non déterminé

Tableau 25 : Les pourcentages de réactions croisées des 19 anticorps obtenus entre les deux formes de méropénème ainsi que les concentrations B/B0 (50 %) du méropénème non-hydrolysé.

Descriptif : Le B/B0 (50 %) correspond à la concentration en compétiteur où 50 % du signal issu du marqueur est déplacé par le compétiteur. Les pourcentages de réactions croisées sont déterminés de la manière suivante : pour une baisse de signal similaire, la concentration de méropénème non-hydrolysé est divisée par la concentration de méropénème hydrolysé, et ce résultat est multiplié par 100 pour être exprimé en pourcentage. Dans le cas où aucune baisse de signal n'a été observée pour le méropénème hydrolysé (même à la plus forte concentration), les réactions croisées n'ont pas pu être déterminées.

Les concentrations en B/B0 (50 %) varient de 0,023 nmol/mL pour les anticorps 2 à 5,30 nmol/mL pour l'anticorps 8. De même, les réactions croisées entre les deux formes de méropénème sont très faibles, sauf pour les anticorps 5 et 9, avec respectivement 40,17 % et 14,89 % (mauvaise reconnaissance du méropénème non-hydrolysé) (Tableau 25). Dans le cas où aucune baisse de signal n'a été observée pour le méropénème hydrolysé (même à la plus forte concentration), les réactions croisées n'ont pas pu être déterminées. Ainsi, la grande majorité des anticorps présente une bonne spécificité pour le méropénème non-hydrolysé.

III.3.4.3. L'évaluation de l'affinité par l'OCTET

III.3.4.3.1. Le matériel et les méthodes

Pour évaluer l'affinité des anticorps vis-à-vis du carbapénème, la technologie de l'interférométrie a été de nouveau utilisée (OCTET Red 96, Pall) (voir II.2.3.3.1.). Le carbapénème-biotine est utilisé à 0,1 µg/mL avec des fibres de streptavidine (Sartorius). Une gamme de concentration pour chaque anticorps est réalisée : 100 nM ; 33,3 nM ; 11,1 nM ; 3,7 nM ; 1,23 nM ; 0,41 nM ; 0,137 nM ; 0 nM. Chaque solution est préparée dans le tampon OCTET. Les senseurs doivent être immergés dans 200 µL de solution pour chaque étape du test (Figure 87).

III.3.4.3.2. Les résultats et l'interprétation

Le graphique pour l'anticorps 4 sur les différentes étapes du test sont présentés en Figure 98.

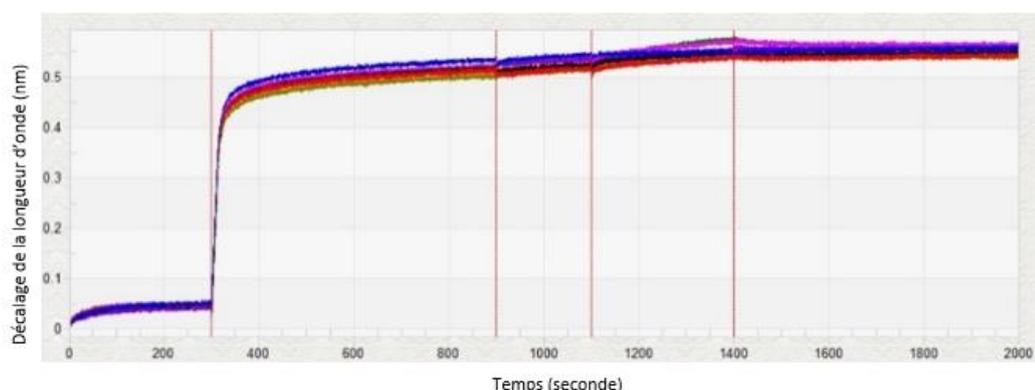


Figure 98 : Le graphique obtenu en OCTET sur l'affinité du carbapénème-biotine non-hydrolysé sur un anticorps.

Descriptif : Les graphiques obtenus sont découpés en plusieurs étapes qui sont : **1-** Une ligne de base pendant 300 secondes effectuée dans le tampon ; **2-** Une association entre le senseur streptavidine et le carbapénème-biotine non-hydrolysé ou hydrolysée (concentration définie précédemment à 0,05 µg/mL) pendant 600 secondes. Chaque courbe correspond à une concentration d'anticorps ; **3-** Une ligne de base pendant 200 secondes effectuée dans le tampon ; **4-** Une association entre les anticorps et le carbapénème-biotine-streptavidine pendant 300 secondes ; **5-** Une dissociation des complexes anticorps/carbapénème-biotine-streptavidine pendant 600 secondes, effectuée dans du tampon. L'association ou la dissociation sont mesurés par un décalage de longueur d'onde. Les courbes de couleur verte, violet clair, jaune, violet foncée, verte kaki, rose, noire et rouge correspondent respectivement aux concentrations d'anticorps à 100 nM, 33,3 nM, 11,1 nM, 3,7 nM, 1,23 nM, 0,41 nM, 0,137 nM, 0 nM.

Malheureusement, aucune formation de complexes carbapénème/anticorps n'est visible sur la Figure 98. Cette absence d'association avec le carbapénème non-hydrolysé a également été observée pour les autres anticorps.

Comme lors de la première sélection, l'affinité des anticorps pour le nouveau carbapénème-biotine semble trop faible pour être visible sur l'OCTET, mais assez pour être observée en ELISA. Comme précédemment, l'une des hypothèses émises est le temps de contact entre l'anticorps et la molécule cible qui est relativement élevé en ELISA (plusieurs heures) et faible en OCTET (quelques minutes). Ainsi, une évaluation de la formation des complexes anticorps/antibiotiques au cours du temps a été réalisée en ELISA pour observer l'effet de la durée d'incubation.

III.3.4.4. L'évaluation de la formation des complexes anticorps/antibiotique au cours du temps en ELISA

III.3.4.4.1. Le matériel et les méthodes

Comme décrit lors de la première sélection (*voir III.2.3.4.1.*), sur une microplaque 96 puits, 100 µL d'une solution de carbapénème-BSA, concentrée à 1 µg/mL et diluée dans du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4, a été déposé dans l'ensemble des puits. Après une incubation sur la nuit, les plaques ont été saturées à l'aide du tampon EIA-PVP. Après lavage des plaques en tampon de lavage, 100 µL de chacun des anticorps concentrés à 1 µg/mL dans du tampon EIA-PVP, ont été déposés à des temps différents : 4 heures, 3 heures, 2 heures, 1 heure, 30 minutes, 15 minutes, 5 minutes et 0 minute. Ces incubations ont été réalisées à température ambiante sous agitation.

Une fois tous les dépôts réalisés, deux lavages successifs en tampon de lavage sont réalisés et des anticorps CAS couplés à de l'acétylcholinestérase ont été ajoutés à 2 UE/mL pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Puis, les plaques sont lavées et le réactif d'Ellman est déposé. Ces dernières sont lues à $DO_{414\text{ nm}}$ après 1 heure d'incubation.

III.3.4.4.2. Les résultats et l'interprétation

Pour plus de clarté, sur les dix-neuf anticorps obtenus, les résultats de quatre anticorps sont représentés en Figure 99.

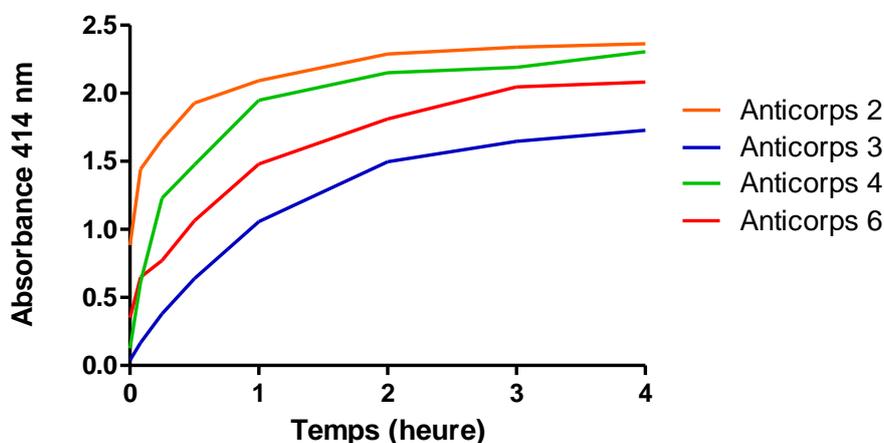


Figure 99 : L'évaluation de la capacité de fixation de quatre anticorps sur le carbapénème-BSA au cours du temps.

Protocole : 100 μ L d'une solution de carbapénème-BSA (1 μ g/mL) ont été immobilisés au fond des puits d'une microplaque 96 puits. Après lavage, quatre anticorps monoclonaux (100 μ L à 1 μ g/mL) sont mis en contact du carbapénème-BSA pour plusieurs temps d'incubation : 0 minutes, 5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures et 4 heures. A l'issue de chaque incubation, la plaque est lavée et de l'anticorps CAS couplé à la streptavidine-acétylcholinestérase est déposé, puis incubé pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, du réactif d'Ellmann (DTNB + acétylthiocholine iodide) est ajouté. Les plaques sont lues à $DO_{414\text{ nm}}$ au bout de 1 heure. L'intensité des signaux obtenus lors de ce test est proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés sur le carbapénème-BSA (CAS : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris ; DTNB : acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)).

Malgré des signaux faibles à $DO_{414\text{ nm}}$, une reconnaissance du carbapénème-BSA par les anticorps est visible même à 0 minute d'incubation pour certains anticorps. Par exemple, l'anticorps 2 affiche une $DO_{414\text{ nm}}$ de 0,88 à 0 minute et jusqu'à 2,1 à 1 heure. Comparé à la première sélection, les intensités sont plus élevées pouvant signifier une meilleure cinétique de fixation des anticorps sur le carbapénème-BSA et donc une constante d'association plus élevée. Les anticorps sont utilisés pour réaliser des tests LFIA afin d'observer si cette augmentation est suffisante pour des tests rapides.

III.3.5. Le développement du test immunochromatographique à flux latéral

III.3.5.1. Le matériel et les méthodes

Pour le développement du test rapide et au vu des résultats précédents, un premier test est réalisé sur les dix-neuf anticorps obtenus. Ainsi, tous les anticorps sont couplés à l'or colloïdal et utilisés à l'absorbance $DO_{530\text{ nm}}$ de 8 (absorbance initiale après couplage). Pour le carbapénème-BSA non-hydrolysé sur la LT, la concentration employée est par défaut de 1 mg/mL. Aucun antibiotique n'est utilisé dans l'échantillon car l'objectif est de savoir s'il y a bien une fixation de l'anticorps marqué sur le carbapénème-BSA présent en LT. Une LC est réalisée (anticorps CAS concentrés à 0,5 mg/mL) pour s'assurer de la bonne migration de l'anticorps marqué (pour la préparation des bandelettes, voir II.3.1.).

Pour lancer un test, 10 μL d'anticorps marqué sous forme liquide ont été ajoutés à 100 μL de tampon de migration dans un puits de microplaque, puis une bandelette est déposée dans le puits. Après 15 minutes de migration, la lecture du résultat est effectuée à l'œil nu. Une valeur numérique à l'aide d'une carte comportant une échelle de couleur permet de juger de l'intensité de la ligne, allant de 1 (négatif) à 10. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

III.3.5.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats des LT et LC des dix-neuf anticorps utilisés en tant qu'anticorps marqués sont présentés dans le Tableau 26.

DO_{530 nm} utilisée : 8	Intensité du signal	
	<i>Test : 1,0 mg/mL carbapénème-BSA</i>	<i>Contrôle : 0,5 mg/mL CAS</i>
<i>Lignes</i>		
<i>Anticorps 1</i>	1	8
<i>Anticorps 2</i>	1	7
<i>Anticorps 3</i>	1	8
<i>Anticorps 4</i>	1	9
<i>Anticorps 5</i>	1	8
<i>Anticorps 6</i>	1	7
<i>Anticorps 7</i>	1	9
<i>Anticorps 8</i>	1	9
<i>Anticorps 9</i>	1	9
<i>Anticorps 10</i>	1	8
<i>Anticorps 11</i>	1	9
<i>Anticorps 12</i>	1	7
<i>Anticorps 13</i>	1	8
<i>Anticorps 14</i>	1	9
<i>Anticorps 15</i>	1	8
<i>Anticorps 16</i>	1	8
<i>Anticorps 17</i>	1	8
<i>Anticorps 18</i>	1	7
<i>Anticorps 19</i>	1	8

Tableau 26 : L'évaluation de la capacité de fixation des anticorps monoclonaux sur le carbapénème-BSA présent en LT sur une bandelette (état liquide, migration verticale).

Protocole : Dans une microplaque 96 puits, 10 µL d'anticorps marqué (DO_{530 nm} : 8) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 µL de tampon de migration. Puis, une bandelette (ligne test : carbapénème-BSA à 1 mg/mL) est déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Ensuite, une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

Comme observé avec les anticorps de la première sélection, pour l'ensemble de ces nouveaux anticorps, aucun signal n'est visible sur la LT. La même opération a été réalisée en doublant la concentration du carbapénème-BSA sur la LT et en doublant l'absorbance DO_{530 nm} mais les résultats sont restés les mêmes.

L'hypothèse de la non-reconnaissance du carbapénème-BSA par les anticorps marqués sur le temps de contact lors de la migration de l'échantillon à travers la bandelette, est toujours mise en avant. Afin de confirmer cette hypothèse, l'anticorps marqué a directement été déposé sur la MbN, au niveau de la LT, puis la bandelette est déposée dans un puits contenant 100 µL de tampon de migration. Pour plus de clarté, les résultats de quatre anticorps sur les dix-neufs sont représentés dans le Tableau 27. Les résultats sont identiques pour les dix-neuf anticorps monoclonaux.

Ligne	Anticorps 1	Anticorps 2	Anticorps 3	Anticorps 4
LT	7	6,5	7	7
LC	8	8	7	8

Tableau 27 : La mise en contact directe entre quatre anticorps marqués et le carbapénème-BSA présent sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).

Protocole : Dans une microplaque 96 puits, 100 μ L de tampon de migration sont ajoutés dans un puits. 10 μ L d'anticorps marqué ($DO_{530\text{ nm}}$: 8) sous forme liquide sont déposés sur la ligne test (carbapénème-BSA : 1,0 mg/mL) d'une bandelette, avant que celle-ci soit déposée dans le puits avec le tampon de migration. Une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Ensuite, une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

Un fort signal est visible sur la LT pour ces quatre anticorps testés ce qui indique une fixation de l'anticorps marqué sur le carbapénème-BSA de la LT. Deux hypothèses ont été formulées : **1-** L'affinité entre l'anticorps et le carbapénème-BSA est trop faible pour observer une fixation lors de la migration de l'anticorps marqué; **2-** Un constituant du tampon de migration impacte la fixation de l'anticorps sur le carbapénème-BSA.

III.3.6. L'origine de la non-fixation des anticorps sur le carbapénème-BSA

III.3.6.1. L'impact du tampon de migration sur la fixation des anticorps au carbapénème-BSA

III.3.6.1.1. Le matériel et les méthodes

Au vu des résultats de cinétique de déplacement et de fixation en ELISA avec le méropénème non-hydrolysé et le carbapénème-BSA, la première hypothèse a été écartée dans un premier temps.

Pour vérifier la seconde hypothèse, chaque constituant du tampon de migration a été ajouté successivement au tampon Tris/HCl 0,1 M pH 8,0. Pour chaque nouveau constituant, un test bandelette est réalisé en mélangeant 10 μ L d'anticorps marqué à 100 μ L de tampon de migration. La lecture s'effectue après 15 minutes de migration à l'œil nu.

III.3.6.1.2. Les résultats et l'interprétation

Pour plus de clartés, les résultats de quatre anticorps sur les dix-neuf sont représentés dans le Tableau 28. Les résultats sont identiques pour les dix-neuf anticorps.

LT : 1 mg/mL	Anticorps 1	Anticorps 2	Anticorps 3	Anticorps 4
Tampon Tris/HCl 0.1M pH 8	7	7	7	7
Tampon Tris/HCl 0.1M pH 8 + NaCl 0,15 M	8	8	7	8
Tampon Tris/HCl 0.1M pH 8 + NaCl 0,15 M + Tween 20 0,5%	8	7	7	8
Tampon Tris/HCl 0.1M pH 8 + NaCl 0,15 M + Tween 20 0,5% + CHAPS 1%	8	7	7	8
Tampon Tris/HCl 0.1M pH 8 + NaCl 0,15 M + Tween 20 0,5% + CHAPS 1% + Azide de sodium 0,01%	8	8	7	8
Tampon Tris/HCl 0.1M pH 8 + NaCl 0,15 M + Tween 20 0,5% + CHAPS 1%+ azide de sodium 0,01% + BSA 0,1%	1	1	1	1

Tableau 28 : L'étude de l'impact des différents constituants du tampon de migration sur la fixation de quatre anticorps marqués sur le carbapénème-BSA présent sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).

Protocole : Dans une microplaque 96 puits, 10 µL d'anticorps marqué ($DO_{530\text{ nm}}$: 8) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 µL de tampon (plusieurs tampons sont testés). Puis, une bandelette (ligne test : carbapénème-BSA à 1 mg/mL) est déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Ensuite, une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

Dans le Tableau 28, il est observé que les signaux sur la LT restent stables jusqu'à l'ajout de la BSA qui inhibe complètement le signal. Il semble donc que l'absence de signal lors du développement de ce test LFIA soit due à la présence de BSA dans le tampon de migration. Pour le vérifier, des tests sont réalisés avec un tampon de migration pour lequel la BSA a été remplacée par de la caséine. Ce tampon est appelé tampon de migration modifié (Tampon Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 + NaCl 0,15 M + Tween 20 0,5 % + CHAPS 1 % + Azide de sodium 0,01 % + Caséine 0,1 %). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 29 pour les quatre mêmes anticorps que précédemment. Les résultats sont identiques pour les dix-neuf anticorps monoclonaux.

LT : 1 mg/mL	Anticorps 1	Anticorps 2	Anticorps 3	Anticorps 4
Tampon de migration	1	1	1	1
Tampon de migration modifié	7	7,5	7	6

Tableau 29 : La comparaison de deux tampons de migration sur la fixation de quatre anticorps marqués sur le carbapénème-BSA présent sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).

Protocole : Dans une microplaque 96 puits, 10 µL d'anticorps marqué ($DO_{530\text{ nm}}$: 8) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 µL de tampon (deux tampons sont testés). Puis, une bandelette (ligne test : carbapénème-BSA à 1 mg/mL) est déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Ensuite, une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

L'utilisation de la caséine permet la restauration du signal sur la LT. Ainsi, cette expérience confirme que la BSA inhibe la liaison des anticorps sur la LT, constituée de carbapénème-BSA.

III.3.6.2. La reconnaissance de la BSA par les anticorps

III.3.6.2.1. Le matériel et les méthodes

Pour identifier la nature de cette inhibition, spécifique ou non-spécifique, de nouveaux essais sont réalisés avec quatre LT différentes, sur quatre bandelettes distinctes :

- Soit la LT contient de la BSA à 1 mg/mL ;
- Soit la LT contient de la BSA-azide à 1 mg/mL ;
- Soit la LT contient du carbapénème-BSA à 1 mg/mL ;
- Soit la LT contient de la caséine à 1 mg/mL.

L'ensemble des dix-neuf anticorps sont testés avec ces différentes bandelettes. Pour réaliser ces tests, 10 µL de l'anticorps marqué sont déposés dans un puits de microplaques 96 puits, et 100 µL de tampon de migration modifié sont ajoutés. Une bandelette est ensuite déposée. La lecture s'effectue après 15 minutes de migration à l'œil nu.

III.3.6.2.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats obtenus pour les dix-neuf anticorps monoclonaux sont présentés dans le Tableau 30.

Anticorps	LT : 1 mg/mL			
	BSA	BSA-azide	Carbapénème-BSA	Caséine
Anticorps 1	7	7	7	1
Anticorps 2	8	8	8	1
Anticorps 3	8	8	8	1
Anticorps 4	7	7,5	7	1
Anticorps 5	9	8,5	9	1
Anticorps 6	7,5	7	7	1
Anticorps 7	6	6,5	6	1
Anticorps 8	7	7,5	7	1
Anticorps 9	6	6,5	5	1
Anticorps 10	6,5	6	5	1
Anticorps 11	7	7	7	1
Anticorps 12	6,5	6	5	1
Anticorps 13	7	7	7	1
Anticorps 14	6	6	6	1
Anticorps 15	9	9	9	1
Anticorps 16	7	7	7	1
Anticorps 17	8	7,5	7,5	1
Anticorps 18	7	7	7	1
Anticorps 19	7,5	7,5	7	1

Tableau 30 : L'évaluation de la fixation des anticorps marqués sur différents composants sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).

Protocole : Dans une microplaque 96 puits, 10 μ L d'anticorps marqué ($DO_{530\text{ nm}}$: 8) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 μ L de tampon de migration modifié. Puis, quatre bandelettes (1- ligne test : BSA à 1 mg/mL ; 2- ligne test : BSA-Azide à 1 mg/mL ; 3- ligne test : Carbapénème-BSA à 1 mg/mL ; 4- ligne test : Caséine à 1 mg/mL) sont déposées dans les puits. Une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Ensuite, une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

Pour chacun des anticorps, des signaux équivalents sont obtenus pour les différentes LT sur lesquelles de la BSA est présente et ce quelle que soit la forme de la BSA. Cela démontre que les signaux ne dépendent pas de la présence du carbapénème sur la BSA.

Il faut noter que les précédents résultats en ELISA ont montré : 1- que les anticorps reconnaissent le carbapénème-biotine ; 2- la liaison entre le carbapénème-biotine et l'anticorps peut être déplacée par le méropénème non-hydrolysé seul. Ainsi, il est possible

de conclure que les anticorps reconnaissent à la fois la BSA et le méropénème. Face à ce constat il est intéressant de déterminer l'affinité relative des anticorps pour ces deux composants de l'immunogène.

III.3.6.3. L'évaluation des affinités des anticorps pour la BSA et le méropénème

III.3.6.3.1. Le matériel et les méthodes

Différentes concentrations de BSA (200 nmol/mL ; 20 nmol/mL ; 2,0 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL et 0 nmol/mL) et de méropénème (20 nmol/mL ; 2,0 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL et 0 nmol/mL) sont testées avec des bandelettes sur lesquelles est immobilisé du carbapénème-BSA (1 mg/mL). Pour réaliser ces tests, 10 µL de l'anticorps marqué sont déposés dans un puits de microplaques 96 puits, et 100 µL de BSA ou de méropénème dilués dans du tampon de migration sont ajoutés. Une bandelette est ensuite déposée. Après 15 minutes de migration, la lecture du résultat est effectuée à l'œil nu. Une valeur numérique à l'aide d'une carte comportant une échelle de couleur permet de juger de l'intensité de la ligne, allant de 1 (négatif) à 10. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

III.3.6.3.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats obtenus pour cinq anticorps sont présentés dans le Tableau 31. Il s'agit de cinq anticorps avec les meilleurs déplacements B/B0 (50 %) avec le méropénème non-hydrolysé.

Méropénème non-hydrolysé	Anticorps 3	Anticorps 6	Anticorps 14	Anticorps 15	Anticorps 17
20nmol/ml	3,5	5,5	6	1	1
2nmol/ml	5,5	6,5	8	4	3,5
0,2nmol/ml	7	7	9	5,5	5
0,02nmol/ml	8	7	9	6	6
0,002nmol/ml	8	7	9	6	6
BSA	Anticorps 3	Anticorps 6	Anticorps 14	Anticorps 15	Anticorps 17
200nmol/ml	1	1	1	1	1
20nmol/ml	1	1	1	1	1
2nmol/ml	1	3,5	4,5	1	1
0,2nmol/ml	4,5	5,5	6	3,5	1
0,02nmol/ml	6	6,5	8	6	4
0,002nmol/ml	7	7	9	6	5
0nmol/ml	8	7	9	6	6

Tableau 31 : Les intensités des tests de compétitions entre le méropénème et la BSA de cinq anticorps marqués et le carbapénème-BSA présent sur la LT d'une bandelette (état liquide, migration verticale).

Protocole : Dans une microplaque 96 puits, 10 μ L d'anticorps marqué ($DO_{530\text{ nm}}$: 8) sous forme liquide ont été ajoutés à 100 μ L de tampon de migration contenant soit du méropénème non-hydrolysé (20 nmol/mL ; 2 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0 nmol/mL), soit de la BSA (200 nmol/mL ; 20 nmol/mL ; 2 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0 nmol/mL). Puis, une bandelette (ligne test : carbapénème-BSA à 1 mg/mL) est déposée dans le puits et une migration de 15 minutes est réalisée pour que l'échantillon migre à travers la bandelette. Ensuite, une échelle d'intensité de couleur est utilisée pour évaluer et comparer les signaux obtenus sur les bandelettes. Cette échelle a été définie de 1 à 10, où chaque valeur est caractéristique d'une intensité de signal croissante. A partir d'une intensité de 3,5, le résultat est considéré comme positif.

Pour les cinq anticorps testés, à concentration équivalente, les inhibitions des signaux avec la BSA sont supérieures par rapport à celles induites par le méropénème non-hydrolysé. Ainsi, il semblerait que les anticorps aient une meilleure affinité pour la BSA que pour le méropénème, malgré la sélection des hybridomes et donc des anticorps monoclonaux avec le méropénème non-hydrolysé. Pour vérifier cette observation, l'évaluation des réactions croisées avec le méropénème non-hydrolysé et la BSA est réalisée en ELISA sur les anticorps monoclonaux.

III.3.6.4. L'évaluation des réactions croisées

III.3.6.4.1. Le matériel et les méthodes

Pour évaluer les réactions croisées de chaque anticorps avec le méropénème et la BSA, le test 3 décrit précédemment a été réalisé avec différentes concentrations de compétiteur (voir III.2.2.1.). L'évaluation des réactions croisées s'est portée uniquement sur la seconde sélection d'anticorps étant donné que les anticorps obtenus indiquent de meilleurs déplacements en présence du méropénème non-hydrolysé.

Les concentrations de chaque anticorps définies dans l'évaluation de la spécificité des anticorps et une concentration de 5,0 ng/ml pour le nouveau carbapénème-biotine non-hydrolysé sont utilisées (voir III.3.4.2.2.). Pour le méropénème, une gamme de concentration a été réalisée : 20 nmol/mL ; 2,0 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL et 0 nmol/mL. Pour la BSA, la gamme suivante est utilisée : 200 nmol/mL ; 20 nmol/mL ; 2,0 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL et 0 nmol/mL.

Pour réaliser ces tests, les différents réactifs sont déposés dans les puits d'une microplaque, sur la paroi où du CAS a été préalablement immobilisé, à raison de 50 µL de marqueur (carbapénème-biotine non-hydrolysé), de 50 µL de compétiteur et de 50 µL de la solution d'anticorps. Après une nuit à 4°C et un lavage en tampon de lavage, 100 µL de streptavidine-acétylcholinestérase ont été ajoutés pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation. Après lavage des puits en tampon de lavage, 200 µL de réactif d'Ellmann ont été déposés. La lecture de l'absorbance a été effectuée après 1 heure d'incubation sous agitation, à DO_{414 nm} au spectrophotomètre.

Avec le méropénème non-hydrolysé utilisé pour la sélection des hybridomes et le carbapénème-biotine non-hydrolysé, le graphique obtenu est $f([\text{compétiteur}]) = B/B_0$ (%). Le pourcentage de réactions croisées est calculé en divisant une concentration de méropénème par la concentration de compétiteur qui induit une baisse de signal similaire à cette concentration de méropénème. Ce résultat est multiplié par 100 pour être exprimé en pourcentage.

III.3.6.4.2. Les résultats et l'interprétation

Les concentrations B/B0 (50 %) du méropénème non-hydrolysé et de la BSA sont déterminées et les réactions croisées pour la BSA sont calculées, pour tous les anticorps. Les résultats sont présentés dans le Tableau 32.

B/B0 (50 %)	Méropénème non-hydrolysé (pmol/ml)	BSA (pmol/ml)	Réaction croisée (%)
Anticorps 1	300,00	5,70	5263,16
Anticorps 2	953,00	154,50	616,83
Anticorps 3	193,50	6,00	3225,00
Anticorps 4	272,00	10,40	2615,38
Anticorps 5	478,00	3,40	14058,82
Anticorps 6	124,00	3,10	4000,00
Anticorps 7	691,50	29,20	2368,15
Anticorps 8	738,00	2,70	27333,33
Anticorps 9	385,10	9,50	4053,68
Anticorps 10	343,10	1,00	34310,00
Anticorps 11	232,00	14,80	1567,57
Anticorps 12	294,00	7,70	3818,18
Anticorps 13	599,90	7,20	8331,94
Anticorps 14	119,50	1,10	10863,64
Anticorps 15	131,60	1,90	6926,32
Anticorps 16	363,30	3,70	9818,92
Anticorps 17	199,20	0,50	39840,00
Anticorps 18	109,19	14,50	753,03
Anticorps 19	616,10	3,10	19874,19

Tableau 32 : Les déplacements obtenus avec le méropénème et la BSA sur les dix-neuf anticorps.

Protocole : Pour chaque anticorps monoclonal obtenu, les concentrations B/B0 (50 %) de compétiteur (BSA et méropénème non-hydrolysé) ont été déterminées pour obtenir un déplacement du signal de carbapénème biotine non-hydrolysé de 50%. Les pourcentages de réactions croisées sont déterminés de la manière suivante : pour une baisse de signal similaire (à 50 %), la concentration de méropénème non-hydrolysé est divisée par la concentration de BSA, et ce résultat est multiplié par 100 pour être exprimé en pourcentage.

Pour l'ensemble des anticorps, une inhibition du signal est observée pour le méropénème et la BSA. Cela confirme la reconnaissance de ces deux molécules par les anticorps monoclonaux. Il faut cependant noter que les réactions croisées sont très largement supérieures à 100 % pour la BSA, ce qui signifie que les anticorps ont une meilleure affinité pour la BSA que pour le méropénème.

III.3.7. La discussion

Cette seconde sélection a permis d'obtenir dix-neuf anticorps monoclonaux ayant la capacité de différencier la forme non-hydrolysée de la forme hydrolysée du méropénème. Chacun de ces anticorps ont indiqué des affinités plus fortes pour le méropénème non-hydrolysé, que celles obtenues lors de la première sélection d'anticorps monoclonaux.

Malheureusement, l'évaluation de l'affinité de ces anticorps par interférométrie n'a pas permis d'obtenir des constantes d'association et de dissociation. En parallèle, l'évaluation de la cinétique de fixation au cours du temps en ELISA a démontré que les anticorps sont capables de fixer le carbapénème-BSA même avec un temps d'incubation < 1 minute.

Puis, l'ensemble de ces anticorps a été testé en test LFIA. Dans un premier temps, les résultats indiquaient une non-fixation des anticorps sur la LT. Lors des études pour déterminer la cause de ces résultats, il a été démontré que les anticorps ont la capacité de fixer la BSA. Ainsi, la BSA contenue dans le tampon de migration sature la totalité des sites de fixation de l'anticorps, empêchant la fixation de ces derniers sur la LT contenant le carbapénème-BSA. Il a été également montré que ces anticorps ont une meilleure affinité pour la BSA que pour le méropénème. De ce fait, même en supprimant les interférences dues à la BSA et en la remplaçant par de la caséine dans le tampon de migration, les concentrations de méropénème nécessaires pour inhiber totalement le signal de la LT sont incompatibles avec le développement du test. En effet, il faudrait que la concentration du méropénème dans l'échantillon soit supérieure ou égale à 20 nmol/mL (7,70 µg/mL) (exemple des anticorps 15 et 17, en Tableau 31). De même, la quantité de β-lactamase nécessaire à la dégradation d'une telle concentration serait trop importante sur une période courte (ici 30 minutes) impactant fortement les performances d'un potentiel test LFIA. A titre de comparaison pour le test de détection de l'activité céphalosporinase sur colonies bactériennes, la concentration de céfotaxime est de 25 ng/mL (258).

