



Développement d'outils innovants pour l'étude de l'infection chronique

Kevin Berrou

► To cite this version:

Kevin Berrou. Développement d'outils innovants pour l'étude de l'infection chronique. Microbiologie et Parasitologie. Université de Nîmes, 2019. Français. NNT : 2019NIME0001 . tel-04355403

HAL Id: tel-04355403

<https://theses.hal.science/tel-04355403>

Submitted on 20 Dec 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **L'UNIVERSITE DE NIMES**

Préparée au sein de l'école doctorale 583 -
Risques et Sociétés
Et de l'unité de recherche EA 7352 - CHROME

Spécialités : **Microbiologie / Biochimie /
Chimie analytique**

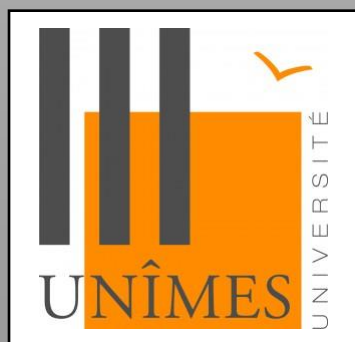
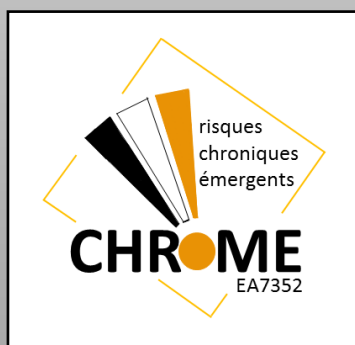
Présentée par **Kévin BERROU**

DEVELOPPEMENT D'OUTILS INNOVANTS POUR L'ETUDE DE L'INFECTION CHRONIQUE

Sous la direction d'**Axelle CADIERE** et **Jean-Philippe LAVIGNE**

Soutenue le **30 janvier 2019** devant le jury composé de

Mme Carole CAMARASA , Directeur de recherche, INRA, Montpellier	Rapporteur
M. Arnaud SALVADOR , Professeur des universités, Institut des Sciences Analytiques, Villeurbanne	Rapporteur
Mme Hélène MARCHANDIN , Professeur, Université de Montpellier	Présidente du jury
Mme Catherine DUNYACH-REMY , Praticienne hospitalier, CHU Nîmes	Examineur
M. Benoît ROIG , Professeur des universités, Université de Nîmes	Examineur



REMERCIEMENTS

Cette thèse s'est déroulée au sein de l'équipe CHROME (détection, évaluation et gestion des risques chroniques et émergents) dirigée par M. Benoît Roig. Je le remercie de m'avoir permis d'intégrer son équipe et d'avoir toujours gardé un œil sur mes travaux.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement tous mes directeurs et co-directeurs de thèse : Mme Catherine Dunyach-Remy et M. Jean-Philippe Lavigne du CHU de Nîmes pour leur expertise dans l'approche médicale et leurs conseils judicieux tout au long de ma thèse. Un grand merci à Mme Axelle Cadere, directrice de thèse qui m'a toujours laissé une très grande autonomie (C'est avant tout ta thèse !). Merci pour tes conseils au quotidien, pour m'avoir poussé à trouver des solutions à chaque problème et pour ta disponibilité même quand il fallait me surveiller au labo (j'étais encore trop petit pour rester seul !).

J'adresse mes remerciements à Mme Carole Camarasa et M. Arnaud Salvador d'avoir été les rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi qu'à Mme Hélène Marchandin, présidente du jury, pour avoir accepté d'évaluer ces trois années de recherche.

Je souhaite remercier les collègues de la première heure pour leur accueil. Merci à Célia 1 et Célia 2 pour m'avoir fait découvrir le labo. Merci à Amélie (actuelle kiwi), alias le couteau suisse, pour tous tes conseils et tes coups de main réguliers sur les nombreux problèmes de laboratoire. Merci à Thibaut pour l'année passée dans le même bureau à se dire « Winter in coming », aux moments à échanger sur le sport (bureau des sports et des paris), et aux remarques philosophiques telles que « Le gras c'est la vie ». Didier, merci pour avoir expliqué que la roue tourne mais ne tombe pas toujours au bon endroit et pour les idées quasi quotidiennes de start-up à développer !

Je remercie également les collègues actuels pour leur implication dans ma thèse : Audrey pour les coups de main au labo et dans l'encadrement de stagiaires, Nicolas pour les heures passées à la GC à se battre et à finir par avoir gain de cause. Merci aussi à Miyanou, alias « Mimi », collègue thésarde et actuelle voisine de bureau qui m'a aidé sur beaucoup de problèmes de chimie. Et non, désolé je n'ai toujours pas la réponse à la question essentielle de savoir si le cheval est diabétique !

Merci également à Isabelle Sanchez de l'INRA de Montpellier pour m'avoir expliqué une petite partie du maniement du logiciel R et pour avoir répondu à toutes mes questions tout au long de ma thèse. On peut vraiment faire de jolies choses quand on s'y connaît !