Cette double reconnaissance du méropénème et de la BSA par les anticorps pourrait s'expliquer par la petite taille du carbapénème-alcyne (285 Da) et de sa proximité avec la BSA. En effet, le site de reconnaissance de l'anticorps (paratope) a une taille supérieure à celle du carbapénème-alcyne. Lors de l'immunisation, la production d'anticorps, qui

reconnaissent le carbapénème et les acides aminés de la BSA situés à proximité de cette molécule, est stimulée. Ainsi, lors de la sélection des hybridomes à l'aide du carbapénème-biotine et du méropénème, ces molécules n'interagissent qu'avec une partie du paratope de l'anticorps. De plus, la meilleure affinité des anticorps pour la BSA montre qu'une part importante des paratopes interagit avec la BSA.

Pour vérifier et confirmer que ce problème provienne de l'immunogène utilisé, des tests par compétition sont réalisés sur les saignées avec le méropénème non-hydrolysé et la BSA. L'objectif est de mettre au point un outil permettant de mettre en évidence la présence d'anticorps dont le paratope interagit avec la BSA et d'éliminer les hybridomes produisant ces anticorps, lors de futures productions d'anticorps monoclonaux anti-carbapénème.

III.4. L'évaluation des réactions croisées des saignées avec la BSA

III.4.1. Les saignées anti-carbapénème-BSA

III.4.1.1. Le matériel et les méthodes

En reprenant les conditions déterminées précédemment sur les tests par compétition sur les saignées des souris, de nouvelles compétitions ont été effectuées avec le méropénème non-hydrolysé et la BSA. En utilisant le carbapénème-amine associé au NHS-LC-Biotine pour les saignées n°4 des souris Biozzi 4881 et 5063 (Saignée n°4 : 1/25 000 – Carbapénème-biotine non-hydrolysé : 20 ng/mL) et le carbapénème-alcyne associé à la Biotine-dPEG®7-azide pour les saignées n°4 des souris Biozzi 5062 et 5064 (Saignée n°4 : 1/100 000 – Carbapénème-biotine non-hydrolysé : 2,5 ng/mL), les conditions de ces tests sont identiques à celles utilisées précédemment.

La gamme de concentration du méropénème non-hydrolysé est : 20 nmol/mL, 2 nmol/mL, 0,2 nmol/mL, 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL ; 0 nmol/mL et celle de la BSA est: 200 nmol/mL, 20 nmol/mL, 2 nmol/mL, 0,2 nmol/mL, 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL ; 0 nmol/mL.

III.4.1.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats obtenus sont représentés en Figure 100 pour les souris Biozzi 4881 et 5063 (ancien carbapénème-biotine) et pour les souris Biozzi 5062 et 5064 (nouveau carbapénème-biotine).

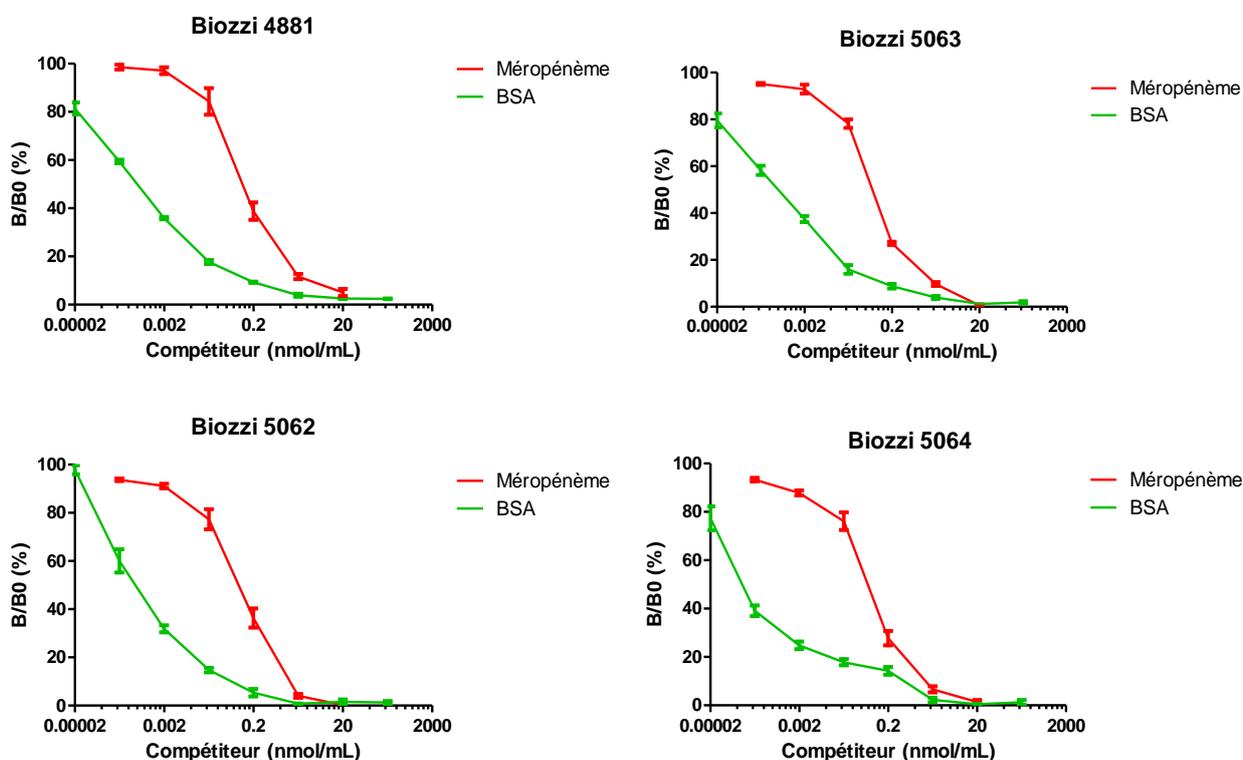


Figure 100 : Les courbes de compétition avec le méropénème non-hydrolysé et la BSA sur les saignées n°4 des souris immunisées avec du carbapénème-BSA.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, 50 μ L carbapénème-biotine non-hydrolysé (ancien marqueur à 20 ng/mL pour les souris Biozzi 4881 et 5063 ; nouveau marqueur à 2,5 ng/mL pour les souris Biozzi 5062 et 5064) est mis en compétition avec soit 50 μ L de méropénème non-hydrolysé (20 nmol/mL ; 2 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL ; 0 nmol/mL), soit 50 μ L de BSA (200 nmol/mL ; 20 nmol/mL ; 2 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL ; 0,00002 nmol/mL ; 0 nmol/mL) vis-à-vis de la reconnaissance par les anticorps sur 50 μ L de la dilution déterminée du dernier prélèvement sanguin de chaque souris. Pour chaque concentration de compétiteur, le pourcentage de déplacement du signal du carbapénème-biotine non-hydrolysé est déterminé.

Pour les quatre souris Biozzi, une inhibition du signal est observée pour des concentrations inférieures en BSA par rapport au méropénème non-hydrolysé. Cela démontre et confirme que le problème des fortes réactions croisées des anticorps avec la BSA n'est pas dû à une mauvaise sélection des hybridomes mais à la structure de l'immunogène.

Il faut noter qu'aucune interférence de la BSA n'avait été mise en évidence lors du développement des tests pour la détection de l'activité céphalosporinase. Il serait intéressant de savoir si cette absence d'interférence pouvait être visualisée au cours de la procédure d'immunisation. Pour ce faire, des tests de compétitions sont réalisés avec les saignées issues des immunisations avec le céfotaxime-BSA, en utilisant le céfotaxime et la BSA comme compétiteur.

III.4.2. Les saignées anti-céfotaxime-BSA

III.4.2.1. Le matériel et les méthodes

Les tests par compétition ont été réalisés dans les conditions déterminées précédemment pour les saignées des souris Biozzi 173, 174, 175 et 176 :

- Souris Biozzi 173 ; Saignée n°3 : 1/100 000 – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé : 1 ng/mL ;
- Souris Biozzi 174 ; Saignée n°3 : 1/100 000 – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé : 10 ng/mL ;
- Souris Biozzi 175 ; Saignée n°3 : 1/200 000 – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé : 3 ng/mL ;
- Souris Biozzi 176 ; Saignée n°3 : 1/200 000 – Céfotaxime-biotine non-hydrolysé : 1 ng/mL.

La gamme de concentration de céfotaxime non-hydrolysé est : 2 nmol/mL, 2 nmol/mL, 0,2 nmol/mL, 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0 nmol/mL, et celle de la BSA est : 20 nmol/mL, 20 nmol/mL, 2 nmol/mL, 0,2 nmol/mL, 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0 nmol/mL.

III.4.2.2. Les résultats et l'interprétation

Les résultats des courbes de compétition avec le céfotaxime et la BSA sur les saignées des quatre souris Biozzi sont représentés en Figure 101.

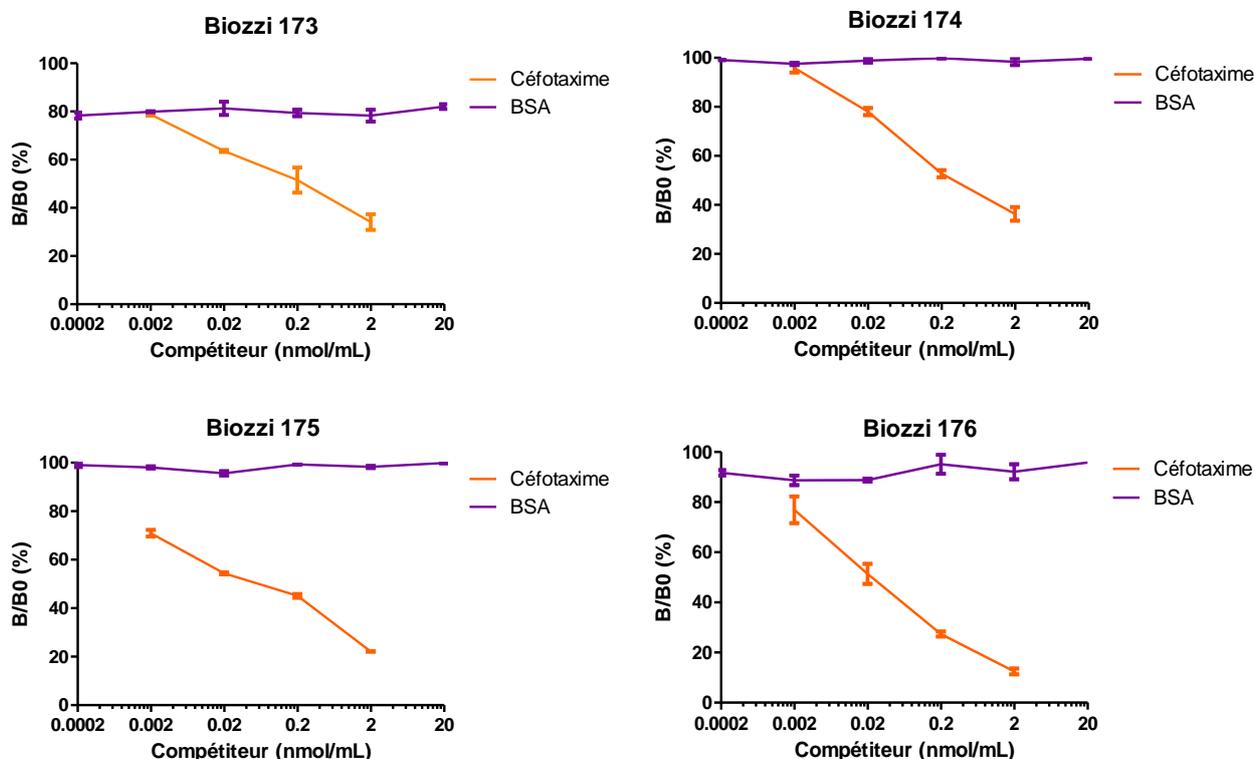


Figure 101 : Les courbes de compétition avec le céfotaxime et la BSA sur les saignées des souris immunisées avec du céfotaxime-BSA.

Protocole : En microplaques 96 puits où du CAS a été immobilisé préalablement, 50 μ L de céfotaxime-biotine non-hydrolysé (souris Biozzi 173 à 176, respectivement 1 ng/mL, 10 ng/mL, 3 ng/mL, 1 ng/mL) est mis en compétition avec soit du céfotaxime non-hydrolysé (2 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL ; 0 nmol/mL), soit de la BSA (20 nmol/mL ; 2 nmol/mL ; 0,2 nmol/mL ; 0,02 nmol/mL ; 0,002 nmol/mL ; 0,0002 nmol/mL ; 0 nmol/mL) vis-à-vis de la reconnaissance par les anticorps sur 50 μ L de la dilution déterminée du dernier prélèvement sanguin de chaque souris. Pour chaque concentration de compétiteur, le pourcentage de déplacement du signal du céfotaxime-biotine non-hydrolysé est déterminé.

Il est observé que contrairement au céfotaxime, la BSA n'induit aucune inhibition du signal. Il n'y a donc aucune reconnaissance de la BSA par les anticorps spécifiques du céfotaxime.

III.4.3. La discussion

Au cours de cette étude, il a été montré que contrairement au carbapénème-BSA, le céfotaxime-BSA permettait l'obtention d'anticorps ne reconnaissant que le céfotaxime. Cela est probablement dû à la plus grande taille du céfotaxime-chloroacétamide (532 Da) par rapport au carbapénème-alcyne (285 Da), qui lui permet d'établir des interactions avec l'ensemble du paratope de l'anticorps. Comme précédemment décrits (264), ces résultats montrent que la taille des molécules est un facteur limitant pour obtenir des anticorps monoclonaux avec une bonne affinité et spécificité.

Pour résoudre ce problème, deux axes d'optimisations sont possibles : **1-** L'ajout d'un connecteur entre le carbapénème-alcyne et la BSA afin d'éloigner les deux molécules et donc favoriser la production d'anticorps monoclonaux reconnaissant uniquement le carbapénème ; **2-** L'utilisation d'un carbapénème de taille supérieure (équivalent à l'ertapénème (475 Da) ou au méropénème (383 Da)). Pour cela, la synthèse d'un nouveau carbapénème avec une fonction réactive pour effectuer le couplage avec une protéine porteuse est nécessaire.

Le premier axe n'a pas été suivi car l'ajout d'un connecteur ne résout pas le problème d'affinité. En effet, la taille de la molécule est toujours trop petite et limitante pour obtenir des anticorps avec de bonnes affinité. Les quantités de carbapénèmes à utiliser dans l'échantillon seraient encore trop importantes car la totalité du paratope de l'anticorps n'interagirait pas uniquement avec le carbapénème.

Le second axe a été favorisé. Un laboratoire a été contacté, le CNRS (UMR 8601, LCBPT, Université Paris Cité), pour la synthèse d'un carbapénème d'une plus grande taille (Figure 102) contenant cette fois-ci le cycle pyrrolidine présent dans la structure du méropénème, de l'ertapénème ou encore du doripénème et une fonction amine permettant le couplage sur une protéine porteuse.

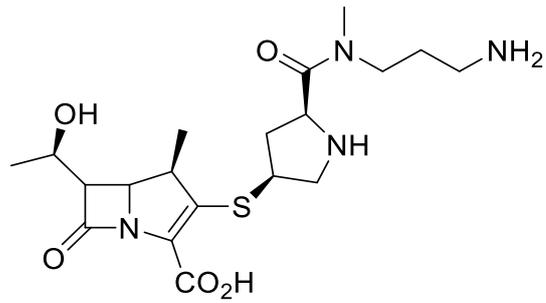


Figure 102 : La structure chimique du nouveau carbapénème utilisé comme futur immunogène

D'autre part, la protéine porteuse utilisée pourra être différente de la BSA, par exemple avec de l'hémocyanine de crustacé (KLH : Keyhole limpet hemocyanin), afin d'éviter de potentielles les réactions croisées avec la BSA contenue dans les différents tampons.

Discussion générale

La résistance aux antibiotiques chez les micro-organismes est un phénomène issu de la pression de sélection. Plus cette pression est présente, et plus le risque d'augmenter la diversité des gènes de résistance chez les bactéries est important. Ainsi, l'usage excessif de ces molécules engendre l'apparition de nouvelles résistances pouvant être retrouvées dans les différents écosystèmes, définis par le concept de « One Health ». Pour les entérobactéries, l'un des principaux mécanismes de résistance est la production de β -lactamases car dans plus de 80 % de cas de traitements d'infection avec ces bactéries, les β -lactamines sont utilisées. Ces bactéries résistantes sont à l'origine d'un taux de mortalité grandissant et estimé à 10 millions de morts en 2050 (265).

Ainsi, la détection rapide et efficace des bactéries résistantes est une étape cruciale pour la bonne gestion de l'utilisation des antibiotiques et le contrôle des infections. Malgré les améliorations technologiques, l'identification des résistances reste complexe et trop longue pour une prise en charge optimale des patients, avec un délai d'obtention des résultats souvent compris entre 24 heures et 48 heures (238).

Le récent développement au laboratoire de tests LFIA pour la détection des mécanismes de résistance aux antibiotiques, en particulier pour les β -lactamases chez les bactéries à Gram négatif, permet maintenant de confirmer de façon facile, rapide et fiable une suspicion de résistance, notamment grâce à la détection des β -lactamases de la famille des CTX-M et des cinq principales carbapénèmases (KPC, VIM, IMP, NDM, OXA-48) (248,251,253,254). Cependant, ces méthodes étant avec « à priori », les tests actuels de détection des β -lactamases pourraient s'avérer inefficaces dans le cas d'apparition de nouvelles enzymes ou de nouveaux variants de l'antibiorésistance, dû à la grande spécificité des anticorps utilisés dans les tests actuels.

Ainsi, pour compléter les tests de détection existants, de nouveaux tests LFIA pour la détection de l'activité enzymatique des β -lactamases ont été développés au cours de cette thèse. La stratégie originale utilisée au cours de ces travaux a fait l'objet d'un dépôt de brevet (résumé de ce brevet en annexe).

Comme décrit dans le projet de thèse et pour atteindre l'objectif de développer ces tests, différentes étapes devaient être réalisées. Parmi celles-ci, l'obtention d'anticorps monoclonaux capables de discriminer la forme non-hydrolysée du cycle β -lactame d'une β -

lactamine de son produit d'hydrolyse, était le plus grand défi. En effet, la faible taille des antibiotiques diminue fortement les possibles interactions entre l'anticorps et sa cible. Ainsi, la production des immunogènes (couplage de l'antibiotique d'intérêt à une protéine porteuse), l'immunisation des souris et la sélection des anticorps monoclonaux représentaient des étapes clés.

Pour le premier immunogène, axé sur la classe des céphalosporines à spectre étendu représenté par le céfotaxime, la diversité des anticorps monoclonaux produits a permis d'obtenir un test ayant une très forte spécificité et affinité pour le céfotaxime non-hydrolysé. A l'heure actuelle, ce test a la capacité de détecter les β -lactamases hydrolysant les céphalosporines à spectre étendu, quelle que soit la bactérie productrice, leur nature ou leur variant. Lors de ces travaux de thèse et avec la collaboration du CNR de la résistance aux antibiotiques (Service de Bactériologie-Hygiène, Hôpital Bicêtre AP-HP, France), une sensibilité >99 % et une spécificité de 100 % ont été obtenues pour la détection des β -lactamases sur colonie bactérienne en 40 minutes (258). Une étude comparative avec trois autres tests a démontré que ce test est le plus performant et le plus simple dans son utilisation et son rendu de résultats, avec un coût compatible pour une utilisation en routine (259). De plus, le multiplexage de cette détection avec la détection de la famille des CTX-M, sans diminuer les performances du test, s'est avéré être un test de confirmation utile, facile, rapide et fiable chez les entérobactéries pour la détection des BLSE de type CTX-M ainsi que les autres β -lactamases capables d'hydrolyser les céphalosporines à spectre étendu (AmpC, BLSE mineures, et certaines carbapénémases) (260). De même, la détection de l'activité enzymatique des β -lactamases sur les céphalosporines à spectre étendu directement dans des échantillons biologiques (urine, hémoculture, milieu de transport d'écouvillons rectaux) à l'aide de ce test et d'un dispositif (SPID) développé au sein du laboratoire est en cours de validation. L'utilisation du système SPID, d'un clip et d'un test rapide permet de simplifier les étapes de traitement d'échantillons et d'améliorer considérablement les performances du test. Ainsi, des limites de détection proches de 1.10^4 UFC/mL sont atteintes pour certaines β -lactamases en urine, seulement une heure après prélèvement de l'échantillon. Il est à noter

que le système SPID a la capacité de stocker et de transporter d'éventuels échantillons. Pour des échantillons cliniques à faibles concentrations bactériennes (entre 1.10^3 à 1.10^5 UFC/mL, selon l'enzyme et l'échantillon biologique), des périodes d'incubation supplémentaires seront probablement à définir pour améliorer la sensibilité du test.

Il est également important de noter que le test révèle la présence d'une β -lactamase par la dégradation du substrat, et ne reflète pas l'efficacité thérapeutique du traitement *in fine* ; il donne uniquement une indication sur la présence d'une activité β -lactamase. Ainsi, le test peut être positif alors que la bactérie est identifiée comme sensible par rapport à une CMI.

D'autres axes de développement de ce test ont été réalisés mais les études n'ont pas été assez approfondies pour établir la capacité du test à répondre au besoin.

L'un des premiers axes est la distinction des différents niveaux d'expression des AmpC qui sont des enzymes très peu détectées dans les tests actuels. La discrimination du niveau d'expression d'AmpC, basal ou surexpression, peut être importante car cela peut impacter le niveau de résistance des bactéries. Les premiers résultats encourageants sur un faible panel de souches (distinction du niveau d'expression d'AmpC à partir d'un certain seuil), devront par la suite être confirmés sur un panel plus large de souches plus important. L'objectif est de déterminer s'il est possible de différencier ces niveaux d'expression avec de bonnes sensibilité et spécificité.

Un autre axe est l'utilisation d'inhibiteur de β -lactamases afin de définir à quelle classe appartient la ou les β -lactamases à détecter. Néanmoins, pour que le résultat soit pertinent, il est souvent nécessaire de réaliser plusieurs tests avec des combinaisons d'inhibiteurs pour définir la classe de la β -lactamase. Ainsi, l'analyse des résultats devient complexe et ces tests perdent leurs principaux avantages : simplicité d'utilisation et rapidité. De plus, l'une des difficultés dans l'analyse de ces résultats est la présence d'autres mécanismes de résistance qui interviennent dans le niveau de résistance des bactéries. Cette constatation est vraie pour l'ensemble des tests basés sur l'hydrolyse de l'antibiotique.

Pour le second immunogène, axé sur la classe des carbapénèmes, la faible masse moléculaire du carbapénème employé n'a pas permis d'obtenir des anticorps suffisamment spécifiques et affins. Ces travaux ont mis en évidence l'effet limitant de la taille d'une molécule utilisée dans l'immunogène pour sa reconnaissance et son interaction avec l'anticorps.

Une nouvelle stratégie consiste à modifier le carbapénème couplé à la protéine porteuse. Basé sur les résultats obtenus au cours de cette thèse, ce nouveau carbapénème possèdera une taille supérieure, équivalente au céfotaxime, permettant ainsi d'augmenter l'affinité et la spécificité des anticorps pour le carbapénème. De même, pour s'assurer de la non-reconnaissance de la protéine porteuse, les dosages par compétition avec cette protéine porteuse sur les saignées et lors de la sélection des anticorps, sera un outil à mettre en place pour favoriser au maximum les chances de réussite.

Ces travaux, qui ouvrent la voie aux futurs tests diagnostiques rapides en antibiorésistance pouvant être basés sur la détection d'une activité enzymatique, s'inscrivent parfaitement dans le concept « One Health » en antibiorésistance qui s'est considérablement développé ces dernières années. Les connexions existantes entre l'homme, l'environnement, la médecine animale, l'alimentation... font que le champ d'application des tests LFIA s'élargit constamment et que des réflexions pour leur utilisation dans le domaine environnemental (contaminations chimiques ou biologiques) et vétérinaire (infections virales ou bactériennes) sont en cours.

Références bibliographiques

1. Stanier RY, van Niel CB. The concept of a bacterium. *Archiv Mikrobiol.* 1 mars 1962;42(1):17-35.
2. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* juin 1990;87(12):4576-9.
3. Tan C, Tomkins J. Information Processing Differences Between Archaea and Eukarya—Implications for Homologs and the Myth of Eukaryogenesis. *Answers Research Journal.* 1 janv 2015;8:121-41.
4. Osiro D, Filho RB, Assis OBG, Jorge LA de C, Colnago LA. Measuring bacterial cells size with AFM. *Braz J Microbiol.* 2012;43(1):341-7.
5. Hiremath P, Bannigidad P, Yelgond S. Identification of Flagellated or Fimbriated Bacterial Cells using Digital Image Processing Techniques. *International Journal of Computer Applications.* 1 déc 2012;59:12-6.
6. Egan AJF, Vollmer W. The physiology of bacterial cell division. *Ann N Y Acad Sci.* janv 2013;1277:8-28.
7. Martínez JE, Vargas A, Pérez-Sánchez T, Encío IJ, Cabello-Olmo M, Barajas M. Human Microbiota Network: Unveiling Potential Crosstalk between the Different Microbiota Ecosystems and Their Role in Health and Disease. *Nutrients.* sept 2021;13(9):2905.
8. Zhang D, Li S, Wang N, Tan HY, Zhang Z, Feng Y. The Cross-Talk Between Gut Microbiota and Lungs in Common Lung Diseases. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020 [cité 3 oct 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00301>
9. Bremer H, Dennis PP. Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates. *EcoSal Plus* [Internet]. 7 oct 2008 [cité 24 oct 2022];3(1). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/ecosal.5.2.3>
10. Levine C, Hiasa H, Marians KJ. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta.* 1 oct 1998;1400(1-3):29-43.
11. Ramakrishnan V. Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell.* 22 févr 2002;108(4):557-72.

12. Facey SJ, Kuhn A. Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell Mol Life Sci.* juill 2010;67(14):2343-62.
13. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* sept 2005;3(9):722-32.
14. Kloesges T, Popa O, Martin W, Dagan T. Networks of Gene Sharing among 329 Proteobacterial Genomes Reveal Differences in Lateral Gene Transfer Frequency at Different Phylogenetic Depths. *Mol Biol Evol.* févr 2011;28(2):1057-74.
15. Muñoz-López M, García-Pérez JL. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Curr Genomics.* avr 2010;11(2):115-28.
16. Merlin C, Toussaint A. Les éléments transposables bactériens. *Med Sci (Paris).* 1999;15(8-9):I.
17. Escudero JA, Loot* C, Nivina A, Mazel D. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiology Spectrum.* 12 mars 2015;3(2):3.2.10.
18. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super-integrans provides an ancestry for multiresistant integrans. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 16 janv 2001;98(2):652-7.
19. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat Rev Microbiol.* sept 2005;3(9):711-21.
20. Hughes VM, Datta N. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature.* avr 1983;302(5910):725-6.
21. Aminov RI. Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. *Front Microbiol* [Internet]. 26 juill 2011 [cité 10 mars 2020];2. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3145257/>
22. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. mai 2010 [cité 8 avr 2020];2(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857177/>
23. Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiol Mol Biol Rev.* déc 2005;69(4):585-607.

24. Parker M, Luu J, Schulte B, Huynh T, Stewart M, Sriram R, et al. Sensing Living Bacteria in Vivo Using α -Alanine-Derived ^{11}C Radiotracers. *ACS Central Science*. 4 févr 2020;XXXX.
25. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev*. 1 sept 2006;30(5):673-91.
26. Bartholomew JW, Mittwer T. The gram stain. *Bacteriol Rev*. mars 1952;16(1):1-29.
27. Rohde M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiology Spectrum*. 24 mai 2019;7(3):7.3.10.
28. Schultz C. Lipopolysaccharide, structure and biological effects. *Gen Int Med Clin Innov* [Internet]. 2018 [cité 9 avr 2020];3(1). Disponible sur: <http://www.oatext.com/lipopolysaccharide-structure-and-biological-effects.php>
29. Bidne KL, Dickson MJ, Ross JW, Baumgard LH, Keating AF. Disruption of female reproductive function by endotoxins. *Reproduction*. 1 avr 2018;155(4):R169-81.
30. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. déc 2003;67(4):593-656.
31. Zhensong W, Zhang JR. Bacterial Capsules. In 2015. p. 33-53.
32. Minamino T, Imada K. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends in Microbiology*. 1 mai 2015;23(5):267-74.
33. Proft T, Baker EN. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci*. févr 2009;66(4):613-35.
34. Setlow P. Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum*. 19 sept 2014;2(5):2.5.11.
35. Meddour R, Amine M, Abdelmadjid L, Abdennour B. La classification bactérienne. 2020.
36. Clardy J, Fischbach M, Currie C. The natural history of antibiotics. *Curr Biol*. 9 juin 2009;19(11):R437-41.
37. Singh SB, Young K, Silver LL. What is an "ideal" antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*. 1 juin 2017;133:63-73.
38. Nemeth J, Oesch G, Kuster SP. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 1 févr 2015;70(2):382-95.

39. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* avr 2014;20(4):O255-266.
40. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* juin 1929;10(3):226-36.
41. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* [Internet]. 2013 [cité 11 oct 2022];12(5). Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/doi:10.1038/nrd3975.epdf>
42. Awad H, El-Shahed KYI, Aziz R, Sarmidi M, El Enshasy H. Antibiotics as Microbial Secondary Metabolites: Production and Application. *Jurnal Teknologi.* 1 janv 2012;59:101-11.
43. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev.* janv 2011;24(1):71-109.
44. Levine C, Hiasa H, Marians KJ. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 1 oct 1998;1400(1):29-43.
45. Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother.* mai 2003;51 Suppl 1:13-20.
46. Kocsis B, Domokos J, Szabo D. Chemical structure and pharmacokinetics of novel quinolone agents represented by avarofloxacin, delafloxacin, finafloxacin, zabofloxacin and nemonoxacin. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 23 mai 2016;15(1):34.
47. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry.* 18 mars 2014;53(10):1565-74.
48. Wehrli W, Staehelin M. Actions of the rifamycins. *Bacteriol Rev.* sept 1971;35(3):290-309.
49. Floss HG, Yu TW. Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem Rev.* févr 2005;105(2):621-32.
50. Romby P, Westhof SM et E. La structure atomique du ribosome en pleine lumière. *Med Sci (Paris).* 1 nov 2009;25(11):977-81.

51. Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol.* 18 janv 2013;8(1):105-15.
52. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1999;43(5):1003-12.
53. Kadurugamuwa JL, Clarke AJ, Beveridge TJ. Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* sept 1993;175(18):5798-805.
54. Begg EJ, Barclay ML. Aminoglycosides--50 years on. *Br J Clin Pharmacol.* juin 1995;39(6):597-603.
55. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* juin 2001;65(2):232-260 ; second page, table of contents.
56. Nathwani D. Tigecycline: clinical evidence and formulary positioning. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 1 mars 2005;25(3):185-92.
57. Dinos GP. The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol.* sept 2017;174(18):2967-83.
58. Mao JCH, Putterman M. Accumulation in Gram-positive and Gram-negative Bacteria as a Mechanism of Resistance to Erythromycin. *J Bacteriol.* mars 1968;95(3):1111-7.
59. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *Journal of Molecular Biology.* 25 juill 2003;330(5):1005-14.
60. Spížek J, Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical Pharmacology.* 1 juin 2017;133:20-8.
61. Hanson AD, Gregory JF. Folate Biosynthesis, Turnover, and Transport in Plants. *Annual Review of Plant Biology.* 2011;62(1):105-25.
62. Masters PA, O'Bryan TA, Zurlo J, Miller DQ, Joshi N. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. *Archives of Internal Medicine.* 24 févr 2003;163(4):402-10.
63. Bushby SRM. Trimethoprim-Sulfamethoxazole: In Vitro Microbiological Aspects. *The Journal of Infectious Diseases.* 1 nov 1973;128(Supplement_3):S442-62.
64. Ovung A, Bhattacharyya J. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophys Rev.* 29 mars 2021;13(2):259-72.

65. Gleckman R, Blagg N, Joubert DW. Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications. *Pharmacotherapy*. août 1981;1(1):14-20.
66. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an « old » class of antibiotics. *Future Microbiol*. juin 2013;8(6):711-24.
67. Abdelraouf K, Braggs KH, Yin T, Truong LD, Hu M, Tam VH. Characterization of polymyxin B-induced nephrotoxicity: implications for dosing regimen design. *Antimicrob Agents Chemother*. sept 2012;56(9):4625-9.
68. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. sept 2006;6(9):589-601.
69. Domingues M, Inácio R, Raimundo J, Martins M, Castanho M, Santos N. Biophysical characterization of polymyxin B interaction with LPS aggregates and membrane model systems. *Biopolymers*. 29 nov 2012;98:338-44.
70. Binda E, Marinelli F, Marcone GL. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics (Basel)*. 4 nov 2014;3(4):572-94.
71. Rybak MJ, Albrecht LM, Boike SC, Chandrasekar PH. Nephrotoxicity of vancomycin, alone and with an aminoglycoside. *J Antimicrob Chemother*. avr 1990;25(4):679-87.
72. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*. janv 2013;24(1):7-17.
73. Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. oct 1965;54(4):1133-41.
74. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 1 mars 2017;90:135-45.
75. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 8 janv 2016;6(8):a025247.
76. Kardos N, Demain AL. Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Appl Microbiol Biotechnol*. nov 2011;92(4):677-87.
77. Wright AJ. The Penicillins. *Mayo Clinic Proceedings*. 1 mars 1999;74(3):290-307.

78. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2011;55(11):4943-60.
79. Bradley JS, Garau J, Lode H, Rolston KVI, Wilson SE, Quinn JP. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 1 févr 1999;11(2):93-100.
80. Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C. Current Status of Newer Carbapenems. *Current Medicinal Chemistry.* 16(5):564-75.
81. Sykes RB, Bonner DP. Aztreonam: The first monobactam. *The American Journal of Medicine.* 8 févr 1985;78(2, Supplement 1):2-10.
82. Neu HC, Fu KP. Clavulanic Acid, a Novel Inhibitor of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 1978;14(5):650-5.
83. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* janv 2010;23(1):160-201.
84. Ravat F, Jault P, Gabard J. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann Burns Fire Disasters.* 31 mars 2015;28(1):13-20.
85. Wahdan HA. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection.* févr 1998;26(1):26-31.
86. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev.* juill 2006;19(3):491-511.
87. Khoruts A, Sadowsky MJ. Therapeutic transplantation of the distal gut microbiota. *Mucosal Immunol.* janv 2011;4(1):4-7.
88. O'Neill J. Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. [Internet]. London: Review on Antimicrobial Resistance.; 2014 [cité 10 oct 2022]. Disponible sur: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf
89. Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, et al. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLOS Pathogens.* 21 juill 2011;7(7):e1002158.

90. Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century--a clinical super-challenge. *N Engl J Med*. 29 janv 2009;360(5):439-43.
91. Perry J, Waglechner N, Wright G. The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. juin 2016 [cité 18 mars 2020];6(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888810/>
92. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* [Internet]. avr 2016 [cité 11 mars 2020];4(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888801/>
93. European Committee on Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST: New S, I and R definitions [Internet]. [cité 10 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.eucast.org/newsiandr>
94. Abraham EP, Chain E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*. déc 1940;146(3713):837-837.
95. One Health initiative [Internet]. [cité 10 oct 2022]. Disponible sur: <https://onehealthinitiative.com/>
96. Destoumieux-Garzón D, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, et al. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front Vet Sci* [Internet]. 12 févr 2018 [cité 12 mai 2020];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5816263/>
97. One Health, une seule santé [Internet]. INRAE Institutionnel. [cité 27 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.inrae.fr/alimentation-sante-globale/one-health-seule-sante>
98. Stratégie nationale 2022-2025 de prévention des infections et de l'antibiorésistance [Internet]. [cité 10 oct 2022]. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/strategie_nationale_2022-2025_prevention_des_infections_et_de_l_antibioresistance.pdf
99. JPIAMR – Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance [Internet]. [cité 10 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.jpiamr.eu/>
100. Global Leaders Group on Antimicrobial Resistance [Internet]. [cité 10 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.amrleaders.org>

101. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2019 [cité 5 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>
102. Piddock LJV. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev.* avr 2006;19(2):382-402.
103. Cattoir V. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie.* 1 déc 2004;52(10):607-16.
104. Ovchinnikov YuA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Lipkin VM, Sverdlov ED, Kiver IF, et al. Primary structure of Escherichia coli RNA polymerase nucleotide substitution in the β subunit gene of the rifampicin resistant rpoB255 mutant. *Mol Gen Genet.* 1 déc 1981;184(3):536-8.
105. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 1995;39(3):577-85.
106. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol.* mai 1984;158(2):513-6.
107. Murphy J, Walshe R. Modeling Antibiotic Resistance in Bacterial Colonies Using Agent-Based Approach. *Understanding the Dynamics of Biological Systems: Lessons Learned from Integrative Systems Biology.* 6 janv 2011;131-54.
108. Flensburg J, Sköld O. Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. *European Journal of Biochemistry.* 1987;162(3):473-6.
109. Doi Y, Arakawa Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases.* 1 juill 2007;45(1):88-94.
110. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 1 janv 2017;32(1):917-9.

111. Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. nov 1987;84(21):7378-82.
112. Jaurin B, Grundström T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A*. août 1981;78(8):4897-901.
113. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 16 mai 1980;289(1036):321-31.
114. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. mars 2010;54(3):969-76.
115. Llarrull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the β -lactams. *Curr Opin Microbiol*. oct 2010;13(5):551-7.
116. Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S, Bingen E. Diagnostic bactériologique des infections gastro-intestinales. *Bactériologie Médicale*. 2016;149-61.
117. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med*. mai 2012;18(5):263-72.
118. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. mars 2008;8(3):159-66.
119. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. oct 2011;17(10):1791-8.
120. Martínez-Martínez L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 janv 2008;14:82-9.
121. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*. 28 janv 2020;8(1):13.
122. Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New β -lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):1835-46.

123. Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care* [Internet]. 12 août 2015 [cité 6 mars 2020];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531117/>
124. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. 1965;208(5007):239-41.
125. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, et al. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol Rev*. mai 2010;34(3):295-316.
126. Chaïbi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother*. avr 1999;43(4):447-58.
127. Matthew M, Hedges RW, Smith JT. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. juin 1979;138(3):657-62.
128. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. janv 2009;22(1):161-82, Table of Contents.
129. Caroff N, Espaze E, Gautreau D, Richet H, Reynaud A. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of Escherichia coli hyperproducing AmpC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 juin 2000;45(6):783-8.
130. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 2002;46(1):1-11.
131. Freitas F, Machado E, Ribeiro TG, Novais Â, Peixe L. Long-term dissemination of acquired AmpC β -lactamases among Klebsiella spp. and Escherichia coli in Portuguese clinical settings. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. avr 2014;33(4):551-8.
132. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. oct 2005;18(4):657-86.
133. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. août 1985;28(2):302-7.

134. Cantón R, Morosini MI, Martin O, de la Maza S, de la Pedrosa EGG. IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 janv 2008;14:53-62.
135. Bauernfeind A, Schweighart S, Grimm H. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1 sept 1990;18(5):294-8.
136. Djamdjian L, Naas T, Tandé D, Cuzon G, Hanrotel-Saliou C, Nordmann P. CTX-M-93, a CTX-M Variant Lacking Penicillin Hydrolytic Activity. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2011;55(5):1861-6.
137. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1 févr 2004;48:1-14.
138. Mendonça J, Guedes C, Silva C, Sá S, Oliveira M, Accioly G, et al. New CTX-M Group Conferring β -Lactam Resistance: A Compendium of Phylogenetic Insights from Biochemical, Molecular, and Structural Biology. *Biology (Basel)*. 7 févr 2022;11(2):256.
139. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. janv 2008;14 Suppl 1:144-53.
140. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol*. août 2013;303(6-7):305-17.
141. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 août 2017;72(8):2145-55.
142. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. mars 2000;44(3):622-32.
143. Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. juin 2006;57(6):1261-2.
144. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Pyrosequencing as a rapid tool for identification of GES-type extended-spectrum beta-lactamases. *J Clin Microbiol*. août 2006;44(8):3008-11.

145. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. Integron-Encoded GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamase with Increased Activity toward Aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2005;49(8):3593-7.
146. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1993;37(5):962-9.
147. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, et al. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* mars 1996;40(3):616-20.
148. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* août 1993;37(8):1637-44.
149. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* avr 2014;27(2):241-63.
150. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 1999;43(3):573-81.
151. Y M, M I. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [Internet]. févr 1999 [cité 12 oct 2022];43(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9925524/>
152. Bonnet R, Sampaio JLM, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, et al. A Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* Isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2000;44(11):3061-8.
153. Poirel L, Brinas L, Verlinde A, Ide L, Nordmann P. BEL-1, a Novel Clavulanic Acid-Inhibited Extended-Spectrum β -Lactamase, and the Class 1 Integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2005;49(9):3743-8.

154. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, et al. TLA-1: a New Plasmid-Mediated Extended-Spectrum β -Lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2000;44(4):997-1003.
155. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 août 1994;91(16):7693-7.
156. Hansen GT. Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Ther.* 1 mars 2021;10(1):75-92.
157. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2001;45(4):1151-61.
158. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* avr 2009;9(4):228-36.
159. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, et al. First Report on a Hyperepidemic Clone of KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel Genetically Related to a Strain Causing Outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2009;53(2):818-20.
160. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2009;53(12):5046-54.
161. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi Metallo- β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis.* janv 2011;17(1):103-6.
162. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases.* 1 sept 2010;10(9):597-602.

163. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 1995;39(4):824-9.
164. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* avr 2005;18(2):306-25.
165. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* juill 2007;20(3):440-58, table of contents.
166. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo- β -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* juill 1999;43(7):1584-90.
167. Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiology.* mars 2011;6(3):317-33.
168. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SGB, Miles RS, Amyes SGB. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 1 févr 1993;2(2):81-7.
169. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* juill 2012;67(7):1597-606.
170. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2004;48(1):15-22.
171. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1993;37(5):939-46.
172. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1990;34(5):755-8.
173. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 1996;40(9):2080-6.

174. Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Molecular Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2004;48(6):2321-4.
175. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2001;45(9):2598-603.
176. Poirel L, Héritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a Chromosome-Encoded SHV β -Lactamase That Compromises the Efficacy of Imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2003;47(2):755-8.
177. Salabi AE, Borra PS, Toleman MA, Samuelsen Ø, Walsh TR. Genetic and Biochemical Characterization of a Novel Metallo- β -Lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* Strain Isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* mai 2012;56(5):2241.
178. Dortet L, Poirel L, Abbas S, Oueslati S, Nordmann P. Genetic and Biochemical Characterization of FRI-1, a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2015;59(12):7420-5.
179. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2004;48(12):4654-61.
180. Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, et al. Genetic and Biochemical Characterization of an Acquired Subgroup B3 Metallo- β -Lactamase Gene, blaAIM-1, and Its Unique Genetic Context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2012;56(12):6154-9.
181. Kim JY, Jung HI, An YJ, Lee JH, Kim SJ, Jeong SH, et al. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C beta-lactamase. *Mol Microbiol.* mai 2006;60(4):907-16.
182. Jousset AB, Oueslati S, Bernabeu S, Takissian J, Creton E, Vogel A, et al. False-Positive Carbapenem-Hydrolyzing Confirmatory Tests Due to ACT-28, a Chromosomally

- Encoded AmpC with Weak Carbapenemase Activity from *Enterobacter kobei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 25 avr 2019;63(5):e02388-18.
183. Antonelli A, D'Andrea MM, Vaggelli G, Docquier JD, Rossolini GM. OXA-372, a novel carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from a *Citrobacter freundii* isolated from a hospital wastewater plant. *J Antimicrob Chemother*. oct 2015;70(10):2749-56.
184. Nendaz MR, Perrier A. Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative d'un test diagnostique. *Revue des Maladies Respiratoires*. 1 avr 2004;21(2):390-3.
185. Schrenzel J. Méthodes pour la détermination des résistances aux antibiotiques. 2018 18:46. 14 nov 2018;18(46):950-6.
186. Cason C, D'Accolti M, Soffritti I, Mazzacane S, Comar M, Caselli E. Next-generation sequencing and PCR technologies in monitoring the hospital microbiome and its drug resistance. *Front Microbiol*. 28 juill 2022;13:969863.
187. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2017 [cité 13 oct 2022];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00108>
188. Singh P, Pfeifer Y, Mustapha A. Multiplex real-time PCR assay for the detection of extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase genes using melting curve analysis. *J Microbiol Methods*. mai 2016;124:72-8.
189. Dortet L, Fusaro M, Naas T. Improvement of the Xpert Carba-R Kit for the Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 23 mai 2016;60(6):3832-7.
190. Nayak G, Behera B, Mahapatra A, Tripathy S, Biswal J. Molecular Detection of Carbapenemase Enzymes Directly from Positive Blood Cultures Using Xpert Carba-R. *J Lab Physicians*. 19 avr 2022;14(3):365-8.
191. Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, Dodgson A, McEwan A, Humphries R, et al. Multisite Evaluation of Cepheid Xpert Carba-R Assay for Detection of Carbapenemase-Producing Organisms in Rectal Swabs. *J Clin Microbiol*. juill 2016;54(7):1814-9.
192. Zabicka D, Strzelecki J, Wozniak A, Strzelecki P, Sadowy E, Kuch A, et al. Efficiency of the Cepheid Xpert vanA/vanB assay for screening of colonization with vancomycin-resistant

- enterococci during hospital outbreak. *Antonie Van Leeuwenhoek*. mars 2012;101(3):671-5.
193. OH AC, LEE JK, LEE HN, HONG YJ, CHANG YH, HONG SI, et al. Clinical utility of the Xpert MRSA assay for early detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Med Rep*. janv 2013;7(1):11-5.
194. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother*. août 2012;67(8):1865-9.
195. Angers A, Petrillo M, Patak A, Querci M, Van den Eede G. The role and implementation of next-generation sequencing technologies in the coordinated action plan against antimicrobial resistance. 2017.
196. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2008;9(1):387-402.
197. Revez J, Espinosa L, Albiger B, Leitmeyer KC, Struelens MJ, ECDC National Microbiology Focal Points and Experts Group. Survey on the Use of Whole-Genome Sequencing for Infectious Diseases Surveillance: Rapid Expansion of European National Capacities, 2015-2016. *Front Public Health*. 2017;5:347.
198. Branton D, Deamer DW, Marziali A, Bayley H, Benner SA, Butler T, et al. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*. oct 2008;26(10):1146-53.
199. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Littauer P, et al. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS*. déc 2004;112(11-12):815-37.
200. Haut Conseil de la Santé Publique. Prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination [Internet]. Rapport de l'HCSP. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique; 2010 févr [cité 27 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=162>

201. McFarland J. The nephelometer - an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccine. *JAMA*. 5 oct 1907;XLIX(14):1176-8.
202. Société Française de Microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie - Recommandations 2021 [Internet]. Société Française de Microbiologie. 2021 [cité 14 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.sfm-microbiologie.org/2021/04/23/casfm-avril-2021-v1-0/>
203. Microbiologie clinique. Antibiogramme | Protocole | Interprétation [Internet]. [cité 22 oct 2022]. Disponible sur: <https://microbiologie-clinique.com/antibiogramme.html>
204. Zwaluw K van der, Haan A de, Pluister GN, Bootsma HJ, Neeling AJ de, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. *PLOS ONE*. 23 mars 2015;10(3):e0123690.
205. Gauthier L, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. Retrospective and prospective evaluation of the Carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *PLOS ONE*. 3 févr 2017;12(2):e0170769.
206. Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, Fossati L, Cavallo R, Costa C. Direct β -Lactam Inactivation Method: a New Low-Cost Assay for Rapid Detection of Carbapenemase- or Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriales Directly from Positive Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol*. 23 déc 2019;58(1).
207. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2017;55(8):2321-33.
208. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*. oct 1991;29(10):2197-203.
209. Girlich D, Halimi D, Zambardi G, Nordmann P. Evaluation of Etest® strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 nov 2013;77(3):200-1.

210. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 avr 2014;20(4):345-9.
211. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 avr 2011;17(4):552-6.
212. Jeremiah S, Balaji V, Anandan S, Sahni R. A possible alternative to the error prone modified Hodge test to correctly identify the carbapenemase producing Gram-negative bacteria. *Indian Journal of Medical Microbiology*. oct 2014;32(4):414-8.
213. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*. janv 2008;14 Suppl 1:90-103.
214. Willems E, Cartuyvels R, Magerman K, Verhaegen J. Evaluation of 3 different agar media for rapid detection of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from surveillance samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. mai 2013;76(1):16-9.
215. Perry JD. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clin Microbiol Rev*. avr 2017;30(2):449-79.
216. Amjad A, Mirza I, Abbasi S, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran J Microbiol*. déc 2011;3(4):189-93.
217. Datta S, Dey R, Dey JB, Ghosh S. A comparative study of modified Hodge test and Carba NP test for detecting carbapenemase production in Gram-negative bacteria. *Medical Journal of Dr DY Patil University*. 7 janv 2017;10(4):365.
218. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. févr 2012;50(2):477-9.

219. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* sept 2012;18(9):1503-7.
220. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* nov 2015;70(11):3014-22.
221. Österblad M, Hakanen AJ, Jalava J. Evaluation of the Carba NP Test for Carbapenemase Detection. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2014;58(12):7553-6.
222. Pires J, Novais Â, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *J Clin Microbiol.* déc 2013;51(12):4281-3.
223. Novais Â, Brilhante M, Pires J, Peixe L. Evaluation of the Recently Launched Rapid Carb Blue Kit for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol.* sept 2015;53(9):3105-7.
224. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, Decré D, et al. Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic β Carba Test. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 déc 2016;54(12):3065-8.
225. Bernabeu S, Dortet L, Naas T. Evaluation of the β -CARBA™ test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother.* 01 2017;72(6):1646-58.
226. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* sept 2012;50(9):3016-22.
227. Poirel L, Fernández J, Nordmann P. Comparison of Three Biochemical Tests for Rapid Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* févr 2016;54(2):423-7.
228. Renvoisé A, Decré D, Amarsy-Guerle R, Huang TD, Jost C, Podglajen I, et al. Evaluation of the β Lacta Test, a Rapid Test Detecting Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Strains of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* déc 2013;51(12):4012-7.

229. Ghavami A, Labbé G, Brem J, Goodfellow VJ, Marrone L, Tanner CA, et al. Assay for drug discovery: Synthesis and testing of nitrocefin analogues for use as β -lactamase substrates. *Analytical Biochemistry*. 1 oct 2015;486:75-7.
230. Carbonnelle É, Nassif X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *Med Sci (Paris)*. oct 2011;27(10):882-8.
231. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β -Lactam Antibiotics. *J Clin Microbiol*. mars 2012;50(3):927-37.
232. Oviaño M, Rodicio MR, Heinisch JJ, Rodicio R, Bou G, Fernández J. Analysis of the Degradation of Broad-Spectrum Cephalosporins by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae Using MALDI-TOF MS. *Microorganisms*. 26 nov 2019;7(12).
233. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol*. juill 2015;53(7):2163-71.
234. Mirande C, Canard I, Buffet Croix Blanche S, Charrier JP, van Belkum A, Welker M, et al. Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. nov 2015;34(11):2225-34.
235. Takeuchi D, Akeda Y, Sugawara Y, Sakamoto N, Yamamoto N, Shanmugakani RK, et al. Establishment of a dual-wavelength spectrophotometric method for analysing and detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Rep [Internet]*. 24 oct 2018 [cité 1 avr 2020];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6200816/>
236. Bogaerts P, Yunus S, Massart M, Huang TD, Glupczynski Y. Evaluation of the BYG Carba Test, a New Electrochemical Assay for Rapid Laboratory Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. févr 2016;54(2):349-58.
237. Bogaerts P, Oueslati S, Meunier D, Nonhoff C, Yunus S, Massart M, et al. Multicentre evaluation of the BYG Carba v2.0 test, a simplified electrochemical assay for the rapid

- laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Scientific Reports*. 30 août 2017;7(1):1-8.
238. Shanmugakani RK, Srinivasan B, Glesby MJ, Westblade LF, Cárdenas WB, Raj T, et al. Current state of the art in rapid diagnostics for antimicrobial resistance. *Lab Chip*. 28 juill 2020;20(15):2607-25.
239. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol*. 1 mars 2005;174(5):2453-5.
240. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 30 juin 2016;60(1):111-20.
241. Di Nardo F, Chiarello M, Cavallera S, Baggiani C, Anfossi L. Ten Years of Lateral Flow Immunoassay Technique Applications: Trends, Challenges and Future Perspectives. *Sensors (Basel)*. 30 juill 2021;21(15):5185.
242. Yetisen AK, Akram MS, Lowe CR. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip*. 2013;13(12):2210.
243. O'Farrell B. Lateral Flow Technology for Field-Based Applications—Basics and Advanced Developments. *Topics in Companion Animal Medicine*. 1 déc 2015;30(4):139-47.
244. Bahadır EB, Sezgintürk MK. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 sept 2016;82:286-306.
245. Urusov AE, Zherdev AV, Dzantiev BB. Towards Lateral Flow Quantitative Assays: Detection Approaches. *Biosensors (Basel)* [Internet]. 17 juill 2019 [cité 6 mars 2020];9(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6784366/>
246. Leung W, Chan CP, Rainer TH, Ip M, Cautherley GWH, Renneberg R. InfectCheck CRP barcode-style lateral flow assay for semi-quantitative detection of C-reactive protein in distinguishing between bacterial and viral infections. *Journal of Immunological Methods*. 20 juill 2008;336(1):30-6.
247. Products of Coris BioConcept: Immunochromatography, Dipstick, Cassettes, Gravity Driven Test [Internet]. [cité 20 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.corisbio.com/products/>
248. Kolenda C, Benoit R, Carricajo A, Bonnet R, Dauwalder O, Laurent F. Evaluation of the New Multiplex Immunochromatographic O.K.N.V. K-SeT Assay for Rapid Detection of

- OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM Carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*. 25 oct 2018;56(11):e01247-18.
249. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y, et al. Rapid Identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli with a Novel Immunochromatographic Lateral Flow Assay. *J Clin Microbiol*. 2016;54(11):2832-6.
250. Era-bio. Product of carbapenem-resistant - LFIA [Internet]. [cité 20 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.era-bio.com/cate-4674-8031.html>
251. Sadek M, Bouvier M, Kerbol A, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of novel immunological rapid test (K.N.I.V.O. Detection K-Set) for rapid detection of carbapenemase producers in multidrug-resistant gram negatives. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 déc 2022;104(4):115761.
252. NG Biotech. Antimicrobial resistance [Internet]. NG Biotech. [cité 20 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.ngbiotech.com/antibiotic-resistance/>
253. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G, et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 1 avr 2018;73(4):909-15.
254. Bernabeu S, Ratnam KC, Boutal H, Gonzalez C, Vogel A, Devilliers K, et al. A Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Identification of CTX-M-Producing Enterobacterales from Culture Plates and Positive Blood Cultures. *Diagnostics*. oct 2020;10(10):764.
255. Doria G, Agarossi G, Biozzi G. In vitro immune response of spleen cells from mice genetically selected for high or low antibody production. *Immunology*. juin 1978;34(6):999-1005.
256. Demord A, Poirel L, D'Emidio F, Pomponio S, Nordmann P. Rapid ESBL NP Test for Rapid Detection of Expanded-Spectrum β -Lactamase Producers in Enterobacterales. *Microb Drug Resist*. août 2021;27(8):1131-5.
257. Rodríguez JC, Hernández R, González M, Rodríguez Z, Tolón B, Velez H, et al. An improved method for preparation of cefpodoxime proxetil. *Farmaco*. mai 2003;58(5):363-9.

258. Moguet C, Gonzalez C, Sallustrau A, Gelhaye S, Naas T, Simon S, et al. Detection of expanded-spectrum cephalosporin hydrolysis by lateral flow immunoassay. *Microbial Biotechnology* [Internet]. 15 févr 2022 [cité 10 nov 2021];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1751-7915.13892>
259. Gonzalez C, Moguet C, Chalin A, Oueslati S, Dortet L, Simon S, et al. Comparison of Three Expanded-Spectrum Cephalosporin Hydrolysis Assays and the NG-Test CTX-M Multi Assay That Detects All CTX-M-Like Enzymes. *Diagnostics (Basel)*. 14 janv 2022;12(1):197.
260. Moguet C, Gonzalez C, Naas T, Simon S, Volland H. Multiplex Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Expanded-Spectrum Hydrolysis and CTX-M Enzymes. *Diagnostics (Basel)*. 13 janv 2022;12(1):190.
261. Volland H, Ballesté-Delpierre C, Szabó D, Gonzalez C, Takissian J, Aszalos AZ, et al. Rapid detection of CTX-M-type ESBLs and carbapenemases directly from biological samples using the BL-DetecTool. *J Antimicrob Chemother*. 30 sept 2022;77(10):2867-75.
262. Saidjalolov S, Braud E, Edoó Z, Iannazzo L, Rusconi F, Riomet M, et al. Click and Release Chemistry for Activity-Based Purification of β -Lactam Targets. *Chemistry*. 17 mai 2021;27(28):7687-95.
263. Iannazzo L, Soroka D, Triboulet S, Fonvielle M, Compain F, Dubée V, et al. Routes of Synthesis of Carbapenems for Optimizing Both the Inactivation of L,D-Transpeptidase LdtMt1 of *Mycobacterium tuberculosis* and the Stability toward Hydrolysis by β -Lactamase BlaC. *J Med Chem*. 14 avr 2016;59(7):3427-38.
264. Guesdon JL, Chevrier D, Mazié JC, David B, Avrameas S. Monoclonal anti-histamine antibody. Preparation, characterization and application to enzyme immunoassay of histamine. *J Immunol Methods*. 27 févr 1986;87(1):69-78.
265. Public Health England. Contained and controlled: the UK's 20-year vision for antimicrobial resistance. 2019 janv p. 19.

Annexes

Méthodes	Tests	Produits	Coût/test	Temps	Performances intrinsèques (variables entre études)	Information(s) fournie(s)	Simplicité de réalisation	Principale(s) limite(s)
Génotypiques	Amplification génique	Xpert® Carba-R (189-191)	~35€	1-2h	Hautes	Distingue les cinq principales carbapénémases	Equipe ment nécessaire + expertise importante nécessaire	Nouveaux variants non-détectés
		Check-MDR CT-103® (194)	~80€	7h	Hautes	Distingue les cinq principales carbapénémases + les BLSE + les céphalosporines plasmidiques	Equipe ment nécessaire + expertise importante nécessaire	Nouveaux variants non-détectés
	Séquençage	Séquençage génome (196-198)	~500€	Oqles heures – Oqles jours	Hautes	Tous gènes de résistance (nouveaux et anciens)	Equipe ment nécessaire + expertise importante nécessaire	Coût de la technique et délai des résultats
Phénotypiques	Les tests de sensibilité aux antimicrobiens basés sur l'activité des β-lactamases	Antibiogramme classique (202)	~5€	16-24h	Hautes	Orienté vers BLSE ou carbapénémases	Peu d'expertise nécessaire	Accumulation d'une grande quantité d'informations
		Le test d'inactivation des carbapénèmes (206,207)	~1-2€	6h	Moyennes à hautes	Orienté vers BLSE ou carbapénémases	Peu d'expertise nécessaire	Variabilité des zones d'inhibition → FN
		Etest® (209)	~6€	16-24h	Hautes	Orienté vers BLSE ou carbapénémases	Peu d'expertise nécessaire	Difficulté à détecter les enzymes de type OXA-48 + certains inhibiteurs peu efficaces
		Disques combinés/Double synergie (210,213)	~1-2€	16-24h	Hautes	Orienté vers BLSE ou carbapénémases	Peu d'expertise nécessaire	Diffusion des antibiotiques variable + certains inhibiteurs peu efficaces + zones d'interprétations douteuses
		Milieux chromogénique (215)	~1€	16-24h	Moyennes à hautes	Orienté vers BLSE ou carbapénémases	Peu d'expertise nécessaire	Non-détection des enzymes avec une activité faible
		Le test de Hodge modifié (218)	~1€	16-24h	Moyennes à hautes	Orienté vers BLSE ou carbapénémases	Expertise moyenne nécessaire	Apparition de FP récurrente + Difficulté à détecter les MBLs
		Carba NP (219-221)	~1-2€	2h	Moyennes à hautes	Orienté vers carbapénémases	Expertise moyenne nécessaire	Aucune standardisation → Interprétation faussée (FN possible)
		Blue Carba (222,223)	~1-2€	2h	Hautes	Orienté vers carbapénémases	Expertise moyenne nécessaire	Aucune standardisation → Interprétation faussée (FN possible)
		β-Carba™ (224,225)	~2€	0,5h	Hautes	Orienté vers carbapénémases	Peu d'expertise nécessaire	Incubation >0,5h pour des souches avec des enzymes de type OXA-48
		ESBL NDP (226,227)	~1-2€	2h	Hautes	Orienté vers BLSE	Expertise moyenne nécessaire	Aucune standardisation → Interprétation faussée (FN possible)
		β-Lacta™ (227,228)	~2€	0,25h	Hautes	Orienté vers BLSE	Peu d'expertise nécessaire	Surexpression d'AmpC peut amener à de FP
		Spectrométrie de masse (231,233,234)	ND	0,5-3h	Hautes	Orienté vers BLSE ou carbapénémases	Equipe ment nécessaire + expertise importante nécessaire	Visualisation des produits de dégradation parfois problématique
		Spectroscopie ultra-violet (235)	ND	1h	Hautes	Orienté vers BLSE ou carbapénémases	Equipe ment nécessaire + expertise importante nécessaire	Présence d'interférences + standardisation des DO difficile
	BYG Carba (236,237)	ND	0,5h	Hautes	Orienté vers carbapénémases	Equipe ment nécessaire + expertise importante nécessaire	Pas de kit commercialisé, ni d'évaluation de la technique	
	Les tests LFIA basés sur la détection des β-lactamases	RESIST (Coris) (247-249)	15 à 20 €	0,25h	Hautes	Quatre des quatre principales carbapénémases en deux tests (VIM, OXA-48, NDM, KPC)	Peu d'expertise nécessaire	Ne détecte pas les enzymes de type IMP, ni tous les nouveaux variants + utilisation de 2 tests
Carbapenem-resistant detection K-Set (Eria-bio) (250,251)		ND	0,25h	Hautes	Les cinq carbapénémases en deux tests (VIM, IMP, OXA-48, NDM, KPC)	Peu d'expertise nécessaire	Ne détecte pas tous les nouveaux variants + utilisation de 2 tests	
NG-Test (NG Biotech) (252-254)		20 à 25 €	0,25h	Hautes	Les cinq carbapénémases en un test + CTX-M	Peu d'expertise nécessaire + utilisation d'un test unique	Ne détecte pas tous les nouveaux variants	

Annexe 1 : Un tableau récapitulatif des méthodes génotypiques et phénotypiques de détection de la résistance aux β-lactamines.

Descriptif : Un tableau récapitulatif du coût, du temps, des performances intrinsèques, des information(s) fournie(s), de la simplicité de la réalisation et de(s) principale(s) limite(s) de chaque test de détection des β-lactamases ; Performances intrinsèques hautes : > 90 % ; moyenne : 70-90 % ; basse : < 70 % ; (FN : Faux négatif, FP : Faux positif, MBL : Métallo-β-lactamase, DO : densité optique, h : heure ; ND : Non déterminé).