Je n'oublie pas toutes les autres personnes de l'université qui m'ont permis de mener à bien ces trois années de travail. Je pense bien sûr à Martine, Rémi, Fathi, Lara, Somar, Julien, Patrizia, Zohra, David, Jean-Luc, Slimane, Vincent...

Pour terminer, je souhaite remercier toute ma famille pour leur soutien, leur motivation et leurs encouragements à tout moment !

Enfin, un merci spécial à ma chérie, Amandine ! Merci d'avoir supporté ces trois années pas toujours faciles, de m'avoir toujours encouragé et soutenu. Merci d'avoir été là, sans toi, je n'aurais pas réussi !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	4
INTRODUCTION GENERALE	7
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
1 Les plaies chroniques de pied diabétique	9
1.1 Définition et physiopathologie	9
1.2 Classification clinique.....	10
1.3 Microbiote des plaies chroniques.....	11
1.4 Quelques caractéristiques des bactéries de plaies chroniques.....	14
2 Le diagnostic des infections bactériennes	15
2.1 Microbiologie de routine	15
2.2 Diagnostic des infections par spectrométrie de masse	17
2.3 Immunologie	19
2.3.1 L'évolution des techniques immunologiques.....	19
2.3.2 Les tests immunochromatographiques.....	21
2.4 Approche de biologie moléculaire pour le diagnostic de l'infection bactérienne	22
2.4.1 ADNr 16S : cible universelle spécifique	22
2.4.2 Amplification et détection de l'ADNr 16S	24
2.4.3 Autres séquences cibles	24
2.4.4 PCR multiplexe.....	25
2.4.5 Biopuces.....	27
2.5 Cytométrie en flux.....	28
2.6 Récapitulatif des techniques actuelles de détection des pathogènes pour le diagnostic des infections.....	29
3 Avancées dans le diagnostic des infections bactériennes	31
Publication n°1 : New technological insights in the clinical diagnosis of bacterial infections.....	32
CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE SBSE POUR L'ANALYSE DE METABOLITES BACTERIENS	53
4.1 Principe et applications de la SBSE	55
4.1.1 Principe	55

4.1.2	Types de barreaux	56
4.1.3	Applications	56
	Publication n°2 : Multiple stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a tentative identification of bacterial volatile and/or semi-volatile metabolites.....	59
4.3	Supplementary material	66
4.4	Conclusion	68
CHAPITRE 2 : COMPARAISON DE DEUX METHODES D'EXTRACTION		69
5.1	Principe et applications de la SPME	70
5.1.1	Principe	70
5.1.2	Sélection des analytes	70
5.1.3	Applications	72
	Publication n°3 : Comparison of stir bar sorptive extraction and solid phase micro-extraction for determining volatile and/or semi-volatile metabolite profile of <i>Staphylococcus aureus</i>	73
5.3	Conclusion	84
CHAPITRE 3 : APPLICATION <i>IN VITRO</i> A UN MODELE DE PLAIE CHRONIQUE		87
6.1	Volatils et semi-volatils produits par les six souches en milieu LB	88
	Publication n°4 : Application of stir bar sorptive extraction for the determination of volatile and semi-volatile bacterial profiles using <i>in vitro</i> model of chronic wound	91
6.3	Supplementary material	103
6.4	Comparaison des deux milieux	107
DISCUSSION GENERALE		111
ANNEXE : Utilisation de la chromatographie liquide pour l'identification de métabolites bactériens.....		115
	Publication n°5 : Identification de métabolites spécifiques de bactéries isolées de plaies chroniques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		127

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNr :	Acide désoxyribonucléique ribosomal
ARN :	Acide ribonucléique
BVC :	Bacterial Volatile Compounds (base de données)
CAR :	Carboxen
CIS :	Cooled Injection System
CMF :	Cytométrie en flux
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
COV :	Composé organique volatil
CW :	Carbowax
DGGE :	Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant
DO :	Densité optique
DVB :	Diméthylbenzène
EGS :	Ethylène glycol / Silicone
ELISA :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
GC :	Chromatographie gazeuse
GC-MS :	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HAP :	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
HRP :	Peroxydase de raifort
HSSE :	Headspace Sorptive Extraction
LB :	Lysogeny Broth (milieu de culture)
LC-MS/MS :	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
m/z :	Rapport masse sur charge
MALDI-TOF MS :	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry
MPS :	Passeur automatique d'échantillons
MVC :	Composé volatil microbien
PA :	Polyacrylate
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PCT :	Procalcitonine
PDMS :	Polydiméthylsiloxane
PMF :	Peptide Mass Fingerprint
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SBSE :	Stir Bar Sorptive Extraction
SPME :	Solid Phase Micro-Extraction
TDU :	Thermal Desorption Unit
TPR :	Template Resine
TR :	Temps de rétention
TRACE :	Time Resolved Amplified Cryptate Emission
VOC :	Composé organique volatil
WLM :	Wound Like Medium (milieu de culture)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Abondance relative des 20 principaux genres bactériens par type de plaie (Wolcott et al., 2016).....	13
Figure 2 : Exemple de test rapide d'antibiorésistance par bandelette (Biomerieux).	17
Figure 3 : Schéma du principe du MALDI-TOF MS (Singhal et al., 2015).	18
Figure 4 : Représentation schématique du principe de détection de bactéries par des anticorps fixés à des billes magnétiques (Campuzano et al., 2010).....	19
Figure 5 : Représentation schématique du principe d'un test immunochromatographique (Bell et al., 2006).....	21
Figure 6 : Représentation schématique du gène codant pour l'ARNr 16S (Petti, 2007).....	23
Figure 7 : Schéma du principe du Luminex™ (Zheng and He, 2012).....	29
Figure 8 : Principe de l'extraction par SBSE ou HSSE (Ochiai et al., 2001).....	55
Figure 9 : Twister® (Gerstel).....	56
Figure 10 : Dispositif de SPME (Zhang et al., 1994).	70
Figure 11 : Croissance bactérienne en milieu LB.	88
Figure 12 : Réseau des métabolites bactériens volatils produits par les six souches en milieu LB.	90
Tableau I : Classification des plaies de pied diabétique (Lipsky et al., 2004).....	10
Tableau II : Résultats de l'étude OPIDIA sur les bactéries isolées de plaies de pied chez le patient diabétique (Richard et al., 2011).	12
Tableau III : Paramètres biologiques ciblés pour la détection de bactériémie (Ozsurekci et al., 2016).	20
Tableau IV : Liste de quelques amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S.....	23
Tableau V : Exemple de gènes spécifiquement ciblés pour la détection de genres ou d'espèces bactériennes.....	25
Tableau VI : Exemple de systèmes d'approches syndromiques commercialisés.	27
Tableau VII : Méthodes utilisées pour la détection et l'identification de bactéries en microbiologie clinique (Singhal et al., 2015).	30
Tableau VIII : Types de fibres SPME commercialisées.	71
Tableau IX : Caractéristiques des techniques d'extraction sur phase.	85
Tableau X : Analyse GC-MS des métabolites volatils bactériens produits par plusieurs souches cliniques en milieu LB et extraits par SBSE/HSSE.	88
Tableau XI : Comparaison des métabolites volatils retrouvés dans les milieux LB et WLM.....	107
Tableau XII : Informations sur les potentiels biomarqueurs identifiés.....	110

INTRODUCTION GENERALE

Toutes les plaies chroniques sont colonisées par des bactéries. Toutefois, ces micro-organismes ne sont pas obligatoirement impliqués dans l'infection de la lésion. L'écologie microbienne associée à ces plaies est complexe, et un microbiote similaire entre deux patients peut ne pas aboutir à la même évolution clinique.

Pour la prise en charge des patients, des critères cliniques différenciant les stades d'évolution de la plaie ont été définis. Ils permettent de classer la plaie selon qu'elle soit colonisée (grade 1) ou infectée (grades 2 à 4 selon la profondeur et la sévérité de la lésion). Actuellement, ce mode de classification clinique est appliqué pour le diagnostic du pied diabétique. Il est néanmoins difficile de distinguer une colonisation du premier stade d'une infection (Jeffcoate et al., 2008; Lipsky et al., 2004). De plus, aucune méthode simple de biologie applicable au niveau de la plaie n'existe à l'heure actuelle. Par conséquent, il est nécessaire de **développer de nouveaux outils de diagnostic permettant d'estimer l'évolution de la plaie.**

La démarche développée dans le cadre de cette thèse consiste à **étudier les métabolites** produits par les principales souches bactériennes retrouvées dans les plaies de pied diabétique et à évaluer si ces métabolites peuvent aider au diagnostic. Il s'agit d'une approche innovante et complémentaire des méthodes existantes en laboratoire ou des technologies prometteuses dans le cadre du diagnostic microbiologique. Plus précisément, le premier objectif de la thèse était d'acquérir des connaissances sur les métabolismes des bactéries présentes sur les plaies. En effet, si pour certaines souches comme *Staphylococcus aureus*, des données sont disponibles (Hammer et al., 2014; Liebeke and Lalk, 2014; Schelli et al., 2017), pour la majorité d'entre elles, aucun élément n'est présent dans la littérature. Le second objectif était d'évaluer s'il existe des métabolites spécifiques de ces bactéries et si ces métabolites présentent un intérêt dans le diagnostic clinique.