Revue II



Metabolomics for personalized medicine: the input of analytical chemistry from biomarker discovery to point-of-care tests

Florence Anne Castelli^{1,2} · Giulio Rosati³ · Christian Moguet¹ · Celia Fuentes³ · Jose Marrugo-Ramírez³ · Thibaud Lefebvre^{1,4,5} · Hervé Volland¹ · Arben Merkoçi³ · Stéphanie Simon¹ · François Fenaille^{1,2} · Christophe Junot^{1,2}

Received: 22 June 2021 / Revised: 24 July 2021 / Accepted: 27 July 2021 / Published online: 25 August 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Metabolomics refers to the large-scale detection, quantification, and analysis of small molecules (metabolites) in biological media. Although metabolomics, alone or combined with other omics data, has already demonstrated its relevance for patient stratification in the frame of research projects and clinical studies, much remains to be done to move this approach to the clinical practice. This is especially true in the perspective of being applied to personalized/precision medicine, which aims at stratifying patients according to their risk of developing diseases, and tailoring medical treatments of patients according to individual characteristics in order to improve their efficacy and limit their toxicity. In this review article, we discuss the main challenges linked to analytical chemistry that need to be addressed to foster the implementation of metabolomics in the clinics and the use of the data produced by this approach in personalized medicine. First of all, there are already well-known issues related to untargeted metabolomics workflows at the levels of data production (lack of standardization), metabolite identification (small proportion of annotated features and identified metabolites), and data processing (from automatic detection of features to multi-omic data integration) that hamper the inter-operability and reusability of metabolomics data. Furthermore, the outputs of metabolomics workflows are complex molecular signatures of few tens of metabolites, often with small abundance variations, and obtained with expensive laboratory equipment. It is thus necessary to simplify these molecular signatures so that they can be produced and used in the field. This last point, which is still poorly addressed by the metabolomics community, may be crucial in a near future with the increased availability of molecular signatures of medical relevance and the increased societal demand for participatory medicine.

Keywords Metabolomics · Biomarkers · Personalized medicine · Precision medicine · Point-of-care tests · Immunoassays · Biosensors

Published in the topical collection *Recent Trends in (Bio)Analytical Chemistry* with guest editors Antje J. Baeumner and Günter Gauglitz.

✉ Christophe Junot
christophe.junot@cea.fr

¹ Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (MTS), Gif-sur-Yvette cedex 91191, France

² MetaboHUB, Gif-sur-Yvette, France

³ Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2), Edifici ICN2 Campus UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

⁴ Centre de Recherche sur l'Inflammation/CRI, Université de Paris, Insem, Paris, France

⁵ CRMR Porphyrie, Hôpital Louis Mourier, AP-HP Nord - Université de Paris, Colombes, France

Introduction

“Omics” analyses are based on the use of large-scale data production techniques (such as nucleic acid sequencing or mass spectrometry). These, coupled with data mining and interpretation tools based on mathematics, statistical analyses, and bioinformatics, make it possible to analyze and understand a system or living organism as a whole, at the different levels of its biological organization (i.e., genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics for the sets of genes, transcripts, proteins, and metabolites, respectively).

Metabolomics has emerged in the late 1990s, following the development of proteomics [1]. It deals with the detection, identification, and quantification of the small molecular weight compounds present in a given biological medium.

The metabolome includes all the compounds of low molecular weight (< 1000 Da or < 1500 Da according to the definitions) that are present in a biological sample, and excludes biological polymers such as proteins or nucleic acids [2]. Such metabolites can be molecules involved in the ubiquitous reactions by which the cells of an organism produce and use energy, as for example amino acids, sugars, nucleotides, or fatty acids. Some other kinds of metabolites can be synthesized by any given biological species for achieving particular biological functions, as for example glucocorticoids or neurotransmitters in mammals, or alkaloids in plants. Xenobiotics (i.e., chemicals which are found in living organisms, but not produced by them) such as drugs and pollutants and their metabolites are also part of the metabolome since they are present in biological media and can be detected by the analytical chemistry tools that are used for metabolomics [3]. This highlights that metabolites are of different origins and come not only from the cellular metabolism, but also from the microbiota, food and drinks, drug intake, and environment. This makes metabolomics an efficient tool to track interactions between a living organism and its environment. However, many metabolites are still uncharacterized due to their large chemical diversity and to insufficient knowledge about metabolism. As a matter of fact, it is estimated that less than 5% of the features detected in biological media using mass spectrometry-based metabolomics methods are annotated [4].

Metabolomics is thus far more complex than the metabolic pathways displayed in metabolic biochemistry textbooks. It is indeed impossible to know exactly how many metabolites compose the metabolomes of living organisms, whereas theoretical proteomes can be more readily inferred from genomic data. Furthermore, as metabolites exhibit a huge chemical diversity, ranging from polar and hydrophilic compounds such as sugar derivatives to apolar and hydrophobic molecules such as lipids, there is no universal method for metabolome analysis. Consequently, the detection of metabolites relies on complementary methods that have to be run in parallel to achieve optimal metabolome coverage [5]. The two main technologies for metabolomics data production are based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS). The latter can be used as a standalone technique (i.e., direct introduction mass spectrometry) or coupled with gas chromatography (GC-MS), liquid chromatography (LC-MS), or capillary electrophoresis (CE-MS).

There are two main kinds of metabolomics approaches: targeted and untargeted (or global) ones. Untargeted approaches seek to detect as many compounds as possible in samples. Such compounds can be known metabolites, putatively annotated metabolites, or unknown ones. In this case, metabolite concentrations are given in a semi-quantitative manner (relative quantification). This means that metabolite concentrations are expressed as arbitrary units or ion intensities. In untargeted MS-based metabolomics, metabolite

abundances are generally provided in chromatographic peak areas. Those peak areas highly depend on the LC-HRMS conditions and thus remain linked to a dataset and are difficult to be directly compared with those from other metabolomics profiling experiments performed at different time periods or within different laboratories. The most used detection methods for global metabolomics approaches are NMR, GC/MS, and liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS). These untargeted approaches are used especially in the first steps of biomarker discovery. Conversely, targeted approaches are focused on a limited number of compounds, belonging to a given chemical class or metabolic pathway. They can be more sensitive than untargeted approaches and can provide, if needed, absolute quantification with results expressed in molarity units. They can be used for mechanistic purposes (in the frame of fluxomic experiments, for example) or for biomarker validation following untargeted approaches [6, 7].

Metabolomics workflows, including sample preparation, MS and/or NMR analyses, data pre-processing, statistical analyses, and data visualization, have been developed since the 2000s and have now reached a certain level of maturity. Nowadays, metabolomics is considered as a tool in its own right and is used in systems biology projects in many biological fields, such as environmental research [8], plant science [9, 10], nutrition, animal and human health [11, 12], etc. In particular, this is the case in the field of biomedical research, for which systems biology has given rise to systems medicine, a systems approach to health and diseases paving the way to personalized medicine.

Personalized medicine highlights the importance of the individuals' characteristics in the response to treatment. This concept has been developed with the improvement of our knowledge, which makes it possible to define pathologies more precisely. According to Leroy Hood, one of the pioneers of this approach, personalized medicine promises to (i) provide deep insights into disease mechanisms, (ii) make blood a diagnostic window for viewing health and disease of an individual, (iii) stratify complex diseases into subtypes, (iv) provide new approaches to drug target discovery, and (v) generate metrics for assessing wellness. Thus, medicine aims at being *preventive*, *predictive*, *personalized*, and *participatory*, referred to as the concept of "P4 medicine" [13]. This approach is particularly relevant in the field of chronic and non-communicable diseases for which it is often difficult to grasp the transition from the healthy to the disease status. In this context, Sagner et al. have proposed a "P4 health continuum model" with 4 stages of health, namely the A, B, C, and D stages, corresponding respectively to an apparently healthy state, the emergence of chronic disease signs (such as elevated blood pressure or dyslipidemia), the emergence of chronic disease symptoms, and the confirmed chronic disease diagnosis, respectively [14].

Research and development in biomarker discovery are central in modern healthcare for personalized and precision medicine. Omics approaches can be regarded as particularly relevant and useful tools to identify new molecular biomarkers or sets of biomarkers to improve the diagnosis and prognosis of various diseases as well as to evaluate treatment efficacy. In this context, metabolomics represents an attractive strategy for profiling a large panel of low molecular weight molecules in patient samples and for pointing out relevant molecules closely related to (patho)physiological conditions and treatment response phenotypes. However, over the last ten years, the number of biomarkers derived from omics-based approaches, approved by regulatory agencies and used in clinical settings, remains far from expectations [15]. This often makes people perceive metabolomics and other omics as over-promising and/or under-delivering approaches when applied to clinical questions [16]. Despite the publication in the last two decades of more than 2000 scientific papers using MS-based metabolomics for human disease diagnostics, no diagnostic test based on metabolomics has yet reached the clinics [17]. There are several reasons and explanations for this observation, the most frequently cited being the difficulty to integrate multiscale biological information to generate knowledge and predictive models [13, 16], the inappropriate design of clinical trials with an often too small number of patients, together with a lack of validation cohorts [16, 18], but also due to issues at the level of data acquisition, i.e., analytical chemistry. Indeed, the lack of standardization of the data production methods, together with the expression of results in a semi-quantitative manner, are frequently highlighted as factors preventing the sharing and reuse of metabolomics data, and their integration into multi-omics models [16, 18]. Anyway, while a growing number of studies report on metabolic signatures for the diagnosis and monitoring of pathologies, responses or non-responses to treatments, it is now necessary to consider converting these complex and multiparametric signatures into reliable assays, with appropriate costs of sample analysis, that could be run in medical biology laboratories and even point-of-care tests, which are part of the participative dimension of personalized medicine. These aspects, which fully deal with analytical chemistry, are still poorly addressed within the metabolomics research community.

In this context, this review deals with the main challenges linked to analytical chemistry that need to be overcome to foster the implementation of metabolomics in personalized medicine and in clinical practice, from data production for biomarker discovery and validation, to the translation of metabolomics signatures into assays for medical laboratories and point-of-care tests.

Metabolomics for personalized medicine: more standardized and sharable metabolomics datasets are still required

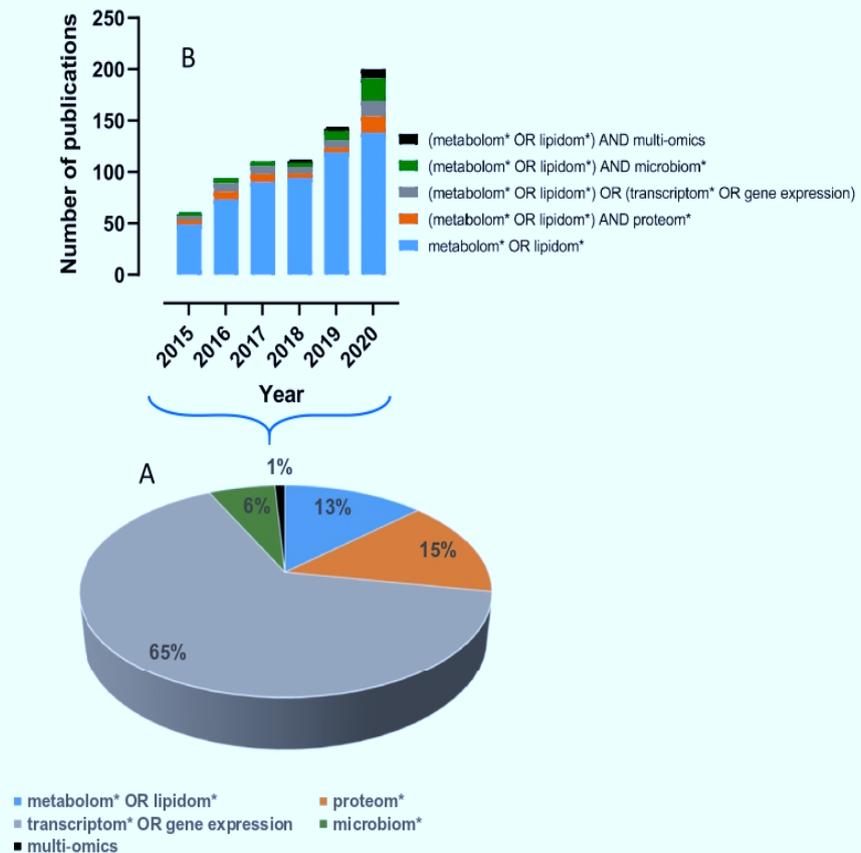
Several recent reviews have already addressed clinical applications of metabolomics in various fields such as oncology, cardiology, neurology, diabetes, kidney and liver diseases, and also response to treatments (aspirin, simvastatin, or anti-hypertensive drugs) [16, 18–21].

In their article entitled “Metabolomics for the masses: the future of metabolomics in a personalized world,” Trivedi et al. have discussed on the current positioning of metabolomics and on its future in a context of personalized medicine and, more generally speaking, healthcare. They have listed around one hundred metabolomics studies proposing biomarkers of various pathologies and published between 2000 and 2017. The authors pointed out limitations at different levels: data production with a lack of interoperability and methodological validation, poor experimental design with many studies dealing with less than one hundred subjects (leading to a lack of statistical robustness and validity), with the absence of replication/validation cohorts. Finally, stating that mass spectrometry-based approaches are not suitable for large-scale screening of a very large population due to their low throughput and high price, they consider alternative analytical chemistry tools accessible to non-specialist end users, such as lateral flow devices, dipstick approaches, or breath measurements of volatiles [18].

The same conclusions are presented in the position paper of Pinu et al., which summarizes the discussions on translational metabolomics undertaken during the peer session of the Australian and New Zealand Metabolomics conference in 2018. In addition to issues related to the lack of standardization of data acquisition protocols and to partial identification and too limited annotation of datasets, these authors also emphasized the insufficient recognition of metabolomics by funding agencies, the difficulty of gathering multiple fields of expertise within a given group, and the necessity to develop routine tests and portable devices [16].

A search in the PubMed database (March 2021) over the 2015–2020 period with keywords related to the main omics techniques, combined with the terms “disease*,” “*marker* or signature*,” and “patients,” and restricted to the occurrence of these words in titles and/or abstracts, yielded 4874 publications. As shown in Fig. 1(A), the bulk of these studies involves transcriptomic analyses. Of these, the contribution of metabolomics or lipidomics analyses amounts to 13%, that of proteomic analyses to 15%, while approaches linked to microbiome and multi-omic analyses are emerging. Figure 1(B) displays the number of publications mentioning the use of metabolomics or lipidomics alone or with other omics approaches. A fourfold increase in the number of publications referring to metabolomics has been observed

Fig. 1 Omics technologies for biomarker discovery in the medical field. (A) Pie chart displaying the relative contributions of the various omics approaches for the discovery of biomarkers of diseases over the 2015–2020 period. The PubMed database was inquired (March 2021) with the following keywords occurring in titles and/or abstracts: “disease*,” “*marker* or signature*,” “patients;” and “metabolom* or lipidom*,” “transcriptom* or gene expression,” “proteom*,” “microbiom*” and “multi-omics,” excluding review articles. (B) Number of publications related to metabolomics and/or lipidomics alone or combined with other omics from 2015 to 2020



between 2015 and 2020. Although metabolomics analyses are still mainly used alone, there is a trend toward increased use of multi-omics approaches in 2020 (62 publications out of 187). Finally, among the 643 publications related to metabolomics or lipidomics, only 15 of them mention the use of a validation cohort to confirm the molecular signatures obtained.

At the same time, data repositories have been developed, making publicly available projects and studies including raw data together with analytical and biological metadata necessary for statistical analysis, as well as processed and annotated datasets. The two main data warehouses in the field of metabolomics are MetaboLights [22, 23] and Metabolomics Workbench [24]. They allow sharing of protocols, assays, and even tools to perform analyses and meta-analyses on the datasets (for Metabolomics Workbench). At the time of writing this review, MetaboLights (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights>, accessed March 2021) contained 554 studies, of which 30% deal with human studies (i.e., related to “homo sapiens” in the browse study menu) and about 18% are performed on human blood and urine samples (i.e., related to “blood,” “serum,” “plasma,” “whole blood,” and “urine” in the browse study menu). Metabolomics Workbench (<https://www.metabolomicsworkbench.org>, accessed March 2021) included 1370 studies of which 41% dealt with human

biological samples. A large number of projects are related to diseases such as cancer (182 projects) or diabetes (63 projects). It should also be noted that spectral data warehouses such as MassIVE (<https://massive.ucsd.edu>), a community resource developed by the NIH center for computational mass spectrometry for the free exchange of mass spectrometry data, are likely to host metabolomics datasets (404 out of 11,065, March 2021).

The development of data warehouses has been facilitated by the efforts made within the community to standardize the different steps of the metabolomics analysis workflow. Initially, the Metabolomics Standards Initiative, set up by the Metabolomics Society in 2005, has addressed, through working groups, various aspects related to ontology problems, data exchange, biological metadata, chemical analyses (from the reporting of analytical chemistry metadata to metabolite identification status), or data processing and statistical analyses [25]. Regarding raw data sharing, vendor independent standards have been proposed since the 1990s, and nowadays, XML (i.e., “eXtensible Markup Language”)–based formats such as mzML [26] and nmrML [27] are supported by vendors and commercial and open-source software [28]. Concerning metadata associated to studies, the ISA-Tab format (“ISA” for Investigation, Study, Assay, and “Tab” for tabular) has been

developed to collect and share both analytical chemistry and biological metadata [29]. Finally, certified reference materials are provided by metrological institutions, which facilitate the implementation of international inter-laboratory studies [30]. This is, for example, the case for human plasma with the SRM 1950, which is produced by the U.S. National Institute of Standards and Technology (NIST) [31], and which has been used in several inter-laboratory tests [32–35]. Beyond the case of human blood samples, NIST urine reference materials have been used in an inter-laboratory study involving NMR, GC-MS, and LC-MS untargeted metabolomics analyses [36], and the development of a human stool reference material for metabolomics and metagenomics gut microbiome analysis is envisaged, as highlighted in a workshop report [37].

However, despite all these advances, the use and reuse of public data from global metabolomics analyses in the frame of meta-analyses remain uncommon. Table 1 shows the main meta-analyses published to date. They are all based on mass spectrometry data, and some of them use software tools such as MetaboAnalystR 3.0 [38] or PAIRUP-MS [39], which enable joint analyses of different projects or batches from raw data and pathway enrichments.

The study of Pang et al. deals with a comprehensive meta-analysis of COVID-19 global metabolomics datasets. It was achieved by using seven liquid chromatography coupled to mass spectrometry datasets obtained from six studies that were realized in three distinct countries. Five datasets were obtained as raw data from public repositories or from the authors of the studies, whereas the remaining two datasets consisted of annotated peak tables obtained from supplementary materials of publications. The authors implemented a computational workflow to process the raw data coming from different experiments and performed pathway enrichment and visual data mining, leading to metabolic signatures characteristic of the disease progression and clinical outcomes [40].

In summary, progresses have been achieved in terms of technological advances for the production and analysis of metabolomics data, and for the standardization and sharing of these data. These advances are reflected in the increasing involvement of metabolomics data in clinical studies dealing with disease biomarker discovery, and in systems medicine research projects based on multi-omics approaches. However, global and non-targeted metabolomics analyses are still very little used, or even not at all, in routine care

Table 1 Meta-analyses involving untargeted metabolomics-based approaches

Publication title	Data	Technology	Software	Reference
Comprehensive meta-analysis of COVID-19 global metabolomics datasets	7 datasets from 3 countries, including 5 raw datasets from MetaboLights, MassIVE, and authors, and 2 annotated peak tables from 2 publications. 438 blood samples from 337 subjects	LC/HRMS	MetaboAnalystR 3.0	Pang et al., <i>Metabolites</i> , 2021 [40]
Benford's law and metabolomics: a tale of numbers and blood	Datasets from 3 studies performed by the author, no raw data available, peaktable available for one study	LC/HRMS	No	D'alessandro, <i>Transfus Apher Sci</i> , 2020 [194]
Integrating untargeted metabolomics, genetically informed causal inference, and pathway enrichment to define the obesity metabolome	3 LC/MS datasets, no raw data available, one peaktable available (related to the software publication)	LC/HRMS	PAIRUP-MS	Hsu et al., <i>Int J Obes (Lond)</i> , 2020 [195]
MicroRNAs regulating human and mouse naïve pluripotency	Meta-analysis including microRNA-seq, RNA-seq, and metabolomics datasets; the metabolomics datasets are from a single published study; peaktables available; no raw data available	LC/HRMS, LC/QQQ-MS, GC/MS	No	Wang et al., <i>Int J Mol Sci</i> , 2019 [196]

practices, especially in medical laboratories. It is therefore necessary to pursue research activities in the field of data production and interoperability, as detailed below with a focus on mass spectrometry-based metabolomics approaches.

Toward inter-operable and reusable metabolomics data for biomarker discovery: from appropriate project design and sample collection to confident identification and measurement of biomarker candidates

The pipeline of biomarker development includes several key stages, consisting of discovery, validation, and clinical translation [41]. Each of these steps has its own limitations and can be improved. For instance, the discovery phase might suffer from a lack of standardized and validated methods, yielding poor experimental reproducibility between laboratories. This is especially the case with MS-based metabolomics, whereas, although detecting less metabolites than LC-HRMS, NMR can be more directly quantitative and can thus deliver more robust data than untargeted LC-HRMS-based approaches. Another reason is that clinical studies are not always appropriately designed for biomarker discovery, with biomarker candidates not validated in independent cohorts and also not sufficient clinical phenotyping available [42, 43]. In this context, in the following paragraphs, we will review and discuss the recent findings in LC/MS-based metabolomics that can fill these gaps by pinpointing the need of the following:

- Large multi-center cohorts as well as validation cohorts to increase statistical power and biomarker specificity and avoid confounding factors
- Improved metabolome coverage and metabolite identification confidence level (e.g., thanks to optimized and validated acquisition workflows, dedicated spectral databases)
- Standardized data production workflow with improved robustness (e.g., with QCs, batch-to-batch consistency/normalization, large-scale quantification) and capability of automated interpretation of the huge amount of data generated
- Linked untargeted and targeted quantitative approaches for proper analytical validation of biomarker candidates

The issue of design of experiment regarding cohort samples: toward more standardization

Metabolomics is a question-driven method. Thus, the prerequisite of a successful metabolomics experiment is a well-defined clinical question, which would unarguably imply active discussions between physicians, analytical chemists, and

data scientists, each one knowing the constraints and requirements of their respective field. A successful metabolomics study requires some key elements, including but not limited to (i) consistency of samples to be analyzed and compared (e.g., individuals matched for sex, age, weight, ethnicity, lifestyle factors, etc.; site and type of sample, sample shipment, storage, and handling), (ii) proper study design, (iii) proper control groups and conditions, and (iv) sufficient sample size of compared groups to encompass inter-individual variability and provide statistical power [44] (Fig. 2).

Preanalytical considerations, study design The levels of metabolites constituting the metabolome of any individual are quantitatively affected by many factors such as disease, drug use, environmental exposures, or nutrition [6, 45]. Therefore, collection of data related to demographic, lifestyle, and physiological factors (e.g., diet, gender, ethnicity, age, and BMI) is necessary to limit inter- and intra-individual variations and identify potential confounding factors. This practice also ensures that appropriate data can be incorporated into the experimental design and data analysis processes [46].

Obviously, sample type/matrix must be consistent between the patient samples and the control group (e.g., plasma EDTA). Although overall concordance in results and similar discriminatory ability can be observed when running plasma and serum metabolomics [47], serum appeared to show higher levels of some metabolites as a potential consequence of the clotting process, as it is exemplified in the study of Wedge et al., which deals with the metabolomics analysis of 29 small-cell lung cancer patients [48]. Some metabolites can also readily degrade or interconvert during sample preparation or during temporary storage at room temperature before analysis [49–51]. Kamlage et al. reported on the impact of blood and plasma processing on the concentration of metabolites. They observed significant metabolite concentration variations (in the 4–19% range) in the case of hemolysis or short-term storage of plasma samples at room temperature or cooled on wet ice, and also some minor consequences when samples were contaminated with buffy layer or in case of micro-clotting [52]. Caution has to be paid to avoid these issues.

Different study designs (e.g., cross-sectional, cohort, case-control studies) have their own strengths and weaknesses, and their applicability depends on the clinical question of interest [53]. Moreover, the sample size of groups should be similar and large enough in a comparison to provide sufficient statistical power. However, it is important to note that some cohort studies may use more controls than cases in their experimental design, which might imply the development and use of specific statistical tools for the treatment of the resulting metabolomics data. In the case of expected high inter-individual variability, a larger sample cohort would even be required. The issue of statistical power related to sample size for the appropriate design of metabolomics studies has already been

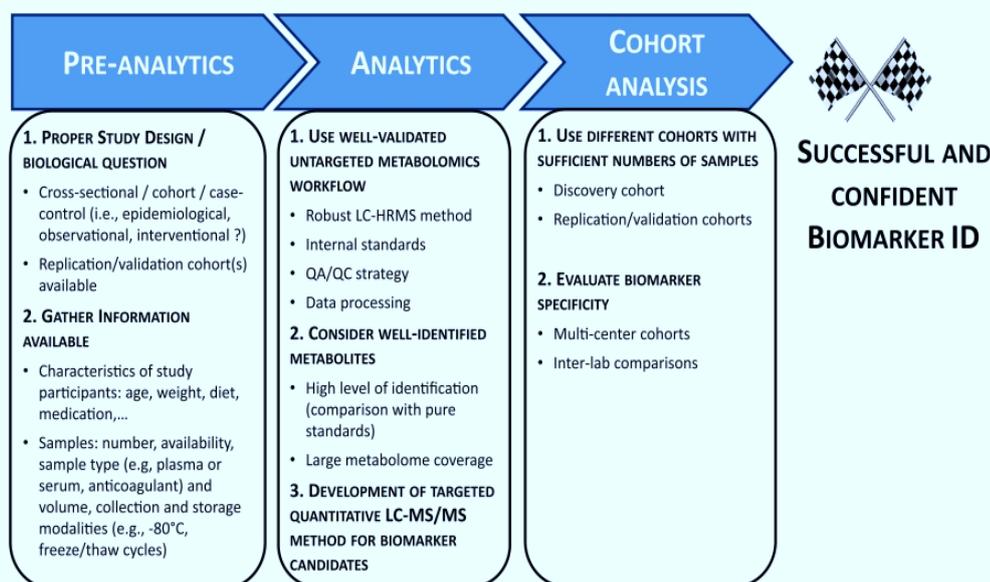


Fig. 2 The road to successful biomarker discovery

addressed through modeling approaches using pilot studies [54], or even when pilot studies are not available [55]. However, there is still a lack of reference procedures to address this point [56]. Thus, experts in data production and statistical analysis should be involved in experimental design, together with the sponsors of the study [57–59]. They should pool their expertise to ensure the most standardized and robust experimental design. Important points to be discussed and agreed are the following: (i) a clear definition of the research question, an as-precise-as-possible description of clinical characteristics of each group to be compared (in order to avoid any unwanted inter-group variability); (ii) a “true control” group (although it is often complicated to collect samples from healthy people in hospitals); (iii) an estimation of the minimal sample size that is required to address the biological question, the number of sample aliquots needed for the study; and (iv) the creation and sharing of a single exhaustive file of sample metadata with all known technical and clinical variables for each sample (sample name, tube labeling or barcode, sample box, location in the box, collection origin, collection date, gender, age, clinical treatment, diet, disease, BMI, used anticoagulant, ethnicity...). Such a file could help to better define the experimental groups in terms of homogeneity, while avoiding any confusion and limiting the occurrence of possible confounding effects (Fig. 2).

Discovery and (pre)validation cohorts As mentioned above, untargeted LC-HRMS metabolomics methods are mainly used for biomarker discovery. The resulting biomarker candidate data should be considered preliminary until their validation on a larger cohort with the use of a similar untargeted workflow or a targeted quantitative metabolomics approach.

Indeed, a common issue in metabolomics-based biomarker discovery is the absence of replication and insufficient sampling, with many studies involving a single cohort of limited size, i.e., often fewer than 100 samples [60]. Replication of the results on biomarker performance using independent multi-center cohorts is needed to ensure proper biomarker validation for further transfer to the clinics [18]. Collaborative networks and access to well-characterized bio-banked samples are often needed to perform such large-scale studies.

Standardized sample preparation As the level of comparability/variability is the critical point to be controlled for standardizing metabolite concentration in the frame of untargeted metabolomics experiments, standard operating procedures (SOP) for sample collection and metabolite extraction are essential [57, 61, 62]. The review of Kirwan et al. [57] gives a valuable overview about well-defined and validated protocols for the collection of samples for metabolomics research.

Kirwan et al. listed several already published protocols for collection and storage of numerous biofluids and tissues. Important insights are synthesized in an informative table highlighting the crucial points of the protocols related to metabolomics: (i) collection methods, (ii) range of temperature before processing, (iii) storage conditions and reported consequences if not followed, and (iv) observed confounding effects [57].

Before implementing an extraction protocol chosen as the most appropriate to address the biological question of interest, a crucial step in the standardization process consists in sample normalization in terms of metabolite concentration before data acquisition [62]. Regarding serum and plasma analyses, a

consensus normalization way is to analyze the sample using a fixed sample volume [61, 63]. As for a biomedical analysis, the sample must be collected in a fasting state to minimize unwanted sources of variability on the metabolome. For human fecal samples, Karu et al. also described several proposed protocols for human fecal metabolomics [64]. We advise to normalize on the dry weight of the freeze-dried stool sample to avoid variability induced by differences in water content from one fresh stool sample to the other [65]. Regarding urine metabolomics studies, the need of normalization due to diuresis variations is well known and it has been already addressed in several publications. Ideally, all urine samples in a study should be collected over a period of time such as 24 h, knowing that the metabolic content of the sample can be impacted by bacterial growth and chemical stability issues [50]. The most used normalization protocols rely on creatinine, osmolality, total useful signal (TUS, post-acquisition normalization), and specific gravity measurements [66–71]. Although no clear recommendation has emerged, the limitation of using creatinine, encountered in many pathological contexts, has been highlighted many times, while osmolality and specific gravity appear to be the most reliable normalization protocols [68, 71, 72].

For tissues, it is often difficult to weigh accurately a small piece of frozen sample. We advise a standardization related to the measurement of the total protein concentration. The protein concentration is thus measured in the pellet obtained after the protein precipitation step during the metabolite extraction (e.g., by using bicinchoninic acid “BCA” protein assay). While for bacteria the normalization can be made based on the optical density measurement [73, 74], normalization of eukaryote cell samples before acquisition can be done on cell numeration (which may lack of accuracy), or more confidently by using total protein concentration or DNA concentration in the extract. To conclude, it is essential to normalize the concentration of metabolites present in the final extract and before acquisition to detect only the metabolic variations related to the clinical parameter being monitored. Post-acquisition normalization can also be implemented, for example, by using the TUS (as mentioned above for normalization of urine samples) [68].

The issue of metabolome coverage and accurate measurement

Obtaining an exhaustive picture of the metabolome is highly desirable to increase the likelihood of getting the best biomarker or set of biomarkers. Although major developments have already taken place, we are still a long way from getting a comprehensive coverage of all the metabolites. In the absence of a universally accepted procedure for biomarker discovery by mass spectrometry-based metabolomics, each data production facility uses its own optimized procedure [18]. To

achieve broader metabolite coverage, samples are often analyzed several times by complementary LC-HRMS(/MS) methods [63, 75–77]. A large portion of the detected signals remains, however, structurally uncharacterized, and thus, metabolite identification still represents a major bottleneck in metabolomics [4, 78]. Detecting as many metabolites or metabolite features as possible with the objective of obtaining maximal biochemical information is a general tendency. However, confidently identifying and measuring true and unique metabolites is a completely different objective that is absolutely required to obtain both reliable biomarker candidates and meaningful biological information readily sharable between laboratories. Therefore, broad metabolome coverage makes sense only if metabolites are annotated/identified at a high confidence level. Of course, this might sound frustrating or can be erroneously linked to poor methodological performances since this often yields limited sets of metabolites (e.g., ~ 200), instead of few thousands of metabolite features or elemental compositions. Such “limited” number of metabolites can already provide key insights into relevant clinical questions. For example, the robust monitoring of 137 metabolites in the blood of 800+ patients with acute decompensation of cirrhosis with/without acute-on-chronic liver failure (ACLF) provided unprecedented insights into the biochemical mechanisms, underlying the development of the ACLF syndrome and also a 38-metabolite blood fingerprint specific for ACLF that revealed mitochondrial dysfunction in peripheral organs [79, 80].