Pour ce travail, cinq espèces bactériennes ont été sélectionnées pour leur prévalence dans les plaies chroniques de pied diabétique : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Proteus mirabilis*. L'existence de souches présentant des comportements différents au sein de la plaie nous a conduit à étudier deux souches de *S. aureus*, l'une décrite comme colonisante (*S. aureus* ATCC 25923) et l'autre

comme infectante (*S. aureus* CC45), afin d'évaluer si ces deux souches présentaient un profil métabolique différent.

De manière plus précise, nous nous sommes intéressés à l'identification des métabolites volatils ou semi-volatils produits par ces différentes bactéries. En effet, ces métabolites sont souvent des métabolites secondaires du métabolisme et sont donc plus spécifiques de l'espèce ou de la souche étudiée (O'Connor, 2015; Seipke, 2015).

Dans un premier temps, le travail réalisé a consisté au développement d'une nouvelle méthodologie analytique nécessaire à la caractérisation de ces métabolites, basée sur un couplage de deux techniques d'extraction utilisant des barreaux adsorbants (SBSE : Stir bar sorptive extraction et HSSE : Headspace sorptive extraction) suivie par une analyse par chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS).

Dans un second temps, la méthode de concentration par SBSE/HSSE a été comparée à la méthode de concentration sur fibre, plus couramment utilisée pour la concentration des métabolites bactériens (Chen et al., 2017; Julák et al., 2003; Preti et al., 2009; Tait et al., 2014).

Pour terminer, nous avons évalué la production des métabolites volatils et semi-volatils des six souches bactériennes dans des conditions de culture mimant une plaie chronique, afin d'identifier de potentiels marqueurs spécifiques.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les plaies chroniques de pied diabétique

1.1 Définition et physiopathologie

Selon la Haute Autorité de Santé, une plaie chronique est une plaie dont le délai de cicatrisation est allongé, c'est à dire si elle persiste après 4 à 6 semaines. Le diabète est une des maladies qui peut contribuer à la défaillance du processus de guérison et engendrer la formation de plaies chroniques au niveau des pieds. Les blessures répétées, l'altération de la réponse au stress, la colonisation bactérienne et l'hypoxie sont les principales causes d'apparition d'une plaie (Price et al., 2009).

Dans le cas d'un diabète mal régulé durant une longue période, le sucre circulant dans le sang provoque le rétrécissement des artères (artérite diabétique) et donc une diminution de l'apport d'oxygène (ischémie) (Bowler et al., 2001; Raymakers et al., 2001). Cette hypoxie peut conduire à une atteinte fonctionnelle et/ou structurelle des nerfs (neuropathie), ce qui entraîne une perte de la sensibilité nerveuse (Abdulrazak et al., 2005; Jeffcoate and Harding, 2003). Cette neuropathie ne permet pas aux patients de ressentir les lésions corporelles et notamment les coupures, les ampoules et les cors au niveau des pieds (Apelqvist et al., 2008), et si un diagnostic et une prise en charge médicale de la plaie ne sont pas mis en place rapidement, les risques d'infections augmentent considérablement.

La formation d'ulcères du pied est rencontrée chez 25% des personnes diabétiques (Messad et al., 2013; Senneville et al., 2014; Singh et al., 2005) et conduit à une infection dans 40 à 80% des cas (Sotto et al., 2007). Cette infection est définie comme étant une invasion tissulaire avec la multiplication de micro-organismes pouvant entraîner des lésions tissulaires avec ou sans réponse de l'organisme. La survenue d'une infection est toujours secondaire à une plaie du pied et peut aboutir à des mesures médicales extrêmes. En effet, lorsque cette infection se propage aux tissus mous et aux structures osseuses, elle peut entraîner des amputations des membres inférieurs (Lipsky et al., 2012; Sotto et al., 2012). En 2013, l'agence nationale de santé publique estime qu'en France, près de 8000 personnes ont dû subir une amputation (Fosse-Edorh et al., 2015).

1.2 Classification clinique

Le diagnostic d'une plaie du pied chez le patient diabétique est principalement clinique. La présence de micro-organismes dans ces plaies n'est pas un signe d'infection car des bactéries commensales, appartenant au microbiote cutané, colonisent en permanence ces plaies.

Pour juger de la sévérité de l'infection, plusieurs classifications cliniques de plaies ont été proposées. Deux d'entre elles ont été retenues. La première provient de l'université du Texas (Lavery et al., 1996; Oyibo et al., 2001). Elle comprend quatre grades où les plaies sont classées selon leur profondeur et la présence d'infection. Il est apparu que cette classification était insuffisante car elle ne prenait en compte que le caractère « présence » de l'infection. Pour compléter cette classification, le Consensus International sur le pied diabétique a classé la gravité de la plaie selon quatre grades où le grade 1 présente uniquement une colonisation de la plaie et pas d'infection. A partir du grade 2, les plaies sont infectées avec une gradation de la sévérité de l'infection (d'infection légère au sepsis sévère) (Tableau I). Une étude prospective a ensuite validé cette classification (Lavery et al., 2007).

Tableau I : Classification des plaies de pied diabétique (Lipsky et al., 2004).

Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Pas de symptômes ou signes d'infection	Infection touchant uniquement la peau et les tissus sous-cutanés, sans atteinte des tissus profonds et sans signes et symptômes systémiques. Aucune autre cause de réponse inflammatoire. Au moins deux des manifestations suivantes sont présentes : • Gonflement ou induration localisée • Écoulement purulent • Chaleur locale • Douleur ou sensibilité locale • Érythème > 0,5-2 cm autour de l'ulcère	Infection touchant des structures plus profondes que la peau et les tissus sous-cutanés. • Érythème s'étendant sur > 2 cm autour d'un ulcère en plus de l'un des éléments suivants : œdème, sensibilité, chaleur, écoulement purulent. • Aucun signe de réponse inflammatoire systémique, comme le montre l'infection de grade 4.	Toute infection du pied présentant des signes d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique, se manifestant par deux ou plusieurs des symptômes suivants : • Température < 36°C ou > 38°C • ≥ 10% formes immatures (bandes) • Numération des globules blancs > 12000 ou < 4000 cellules/mm³ • PaCO₂ < 32 mmHg • Fréquence respiratoire > 20 battements/min • Fréquence cardiaque > 90 battements/min

Il se peut toutefois que cette classification clinique soit difficilement applicable. En effet, certaines de ces manifestations cliniques de l'infection peuvent passer inaperçues chez le patient diabétique en raison de l'artériopathie et de la neuropathie sous-jacente. Il est donc

indispensable de développer de nouveaux paramètres d'évaluation complémentaires pouvant aider au diagnostic de l'infection de plaies de pied diabétique.

1.3 Microbiote des plaies chroniques

La nature poly-microbienne des plaies a été observée sur des plaies du pied diabétique (Karchmer and Gibbons, 1994; Ramakant et al., 2011). Le nombre important d'espèces bactériennes différentes isolées met en jeu des métabolismes variés, notamment en ce qui concerne les échanges gazeux où des bactéries aérobies et anaérobies sont impliquées dans l'infection (Ademiluyi et al., 1988; Daltrey et al., 1981; Gilchrist and Reed, 1989; Imirzalioglu et al., 2014).

Toutefois, l'isolement des bactéries anaérobies est difficile et la méthode d'échantillonnage, ainsi que le transport et les conditions de cultures doivent être appropriés à ce type de micro-organismes (Gerding, 1995). En effet, la pertinence de la méthode d'échantillonnage a déjà été remise en question car le microbiote des tissus superficiels ne reflète pas celui des tissus profonds (Perry et al., 1991). Les bactéries anaérobies sont généralement isolées dans les plaies profondes, et sont suspectées d'être plus impliquées dans l'infection que les bactéries aérobies (Bowler and Davies, 1999). En effet, *Finegoldia magna* et *Bacteroides fragilis* sont les plus couramment isolées et il s'agit également des bactéries les plus pathogènes (Charles et al., 2015; Ng et al., 2008). Par conséquent, il semble intéressant de pratiquer un prélèvement en profondeur de la plaie par biopsie lorsque cela s'avère possible (Bravo-Molina et al., 2016; Brook, 1991), ou pour plus de précisions, d'utiliser écouvillon et biopsie pour obtenir une représentation la plus fiable et complète possible du microbiote de la plaie (Dunyach-Remy et al., 2014; Gradon and Adamson, 1995).

Une comparaison du microbiote de plaies chroniques du pied de patients diabétiques avec des personnes saines a permis de mettre en évidence que chez les personnes saines, il y avait une plus grande diversité bactérienne avec une moins grande proportion de *Staphylococcus*, contrairement aux patients diabétiques où une plus forte présence de *S. aureus* a été observée. Ces changements peuvent possiblement être considérés comme précurseurs d'une infection du pied diabétique et d'un développement d'ulcère (Redel et al., 2013).

Des études menées à grande échelle sur de nombreux patients atteints de plaies chroniques ont été menées dans le but de mieux définir le microbiote de ces lésions. L'étude OPIDIA réalisée

sur 291 patients souffrant de plaies de pied diabétique a mis en évidence la forte présence de coques à Gram positif (dans 60% des plaies) (Richard et al., 2011). Parmi elles, *S. aureus* a été l'espèce majoritairement retrouvée (dans 114 plaies et pour 32,5% des bactéries isolées). Une proportion similaire de *Staphylococcus* spp. (entre 25 et 35%) a été mise en évidence après une étude réalisée sur 2963 patients atteints de différentes plaies chroniques (Wolcott et al., 2016). Concernant les bactéries à Gram négatif, les plus fréquemment isolées sont *Proteus* spp. (8,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (6,6%) et *Escherichia coli* (4,8%) d'après l'étude OPIDIA (Tableau II). D'autre part, l'étude de Wolcott *et al.* (Figure 1) montre une part importante de *Pseudomonas* (10%). Ces deux études mettent également en évidence le caractère polymicrobien des infections de ces plaies.