Confident annotation and identification of metabolites As mentioned above, accurate identification and monitoring of metabolites are prerequisites to achieve measurements’ reproducibility across laboratories and among countries. Confident metabolite identification in complex biological matrices requires the combination of several information lines exploited in conjunction. High mass resolution ($> 100,000, M/\Delta M$, full width at half maximum) and high mass measurement accuracy (< 1 ppm) allow for the measurement of isotope pattern and isotope fine structure, including the distinction of isobaric isotopes [81–83]. Complementarily, accurate retention time(s) and MS/MS spectra can provide high confidence in metabolite identification when matched to reference data included in chemical/spectral libraries. Among those complementary information lines, one of the most valuable elements to confirm metabolite annotation or reduce the list of possible annotations is the acquisition of fragmentation spectra and their comparison to reference MS/MS spectra included in reference mass spectral libraries [82]. Differently from proteins, fragmentation of metabolites under low-energy conditions is relatively unpredictable (at least with a high confidence level). Therefore, the most relevant mass spectral databases for definitive identification of metabolite biomarker candidates are those obtained from pure authentic standards, and are thus

unfortunately limited by their (most often commercial) availability.

Databases are essential but often reflect only what is identified and commercially available Most widely used (public and proprietary) spectral databases include MassBank [84], HMDB [85], GNPS [86], MoNA (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), LIPID MAPS [87], NIST 20 (<https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:msms>), METLIN [88], and mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>). For a more detailed comparison and discussion of these databases, we recommend these articles in the field [89, 90]. However, in brief, procedures for data collection and curation, instruments used (e.g., Orbitrap, Q-TOF), fragmentation conditions (e.g., resonant and/or non-resonant conditions, number of collision energies, MSⁿ), and type of molecules differ from one database to the other. Presently available spectral databases are therefore not strongly overlapping [90], which underlines their complementarity as exploited by recent studies for larger metabolite identification [91]. Interestingly, a European proposal for quality control and quality assurance of tandem mass spectral libraries has been recently published and also reported that Q-TOF and Orbitrap-based instruments yielded comparable MS/MS spectra [92]. As a representative example, the MS/MS spectrum of taurocholic acid as acquired in the positive ion mode on a first-generation Thermo Q-Exactive instrument (at a normalized collision energy “NCE” of 20%) has been successfully matched to spectra stored in the MoNA database and previously recorded both on a Q-Exactive HF and a Waters Q-TOF II instruments used under different fragmentation conditions (Fig. 3). This opens the door to spectral databases generated in the FAIR (i.e., “Findable, Accessible, Interoperable, Reusable”) data context [93] also with a standardized way of describing the observed ions [94].

Although covering more and more metabolites, not all metabolites found naturally in biological matrices are currently commercially available to feed those databases, which clearly limits their expansion. As a matter of fact, metabolomics researchers usually focus on metabolites that are present in databases or websites. Although very exciting for the analytical chemist, the exploration of unknown metabolites, the so-called dark matter [95], is one of the biggest challenges and a research field on its own and is therefore still insufficiently explored. Therefore, acquisition and thorough annotation (or putative identification) of MS/MS data from biologically relevant and recurrently observed metabolite features absent from databases and chemical provider catalogs is required for their further implementation and storage in specific shared databases. Such a strategy has been recently used to build spectral libraries of unidentified but annotated recurrent spectra derived from NIST urine samples [96], and could be

extended to unknown signals returned by meta-analysis at the pathway level with software tools such as Mummichog [97].

Reporting high-quality and robust data in the frame of untargeted MS-based metabolomics studies

General quality assurance and quality control practices

Quality assurance (QA) and quality control (QC) are indispensable processes in research and critical in metabolomics to obtain high-quality and FAIR data [58, 59, 98, 99].

QA deals with processes planned and performed before sample collection to fulfill predefined quality requirement. The main processes for metabolomics experiments are staff training, preventive instrument maintenance, analytical methods validation, and calibration of analytical tools and verification of their performance.

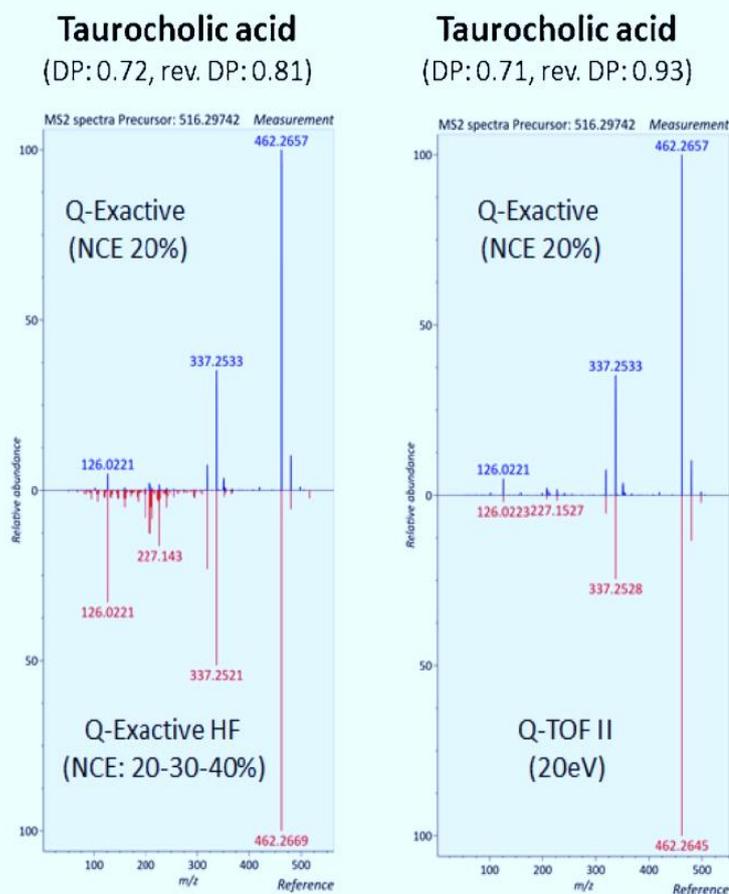
Quality control deals with techniques and activities used to measure and report if these QA requirements have been met during and after data acquisition. It can include (i) run order randomization to control unwanted variation and unwanted correlation; (ii) internal standards added to samples in order to report the quality of data within and between batches; (iii) blank samples to assess the occurrence of contaminations, interferences, artifact feature, carry-over phenomenon, and matrix effect (if internal standards are added); and (iv) QC samples (including diluted QC in order to highlight artifactual features).

QC samples should be representative of the qualitative and quantitative composition of the samples to be analyzed. The samples can be obtained by pooling aliquots of each original sample and then following the same sample preparation protocol of the biological samples. Proposed in 2006 for the first time for untargeted metabolomics studies in order to check for data quality [100], QC samples have been and are used in numerous studies and several publications have highlighted their importance in the metabolomics workflow [59, 61, 98, 99, 101]. Broadhurst et al. have reported on the different kinds of QC samples, and their respective advantages and limitations [98]. QC samples are usually injected several times at the beginning of each batch analysis in order to equilibrate the analytical platform, and then every 5 to 10 biological samples in order to control the stability and performance of the analytical platform, and its reliability during the course of analysis. They have also a crucial role in data pre-processing, as emphasized below.

The need for reproducible data (pre)processing workflows and precisely documented metabolite identification procedures

This includes data preprocessing and processing, the reporting of metabolite identification, and publication and data sharing.

Fig. 3 Head-to-tail comparison of evaluated versus reference MS/MS spectra of taurocholic acid obtained under non-resonant conditions. Evaluated MS/MS spectra (blue color) were obtained in the positive ion mode on a Thermo Q-Exactive instrument (NCE 20%). Reference spectra (red color) are stored in the MoNA database and were recorded in the positive ion mode on a Q-Exactive HF (NCE 20–30–40%) and a Waters Q-TOF II instrument (20 eV). $[M+H]^+$ ion at m/z 516.2974. Spectral matching was performed using the MS-DIAL version 4.12) software [208]. DP, dot product; rev. DP, reverse dot product



The data-preprocessing step deals with the implementation of a peak-picking (i.e., detection and integration of LC/MS peaks, i.e., features), feature alignment and feature integration workflow. This is a key step in untargeted metabolomics, which leads to data matrices that have to be cleaned and annotated before being subjected to statistical analyses. Software packages dedicated to NMR, GC-MS, or LC-HRMS are available for that, and their description is beyond the scope of this review. There is a need to standardize these pre-processing steps [102], but most importantly to standardize the sharing of processed data so that they can be re-analyzed by other investigators to advance in the development of these tools. This can be achieved by integrated software tools that combine several data treatment steps, from data preprocessing to statistical analyses, such as workflow4metabolomics [103] or Metaboanalyst [104], the latter also proposing some data visualization and metabolic pathway enrichment tools. Such metabolomics data-processing platforms enable to store and share all the parameter values related to data pre-processing and processing.

Dataset annotation and metabolite identification are crucial steps enabling to convert hundreds to thousands of

metabolites features contained in peak tables into biologically interpretable data. The way of reporting metabolite identification has already been highlighted as a key issue. The Chemical Analysis Working Group of the Metabolomics Standards Initiative has thus proposed four levels of confidence for metabolite identification [105]:

- Level 1: fully identified compounds based on at least 2 orthogonal (i.e., independent) data related to an authentic standard analyzed in the same experimental conditions.
- Level 2: putatively annotated compounds based on characteristic physicochemical properties or spectral similarity with spectral libraries. In this case, there is one candidate, but the authentic standard is not available for confirmation.
- Level 3: putative characterized compound classes, based on characteristic physicochemical properties of a chemical class (i.e., acylcarnitine derivatives, or sulfoconjugates). In this case, several candidates are possible and it is not possible to highlight a precise chemical structure.
- Level 4: unknown compounds.

Although they are simple to implement, these identification levels have limitations since they cannot avoid ambiguities. For example, the use of at least two orthogonal data together with that of a standard, as it is required for a level 1 metabolite identification, does not always lead to an unambiguous identification, as observed with optical isomers such as enantiomers, for example [106]. Although improvements have been proposed with the addition of a fifth level [107], or with the proposal of metabolite identification metrics with a quantitative scoring system based on the sum of all the data types supporting the identification [108], there is a need to propose a metabolite identification reporting system that focuses further on chemical structures.

Application to different types of medical cohorts

Depending on the level of complexity of the study, different kinds of quality control procedures should be applied to the metabolomics data production workflow in order to achieve a sufficient degree of standardization. Thus, non-targeted metabolomics studies performed with MS technologies can be classified into three categories:

- (a) Studies dealing with a sample set analyzed in a single batch, in the same laboratory, and with the same instrument
- (b) Studies dealing with a large cohort requiring to be analyzed in several batches, over a long period of time, in the same laboratory
- (c) Studies dealing with a large cohort and requiring several laboratories

All the QA and QC procedures previously detailed below apply in terms of experimental design, sample preparation, data production, and pre-processing. The most important element is to use QC samples and to analyze them at regular intervals in order to guarantee signal stability over the duration of the experiment.

Studies dealing with a sample set analyzed in a single batch, in the same laboratory and with the same instrument This case deals with cohorts ranging from 200 to 500 samples, depending on the kind of sample preparation protocols and instruments used. It is the simplest one because recommendations on how to standardize the different steps of the untargeted metabolomics workflow and quality management practices (from the experimental design of the study to the submission of data into public repositories) are available and have been the subject of many publications [30, 57–59, 61, 62, 98, 99, 105, 109–113] (Table 2).

Studies dealing with large cohorts requiring to be analyzed in several batches, over a long period of time, in the same laboratory In this case, in addition to the already described QA and QC procedures, it is important to have a “long-term reference (LTR)” QC sample, as proposed by Dunn et al. [61]. In

some cases, the strategy of the “pooled QC sample” might not be the most relevant. For instance, when analyzing some particularly large cohorts, the amount of QC sample available can become limiting; while for projects involving rare diseases or longitudinal studies, the exact number of batches to be received can be unknown or the samples are not all available at the beginning of sample preparation and analysis. In such situations, a commercially available plasma LTR QC sample from NIST (see below) can represent a reliable alternative.

There are several key issues associated with these LTR QC samples. The first one deals with how representative such samples are, in terms of metabolites and concentration ranges. As an example, the standard reference material (SRM) dedicated to metabolites in human plasma (SRM 1950) is prepared from 100 donors, with an equal number of men and women of 40 to 50 years of age, selected to be representative of the ethnic distribution of the US population [31]. However, it is not established whether or not this SRM will be appropriate for studies performed on other populations, or on patients affected by overt diseases or metabolic disorders. Further studies are needed to address these issues.

The second one is their long-term stability. Indeed, stability studies are challenging to implement in the case of non-targeted and semi-quantitative approaches, especially those based on the use of mass spectrometry, due to the impossibility to ensure the stability of the metabolites contained in the QC samples that are used for inter-batch normalization. However, a few studies dealing with untargeted metabolomics approaches have been published on this issue. For example, Laparre et al. have evaluated the impact of the storage temperature (+4 °C, –20 °C, –80 °C, and freeze-dried stored at –80 °C) and the storage duration (5 to 144 days) on the bovine urinary metabolome by using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry [114]. The authors focused on 200 identified metabolites contained in their spectral database. Normalization was performed by dividing each feature’s intensity recorded on the different days by the corresponding feature’s intensity recorded in the freshly collected urine sample at day 0 for every subject. Furthermore, scaling factors were calculated by dividing the average intensities recorded in –80 °C stored samples per feature and for each batch by the corresponding intensities recorded in the reference batch. By these means, they found that urine metabolic profiles are altered starting from 5 days when stored at +4 °C, and after one month at –20 °C. The temperature of –80 °C was considered as the most convenient urine long-term storage condition. In another study, Palmer et al. have investigated the 12-month stability of dried blood spots (DBS) and dried urine spots (DUS) at different storage temperatures (–20, +4, and +21 °C) and compared it to plasma and urine biofluids stored at the same storage temperatures and time by using LC/HRMS-based untargeted metabolomics [115]. Inter-batch normalization was achieved using a pooled QC sample.

Table 2 Selected publications dealing with recommendations and guidelines regarding metabolomics workflows

References	Experimental design	Sample collection	Sample preparation	Data acquisition	Data pre-processing	Data processing	Metabolite identification
Sumner et al., 2007 [105]	–	–	Protocol and extraction methods	Instrumental conditions and performance, method validation	Peak detection/integration	–	Metabolite identification
Goodacre et al., 2007 [197]	–	–	–	–	Peak detection/integration	Data mining, statistical analyses	–
Dunn et al., 2011 [61]	QA/QC, large cohorts	Large-scale studies	Serum, plasma	GC and LC-MS, samples, and pooled QC	Data preprocessing workflow	Data processing workflow	Levels of confidence, unknown metabolites
Dudzik et al., 2018 [59]	QA	Plasma, serum, urine, cells, tissues	Plasma, serum, urine cells, tissues	Instrumental conditions, batch and matrix effects, carryover	QA/QC	QA/QC	–
Kirwan et al., 2018 [57]	Project planning	Plasma, serum, urine, feces, saliva, CSF, tissues	–	–	–	–	–
Broadhurst et al., 2018 [98]	–	–	Pooled-QC preparation	Pooled-QC: precision, conditioning	–	Pooled-QC: inter batch correction	–
González-Riano et al., 2020 [62]	–	–	Plasma, serum, urine, feces, cells, tissues	Multi-targeted metabolomics, GC-MS, CE-MS, IMS, chiral analysis	Peak detection/integration	Data cleaning normalization, confounding factors, variable selection	GC-EI-MS (commercial or in-house spectral libraries), LC-MS and CE-MS solutions
Rampler et al., 2021 [30]	–	–	Discussion on protocols	Absolute quantification, reference material	Peak detection /integration	MS-based multi-omics, merging metabolomics and lipidomics	Metabolite and lipid annotation

They concluded that DBS and DUS stored at + 21 °C are stable for up to 4 weeks but are not stable over a 1-year period, whereas they showed good stability when stored at – 20 °C for 1 year.

These two studies are based on the assumption that QC samples used for inter-batch normalization are stable in “reference storage conditions” (i.e., at – 80 °C or – 20 °C). However, some studies using absolute quantification and/or a calibration system highlighted some altered metabolite concentrations in plasma samples stored at – 80 °C up to five years. By using the Biocrates AbsoluteIDQ p180 targeted-metabolomics assay, Haid et al. observed significantly changed levels of amino acids, acylcarnitines, glycerophospholipids, sphingomyelins, and the sum of hexoses, with average increases or decreases of + 13.7% or – 14.5%, respectively [116]. Otherwise, Wagner-Golbs et al. analyzed EDTA plasma samples stored for up to 16 years by gas and liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based quantitative metabolomics. They found that 226 out of 231 metabolites remained stable during the first seven years of storage [117].

There is a limited number of large-scale studies using untargeted metabolomics that have been published. Among those, a representative one is that of Dunn et al. who have reported on the molecular phenotyping of 1200 “healthy adults” from the UK in the age range of 19–81 years, by using GC/MS and LC/HRMS-based metabolomics [118]. The data were acquired across 11 months in 10 batches including samples from 120 subjects analyzed within a five-day period. Data were processed using dedicated GC- and LC-HRMS workflows, and inter-batch normalization was achieved thanks to a unique QC sample and the LOESS algorithm. From 259, 7813, and 7914 metabolite features initially detected in GC-MS, LC-HRMS (positive mode), and LC-HRMS (negative mode), the implementation of signal correction, batch integration, and quality assurance procedures led to 126, 2181, and 2283 metabolite features combined within a single multi-batch data matrix and available for statistical analyses.

Another interesting study is that of Sindelar et al. on the use of metabolomics to highlight prognostic markers of COVID-19 severity [119]. Seven hundred and four human plasma samples were collected at six-month longitudinal points from 341 patients, and SRM 1950 was used as QC sample. Given that the metabolic profiles were acquired over several months, the combined data showed strong batch effects that proved efficiently corrected by combined batch correction [120].

Chromatographic retention time shifts are the main issues regarding batch fusion over long periods. Particular software solutions have been described to correct within- and between-batch variability drifts in terms of mass accuracy, intensity, and retention times [121, 122]. Nevertheless, if there are too large differences in retention times between batches, it can become difficult to correctly align peaks with common automatic signal detection and alignment software tools [123,

124]. Then, targeted detection of metabolites that are present in laboratory spectral databases can be carried out using peak integration software from instrument suppliers. The batch fusion process would then be carried out more easily on the basis of known metabolites (targeted data treatment) and no longer based on m/z ratios and retention times alone and in a more blinded way (untargeted data treatment).

Studies dealing with large cohorts and requiring several laboratories Although several laboratories with complementary technological expertise may be required in order to achieve the largest metabolome coverage, most studies dealing with a multi-platform approach are actually multi-omic studies involving a single metabolomics platform. In this case, generally, each type of omics data is analyzed separately in order to achieve molecular signatures, which are in turn collated and integrated by using molecular network analysis and visualization software tools [125].

Most of published metabolomics studies involving several laboratories or platforms with inter-laboratory comparison studies are dedicated to the evaluation of the performance and comparability of analytical methods [126–128].

The metabo-ring initiative gathered 5 NMR and 11 different LC/HRMS platforms with the objective of assessing the reliability of untargeted metabolomics approaches in obtaining comparable metabolomics profiles. Biological samples obtained from 2 different conditions were analyzed by the partners using their own in-house protocols. It was observed that, despite large differences in the number of spectral features produced after post-processing and the heterogeneity of the analytical conditions and the data treatment, the spectral information within and across technologies (NMR vs. LCMS) was highly convergent regarding 2 test datasets in terms of statistical analysis [126].

Izumi et al. performed an inter-laboratory comparison study on cell line extracts including 12 participating laboratories using their own analytical methods (capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry, GC/MS and LC/MS with different kinds of high-resolution mass spectrometers and chromatographic conditions, corresponding to 15 and 9 methods for hydrophilic and lipophilic compounds, respectively). The aim of the study was to evaluate issues in integrating different kinds of metabolomics data. Overall, 203 metabolites and 580 lipid species were detected by at least one analytical method, among which 148 hydrophilic metabolites and 285 hydrophobic metabolites were detected by at least two methods [127].

Finally, in their article, Yu et al. describe the Consortium of Metabolomics Studies, which was established in 2014 for fostering large-scale collaborative research on medical cohorts and epidemiology. This initiative includes 47 cohorts from Asia, Europe, North America, and South America, and blood samples were analyzed by 17 platforms. It appeared, from 2

feasibility studies, that the overlap between any 2 different laboratories in terms of detected metabolites ranged from 6 to 121 metabolites within 5 leading laboratories, and that the median Spearman correlation coefficient was of 0.79 on 111 metabolites detected by two platforms. Absolute concentrations were provided on only 31 metabolites across the 5 platforms, and 28% of identified metabolites were not listed in public databases [128].

All these studies highlighted a modest overlap in terms of metabolite detection from one facility to the other, and two of them reported on inconsistencies in compound identifiers that limit the integration of datasets [127, 128]. This is especially the case with isomers that can be discriminated or not from one platform to the other. Such issues could be addressed by the development and sharing of spectral databases [33], by fostering the evaluation and the use of standard reference materials within metabolomics data production facilities [127, 128], and of course by providing absolute concentrations on identified metabolites present in the chemical libraries of data production facilities, in the frame of untargeted approaches.

Analytical validation of biomarker candidates highlighted by untargeted metabolomics: the need for targeted quantitative metabolomics approaches

As mentioned above, confident metabolite identification is required for biomarker discovery. As a corollary, quantitative information about measured metabolites instead of relative differences must be provided if the biomarkers are to be used in clinical settings for diagnostic purposes through the definition of normal ranges of metabolite concentration. In addition to providing relevant data for answering clinical questions, metabolite concentrations expressed as molarity units will also facilitate access to the dynamics of the metabolome and of course the integration of metabolomics data with those of other omics, while also enabling facile comparison of results among laboratories and studies.

Accurate and validated metabolite quantification is generally accomplished by using targeted LC-MS/MS-based approaches using low-resolution triple quadrupole instruments operating in the multiple reaction monitoring mode (MRM) and using metabolites labeled with stable isotopes (e.g., ^{13}C , ^{15}N , ^2H) [129]. Such an approach can also be used to validate the results obtained by untargeted LC-HRMS metabolomics. For example, the concentrations of 4 tryptophan metabolites have been recently measured by LC-MS/MS (multiple reaction monitoring—MRM—mode with isotope dilution) in the serum of 218 patients with acute decompensation and ACLF in cirrhosis, and demonstrated excellent correlation with the corresponding MS signals observed under LC-HRMS conditions [130] (Fig. 4).

Although targeted LC-MS/MS (MRM) methods offer the best quantification sensitivity, they are often focused on a

small set of compounds and thus suffer from such a limited metabolite coverage. New MS/MS workflows as implemented on high-resolution mass spectrometers such as Q-TOF or Orbitrap-based instruments have merged as powerful alternative strategies [131]. Such acquisition methods referred to as data independent acquisition (DIA) including the SWATH (accounting for Sequential Window Acquisition of all Theoretical fragment-ion spectra) approach are being increasingly used in metabolomics by enabling simultaneous metabolite identification and quantification through the acquisition of MS/MS spectra for all analytes in a single run [131, 132]. Although slightly less sensitive than traditional LC-HRMS or MRM approaches, recent publications highlighted the potential of SWATH approaches for unambiguous compound detection and accurate quantification in complex samples [133–136]. With constant instrumental improvements (e.g., data acquisition speed on Orbitrap mass analyzers, in collision energies management, sensitivity, MS^2 spectra deconvolution), one can imagine great potential of such approach for future biological metabolomics applications. As a sort of proof of principle, Zha et al. recently reported on an innovative SWATH-to-MRM approach. Thus, a high-coverage targeted metabolomics method with 1303 metabolites in one injection was developed to profile colorectal tissues [137]. The success of such an approach would make LC-HRMS-based metabolomics both a screening and quantitative confirmatory technology.

How to transfer metabolomics signatures from the research laboratories to the field

Metabolomics signatures are generally defined by clinical research studies, which cannot be considered as routine care practice. They are complex for several reasons. First, they are multi-parametric in that they often consist of few tens of metabolites. They often deal with small concentration variations from one group to the others, with concentration ratios often less than a factor five. Some of the metabolites of interest may be only partially characterized (i.e., for example a compound class, such as an acylcarnitine species including a hydroxylated carboxylic acid in which the position of the hydroxyl group cannot be precisely located). Furthermore, when obtained by using untargeted approaches, results are not expressed in molarity units but rather as peak areas, which obviously limits data reuse and sharing. Finally, these molecular signatures are often not validated due to a lack of validation cohorts, and also of specificity studies which are time consuming, expensive, and difficult to design.

Consequently, metabolomics signatures obtained from untargeted metabolomics cannot be directly used in the routine care practice. There is a need for simplification and for moving to quantitative results. Simplification can be achieved through

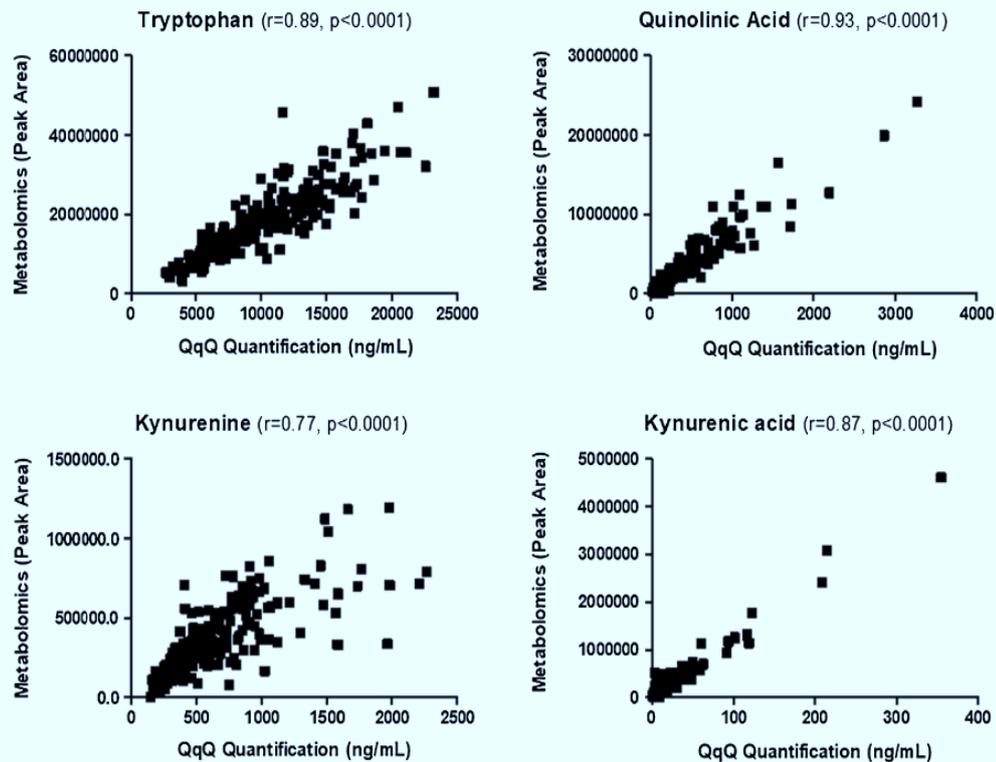


Fig. 4 Comparison of metabolite concentrations measured by using untargeted and targeted approaches. Correlation between LC-HRMS data (peak area, exactive instrument) and absolute quantification data (ng/mL, Waters Xevo TQ-XS instrument) obtained for tryptophan, quinolinic acid, kynurenine, and kynurenic acid measured in the serum of 217 patients

with different levels of cirrhosis decompensation. Correlation analyses were achieved by calculating Pearson correlation coefficients (r). Experimental conditions are displayed in the publication of Claria et al. [130]

statistical analysis tools enabling to select a small number of key components of the signatures. This is, for example, the case with the *biosigner* algorithm, which enables to find the smallest feature subset which significantly contributes to the performance of a multivariate statistical analysis model [138]. Regarding quantification, multiplexed targeted assays can be developed and implemented for specifically monitoring essential metabolites obtained from complex molecular signatures in order to confirm results obtained from untargeted metabolomics experiments, as already described in the previous section.

Furthermore, many actors and structures are involved in healthcare systems: clinical units in hospitals, medical laboratories in hospital settings or outside the hospitals, physician's offices, pharmacists, and at least the patient at home. Current limitations in terms of data reuse and interoperability combined with a lack of validation data for the molecular signatures generated make metabolomics not yet easily usable in routine care. However, the main users in the short term could be clinical biologists and chemists, as well as non-experts, working in medical laboratories in a hospital context, near the clinical units. It is likely that in the near future the use of MS-based approaches will remain limited to hospital settings, operated by trained staff. This because (i) the sample preparation requires technically advanced

operations and (ii) outputs of metabolomics workflows are complex molecular signatures of few tens of metabolites, often with small concentration variations. In the field of personalized medicine, the challenges will then lie in the longer term in the development and use of field rapid diagnostic tests based on the development of biosensors for the multiplexed and quantitative detection of several biomarker candidates.

Metabolomics at medical laboratories

The clinical context has a strong impact on the manner of translating metabolomics signatures into clinical practice. It can be intended for a critical care, a chronic disease follow-up, or a genetic rare disease. Modalities such as the frequency of analysis, the delivery time of the results, the geographical availability (local, regional) of equipment, and the routine workflow have to be defined by taking into account this context. These aspects are usually managed in a clinical laboratory by a clinical biologist. One role of the biologist is to integrate these requirements with analytical constraints, by setting a framework in which the sample pathway, the analytical quality, and the delivery of the results are well defined.

Delivering a metabolic signature to a physician is challenging. This means to translate complex and numerous data into a self-explanatory analysis report, which must be available and interpretable for any clinician specialized in a given medical area. This translation requires processing, integration, and interpretation of data, in order to transmit a suitable information to the clinical issue. Clinical biologists will have a key role in the results transmission by integrating the biological message into the global clinical context. This requires rethinking medical biology by no longer reasoning in terms of isolated markers reflecting an organic function, but rather in terms of molecular signatures reflecting the stage of a disease at a given time. This is a major paradigm shift from a focus on broad categories of disease, to a more holistic approach that will integrate a patient's metabolic status, impacted by all of their co-morbidities and their environment. To achieve this, clinical biologists will have to upgrade analytical technologies to generate data, integrate bioinformatics solutions, and develop an automated algorithm to express targeted and accurate results from complex data. Actually, clinical biochemistry is likely to undergo the same technological revolution as molecular genetics has undergone over the last 20 years with the advent of genomics and next-generation sequencing. One of the main challenges will be to obtain concentrations of key metabolites expressed in units of molarity, in order to meet the short-term needs of clinicians, while at the same time having the possibility of building databases of metabolic profiles that will be interrogated in different medical contexts.

Although there are some liquid chromatography coupled to mass spectrometry systems that are CE-IVD (i.e., European directive for *In Vitro* Diagnostics) approved for clinical biochemistry, toxicology, or therapeutic drug monitoring, and mass spectrometers can be used in operating rooms [139, 140], not all medical laboratories are and will be equipped with mass spectrometers (especially high-resolution instruments) and very few of them with nuclear magnetic resonance instruments. Thus, other analytical methods, such as enzyme assays, immunoassays, and biosensors, have to be envisaged for metabolite detection. For example, enzyme- and immunoassays are already widely and routinely used in hospitals for clinical biochemistry and therapeutic drug monitoring, as part of industrial automated *in vitro* diagnostic systems.

Alternative tools to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance instruments for making metabolomics valuable in clinical laboratories

Enzyme assays for monitoring metabolites in biological fluids

As previously emphasized, enzyme assays are already widely used in clinical laboratories for monitoring metabolites, such

as bile acids [141], formic acid [142], oxalic acid [143], or sialic acid [144]. Such assays are mainly based on the monitoring of enzymatic cofactors such as NADH or NADPH that are consumed by the enzymatic reaction together with the analyte. Although simple to implement when kits are commercially available, these approaches may suffer from low specificity and may lead to underestimated values, as recently reported for bile acids [145]. They are also prone to interferences, as observed with oxalic acid for which vitamin C interferes [143]. Furthermore, as enzymes may process all the members of a chemical class, some enzyme assays enable the determination of total concentrations rather than individual ones, as observed for bile acids and triglycerides, for example. Finally, such assays suffer from low multiplexing capabilities.

For all these reasons, if enzymatic methods are useful to analyze a metabolite or possibly a set of metabolites belonging to a given chemical class, it seems unlikely to use them for more complex metabolomics signatures as they require the ability to find and produce dedicated enzymes and to set up conditions allowing enzymatic activity measurement in different types of biological media.

Laboratory immunoassays for the detection of metabolites in biological fluids

As main tools of immunoassays, antibodies enable the detection and quantification of specific biomarkers and are particularly suitable for molecules with a molecular weight above 3000 Da [146]. Performances of an immunoassay will rely first on the affinity and specificity of the antibodies used: polyclonal antibodies (i.e., collection of purified immunoglobulin molecules obtained from immunization of animals such as rabbits, sheep, donkeys, or goats), usually easier and faster to produce than monoclonal antibodies (i.e., single class of antibodies produced by a monoclonal immortalized B lymphocyte), generally display high affinities for their target but limited specificity. Monoclonal antibodies (mAb) are preferred tools for the development of accurate and specific immunological tests. Second, performances will depend on the detection system that can be achieved using various methods, including among others isotopic labeling (radioimmunoassays), enzyme reaction with UV-visible or fluorescence or chemiluminescence detection, or colloidal gold particles.

There are two main immunoassay formats: competitive and immunometric, depending on the size of the analyte. In immunometric assays, a first capture antibody, specific for the antigen, is bound to a solid surface. The antigen is then added, followed by addition of a detection antibody. The latter binds the antigen to a different epitope from the capture antibody. Thus, this assay format is adapted to analytes containing a least two epitopes (i.e., molecules having a molecular mass above 1000 Da, assuming that an epitope includes at least 5 amino acids). Conversely, in competitive immunoassays, the

antibody is immobilized on a support and the detection is achieved through a labeled antigen. The addition of the sample containing free antigen induces an antibody binding equilibrium between the free antigens and the labeled ones. This assay format is preferably used when only one antibody is available, or when the analyte has only one epitope (i.e., small antigen < 1000 Da), which is the case for metabolites.

Before the development and popularization of LC-MS approaches in the 1990s, competitive immunoassays were widely used for the sensitive detection of drugs and their metabolites for pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring, and for clinical chemistry, as it was for example the case for steroid hormones [147, 148]. Nowadays, competitive immunoassays are still used for a number of clinical biology analyses such as the detection of 25-hydroxyvitamin D (vitamin D metabolite) by radioimmunoassay [149], the detection of oxidative stress biomarkers based on the combination of microfluidics and fluorescent immunoassay [150], and the detection of hormones such as progesterone by coupling microchip electrophoresis and chemiluminescent immunoassay [151] or cortisol using a paper-based immunosensor with a colloidal-gold labeled immunoassay [152].

Various types of competitive assays have thus been developed and implemented on automated in vitro diagnostic devices. The most popular are competitive immunoassays in homogeneous phase (i.e., reagents, samples, and

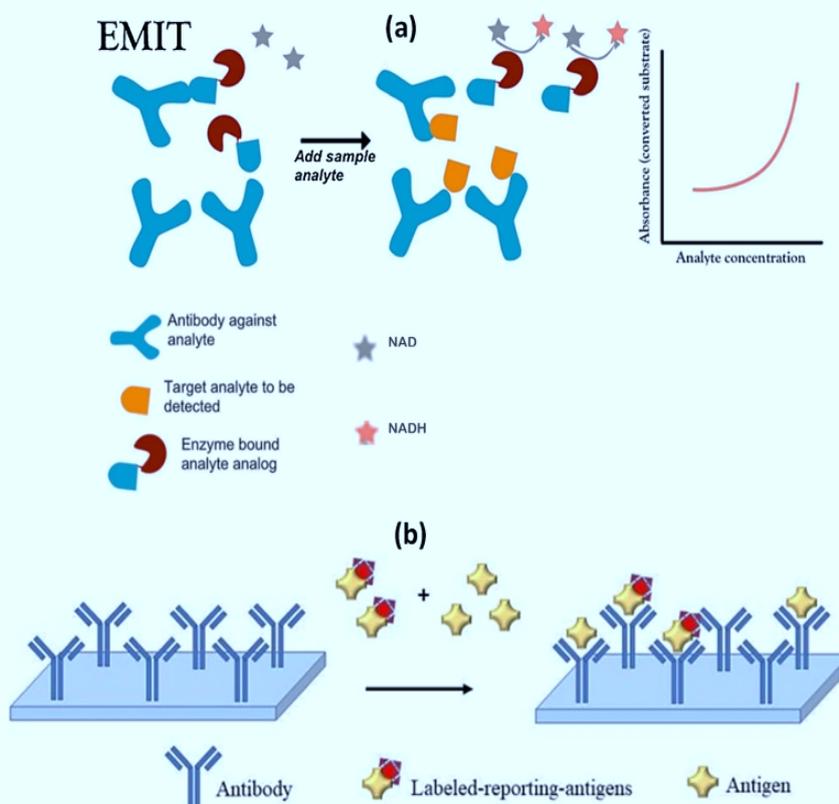
measurements are achieved in a liquid phase), such as EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique; see Fig. 5a), CEDIA (Clone Enzyme Donor Immunoassay), FPIA (Fluorescence Polarisation Immunoanalysis), and KIMS (Kinetic Interaction of Microparticle in Solution) [153].

Laboratory immunoassays can also take place in heterogeneous phases. In this case, the assays are performed in several steps with reagents added and optionally washed or separated at the site of the antigen/mAb complexes. Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) are probably the most used heterogeneous phase assay formats for the detection and quantification of biomarkers in biological media. Since it requires multiple steps (and washing steps in between), ELISA (Fig. 5b) needs to be performed by trained staff with laboratory equipment.

Finally, other types of assays aiming at overcoming the limitations of competitive formats have been specifically developed for the detection and quantification of small molecules. Some of them, such as SPIE-IA (solid-phase immobilized epitope-immunoassay), AIA-NIA (anti-idiotypic antibody-based non-competitive immunoassay), AICA-NIA (anti-immune complex antibody-based non-competitive immunoassay), and OS-NIA (open sandwich non-competitive immunoassay), are described in Fig. 6 [155].

Although some of these assay formats are attractive and inspiring for the design of biosensors for personalized

Fig. 5 Competitive laboratory immunoassays for small molecules. **a** Principle of EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) [153]. EMIT is a competitive immunoassay in homogeneous phase in which an analyte analog is bound to an enzyme using nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD) as a cofactor. The enzymatic reaction generates NADH which is detected by spectrophotometry at 340 nm. A competition between the analyte and the enzyme bound analog takes place toward the antibody. The amount of NADH produced is directly related to the amount of analyte present in the sample. **b** Competitive ELISA [154]: Antibodies are immobilized on the solid support. A competition takes place between an analyte analog coupled to an enzyme and the free analyte in the sample. The detection is achieved through enzymatic activity



medicine purposes, immunoassays for small molecules suffer from several limitations. Indeed, the lack of sensitivity and specificity of antibodies for small molecules are their main weaknesses. Although many antibodies have been developed against small molecules, they can suffer from cross-reactions. This is the case, for example, for antibodies against cortisol which have cross-reactivity with many endogenous steroids

such as cortisone or many synthetic steroids such as prednisolone or prednisone [156]. The challenge to develop assays based on the recognition of metabolites by antibodies firstly lies in the possibility to derive these small chemical molecules, to make them haptens (i.e., to link them covalently to carrier proteins whose role is to provoke/favor the immune response in immunized animals, naturally not immunogenic). In some

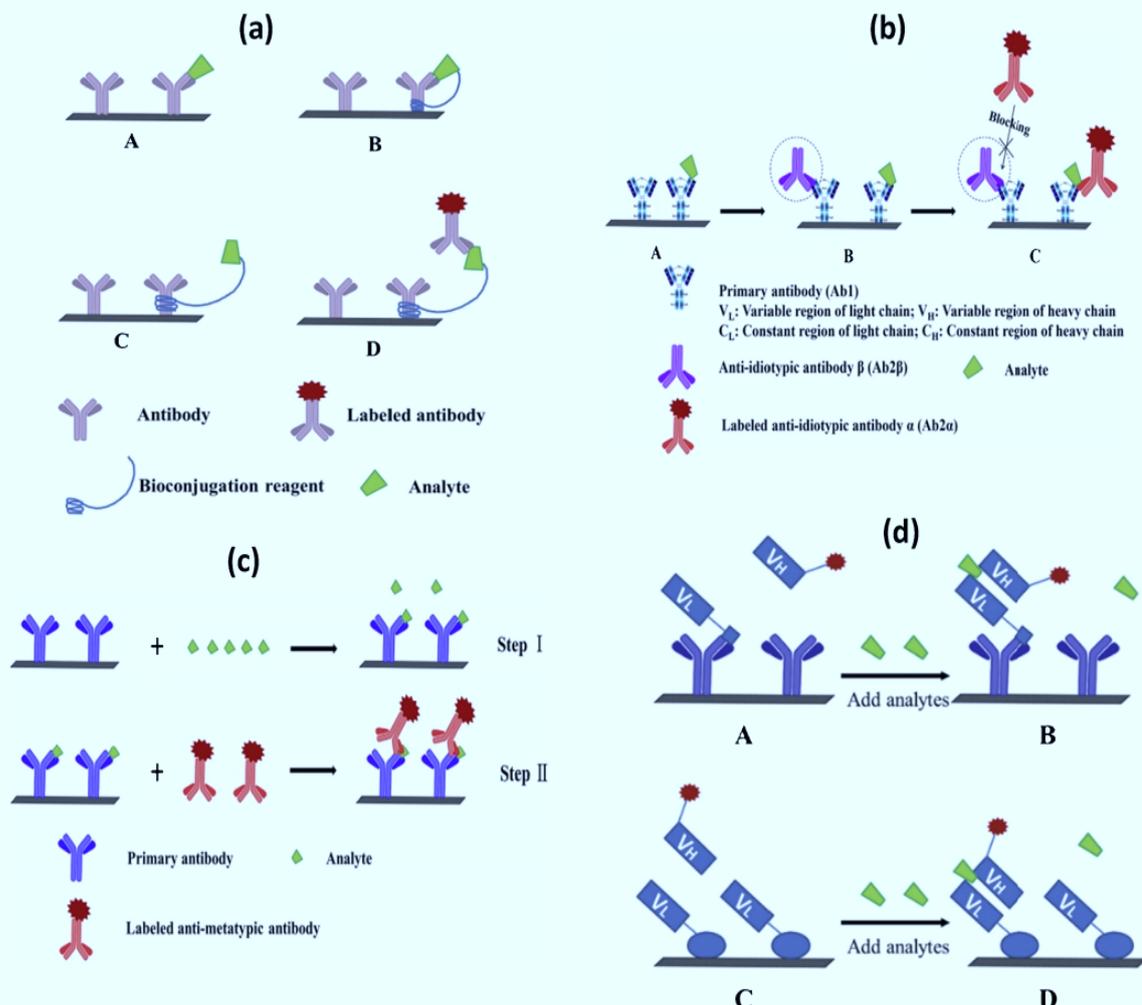


Fig. 6 Non-competitive laboratory immunoassays for small molecules [155]. **a** SPIE-IA (solid-phase immobilized epitope-immunoassay): This format is based on the use of a single antibody that acts as both capture and detection antibody. It takes place in four steps: (i) Analytes are captured by immobilized antibodies. (ii) Analytes are covalently bound to the immobilized antibodies with the help of a reagent (e.g., glutaraldehyde, carbonyldiimidazole). (iii) C-Analytes are then released from the immobilized antibodies by denaturation with a solvent. (iv) Detection antibodies coupled to an enzyme can then fix the analytes. **b** AIA-NIA (anti-idiotypic antibody-based non-competitive immunoassay): This format requires the use of three antibodies: an immobilized primary antibody (Ab1), an anti-idiotypic antibody (Ab2 α), and a labeled anti-idiotypic antibody (Ab2 β) and is performed in four steps: (i) The analyte binds to Ab1. (ii) Ab2 β is added to block the remaining Ab1 free binding sites. (iii) Ab2 α are then added to capture only the Ab1/analyte complexes (Ab2 β /Ab1 complexes cannot be captured due to steric hindrance). The

signal strength is proportional to the amount of Ab2 α labeled and bound to the Ab1/antigen complex. **c** AICA-NIA (anti-immune complex antibody-based non-competitive immunoassay): This assay uses an immobilized (Ab1) and an anti-metatypic (Ab2) antibody, the latter stabilizing the antibody/analyte complex. It takes place in two stages: (i) The analyte binds to the Ab1. (ii) Ab2 is added and binds the analyte-antibody complexes. The intensity reflects the amount of Ab2 that has bound. **d** OS-NIA (open sandwich non-competitive immunoassay): This format is based on the association of free VH and VL chains from the variable domain of an antibody, which dissociate in the absence of the antigen (i.e., the analyte). It takes place in two stages: (i) The VL chains, conjugated to a carrier protein, are fixed by immobilized antibodies. (ii) The analyte and the labeled VH chains are added. The binding of the antigens to the VL chains allows the association of the VL and VH chains. The intensity of the signal is proportional to the quantity of labeled VH chains present

cases, complex coupling chemistry procedures are necessary to obtain an immunogen [157]. Furthermore, antibodies of interest have to be selected on their specificity to recognize exclusively the molecule, without recognition of the derived molecule, or of related molecules. The smaller the molecule, the more difficult this selection is to achieve. Competitive immunoassays also exhibit poorer sensitivity than immunometric ones because of the use of a limited amount of reagent, which does not facilitate the formation of antigen/antibody complexes.

Finally, there could be issues of loss of performance, potentially in terms of specificity, when moving from mass spectrometry-based methods to immunoassays. In this context, there are many studies aimed at comparing the performances of immunoassays and mass spectrometry-based approaches. Most of them deal with drugs and their metabolites, and, to a lesser extent, with endogenous metabolites such as steroids, thyroid hormones, and vitamin D derivatives. Some of these studies show that these two methods exhibit the same kind of performances [158–160], whereas others point out variable quantitative performances between immunoassays [161], and specificity issue with over- or underestimated concentrations measured in immunoassays [162–165].

Anyway, despite these limitations, it is important to continue working on new small-molecule immunoassay formats given their sensitivity, their relative simplicity of implementation, and the lack of efficient alternative methods, when methods based on mass spectrometry and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy cannot be used.

Biosensors for small molecules: toward point of care tests for metabolomics?

Point-of-care (PoC) tests are medical laboratory diagnostic tests intended to be carried out in the direct proximity of the patient, at the physician's office, in pharmacies, in medical centers, in the emergency rooms of hospitals, or even in professional laboratories. Whether in hospitals or not, PoC tests are expected to give results within a short period of time (30 min). Those tests thus require the smallest possible logistical footprint, in terms of transport and space and storage conditions, as well as handling time, and are designed to be carried out by staff not necessarily trained in laboratory medicine (nurse, medical assistant), or even by the patient himself or his relatives. Lateral flow immunoassay (LFIA) is probably the ideal on-field point-of-care test since it does not require complex sample preparation or further steps after the deposition of the sample and can be performed easily by untrained staff. Although mainly used for protein targets, competitive LFIA, whose principle is described on Fig. 7, have been developed for small molecules. However, they are more complex to implement and less sensitive than non-competitive LFIA for different reasons. Firstly, obtaining a specific and

affine antibody is difficult as the molecule is small [146]. Secondly, the decreased signal observed in competitive methods is more difficult to interpret than the appearance of a signal [146]. Moreover, these tests are neither suitable for multiplexed detection nor for field quantification, and are subject to matrix effects. Indeed, in the case of small endogenous molecules, the challenge is important: some of them may have relatively small variations (less than a factor of 5) between a physiological and a pathological state, they generally require a preliminary sample extraction step, and only the integration of data from several biomarkers will allow the interpretation of a biological signature. The test must be accurate, robust (with little matrix effect), quantitative, highly multiplexable, and easily interpretable, and must integrate automated sample preparation before analysis. Therefore, the PoC tests for fine, multiplexed, integrated quantification of multiple metabolites of different natures must address unmet needs and will require a large research effort which will be driven by the need of clinicians [167].

Research on rapid tests has developed considerably, especially regarding nanoparticles-based devices [168] and microfluidics [169], paving the way to the emergence of new diagnostic devices [170]. Wearable chemical sensors enabling real-time on-body analytical chemistry are in increasing development. However, they only allow monitoring electrolytes and few metabolites such as glucose or lactic acid at the time of writing this review [171].

Biosensors are devices that combine the physical properties of a transducing platform (electrical, optical, etc.) with those of a biological or synthetic component in order to detect, i.e., sense, the presence and, possibly, quantify the concentration of a target compound, i.e., the analyte. This combination, if properly addressed, benefits from both the natural selectivity of a wide range of bioreceptors (enzymes, antibodies but also nucleic acids and even viruses, bacteria, and whole cells) or synthetic molecules (i.e., molecularly imprinted polymers (MIPs), aptamers, etc.) and the sensitivity of the devices converting, i.e., transducing, the binding event between the bioreceptors and the analyte in an analytical signal. Depending on the nature of this signal, several transduction methods could be employed, such as optical, electrochemical, thermal, or piezoelectric biosensors.

Biosensors are one of the most important representatives of PoC devices that are having a remarkable impact on patients' life and, thus, are also being pursued with the highest interest by the research community. Indeed, PoC biosensors' characteristics should reach the criteria "REASSURED," i.e., real-time connectivity, ease of specimen collection and environmental friendliness, affordable, sensitive, specific, user friendly, rapid, equipment free, delivered [172], as they should provide real-time connectivity and easy specimen collection.

Nanotechnology can push even further the characteristics of PoC biosensors by introducing nanomaterials, guaranteeing

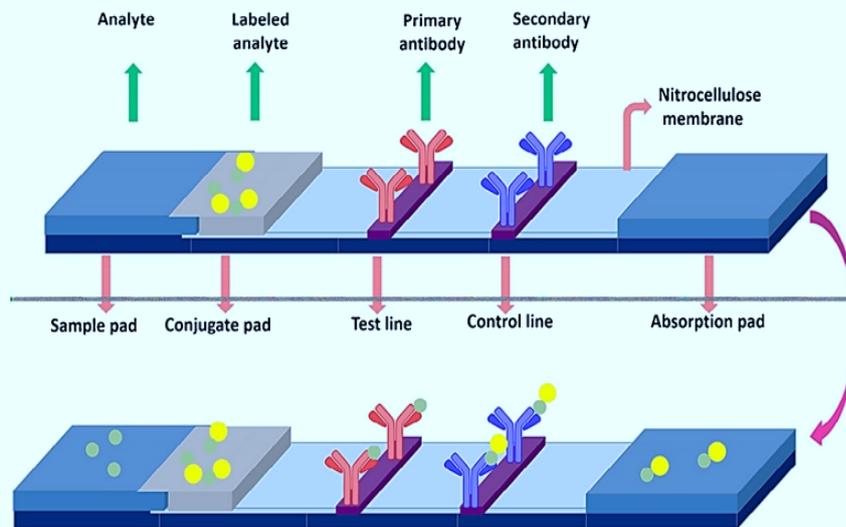


Fig. 7 Principle of competitive lateral flow immunoassays: The device is composed of four parts: (i) a sample pad, on which the sample is deposited; (ii) a conjugate dried buffer, containing the labeled analyte analog; (iii) a nitrocellulose membrane, on which are found test line(s) composed of antibodies recognizing the analyte(s), and control line(s) formed by antibodies which recognize the labeled analyte analog; and (iv) an absorbent paper, which serves to pump the liquid sample and reserves any

excess sample. In the absence of the target analyte (negative sample), labeled analog analytes move through the strip and bind on both test and control lines. In a positive sample, a competition takes place on the test line between the analyte and its labeled analog. As before, the excess of labeled analyte analog is captured by antibodies in the control line. Thus, a signal is only observed on the control line. Adapted from reference [166]

numerous advantages, such as ultra-high sensitivity, further miniaturization if necessary, nanoreceptors with high stability and specificity, and innovative detection mechanisms, improving the performances while decreasing the associated costs.

Most of the challenges of small-molecule detection are directly related to the use of biorecognition elements. As previously emphasized, due to the low molecular weight and simple structure of small molecules, they show a lack of immunogenicity when it comes to antibody production. For this reason, there have been strong efforts to develop other types of bioreceptors in order to have better performance with this type of molecules. Among them are aptamers and MIPs, which can be successfully applied to PoC nanobiosensors.

Aptamers are nucleic acid (DNA or RNA) short sequences that bind to a specific target and are determined through sequential evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) [173, 174]. A pool of random nucleic acid sequences is repeatedly incubated with the target analyte, and the unbound sequences are discarded. After various rounds with different stringencies, the sequences with higher affinity for the target are selected. The SELEX methodology has been successful in developing aptamers for small molecules. This is in part thanks to the flexibility of the method, which can be adapted to the nature and needs of the target molecule (capture-SELEX, capillary-SELEX, or nitrocellulose-SELEX, for instance). [175, 176]. Conventional and capture-SELEX have been reported as suitable options for small molecules [177].

Theoretically, these methods allow the production of big amounts of aptamers at low cost and take less time compared to antibody production, as well as avoiding the use of animal testing and batch-to-batch variations. Of course, this allows the production of aptamers for toxic molecules that would kill the animal in the immunization process. Moreover, stability and affinity toward the target can be modulated by modifying the sequence of the aptamer, along with adding other elements to the sequence depending on its intended use (fluorophores, biotin, thiol groups, etc.), which is especially interesting for assays combining aptamers with nanomaterials. As SELEX is performed by incorporating negative counter-selection rounds, a high specificity and selectivity are ensured. In contrast, antibodies often show cross-reactivity between similar molecules [178].

Aptamers are approximately one tenth of the size of an antibody, with enough recognition surface area to target small molecules, unlike antibodies, which rely on epitopes that are often scarce in small molecules [179]. Compared with antibodies, the small size of aptamers also allows a high immobilization rate at the surface of a biosensor, increasing its sensitivity. Besides, they can be regenerated for long-term monitoring and are not susceptible to irreversible denaturation, in contrast to antibodies. Moreover, aptamers have a long shelf-life and stability under strong conditions such as temperature, chemicals or pH, which makes its transportation, storage, and performance much easier in remote areas [178]. As depicted in Table 3, different platforms and detection strategies have been successfully and

sensitively detecting small molecules in biological samples by using aptamers in the last decade. For instance, microfluidic devices, lateral flow and electrochemical systems are some of the potential platforms where aptamers can be implemented (see Fig. 8).

To summarize, aptamers have shown potentially great advantages over the use of antibodies for diagnostic applications since their discovery in 1990. This is especially of interest for small molecules for which antibodies are not well suited. However, their implementation into PoC nanobiosensors is rather scarce [169], and despite promising results, there is still no commercialized diagnostic tests based on aptamers. Studies are needed to evaluate their performance in biological media for diagnostic tests involving metabolites.

For the last decades, it has been a challenging task to generate polymeric matrices with homogeneously distributed and highly specific cavities, thoroughly designed to match the dimensions and chemical functionality of a target molecule. This type of bioreceptors is known as molecularly imprinted polymers (MIPs), which are considered synthetic biorecognition elements resulting from the polymerization of

a precise combination of one or several functional monomers and the desired target, i.e., “template molecule,” along with other components present in the polymerization solution, such as a cross-linker molecule. The utmost important challenge that needs to be addressed in the first stages of the development of a MIP would be to study the binding interactions among the monomers and between the monomer and the template, which must be guaranteed in order to form a spontaneous and stable template-monomer complexation. From this, several other parameters must be considered for the formation of a single-molecule MIP or a “class-selective” one, which is particularly designed to detect a family of related molecules. Some of them are the template-to-monomer (T:M) ratio, the crosslinking degree, porogenic solvent selection, and some physical parameters, such as temperature, pH, and agitation of the polymer solution.

The use of MIPs as another metabolomics tool has been considered an interesting approach due to their fast production, robustness, chemical inertness, cost-effectiveness, and long-term stability. If precisely tuned, they can withstand extreme values of pH and temperature [180, 181]. Unlike current

Table 3 Characteristics and performance of the main biosensors currently available for small-molecule detection in biological fluids

Analyte	Transducer	Bioreceptor	LOD	Response time	Biological fluid	Ref.
Cocaine and synthetic cathinones	Colorimetric	Aptamer	10 μ M	5 min	Saliva and urine	Luo et al., 2019 [198]
Cocaine	Microfluidic, electrochemistry	Aptamer	10 μ M	1–2 min	Blood serum	Swensen et al., 2009 [199]
Adenosine triphosphate (ATP)	Lateral-flow assay	Self-assembly of split aptamers fragments	2 μ M	10 min	Blood serum	Chen et al., 2012 [200]
Adenosine	Electrochemistry uPAD	Aptamers	5.7 μ M	10 min	Urine	Fu et al., 2017 [201]
Cocaine, ATP	Fluorescence	Exonuclease-mediated aptamer digestion	500 nM	25 min	Urine	Canoura et al., 2018 [202]
Tetrahydrocannabinol	Magnetoresistive sensor	Antibodies competitive detection	10 ng/ml	< 15 min	Saliva	Lee et al., 2016 [203]
Ochratoxin A, aflatoxin B1, ATP, potassium ions	Localized surface plasmon resonance	Aptamers on gold nanorods	0.56, 0.63, 0.87, 1.05 pM	30–60 min	Serum	Park et al., 2017 [204]
L-Tyrosinamide	Fluorescence polarization assay	Aptamer	200 nM	< 10 min	Urine	Ruta et al., 2009 [205]
Phenytoin	CMOS BioMEMS		4.06 μ g/ml	25 min	Artificial samples	Yen et al., 2020 [206]
Dopamine, cortisol, serotonin	Thermal variation	MIPs and thermal transducers	8 μ M	/	Serum and urine	Diliën et al., 2017 [186]
Carnitine	Potentiometric	MIPs, Radical polymerization	80 μ M	/	Urine	Moret et al., 2014 [187]
Dopamine	Ratiometric electrochemical	MIPs and nanoporous Au	0.1 μ M	2 min	Artificial CSF	Yang et al., 2019 [207]
Glucose	Electrochemical	MIPs and AuNPs	1.25 nM	30 min	Serum	Sehit et al., 2020 [188]

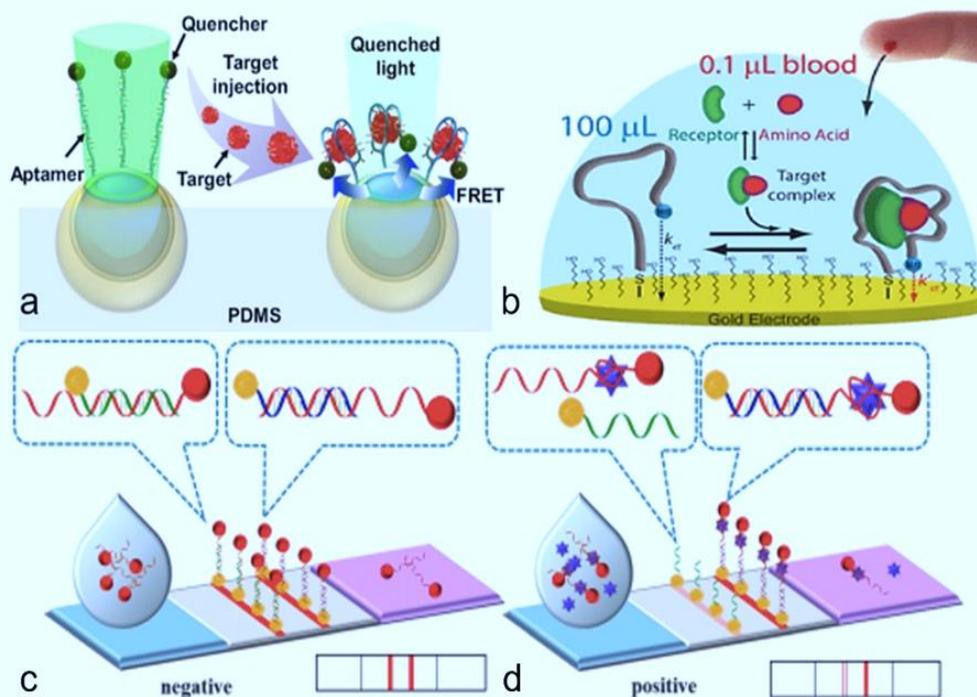


Fig. 8 Overview of the possible adaptation of aptamers in different detection platforms combined with nanomaterials. (a) Gold nanocapsule-supported up-conversion nanoparticles for fabrication of a solid-phase aptasensor for ochratoxin A detection. Extracted from reference [209]. (b) Calibration-free measurement of phenylalanine levels in the blood

using an electrochemical aptamer-based sensor suitable for point-of-care applications extracted from reference [210]. (c and d) Aptamer-based lateral flow test strip for rapid detection of zearalenone in corn samples. Adapted from reference [211]

and typical immunoaffinity-based approaches, MIPs have demonstrated a higher sample load capacity for small molecules (MW below 3 kDa), resulting in higher recoveries for further analytical applications, as well as displaying a slightly higher selectivity and specificity toward smaller targets [182].

Based on the final applicability of the desired sensor, several approaches have been developed. For detecting tamoxifen, for example, an estrogen receptor used to prevent breast cancer, a successfully electropolymerized MIP composed of *o*-phenylenediamine and resorcinol was developed [183]. This methodology demonstrated a better diffusion rate, permeability, and binding affinity to the target. Acetaminophen has also been investigated for medical and clinical purposes, by using signal enhancers, such as gold nanoparticles [184], or developing a thin MIP layer that enhances the selectivity [185]. Other metabolites have also been studied, such as dopamine [186], carnitine [187], and glucose [188], among others, as it can be seen in Table 3 and Fig. 9.

Anyway, to our knowledge and as for aptamers, there are still no commercialized diagnostic tests based on MIPs. These two types of synthetic bioreceptors (aptamers and MIPs) need to address the issue of properly working in real biological fluids, as well as for enzyme- and immunoaffinity-based systems, as it was aforementioned [189]. Most metabolites are often found in ultra-low concentrations in biological samples.

In these cases, the integration of nanomaterials clearly upgrades the sensitivity, either by signal amplification or better immobilization of the biorecognition elements [190]. Another inconvenience is the complexity of biological fluids, which might contain contaminants causing cross-reactivity, or even nucleases, that are detrimental for these bioreceptors [191]. While electrochemical platforms are well known for their advantages in complex matrices like blood (i.e., glucometer, the most-known example), optical platforms still face the problem of interferences mainly due to the viscosity and optical properties of the samples (e.g., the deep red of blood causes background interference) [192] [193].