Tableau II : Résultats de l'étude OPIDIA sur les bactéries isolées de plaies de pied chez le patient diabétique (Richard et al., 2011).

Micro-organisme	n° (%)	MDROs ^b
Coques aérobies Gram positif	210 (59,8)	29
<i>Staphylococcus aureus</i>	114 (32,5)	28
<i>Streptococcus</i> spp.	48 (13,7)	-
<i>Enterococcus</i> spp.	28 (8,0)	1
Staphylocoques coagulase négative	16 (4,6)	-
Autre coques Gram positif aérobie	4 (1,1)	-
Bacilles Gram négatif aérobie	126 (35,9)	12
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	95 (27,1)	6
<i>Escherichia coli</i>	17 (4,8)	1
<i>Proteus</i> spp.	30 (8,5)	1
<i>Enterobacter</i> spp.	17 (4,8)	2
<i>Klebsiella</i> spp.	4 (1,1)	-
<i>Morganella morganii</i>	15 (4,3)	1
<i>Citrobacter</i> spp.	4 (1,1)	1
<i>Hafnia alvei</i>	1 (0,3)	-
<i>Serratia marcescens</i>	5 (1,4)	-
Autres <i>Enterobacteriaceae</i>	2 (0,6)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23 (6,6)	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3 (0,9)	-
Autre bacilles Gram négatif aérobie	5 (1,4)	-
Anaérobies	7 (2,0)	-
Bacilles Gram positif aérobie	8 (2,3)	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	8 (2,3)	-
Total	351	41

^a Bactéries isolées parmi tous les isolats (n = 351).

^b Organismes multirésistants, y compris les SARM, entérocoques résistants aux glycopeptides, entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (β -lactamases à spectre étendu et céphalosporinase déréprimée), *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistant aux ceftazidime-résistant à au moins deux des antibiotiques suivants ticarcilline, ciprofloxacine, ceftazidime et imipénem.

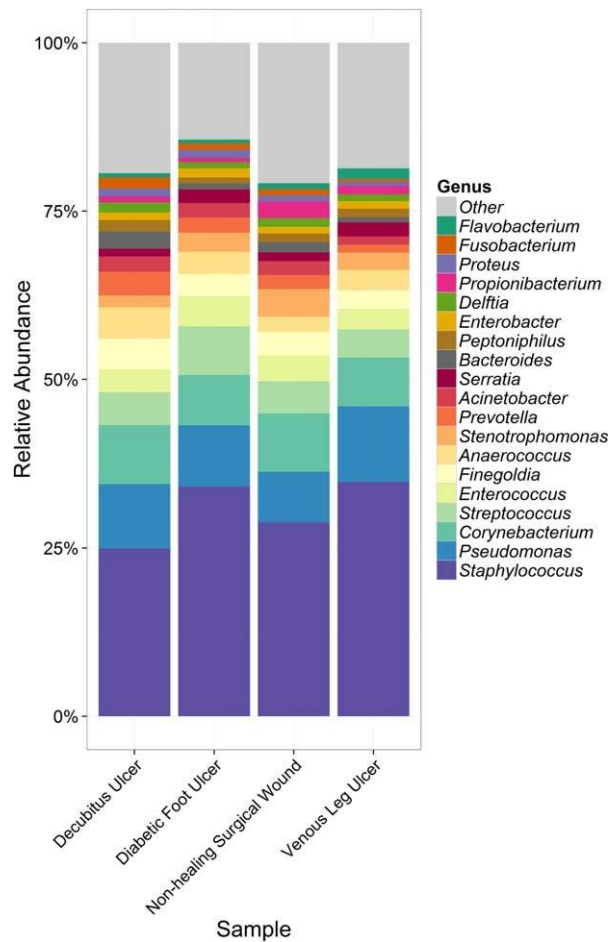


Figure 1 : Abondance relative des 20 principaux genres bactériens par type de plaie (Wolcott et al., 2016).

Au final, plus d'une centaine d'espèces bactériennes différentes à Gram positif ou négatif peuvent être isolées dans les plaies chroniques de pied de patients diabétiques, à la fois aérobies et anaérobies (Dowd et al., 2008; Johnson et al., 1995; Rhoads et al., 2012; Wolcott et al., 2016). Les plaies les plus profondes présentent une diversité microbienne plus importante, composée de plus de bactéries anaérobies et de Proteobactéries alors que les plaies superficielles sont, elles, associées à la forte présence de Staphylocoques. Chaque plaie a un profil bactérien unique composé d'un microbiote complexe où plusieurs types de bactéries sont identifiés associés en biofilm. Il est donc essentiel d'avoir une approche thérapeutique ciblée pour soigner ces plaies le plus efficacement possible (Wolcott et al., 2009).

1.4 Quelques caractéristiques des bactéries de plaies chroniques

Au contraire des plaies aiguës, la présence de biofilm est un élément important dans l'écologie des plaies chroniques. En effet, il a été rapporté une grande différence entre ces deux types de plaies avec seulement 6% de biofilm dans les plaies aiguës contre 60% dans les plaies chroniques (James et al., 2008). Ces biofilms sont souvent constitués par des communautés poly-microbiennes structurées, à la fois aérobie et anaérobie (Bowler and Davies, 1999; James et al., 2008). Ces bactéries adhèrent entre elles au niveau d'une interface et sécrètent une matrice adhésive et protectrice. Ces cellules en biofilm possèdent des expressions génétiques et des phénotypes spécifiques de par leur capacité de communication via le *quorum sensing* (Donlan and Costerton, 2002), et manifestent une plus grande résistance aux antibiotiques et aux mécanismes immunitaires de l'hôte.

La présence de bactéries résistantes aux antibiotiques a augmenté au cours des dernières années (Varaiya et al., 2008), notamment avec les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) isolées dans des plaies de pied de patients diabétiques (Dang et al., 2003; Tentolouris et al., 2006). La prise en charge rapide des patients atteints d'infections nécessite l'administration immédiate d'un traitement antibiotique à large spectre, sans attendre les résultats des tests. Un traitement initial inapproprié peut d'une part augmenter la mortalité et d'autre part participe à l'utilisation excessive d'antibiotiques, ce qui peut contribuer à l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques (Kollef, 2008; Kuti et al., 2008).

Toutefois, plus récemment il a été montré que les SARM sont moins présents dans ces plaies, avec une prévalence de 20% à 25% (Richard et al., 2008, 2011), même si leur présence ou leur absence n'est pas un facteur qui va influencer le temps de cicatrisation des plaies si une antibiothérapie précoce et adaptée est mise en place (Hartemann-Heurtier et al., 2004; Richard et al., 2008).

D'autres bactéries sont également susceptibles de poser problème lors de traitements à cause de leur résistance comme les entérocoques résistants à la vancomycine (Napolitano, 2005), les entérobactéries résistantes à certaines β -lactames et à la gentamicine ou encore *P. aeruginosa* résistante aux quinolones, à la gentamicine ou aux céphalosporines de troisième et de quatrième génération (Shanmugam et al., 2013).

2 Le diagnostic des infections bactériennes

2.1 Microbiologie de routine

Dans le cadre d'infection, la pratique courante pour le diagnostic microbiologique implique l'identification des bactéries ainsi que la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques (Xu et al., 2017). La première étape consiste donc en un examen clinique du patient par le praticien hospitalier, suivi de prélèvements d'échantillons. De manière générale, les prélèvements réalisés sont dépendants du siège de l'infection (par exemple : prélèvement de liquide céphalo-rachidien et de sang pour une suspicion de méningite). Dans le cas des plaies, des prélèvements peuvent être effectués si le grade 2 est atteint. Pour ce faire, un débridement de la plaie (retrait de tissu mort) est pratiqué avant de réaliser un prélèvement superficiel par écouvillonnage ou curetage, ou bien profond avec des biopsies tissulaires ou des aspirations à l'aiguille fine. Ensuite, une analyse microscopique peut être réalisée. Elle consiste en une réalisation d'un état frais, d'une coloration de Gram ou bien au Ziehl-Neelsen pour la détection des mycobactéries (Rasamiravaka et al., 2011). Ces méthodes ont néanmoins l'inconvénient d'avoir une sensibilité très limitée (Dinarelli et al., 2017). Le plus souvent la recherche de microorganismes est réalisée par culture. Une étape de pré-enrichissement non sélective (24h) peut alors être appliquée pour la régénération et la multiplication des bactéries prélevées, avant de les mettre en culture. Cette étape est réalisée dans des milieux liquides comme par exemple le bouillon de Schaedler adapté à la croissance de micro-organismes exigeants, avec de fortes teneurs en peptone, glucose et extrait de levure qui le rend hautement nutritif.

Pour identifier les bactéries par culture, deux types de milieux peuvent être utilisés : des milieux non sélectifs et des milieux sélectifs. Les milieux non sélectifs sont réalisés à base de sang (hémocultures), ils permettent la croissance des micro-organismes difficilement cultivables tels que les bactéries anaérobies (Sonnenwirth, 1972). De plus, ces milieux permettent de mettre en évidence la capacité hémolytique d'une bactérie. Les milieux sélectifs de par leur composition permettent la croissance sélective de certains types de micro-organismes comme par exemple une forte concentration en sel et en mannitol du milieu Chapman qui permet la culture spécifique de *Staphylococcus* spp. La présence d'une auréole jaune autour de la colonie signifie que la bactérie est capable de fermenter le mannitol, ce qui oriente l'identification vers *S. aureus*.