Conclusion

Metabolomics workflows, including sample preparation, MS and/or NMR analyses, data pre-processing, statistical analyses, and data visualization, have been developed since the 2000s and have now reached a certain level of maturity. Data production methods have gained in sensitivity and versatility, suggesting the possibility of achieving metabolite detection, identification, and quantification at the same time. Many guidelines covering pre-analytical stages, data acquisition, and study design have been published. Quality

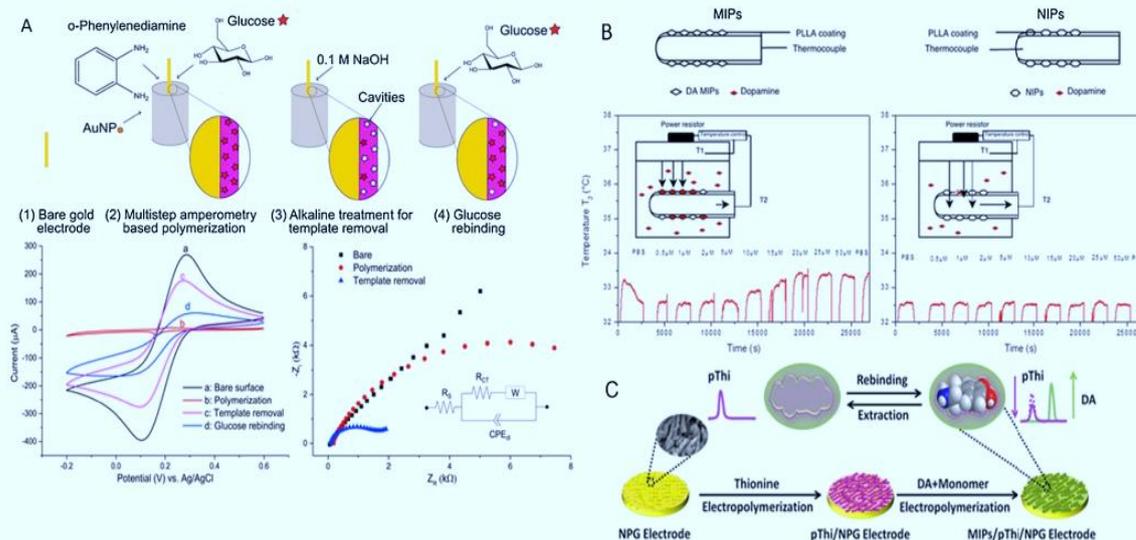


Fig. 9 MIP-based biosensing platforms. **a** Gold nanoparticle (AuNP) decorated MIPs using o-PD and glucose as monomer and template molecules, respectively. CV and DPV measurement of each step. Extracted from Sehiti et al. [188]. **b** Schematic representation of the heat flow through the MIP and NIP-coated thermocouples. Extracted from Diliën

et al. [186]. **c** Schematic diagram of the synthesis process of MIPs/pThi/NPG electrodes, along with their respective DPV measurements and the calibration curves for dopamine detection. Adapted from Yang et al. [207]

management processes have been proposed, become consensual, and are more and more used. Data warehouses dedicated to metabolomics have been developed, improving data sharing. Despite this, no diagnostic test based on metabolomics has yet been marketed. The main issues are linked to lacks of standardized data production tools and interoperability, to inappropriate design of clinical trials for the discovery and validation of metabolomics signatures, and to the difficulty of integrating multiscale biological information to generate knowledge and predictive models.

However, more than 600 articles dealing with metabolomics for the investigation of medical cohorts have been published over the 2015–2020 period, some of them leading to proposed metabolomics signatures of disease diagnosis and severity, and response or non-response to treatments. In this context, it is now time to consider how to be prepared to efficiently transfer future metabolomics signatures to clinical settings. First of all, metabolomics signatures obtained from untargeted metabolomics cannot be directly used in the routine care practice. There is a need for simplification and for moving to quantitative results. Indeed, many actors and structures are involved in healthcare systems, such as clinical units in hospitals, medical laboratories in hospital settings or outside the hospitals, physician's offices, pharmacists, and at least the patient at home.

A first step regarding the transfer of metabolomics signatures to the field could rely on medical laboratories in hospital settings. Clinical biologists will certainly have a key role in data production and interpretation, and for transmitting the results, clinicians by integrating the biological message into the global clinical context. In this case, one can think about

centralized data production platforms equipped with (high-resolution) MS or NMR instruments. However, not all medical laboratories are and will be equipped with these instruments. Thus, there is a need to consider alternative methods, such as enzyme assays, immunoassays, and biosensors. In particular, even if enzyme assays have been and are still widely used for monitoring small molecules in biological fluids, they are restricted to few key metabolic intermediates present at high concentrations, and they have low multiplexing capabilities. Immunoassays are also very popular in the field of clinical and environmental chemistry, regarding the detection of drugs and more generally xenobiotics. However, they still suffer from limitations linked to the difficulty of generating antibodies having satisfactory sensitivity and specificity, which limits the design of biosensors for small molecules. Aptamers and molecularly imprinted polymers are attractive and promising alternatives to antibodies, especially in the field of small molecules, but further research efforts are needed to evaluate their relevance in complex biological media.

To conclude, it is important to intensify research in analytical chemistry, not only in the generation of metabolomics data for producing interoperable and reusable data, but also in the field of point-of-care tests, in order to be ready when molecular signatures can be used in routine care practice. Furthermore, the small metabolite concentration variations that are often observed between groups in many metabolomics and lipidomics studies represent an important limitation for clinical translation, which will call for new ways of thinking in the fields of analytical chemistry and data sciences to overcome this issue.

Funding Christian Moguet is the recipient of a PhD grant funded by CEA. We acknowledge funding from the MICROB-PREDICT project. The MICROB-PREDICT project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 825694. This reflects only the author's view, and the European Commission is not responsible for any use that may be made of the information it contains.

Declarations

Ethics approval Not applicable

Source of biological material Not applicable

Statement on animal welfare Not applicable

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 1998;16:373–8.
- Junot C, Fenaile F, Colsch B, Bécher F. High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways. *Mass Spectrom Rev.* 2014;33:471–500. <https://doi.org/10.1002/mas.21401>.
- Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell.* 2008;134:714–7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.026>.
- da Silva RR, Dorrestein PC, Quinn RA. Illuminating the dark matter in metabolomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:12549–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516878112>.
- Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, Young N, Xia J, Knox C, Dong E, Huang P, Hollander Z, Pedersen TL, Smith SR, Bamforth F, et al. The human serum metabolome. *PLoS ONE.* 2011;6:e16957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016957>.
- Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:263–9. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>.
- Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev.* 2011;40:387–426. <https://doi.org/10.1039/B906712B>.
- Deng P, Li X, Petriello MC, Wang C, Morris AJ, Hennig B. Application of metabolomics to characterize environmental pollutant toxicity and disease risks. *Rev Environ Health.* 2019;34:251–9. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0030>.
- Salem MA, Perez de Souza L, Serag A, Femie AR, Farag MA, Ezzat SM, Alseekh S. Metabolomics in the context of plant natural products research: from sample preparation to metabolite analysis. *Metabolites.* 2020;10. <https://doi.org/10.3390/metabo10010037>.
- Castro-Moretti FR, Gentzel IN, Mackey D, Alonso AP. Metabolomics as an emerging tool for the study of plant-pathogen interactions. *Metabolites.* 2020;10:37. <https://doi.org/10.3390/metabo10020052>.
- González-Peña D, Brennan L. Recent advances in the application of metabolomics for nutrition and health. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2019;10:479–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121715>.
- Rivera-Velez SM, Navas J, Villarino NF. Applying metabolomics to veterinary pharmacology and therapeutics. *J Vet Pharmacol Ther.* 2021. <https://doi.org/10.1111/jvp.12961>.
- Hood L, Flores M. A personal view on systems medicine and the emergence of proactive P4 medicine: predictive, preventive, personalized, and participatory. *New Biotechnol.* 2012;29:613–24. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.03.004>.
- Sagner M, McNeil A, Puska P, Auffray C, Price ND, Hood L, Lavie CJ, Han Z-G, Chen Z, Brahmachari SK, McEwen BS, Soares MB, Balling R, Epel E, Arena R. The P4 health spectrum - a predictive, preventive, personalized and participatory continuum for promoting healthspan. *Prog Cardiovasc Dis.* 2017;59:506–21. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2016.08.002>.
- Bossuyt PM. Where are all the new omics-based tests? *Clin Chem.* 2014;60:1256–7. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.223339>.
- Pinu FR, Goldansaz SA, Jaine J. Translational metabolomics: current challenges and future opportunities. *Metabolites.* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/metabo9060108>.
- Trifonova OP, Maslov DL, Balashova EE, Lokhov PG. Mass spectrometry-based metabolomics diagnostics - myth or reality? *Expert Rev Proteomics.* 2021;18:7–12. <https://doi.org/10.1080/14789450.2021.1893695>.
- Trivedi DK, Hollywood KA, Goodacre R. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. *New Horiz Transl Med.* 2017;3:294–305. <https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2017.06.001>.
- Zhang X, Li Q, Xu Z, Dou J. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: a systematic review. *RSC Adv.* 2020;10:3092–104. <https://doi.org/10.1039/C9RA08985C>.
- Li B, He X, Jia W, Li H. Novel applications of metabolomics in personalized medicine: a mini-review. *Mol Basel Switz.* 2017;22:1173. <https://doi.org/10.3390/molecules22071173>.
- Kohler I, Hankemeier T, van der Graaf PH, Knibbe CAJ, van Hasselt JGC. Integrating clinical metabolomics-based biomarker discovery and clinical pharmacology to enable precision medicine. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2017;109S: S15–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.018>.
- Haug K, Salek RM, Conesa P, Hastings J, de Matos P, Rijnbeek M, Mahendrakar T, Williams M, Neumann S, Rocca-Serra P, Maguire E, González-Beltrán A, Sansone S-A, Griffin JL, Steinbeck C. MetaboLights—an open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D781–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1004>.
- Haug K, Cochrane K, Nainala VC, Williams M, Chang J, Jayaseelan KV, O'Donovan C. MetaboLights: a resource evolving in response to the needs of its scientific community. *Nucleic Acids Res.* 2020;48:D440–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1019>.

24. Sud M, Fahy E, Cotter D, Azam K, Vadivelu I, Burant C, Edison A, Fiehn O, Higashi R, Nair KS, Sumner S, Subramaniam S. Metabolomics workbench: an international repository for metabolomics data and metadata, metabolite standards, protocols, tutorials and training, and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:D463–70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1042>.
25. Fiehn O, Robertson D, Griffin J, van der Werf M, Nikolau B, Morrison N, Sumner LW, Goodacre R, Hardy NW, Taylor C, Fostel J, Kristal B, Kaddurah-Daouk R, Mendes P, van Ommen B, Lindon JC, Sansone S-A. The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics.* 2007;3:175–8. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>.
26. Martens L, Chambers M, Sturm M, Kessner D, Levander F, Shofstahl J, Tang WH, Römpf A, Neumann S, Pizarro AD, Montecchi-Palazzi L, Tasman N, Coleman M, Reisinger F, Souda P, Hernjakob H, Binz P-A, Deutsch EW. mzML—a community standard for mass spectrometry data. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2011;10:R110.000133. <https://doi.org/10.1074/mcp.R110.000133>.
27. Schober D, Jacob D, Wilson M, Cruz JA, Marcu A, Grant JR, Moing A, Deborde C, de Figueiredo LF, Haug K, Rocca-Serra P, Easton J, Ebbels TMD, Hao J, Ludwig C, Günther UL, Rosato A, Klein MS, Lewis IA, et al. nmrML: a community supported open data standard for the description, storage, and exchange of NMR data. *Anal Chem.* 2018;90:649–56. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02795>.
28. Rocca-Serra P, Salek RM, Arita M, Correa E, Dayalan S, Gonzalez-Beltran A, Ebbels T, Goodacre R, Hastings J, Haug K, Koulman A, Nikolski M, Oresic M, Sansone S-A, Schober D, Smith J, Steinbeck C, Viant MR, Neumann S. Data standards can boost metabolomics research, and if there is a will, there is a way. *Metabolomics.* 2016;12:14. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0879-3>.
29. Sansone S-A, Rocca-Serra P, Field D, Maguire E, Taylor C, Hofmann O, Fang H, Neumann S, Tong W, Amaral-Zettler L, Begley K, Booth T, Bougueleret L, Burns G, Chapman B, Clark T, Coleman L-A, Copeland J, Das S, et al. Toward interoperable bioscience data. *Nat Genet.* 2012;44:121–6. <https://doi.org/10.1038/ng.1054>.
30. Rampler E, Abiead YE, Schoeny H, Ruzs M, Hildebrand F, Fitz V, Koellensperger G. Recurrent topics in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics-standardization, coverage, and throughput. *Anal Chem.* 2021;93:519–45. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04698>.
31. Phinney KW, Ballihaut G, Bedner M, Benford BS, Camara JE, Christopher SJ, Davis WC, Dodder NG, Eppe G, Lang BE, Long SE, Lowenthal MS, McGaw EA, Murphy KE, Nelson BC, Prendergast JL, Reiner JL, Rimmer CA, Sander LC, et al. Development of a standard reference material for metabolomics research. *Anal Chem.* 2013;85:11732–8. <https://doi.org/10.1021/ac402689t>.
32. Siskos AP, Jain P, Römisch-Margl W, Bennett M, Achaintre D, Asad Y, Marney L, Richardson L, Koulman A, Griffin JL, Raynaud F, Scalbert A, Adamski J, Prehn C, Keun HC. Interlaboratory reproducibility of a targeted metabolomics platform for analysis of human serum and plasma. *Anal Chem.* 2017;89:656–65. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02930>.
33. Telu KH, Yan X, Wallace WE, Stein SE, Simón-Manso Y. Analysis of human plasma metabolites across different liquid chromatography/mass spectrometry platforms: cross-platform transferable chemical signatures. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2016;30:581–93. <https://doi.org/10.1002/rcm.7475>.
34. Bowden JA, Heckert A, Ulmer CZ, Jones CM, Koelmel JP, Abdullah L, Ahonen L, Alnouti Y, Amando AM, Asara JM, Bamba T, Barr JR, Bergquist J, Borchers CH, Brandsma J, Breitkopf SB, Cajka T, Cazenave-Gassiot A, Checa A, et al. Harmonizing lipidomics: NIST interlaboratory comparison exercise for lipidomics using SRM 1950—metabolites in frozen human plasma. *J Lipid Res.* 2017;58:2275–88. <https://doi.org/10.1194/jlr.M079012>.
35. Thompson JW, Adams KJ, Adamski J, Asad Y, Borts D, Bowden JA, Byram G, Dang V, Dunn WB, Fernandez F, Fiehn O, Gaul DA, Hühmer AF, Kalli A, Koal T, Koeniger S, Mandal R, Meier F, Naser FJ, et al. International ring trial of a high resolution targeted metabolomics and lipidomics platform for serum and plasma analysis. *Anal Chem.* 2019;91:14407–16. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02908>.
36. Bearden DW, Sheen DA, Simón-Manso Y, Benner BA, Rocha WFC, Blonder N, Lippa KA, Beger RD, Schnackenberg LK, Sun J, Mehta KY, Cheema AK, Gu H, Marupaka R, Nagana Gowda GA, Raftery D. Metabolomics test materials for quality control: a study of a urine materials suite. *Metabolites.* 2019;9:270. <https://doi.org/10.3390/metabo9110270>.
37. Mandal R, Cano R, Davis CD, Hayashi D, Jackson SA, Jones CM, Lampe JW, Latulippe ME, Lin NJ, Lippa KA, Piotrowski P, Da Silva SM, Swanson KS, Wishart DS. Workshop report: Toward the development of a human whole stool reference material for metabolomic and metagenomic gut microbiome measurements. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2020;16:119. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01744-5>.
38. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:W251–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv380>.
39. Hsu Y-HH, Churchhouse C, Pers TH, Mercader JM, Metspalu A, Fischer K, Fortney K, Morgen EK, Gonzalez C, Gonzalez ME, Esko T, Hirschhorn JN. PAIRUP-MS: Pathway analysis and imputation to relate unknowns in profiles from mass spectrometry-based metabolite data. *PLoS Comput Biol.* 2019;15:e1006734. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006734>.
40. Pang Z, Zhou G, Chong J, Xia J. Comprehensive meta-analysis of COVID-19 global metabolomics datasets. *Metabolites.* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/metabo11010044>.
41. Ioannidis JPA, Bossuyt PMM. Waste, leaks, and failures in the biomarker pipeline. *Clin Chem.* 2017;63:963–72. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.254649>.
42. Poste G. Bring on the biomarkers. *Nature.* 2011;469:156–7. <https://doi.org/10.1038/469156a>.
43. Ramautar R, Berger R, van der Greef J, Hankemeier T. Human metabolomics: strategies to understand biology. *Curr Opin Chem Biol.* 2013;17:841–6. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.015>.
44. Kennedy AD, Wittmann BM, Evans AM, Miller LAD, Toal DR, Lonergan S, Elsea SH, Pappan KL. Metabolomics in the clinic: a review of the shared and unique features of untargeted metabolomics for clinical research and clinical testing. *J Mass Spectrom JMS.* 2018;53:1143–54. <https://doi.org/10.1002/jms.4292>.
45. Collino S, Martin F-PJ, Rezzi S. Clinical metabolomics paves the way towards future healthcare strategies. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75:619–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04216.x>.
46. Beger RD, Dunn W, Schmidt MA, Gross SS, Kirwan JA, Cascante M, Brennan L, Wishart DS, Oresic M, Hankemeier T, Broadhurst DI, Lane AN, Suhre K, Kastenmüller G, Sumner SJ, Thiele I, Fiehn O, Kaddurah-Daouk R, for “Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group”. Metabolomics Society Initiative. Metabolomics enables precision medicine: “A White Paper, Community Perspective”. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2016;12:149. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1094-6>.
47. Saito K, Maekawa K, Pappan KL, Urata M, Ishikawa M, Kumagai Y, Saito Y. Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their

- inter-individual variations. *Metabolomics*. 2014;10:402–13. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0591-0>.
48. Wedge DC, Allwood JW, Dunn W, Vaughan AA, Simpson K, Brown M, Priest L, Blackhall FH, Whetton AD, Dive C, Goodacre R. Is serum or plasma more appropriate for intersubject comparisons in metabolomic studies? An assessment in patients with small-cell lung cancer. *Anal Chem*. 2011;83:6689–97. <https://doi.org/10.1021/ac2012224>.
 49. Fang M, Ivanisevic J, Benton HP, Johnson CH, Patti GJ, Hoang LT, Uritboonthai W, Kurczy ME, Siuzdak G. Thermal degradation of small molecules: a global metabolomic investigation. *Anal Chem*. 2015;87:10935–41. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03003>.
 50. Roux A, Thévenot EA, Seguin F, Olivier M-F, Junot C. Impact of collection conditions on the metabolite content of human urine samples as analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics*. 2015;11:1095–105. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0764-5>.
 51. Lu W, Su X, Klein MS, Lewis IA, Fiehn O, Rabinowitz JD. Metabolite measurement: pitfalls to avoid and practices to follow. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:277–304. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044952>.
 52. Kamlage B, Maldonado SG, Bethan B, Peter E, Schmitz O, Liebenberg V, Schatz P. Quality markers addressing preanalytical variations of blood and plasma processing identified by broad and targeted metabolite profiling. *Clin Chem*. 2014;60:399–412. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.211979>.
 53. Rebholz CM, Rhee EP. Application of metabolomics to renal and cardiometabolic diseases. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2020;2104:401–17. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_20.
 54. Blaise BJ, Correia G, Tin A, Young JH, Vergnaud A-C, Lewis M, Pearce JTM, Elliott P, Nicholson JK, Holmes E, Ebbels TMD. Power analysis and sample size determination in metabolic phenotyping. *Anal Chem*. 2016;88:5179–88. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00188>.
 55. Nyamundanda G, Gormley IC, Fan Y, Gallagher WM, Brennan L. MetSizeR: selecting the optimal sample size for metabolomic studies using an analysis based approach. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:338. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-338>.
 56. Billoir E, Navratil V, Blaise BJ. Sample size calculation in metabolic phenotyping studies. *Brief Bioinform*. 2015;16:813–9. <https://doi.org/10.1093/bib/bbu052>.
 57. Kirwan JA, Brennan L, Broadhurst D, Fiehn O, Cascante M, Dunn WB, Schmidt MA, Velagapudi V. Preanalytical processing and biobanking procedures of biological samples for metabolomics research: a white paper, community perspective (for “Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group”-The Metabolomics Society Initiative). *Clin Chem*. 2018;64:1158–82. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.287045>.
 58. Long NP, Nghi TD, Kang YP, Anh NH, Kim HM, Park SK, Kwon SW. Toward a standardized strategy of clinical metabolomics for the advancement of precision medicine. *Metabolites*. 2020;10:51. <https://doi.org/10.3390/metabo10020051>.
 59. Dudzik D, Barbas-Bernardos C, García A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. A review. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;147:149–73. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.044>.
 60. Pepe MS, Li Cl, Feng Z. Improving the quality of biomarker discovery research: the right samples and enough of them. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2015;24:944–50. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-1227>.
 61. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, Nicholls AW, Wilson ID, Kell DB, Goodacre R, Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*. 2011;6:1060–83. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335>.
 62. González-Riano C, Dudzik D, Garcia A, Gil-de-la-Fuente A, Gradillas A, Godzien J, López-González Á, Rey-Stolle F, Rojo D, Ruperez FJ, Saiz J, Barbas C. Recent developments along the analytical process for metabolomics workflows. *Anal Chem*. 2020;92:203–26. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04553>.
 63. Boudah S, Olivier M-F, Aros-Calt S, Oliveira L, Fenaile F, Tabet J-C, Junot C. Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014;966:34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.025>.
 64. Karu N, Deng L, Slac M, Guo AC, Sajed T, Huynh H, Wine E, Wishart DS. A review on human fecal metabolomics: methods, applications and the human fecal metabolome database. *Anal Chim Acta*. 2018;1030:1–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.031>.
 65. Tabone M, Bressa C, García-Merino JA, Moreno-Pérez D, Van EC, Castelli FA, Fenaile F, Larrosa M. The effect of acute moderate-intensity exercise on the serum and fecal metabolomes and the gut microbiota of cross-country endurance athletes. *Sci Rep*. 2021;11:3558. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82947-1>.
 66. Mervant L, Tremblay-Franco M, Jamin EL, Kesse-Guyot E, Galan P, Martin J-F, Guéraud F, Debrauwer L. Osmolality-based normalization enhances statistical discrimination of untargeted metabolomic urine analysis: results from a comparative study. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc*. 2021;17:2. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01758-z>.
 67. Thévenot EA, Roux A, Xu Y, Ezan E, Junot C. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *J Proteome Res*. 2015;14:3322–35. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00354>.
 68. Edmands WMB, Ferrari P, Scalbert A. Normalization to specific gravity prior to analysis improves information recovery from high resolution mass spectrometry metabolomic profiles of human urine. *Anal Chem*. 2014;86:10925–31. <https://doi.org/10.1021/ac503190m>.
 69. Chen Y, Shen G, Zhang R, He J, Zhang Y, Xu J, Yang W, Chen X, Song Y, Abliz Z. Combination of injection volume calibration by creatinine and MS signals' normalization to overcome urine variability in LC-MS-based metabolomics studies. *Anal Chem*. 2013;85:7659–65. <https://doi.org/10.1021/ac401400b>.
 70. Warrack BM, Hnatyshyn S, Ott K-H, Reilly MD, Sanders M, Zhang H, Drexler DM. Normalization strategies for metabolomic analysis of urine samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877:547–52. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.007>.
 71. Jacob CC, Dervilly-Pinel G, Biancotto G, Le Bizec B. Evaluation of specific gravity as normalization strategy for cattle urinary metabolome analysis. *Metabolomics*. 2014;10:627–37. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0604-z>.
 72. Meister I, Zhang P, Sinha A, Sköld CM, Wheelock AM, Izumi T, Chaleckis R, Wheelock CE. High-precision automated workflow for urinary untargeted metabolomic epidemiology. *Anal Chem*. 2021;93:5248–58. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00203>.
 73. Aros-Calt S, Castelli FA, Lamourette P, Gervasi G, Junot C, Muller BH, Fenaile F. Metabolomic investigation of *Staphylococcus aureus* antibiotic susceptibility by liquid

- chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;1871:279–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8814-3_18.
74. Moynes O, Castelli F, Bicout DJ, Bocard J, Camara B, Cournoyer B, Faudry E, Terrier S, Hannani D, Huot-Marchand S, Léger C, Maurin M, Ngo T-D, Plazy C, Quinn RA, Attree I, Fenaille F, Toussaint B, Le Gouëllec A. Metabotypes of *Pseudomonas aeruginosa* correlate with antibiotic resistance, virulence and clinical outcome in cystic fibrosis chronic infections. *Metabolites*. 2021;11:63. <https://doi.org/10.3390/metabo11020063>.
75. Contrepois K, Jiang L, Snyder M. Optimized analytical procedures for the untargeted metabolomic profiling of human urine and plasma by combining hydrophilic interaction (HILIC) and reverse-phase liquid chromatography (RPLC)-mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2015;14:1684–95. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046508>.
76. Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2015;1:a000588. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>.
77. Southam AD, Haglington LD, Najdekr L, Jankevics A, Weber RJM, Dunn WB. Assessment of human plasma and urine sample preparation for reproducible and high-throughput UHPLC-MS clinical metabolic phenotyping. *The Analyst*. 2020;145:6511–23. <https://doi.org/10.1039/d0an01319f>.
78. Blaženović I, Kind T, Ji J, Fiehn O. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. *Metabolites*. 2018;8:31. <https://doi.org/10.3390/metabo8020031>.
79. Moreau R, Clària J, Aguilar F, Fenaille F, Lozano JJ, Junot C, Colsch B, Caraceni P, Trebicka J, Pavesi M, Alessandria C, Nevens F, Saliba F, Welzel TM, Albillos A, Gustot T, Fernández J, Moreno C, Baldassarre M, et al. Blood metabolomics uncovers inflammation-associated mitochondrial dysfunction as a potential mechanism underlying ACLF. *J Hepatol*. 2020;72:688–701. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.11.009>.
80. Zaccherini G, Aguilar F, Caraceni P, Clària J, Lozano JJ, Fenaille F, Castelli F, Junot C, Curto A, Formentin C, Weiss E, Bernardi M, Jalan R, Angeli P, Moreau R, Arroyo V. Assessing the role of amino acids in systemic inflammation and organ failure in patients with ACLF. *J Hepatol*. 2021;74:1117–31. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.035>.
81. Kind T, Fiehn O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:234. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-234>.
82. Nash WJ, Dunn WB. From mass to metabolite in human untargeted metabolomics: recent advances in annotation of metabolites applying liquid chromatography-mass spectrometry data. *TrAC Trends Anal Chem*. 2019;120:115324. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.022>.
83. Barbier Saint Hilaire P, Hohenester UM, Colsch B, Tabet J-C, Junot C, Fenaille F. Evaluation of the high-field Orbitrap fusion for compound annotation in metabolomics. *Anal Chem*. 2018;90:3030–5. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05372>.
84. Horai H, Anita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, Oda Y, Kakazu Y, Kusano M, Tohge T, Matsuda F, Sawada Y, Hirai MY, Nakanishi H, Ikeda K, et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom JMS*. 2010;45:703–14. <https://doi.org/10.1002/jms.1777>.
85. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly M-A, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeronik K, Stothard P, et al. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:D521–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gk1923>.
86. Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Nguyen DD, Watrous J, Kapono CA, Luzzatto-Knaan T, Porto C, Bouslimani A, Melnik AV, Meehan MJ, Liu W-T, Crüsemann M, Boudreau PD, Esquenazi E, Sandoval-Calderón M, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol*. 2016;34:828–37. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.
87. Fahy E, Sud M, Cotter D, Subramaniam S. LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:W606–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm324>.
88. Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, Custodio DE, Abagyan R, Siuzdak G. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit*. 2005;27:747–51.
89. Vinaixa M, Schymanski EL, Neumann S, Navarro M, Salek RM, Yanes O. Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: state of the field and future prospects. *TrAC Trends Anal Chem*. 2016;78:23–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005>.
90. Frainay C, Schymanski EL, Neumann S, Merlet B, Salek RM, Jourdan F, Yanes O. Mind the gap: mapping mass spectral databases in genome-scale metabolic networks reveals poorly covered areas. *Metabolites*. 2018;8:51. <https://doi.org/10.3390/metabo8030051>.
91. Blaženović I, Kind T, Sa MR, Ji J, Vaniya A, Wancewicz B, Roberts BS, Torbašinović H, Lee T, Mehta SS, Showalter MR, Song H, Kwok J, Jahn D, Kim J, Fiehn O. Structure annotation of all mass spectra in untargeted metabolomics. *Anal Chem*. 2019;91:2155–62. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04698>.
92. Oberacher H, Sasse M, Antignac J-P, Guillon Y, Debrauwer L, Jamin EL, Schulze T, Krauss M, Covaci A, Caballero-Casero N, Rousseau K, Damont A, Fenaille F, Lamoree M, Schymanski EL. A European proposal for quality control and quality assurance of tandem mass spectral libraries. *Environ Sci Eur*. 2020;32. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00314-9>.
93. Wilkinson MD, Dumontier M, Sansone S-A, Bonino da Silva Santos LO, Prieto M, Batista D, McQuilton P, Kuhn T, Rocca-Serra P, Crosas M, Schultes E. Evaluating FAIR maturity through a scalable, automated, community-governed framework. *Sci Data*. 2019;6:174. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0184-5>.
94. Damont A, Olivier M-F, Warnet A, Lyan B, Pujos-Guillot E, Jamin EL, Debrauwer L, Bernillon S, Junot C, Tabet J-C, Fenaille F. Proposal for a chemically consistent way to annotate ions arising from the analysis of reference compounds under ESI conditions: a prerequisite to proper mass spectral database constitution in metabolomics. *J Mass Spectrom JMS*. 2019;54:567–82. <https://doi.org/10.1002/jms.4372>.
95. Peisl BYL, Schymanski EL, Wilmes P. Dark matter in host-microbiome metabolomics: tackling the unknowns—a review. *Anal Chim Acta*. 2018;1037:13–27. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.12.034>.
96. Simón-Manso Y, Marupaka R, Yan X, Liang Y, Telu KH, Mirokhin Y, Stein SE. Mass spectrometry fingerprints of small-molecule metabolites in biofluids: building a spectral library of recurrent spectra for urine analysis. *Anal Chem*. 2019;91:12021–9. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02977>.
97. Li S, Park Y, Duraisingham S, Strobel FH, Khan N, Soltow QA, Jones DP, Pulendran B. Predicting network activity from high throughput metabolomics. *PLoS Comput Biol*. 2013;9:e1003123. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003123>.
98. Broadhurst D, Goodacre R, Reinke SN, Kuligowski J, Wilson ID, Lewis MR, Dunn WB. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics*. 2018;14:72. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>.

99. Evans AM, O'Donovan C, Playdon M, Beecher C, Beger RD, Bowden JA, Broadhurst D, Clish CB, Dasari S, Dunn WB, Griffin JL, Hartung T, Hsu P-C, Huan T, Jans J, Jones CM, Kachman M, Klemsang A, Lewis MR, et al. Dissemination and analysis of the quality assurance (QA) and quality control (QC) practices of LC-MS based untargeted metabolomics practitioners. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2020;16:113. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01728-5>.
100. Sangster T, Major H, Plumb R, Wilson AJ, Wilson ID. A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabolomic analysis. *The Analyst.* 2006;131:1075–8. <https://doi.org/10.1039/b604498k>.
101. Godzien J, Kalaska B, Adamska-Patrano E, Siroka J, Ciborowski M, Kretowski A, Barbas C. Oxidized glycerophosphatidylcholines in diabetes through non-targeted metabolomics: their annotation and biological meaning. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019;1120:62–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.053>.
102. Rafiei A, Sleno L. Comparison of peak-picking workflows for untargeted liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry metabolomics data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2015;29:119–27. <https://doi.org/10.1002/rcm.7094>.
103. Giacomoni F, Le Corguillé G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Pétéra M, Duprier C, Tremblay-Franco M, Martin J-F, Jacob D, Goulitquer S, Thévenot EA, Caron C. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinforma Oxf Engl.* 2015;31:1493–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813>.
104. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J. *MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis.* *Nucleic Acids Res.* 2018;46:W486–94. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>.
105. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TW-M, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Hamly J, Higashi R, Kopka J, Lane AN, Lindon JC, Marriott P, Nicholls AW, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2007;3:211–21. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>.
106. Creek DJ, Dunn WB, Fiehn O, Griffin JL, Hall RD, Lei Z, Mistrik R, Neumann S, Schymanski EL, Sumner LW, Trengove R, Wolfender J-L. Metabolite identification: are you sure? And how do your peers gauge your confidence? *Metabolomics.* 2014;10:350–3. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0656-8>.
107. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ Sci Technol.* 2014;48:2097–8. <https://doi.org/10.1021/es5002105>.
108. Sumner LW, Lei Z, Nikolau BJ, Saito K, Roessner U, Trengove R. Proposed quantitative and alphanumeric metabolite identification metrics. *Metabolomics.* 2014;10:1047–9. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0739-6>.
109. Lewis MR, Pearce JTM, Spagou K, Green M, Dona AC, Yuen AHY, David M, Berry DJ, Chappell K, Homeffer-van der Sluis V, Shaw R, Lovestone S, Elliott P, Shockcor J, Lindon JC, Cloarec O, Takats Z, Holmes E, Nicholson JK. Development and application of ultra-performance liquid chromatography-TOF MS for precision large scale urinary metabolic phenotyping. *Anal Chem.* 2016;88:9004–13. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01481>.
110. Considine EC. The search for clinically useful biomarkers of complex disease: a data analysis perspective. *Metabolites.* 2019;9:126. <https://doi.org/10.3390/metabo9070126>.
111. Viant MR, Ebbels TMD, Beger RD, Ekman DR, Epps DJT, Kamp H, Leonards PEG, Loizou GD, MacRae JI, van Ravenzwaay B, Rocca-Serra P, Salek RM, Walk T, Weber RJM. Use cases, best practice and reporting standards for metabolomics in regulatory toxicology. *Nat Commun.* 2019;10:3041. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10900-y>.
112. Burla B, Arita M, Arita M, Bendt AK, Cazenave-Gassiot A, Dennis EA, Ekroos K, Han X, Ikeda K, Liebisch G, Lin MK, Loh TP, Meikle PJ, Orešič M, Quehenberger O, Shevchenko A, Torta F, Wakelam MJO, Wheelock CE, Wenk MR. MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines. *J Lipid Res.* 2018;59:2001–17. <https://doi.org/10.1194/jlr.S087163>.
113. Beger RD, Dunn WB, Bandukwala A, Bethan B, Broadhurst D, Clish CB, Dasari S, Derr L, Evans A, Fischer S, Flynn T, Hartung T, Herrington D, Higashi R, Hsu P-C, Jones C, Kachman M, Karuso H, Kruppa G, et al. Towards quality assurance and quality control in untargeted metabolomics studies. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2019;15:4. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1460-7>.
114. Laparre J, Kaabia Z, Mooney M, Buckley T, Sherry M, Le Bizec B, Dervilly-Pinel G. Impact of storage conditions on the urinary metabolomics fingerprint. *Anal Chim Acta.* 2017;951:99–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.055>.
115. Palmer EA, Cooper HJ, Dunn WB. Investigation of the 12-month stability of dried blood and urine spots applying untargeted UHPLC-MS metabolomic assays. *Anal Chem.* 2019;91:14306–13. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02577>.
116. Haid M, Muschet C, Wahl S, Römisch-Margl W, Pohn C, Möller G, Adamski J. Long-term stability of human plasma metabolites during storage at -80 °C. *J Proteome Res.* 2018;17:203–11. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00518>.
117. Wagner-Golbs A, Neuber S, Kamlage B, Christiansen N, Bethan B, Rennefahrt U, Schatz P, Lind L. Effects of long-term storage at -80 °C on the human plasma metabolome. *Metabolites.* 2019;9:884–96. <https://doi.org/10.3390/metabo9050099>.
118. Dunn WB, Lin W, Broadhurst D, Begley P, Brown M, Zelena E, Vaughan AA, Halsall A, Harding N, Knowles JD, Francis-McIntyre S, Tseng A, Ellis DI, O'Hagan S, Aarons G, Benjamin B, Chew-Graham S, Moseley C, Potter P, et al. Molecular phenotyping of a UK population: defining the human serum metabolome. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2015;11:9–26. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0707-1>.
119. Sindelar M, Stancliffe E, Schwaiger-Haber M, Anbukumar DS, Albrecht RA, Liu W-C, Adkins-Travis K, Garcia-Sastre A, Shriver LP, Patti GJ. Longitudinal metabolomics of human plasma reveals robust prognostic markers of COVID-19 disease severity. *MedRxiv Prepr Serv Health Sci.* 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.02.05.21251173>.
120. Fernández-Albert F, Llorach R, Garcia-Aloy M, Ziyatdinov A, Andres-Lacueva C, Perera A. Intensity drift removal in LC/MS metabolomics by common variance compensation. *Bioinforma Oxf Engl.* 2014;30:2899–905. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu423>.
121. Brunius C, Shi L, Landberg R. Large-scale untargeted LC-MS metabolomics data correction using between-batch feature alignment and cluster-based within-batch signal intensity drift correction. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2016;12:173. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1124-4>.
122. Webb-Robertson B-JM, Stratton KG, Kyle JE, Kim Y-M, Bramer LM, Waters KM, Koeller DM, Metz TO. Statistically driven metabolite and lipid profiling of patients from the undiagnosed diseases network. *Anal Chem.* 2020;92:1796–803. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03522>.
123. Watrous JD, Henglin M, Claggett B, Lehmann KA, Larson MG, Cheng S, Jain M. Visualization, quantification, and alignment of spectral drift in population scale untargeted metabolomics data.

- Anal Chem. 2017;89:1399–404. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04337>.
124. Liu Q, Walker D, Uppal K, Liu Z, Ma C, Tran V, Li S, Jones DP, Yu T. Addressing the batch effect issue for LC/MS metabolomics data in data preprocessing. *Sci Rep.* 2020;10:13856. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70850-0>.
125. Li S, Sullivan NL, Roupael N, Yu T, Banton S, Maddur MS, McCausland M, Chiu C, Canniff J, Dubey S, Liu K, Tran V, Hagan T, Duraisingham S, Wieland A, Mehta AK, Whitaker JA, Subramaniam S, Jones DP, et al. Metabolic phenotypes of response to vaccination in humans. *Cell.* 2017;169:862–877.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.026>.
126. Martin J-C, Maillot M, Mazerolles G, Verdu A, Lyan B, Migné C, Defoort C, Canlet C, Junot C, Guillou C, Manach C, Jabob D, Bouveresse DJ-R, Paris E, Pujos-Guillot E, Jourdan F, Giacomoni F, Courant F, Favé G, et al. Can we trust untargeted metabolomics? Results of the metabo-ring initiative, a large-scale, multi-instrument inter-laboratory study. *Metabolomics.* 2015;11:807–21. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0740-0>.
127. Izumi Y, Matsuda F, Hirayama A, Ikeda K, Kita Y, Horie K, Saigusa D, Saito K, Sawada Y, Nakanishi H, Okahashi N, Takahashi M, Nakao M, Hata K, Hoshi Y, Morihara M, Tanabe K, Bamba T, Oda Y. Inter-laboratory comparison of metabolite measurements for metabolomics data integration. *Metabolites.* 2019;9:257. <https://doi.org/10.3390/metabo9110257>.
128. Yu B, Zanetti KA, Tempresa M, Albanes D, Appel N, Barrera CB, Ben-Shlomo Y, Boerwinkle E, Casas JP, Clish C, Dale C, Dehghan A, Derkach A, Eliassen AH, Elliott P, Fahy E, Gieger C, Gunter MJ, Harada S, et al. The Consortium of Metabolomics Studies (COMETS): metabolomics in 47 prospective cohort studies. *Am J Epidemiol.* 2019;188:991–1012. <https://doi.org/10.1093/aje/kwz028>.
129. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol Chapter.* 2012;30:Unit 30.2.1-24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>.
130. Clària J, Moreau R, Fenaille F, Amorós A, Junot C, Gronbaek H, Coenraad MJ, Pruvost A, Ghetta S, Chu-Van E, López-Vicario C, Oettl K, Caraceni P, Alessandria C, Trebicka J, Pavesi M, Deulofeu C, Albillos A, Gustot T, et al. Orchestration of tryptophan-kynurenine pathway, acute decompensation, and acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. *Hepatology.* 2019;69:1686–701. <https://doi.org/10.1002/hep.30363>.
131. Raetz M, Bonner R, Hopfgartner G. SWATH-MS for metabolomics and lipidomics: critical aspects of qualitative and quantitative analysis. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2020;16:71. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01692-0>.
132. Fenaille F, Barbier Saint-Hilaire P, Rousseau K, Junot C. Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: where do we stand? *J Chromatogr A.* 2017;1526:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.043>.
133. Barbier Saint Hilaire P, Rousseau K, Seyer A, Dechaumet S, Damont A, Junot C, Fenaille F. Comparative evaluation of data dependent and data independent acquisition workflows implemented on an Orbitrap fusion for untargeted metabolomics. *Metabolites.* 2020;10:158. <https://doi.org/10.3390/metabo10040158>.
134. van der Laan T, Boom I, Maliepaard J, Dubbelman A-C, Harms AC, Hankemeier T. Data-independent acquisition for the quantification and identification of metabolites in plasma. *Metabolites.* 2020;10. <https://doi.org/10.3390/metabo10120514>.
135. Cifuentes Girard MF, Ruskic D, Böhm G, Picononi R, Hopfgartner G. Automated parallel derivatization of metabolites with SWATH-MS data acquisition for qualitative and quantitative analysis. *Anal Chim Acta.* 2020;1127:198–206. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.030>.
136. Cho K, Schwaiger-Haber M, Naser FJ, Stancliffe E, Sindelar M, Patti GJ. Targeting unique biological signals on the fly to improve MS/MS coverage and identification efficiency in metabolomics. *Anal Chim Acta.* 2021;1149:338210. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338210>.
137. Zha H, Cai Y, Yin Y, Wang Z, Li K, Zhu Z-J. SWATHtoMRM: development of high-coverage targeted metabolomics method using SWATH technology for biomarker discovery. *Anal Chem.* 2018;90:4062–70. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05318>.
138. Rinaudo P, Boudah S, Junot C, Thévenot EA. biosigner: a new method for the discovery of significant molecular signatures from omics data. *Front Mol Biosci* 3:26. 2016. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00026>.
139. Piro V, Alfaro CM, Jamusch AK, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Intraoperative assessment of tumor margins during glioma resection by desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:6700–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706459114>.
140. Brown HM, Alfaro CM, Piro V, Dey M, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Intraoperative mass spectrometry platform for IDH mutation status prediction, glioma diagnosis, and estimation of tumor cell infiltration. *J Appl Lab Med.* 2021. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa233>.
141. Iwata T, Yamasaki K. Enzymatic determination and thin-layer chromatography of bile acids in blood. *J Biochem (Tokyo).* 1964;56:424–31. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128013>.
142. Triebig G, Schaller KH. A simple and reliable enzymatic assay for the determination of formic acid in urine. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 1980;108:355–60. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(80\)90341-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(80)90341-1).
143. Rolton HA, McConnell KN, Modi KS, Macdougall AI. A simple, rapid assay for plasma oxalate in uraemic patients using oxalate oxidase, which is free from vitamin C interference. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 1989;182:247–54. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90102-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90102-2).
144. Crook MA, Kargbo S, Lumb P. Measurement of urine total sialic acid: comparison of an automated ultraviolet enzymatic method with a colorimetric assay. *Br J Biomed Sci.* 2002;59:20–3. <https://doi.org/10.1080/09674845.2002.11783629>.
145. Žižalová K, Vecka M, Vítek L, Leniček M. Enzymatic methods may underestimate the total serum bile acid concentration. *PLoS One.* 2020;15:e0236372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236372>.
146. Darwish IA. Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. *Int J Biomed Sci IJBS.* 2006;2:217–35.
147. Pratt JJ. Steroid immunoassay in clinical chemistry. *Clin Chem.* 1978;24:1869–90.
148. Wudy SA, Schuler G, Sánchez-Guijo A, Hartmann MF. The art of measuring steroids: principles and practice of current hormonal steroid analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;179:88–103. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.003>.
149. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol.* 2009;19:73–8. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2007.12.001>.
150. Murphy BM, He X, Dandy D, Henry CS. Competitive immunoassays for simultaneous detection of metabolites and proteins using micromosaic patterning. *Anal Chem.* 2008;80:444–50. <https://doi.org/10.1021/ac7019046>.
151. Ye F, Liu J, Huang Y, Li S, Zhao S. Competitive immunoassay of progesterone by microchip electrophoresis with chemiluminescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013;936:74–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.002>.

152. Apilux A, Rengpipat S, Suwanjang W, Chailapakul O. Paper-based immunosensor with competitive assay for cortisol detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;178:112925. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112925>.
153. Sanavio B, Krol S. On the slow diffusion of point-of-care systems in therapeutic drug monitoring. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00020>.
154. Reynoso E, Torres E, Bettazzi F, Palchetti I. Trends and perspectives in immunosensors for determination of currently-used pesticides: the case of glyphosate, organophosphates, and neonicotinoids. *Biosensors.* 2019;9:20. <https://doi.org/10.3390/bios9010020>.
155. Li Y, Zhang G, Mao X, Yang S, De Ruyck K, Wu Y. High sensitivity immunoassays for small molecule compounds detection – novel noncompetitive immunoassay designs. *TrAC Trends Anal Chem.* 2018;103:198–208. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.008>.
156. Roberts RF, Roberts WL. Performance characteristics of five automated serum cortisol immunoassays. *Clin Biochem.* 2004;37:489–93. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.01.009>.
157. Wen K, Bai Y, Wei Y, Li C, Shen J, Wang Z. Influence of small molecular property on antibody response. *J Agric Food Chem.* 2020;68:10944–50. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04333>.
158. Brozmanova H, Urinovska R, Safarcik K, Vsiansky F, Kacirova I, Grundmann M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of gentamicin and its individual congeners in serum and comparison results with two immunoanalytical methods (fluorescence polarization immunoassay and chemiluminiscent microparticle immunoassay). *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2021;S0009-8981(21):00254. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.07.014>.
159. Bowerbank SL, Carlin MG, Dean JR. A direct comparison of liquid chromatography-mass spectrometry with clinical routine testing immunoassay methods for the detection and quantification of thyroid hormones in blood serum. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411:2839–53. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01724-2>.
160. Shin S-Y, Kwon M-J, Song J, Park H, Woo H-Y. Measurement of serum total vitamin D (25-OH) using automated immunoassay in comparison [corrected] with liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *J Clin Lab Anal.* 2013;27:284–9. <https://doi.org/10.1002/jcla.21598>.
161. Farrell C-JL, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem.* 2012;58:531–42. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.172155>.
162. Moal V, Mathieu E, Reynier P, Malhiéry Y, Gallois Y. Low serum testosterone assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison with five immunoassay techniques. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2007;386:12–9. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.07.013>.
163. Huhtaniemi IT, Tajar A, Lee DM, O'Neill TW, Finn JD, Bartfai G, Boonen S, Casanueva FF, Giwercman A, Han TS, Kula K, Labrie F, Lean MEJ, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Vanderschueren D, Forti G, Wu FCW, EMAS Group. Comparison of serum testosterone and estradiol measurements in 3174 European men using platform immunoassay and mass spectrometry; relevance for the diagnostics in aging men. *Eur J Endocrinol.* 2012;166:983–91. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-1051>.
164. Martínez-Escribano A, Maroto-García J, Ruiz-Galdón M, Barrios-Rodríguez R, Álvarez-Millán JJ, Cabezas-Sánchez P, Plaza-Andrades I, Molina-Vega M, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI, Fernández-García JC. Measurement of serum testosterone in non-diabetic young obese men: comparison of direct immunoassay to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomolecules.* 2020;10:E1697. <https://doi.org/10.3390/biom10121697>.
165. Watanabe T, Tanaka R, Ono H, Suzuki Y, Tatsuta R, Itoh H. Sensitive, wide-range and high-throughput quantification of cyclosporine in whole blood using ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and comparison with an antibody-conjugated magnetic immunoassay. *Biomed Chromatogr BMC.* 2021;35:e5128. <https://doi.org/10.1002/bmc.5128>.
166. Bahadır EB, Sezgintürk MK (2016) Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends Anal Chem* 82: 286–306. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.006>.
167. Dincer C, Bruch R, Kling A, Dittrich PS, Urban GA. Multiplexed point-of-care testing – xPOCT. *Trends Biotechnol.* 2017;35:728–42. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.03.013>.
168. Quesada-González D, Merkoçi A. Nanomaterial-based devices for point-of-care diagnostic applications. *Chem Soc Rev.* 2018;47:4697–709. <https://doi.org/10.1039/C7CS00837F>.
169. Liang W, Lin H, Chen J, Chen C. Utilization of nanoparticles in microfluidic systems for optical detection. *Microsyst Technol.* 2016;22:2363–70. <https://doi.org/10.1007/s00542-016-2921-4>.
170. Fuentes-Chust C, Parolo C, Rosati G, Rivas L, Perez-Toralla K, Simon S, de Lecuona I, Junot C, Trebicka J, Merkoçi A. The microbiome meets nanotechnology: opportunities and challenges in developing new diagnostic devices. *Adv Mater Deerfield Beach Fla.* 2021;33:e2006104. <https://doi.org/10.1002/adma.202006104>.
171. Sempionatto JR, Jeerapan I, Krishnan S, Wang J. Wearable chemical sensors: emerging systems for on-body analytical chemistry. *Anal Chem.* 2020;92:378–96. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04668>.
172. Land KJ, Boeras DI, Chen X-S, Ramsay AR, Peeling RW. Reassured diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nat Microbiol.* 2019;4:46–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>.
173. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990;249:505–10. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.
174. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990;346:818–22. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
175. Stoltenburg R, Nikolaus N, Strehlitz B. Capture-SELEX: selection of DNA aptamers for aminoglycoside antibiotics. *J Anal Methods Chem.* 2012;1. <https://doi.org/10.1155/2012/415697>.
176. Mendonsa SD, Bowser MT. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc.* 2004;126:20–1. <https://doi.org/10.1021/ja037832s>.
177. McKeague M, Derosa MC. Challenges and opportunities for small molecule aptamer development. *J. Nucleic Acids.* 2012;2012.
178. Bauer M, Strom M, Hammond DS, Shigdar S. Anything you can do, i can do better: can aptamers replace antibodies in clinical diagnostic applications? *Molecules.* 2019;24:1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules24234377>.
179. Thiviyathan V, Gorenstein GD. Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. *Proteomics Clin Appl.* 2012;6:563–73.
180. Rampey AM, Umpleby RJ, Rushton GT, Iseman JC, Shah RN, Shimizu KD. Characterization of the imprint effect and the influence of imprinting conditions on affinity, capacity, and heterogeneity in molecularly imprinted polymers using the Freundlich isotherm-affinity distribution analysis. *Anal Chem.* 2004;76:1123–33. <https://doi.org/10.1021/ac0345345>.
181. Spivak D. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:1779–94. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.012>.
182. Naseri M, Mohammadniaei M, Sun Y, Ashley J. The use of aptamers and molecularly imprinted polymers in biosensors for

- environmental monitoring: a tale of two receptors. *Chemosensors*. 2020;8:32. <https://doi.org/10.3390/chemosensors8020032>.
183. Yaman A, Scheller F. The first electrochemical MIP sensor for tamoxifen. *Sensors*. 2014;14:7647–54. <https://doi.org/10.3390/s140507647>.
 184. Menon S, Rajeshkumar S, Venkat Kumar S. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. *Resour-Effic Technol*. 2017;3:516–27. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.08.002>.
 185. Lee S, Lin OH, Doong R. Design of size-tunable molecularly imprinted polymer for selective adsorption of acetaminophen. *Clean Technol Environ Policy*. 2017;19:243–50. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1201-4>.
 186. Diliën H, Peeters M, Royakkers J, Harings J, Cornelis P, Wagner P, Steen Redeker E, Banks CE, Eersels K, van Grinsven B, Cleij TJ. Label-free detection of small organic molecules by molecularly imprinted polymer functionalized thermocouples: toward in vivo applications. *ACS Sens*. 2017;2:583–9. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00104>.
 187. Moret J, Moreira FTC, Almeida SAA, Sales MGF. New molecularly-imprinted polymer for camitine and its application as ionophore in potentiometric selective membranes. *Mater Sci Eng C*. 2014;43:481–7. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.056>.
 188. Sehit E, Drzazgowska J, Buchenau D, Yesildag C, Lensen M, Altintas Z. Ultrasensitive nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on gold nanoparticles and molecularly imprinted polymers. *Biosens Bioelectron*. 2020;165:112432. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112432>.
 189. Zhou W, Jimmy Huang PJ, Ding J, Liu J. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst*. 2014;139:2627–40. <https://doi.org/10.1039/c4an00132j>.
 190. Seok Kim Y, Ahmad Raston NH, Bock Gu M. Aptamer-based nanobiosensors. *Biosens Bioelectron*. 2016;76:2–19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.040>.
 191. Prante M, Segal E, Scheper T, Bahnmann J, Walter J. Aptasensors for point-of-care detection of small molecules. *Biosensors*. 2020;10. <https://doi.org/10.3390/bios10090108>.
 192. Zuo X, Xiao Y, Plaxco KW. High specificity, electrochemical sandwich assays based on single aptamer sequences and suitable for the direct detection of small-molecule targets in □ blood and other complex matrices. *J Am Chem Soc*. 2009;131:6944–5. <https://doi.org/10.1021/ja901315w>.
 193. Alyamani BJ, Alsager OA, Zourob M. Label-free fluorescent aptasensor for small targets via displacement of groove bound curcumin molecules. *Sens Switz*. 2019;19. <https://doi.org/10.3390/s19194181>.
 194. D'Alessandro A. Benford's law and metabolomics: a tale of numbers and blood. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. 2020;59:103019. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.103019>.
 195. Hsu Y-HH, Astley CM, Cole JB, Vedantam S, Mercader JM, Metspalu A, Fischer K, Fortney K, Morgen EK, Gonzalez C, Gonzalez ME, Esko T, Hirschhorn JN (2020) Integrating untargeted metabolomics, genetically informed causal inference, and pathway enrichment to define the obesity metabolome. *Int J Obes*. 2005;44:1596–606. <https://doi.org/10.1038/s41366-020-0603-x>.
 196. Wang Y, Hussein AM, Somasundaram L, Sankar R, Detraux D, Mathieu J, Ruohola-Baker H. microRNAs regulating human and mouse naïve pluripotency. *Int J Mol Sci*. 2019;20:5864. <https://doi.org/10.3390/ijms20235864>.
 197. Goodacre R, Broadhurst D, Smilde AK, Kristal BS, Baker JD, Beger R, Bessant C, Connor S, Capuani G, Craig A, Ebbels T, Kell DB, Manetti C, Newton J, Paternostro G, Somorjai R, Sjöström M, Trygg J, Wulfert F. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics*. 2007;3:231–41. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0081-3>.
 198. Luo Y, Yu H, Alkhamis O, Liu Y, Lou X, Yu B, Xiao Y. Label-free, visual detection of small molecules using highly target-responsive multimodule split aptamer constructs. *Anal Chem*. 2019;91:7199–207. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00507>.
 199. Swensen JS, Xiao Y, Ferguson BS, Lubin AA, Lai RY, Heeger AJ, Plaxco KW, Soh HT. Continuous, real-time monitoring of cocaine in undiluted blood serum via a microfluidic, electrochemical aptamer-based sensor. *J Am Chem Soc*. 2009;131:4262–6. <https://doi.org/10.1021/ja806531z>.
 200. Chen J, Fang Z, Lie P, Zeng L. Computational lateral flow biosensor for proteins and small molecules: a new class of strip logic gates. *Anal Chem*. 2012;84:6321–5. <https://doi.org/10.1021/ac301508b>.
 201. Fu H, Yang J, Guo L, Nie J, Yin Q, Zhang L, Zhang Y. Using the Rubik's cube to directly produce paper analytical devices for quantitative point-of-care aptamer-based assays. *Biosens Bioelectron*. 2017;96:194–200. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.012>.
 202. Canoura J, Wang Z, Yu H, Alkhamis O, Fu F, Xiao Y. No structure-switching required: a generalizable exonuclease-mediated aptamer-based assay for small-molecule detection. *J Am Chem Soc*. 2018;140:9961–71. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b04975>.
 203. Lee J-R, Choi J, Shultz TO, Wang SX. Small molecule detection in saliva facilitates portable tests of marijuana abuse. *Anal Chem*. 2016;88:7457–61. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01688>.
 204. Park J-H, Byun J-Y, Jang H, Hong D, Kim M-G. A highly sensitive and widely adaptable plasmonic aptasensor using berberine for small-molecule detection. *Biosens Bioelectron*. 2017;97:292–8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.06.019>.
 205. Ruta J, Perrier S, Ravelet C, Fize J, Peyrin E. Noncompetitive fluorescence polarization aptamer-based assay for small molecule detection. *Anal Chem*. 2009;81:7468–73. <https://doi.org/10.1021/ac9014512>.
 206. Yen Y-K, Chiu C-Y. A CMOS MEMS-based membrane-bridge nanomechanical sensor for small molecule detection. *Sci Rep*. 2020;10:2931. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60057-8>.
 207. Yang J, Hu Y, Li Y. Molecularly imprinted polymer-decorated signal on-off ratiometric electrochemical sensor for selective and robust dopamine detection. *Biosens Bioelectron*. 2019;135:224–30. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.054>.
 208. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods*. 2015;12:523–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>.
 209. Kim K, Jo E-J, Lee KJ, Park J, Jung GY, Shin Y-B, Lee LP, Kim M-G. Gold nanoparticle-supported upconversion nanoparticles for fabrication of a solid-phase aptasensor to detect ochratoxin A. *Biosens Bioelectron*. 2020;150:111885. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111885>.
 210. Idili A, Parolo C, Ortega G, Plaxco KW. Calibration-free measurement of phenylalanine levels in the blood using an electrochemical aptamer-based sensor suitable for point-of-care applications. *ACS Sens*. 2019;4:3227–33. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b01703>.
 211. Wu S, Liu L, Duan N, Li Q, Zhou Y, Wang Z. Aptamer-based lateral flow test strip for rapid detection of zearalenone in corn samples. *J Agric Food Chem*. 2018;66:1949–54. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05326>.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Brevet

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2022/162303 A1

(43) Date de la publication internationale
04 août 2022 (04.08.2022)

WIPO | PCT

- (51) Classification internationale des brevets :
CI2Q 1/10 (2006.01) *G01N 33/558* (2006.01)
CI2Q 1/34 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2022/050133
- (22) Date de dépôt international :
25 janvier 2022 (25.01.2022)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
FR2100708 26 janvier 2021 (26.01.2021) FR
- (71) Déposants : **COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES** [FR/FR] ; 25, rue Leblanc Bâtiment Le Ponant D, 75015 PARIS (FR). **UNIVERSITE PARIS-SACLAY** [FR/FR] ; Bâtiment BREGUET, 3 Rue Joliot Curie, 91190 GIF-SUR-YVETTE (FR).
- (72) Inventeurs : **VOLLAND, Hervé** ; CEA SACLAY - DRF/JOLIOT/DMTS/SPI/LERI, Bat. 136, 91190 GIF-SUR-YVETTE (FR). **MOGUET, Christian** ; CEA SACLAY - DRF/JOLIOT/DMTS/SPI/LERI, Bat. 136, 91190 GIF-SUR-YVETTE (FR). **NAAS, Thierry** ; Hôpital de Bicêtre Bâtiment Broca, 3ème étage, 78 rue du Gal Leclerc, 94275 LE KREMLIN-BICETRE (FR).
- (74) Mandataire : **REGIMBEAU** ; 20, rue de Chazelles, 75847 PARIS CEDEX 17 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))

(54) Title: DETECTING BETA-LACTAMASE ENZYME ACTIVITY

(54) Titre : DETECTION D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE DES BÉTA-LACTAMASES

(57) Abstract: It is essential to have efficient, simple, quick and transportable tools for reliably identifying bacteria that are multiresistant to antibiotics, more specifically broad-spectrum beta-lactamase (BSBL)-producing Enterobacteriaceae, which are the most widespread among Enterobacteriaceae. The present invention meets this requirement through its ease of use and its speed. The invention is based on detecting the enzyme activity of beta-lactam hydrolysis using an antibody capable of discriminating between the intact form of the beta-lactam ring of a beta-lactam and its hydrolysis product. This antibody can be used in kits and methods enabling for rapidly detecting (in less than one hour), without using expensive equipment (a small strip visible to the naked eye), the presence of bacteria producing penicillin-type, plasmid-mediated or hyper-produced AmpC enzymes, of BSBL or carbapenemase from colonies or in a sample.

(57) Abrégé : Il est crucial de disposer d'outils performants, simples, rapides, et transportables, pour identifier de manière fiable les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, et plus particulièrement les entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre élargi (BLSE) qui sont les plus largement répandues chez les Entérobactéries. La présente invention répond à ce besoin, par sa simplicité d'utilisation et sa rapidité. Elle repose sur la détection de l'activité enzymatique d'hydrolyse de β -lactamines, en utilisant un anticorps capable de discriminer entre la forme intacte du cycle β -lactamase d'une β -lactamine et de son produit d'hydrolyse. Cet anticorps peut être utilisé dans des kits et des procédés permettant de détecter très rapidement (en moins d'une heure), sans utiliser un matériel coûteux (une bandelette lisible à l'œil nu), la présence de bactéries produisant des enzymes de type pénicillinases, AmpC plasmidiques ou hyper-produites, de BLSE ou de carbapénémases à partir de colonies ou dans un échantillon.

WO 2022/162303 A1

Titre : Développement de tests rapides pour la détection des bêta-lactamases

Mots clés : Diagnostic, Antibiorésistance, Test immunochromatographique à flux latéral

Résumé : La lutte contre les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) représente un des plus grands défis auxquels doivent faire face nos sociétés actuelles. Le nombre d'infections causées par des BMR étant en nette augmentation dans le monde entier, celles-ci représentent un enjeu crucial de santé publique.

L'un des principaux mécanismes de résistance mis en place par les bactéries est la production de bêta-lactamases, enzymes hydrolysant les antibiotiques de type bêta-lactamine. Pour lutter efficacement contre la dissémination de bactéries produisant ces enzymes et fournir un traitement approprié aux patients, il est essentiel de pouvoir détecter rapidement les bêta-lactamases.

Dans ce contexte, le projet de cette thèse est de développer deux nouveaux tests bandelettes permettant de détecter l'activité enzymatique de ces enzymes. Ils détecteront l'hydrolyse de deux classes de bêta-lactamines : les céphalosporines et les carbapénèmes.

Ces tests seront basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de ces deux classes d'antibiotiques. Ces travaux de thèse impliqueront la production, la sélection et la caractérisation de ces anticorps. Les tests développés seront transférés à un industriel et validés avec différentes souches bactériennes produisant différentes bêta-lactamases dans différents échantillons biologiques (hémocultures, urines, écouvillons rectaux).

Title : Development of rapid tests for beta-lactamases detection

Key words : Diagnostic, Antimicrobial resistance, Lateral flow immunoassay

Abstract : The fight against multi-antibiotic resistant bacteria (MDR) is one of the greatest challenges facing our current societies. As the number of infections caused by MDRs is increasing significantly worldwide, they represent a crucial public health issue.

One of the main resistance mechanisms developed by bacteria is the production of beta-lactamases, enzymes that hydrolyze beta-lactam antibiotics. To effectively control the spread of bacteria producing these enzymes and provide appropriate treatment to patients, it is essential to be able to detect beta-lactamases as soon as possible.

In this context, the project of this thesis is to develop two new strip tests to detect the enzymatic activity of these enzymes. They will detect the hydrolysis of two classes of beta-lactamines: cephalosporins and carbapenems.

These tests will be based on the use of monoclonal antibodies specific to these two classes of antibiotics. This thesis work will involve the production, selection and characterization of these antibodies. The tests developed will be transferred to a company and validated with different bacterial strains producing various beta-lactamases in different biological sample (blood cultures, urine, rectal swabs).