Pour le diagnostic clinique de nombreuses infections, des milieux chromogènes peuvent être utilisés. Ces milieux sélectifs permettent de mettre en évidence une enzyme spécifique d'un

genre ou d'une espèce bactérienne. Ils utilisent des substrats spécifiques de cette enzyme qui, après dégradation, confèrent aux colonies ciblées des couleurs clairement identifiables. Par exemple, le milieu chromogène ChromID® *P. aeruginosa* (Biomerieux) permet l'identification spécifique de *P. aeruginosa* par la présence de colonies violettes, spécifiques de l'action d'une aminopeptidase (Laine et al., 2009). Ce milieu est utilisé pour le diagnostic d'infections pulmonaires.

Il est également possible d'employer des milieux gélifiés contenant des antiseptiques comme la gélose au cétrimide, un ammonium quaternaire qui, couplé à l'acide nalidixique, inhibe la croissance de la plupart des espèces bactériennes autres que *P. aeruginosa*. Pour cela, la présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium dans ce milieu va permettre la stimulation de la production de pyocyanine, un facteur de virulence de cette bactérie qui colore spécifiquement les colonies en bleu-vert (Nonaka et al., 2010; Wolska et al., 2012).

Certains milieux chromogènes sont aussi utilisés pour dépister des bactéries résistantes dans des échantillons cliniques. Ils sont basés sur la présence de différents antibiotiques permettant la sélection des bactéries, puis des mêmes types de réactions biochimiques que précédemment pour l'identification de ces pathogènes. Les résultats obtenus vont alors permettre de faciliter la prise de décisions cliniques, et ainsi améliorer la gestion de la résistance aux antibiotiques.

Il est également possible de retrouver des tests rapides permettant de déterminer la sensibilité aux antibiotiques de souches bactériennes, qui peuvent se trouver sous forme de disques imbibés de solutions antibiotiques (Antimicrobial Susceptibility Disks, Bio-Rad), de bandelettes (par exemple ETEST® Ceftolozane / Tazobactam, Biomerieux) (Figure 2) pour une détermination rapide de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en antibiotique ou bien de géloses additionnées d'antibiotiques où seules les bactéries résistantes montrent une croissance. Parfois, ces systèmes sont automatisés (ADAGIO™ Automated System, Bio-Rad ; VITEK 2®, Biomerieux) pour la lecture et l'interprétation des CMI sur des boîtes de Pétri.



Figure 2 : Exemple de test rapide d'antibiorésistance par bandelette (Biomerieux).

L'identification par des techniques microbiologiques conventionnelles peut être longue et les résultats peuvent être partiels et/ou erronés. De nombreuses études vont dans ce sens en mettant en évidence les limites associées à ce type de diagnostic basé sur des cultures bactériennes (Budding et al., 2016; Dickson et al., 2014; Melendez et al., 2010). Il apparaît alors que ces méthodes sont insuffisantes pour un diagnostic fiable et rapide.

2.2 Diagnostic des infections par spectrométrie de masse

Apparue au début du 20^{ème} siècle, la spectrométrie de masse est une méthode analytique permettant de déterminer la masse moléculaire précise d'un composé chimique ou biologique en mesurant son rapport masse sur charge (m/z). Développé pour l'analyse de biomolécules (Patterson and Aebersold, 2003), le MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry) est actuellement la technique de spectrométrie de masse la plus utilisée en diagnostic médical pour l'identification de bactéries. D'abord réalisée sur des extraits protéiques (Cain et al., 1994), elle est ensuite appliquée à des bactéries intactes (Holland et al., 1996) pour discriminer le genre mais aussi l'espèce (Claydon et al., 1996).

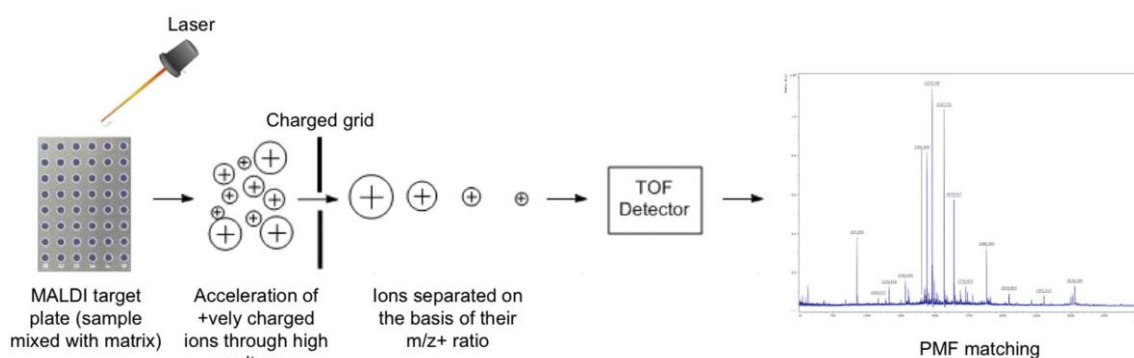


Figure 3 : Schéma du principe du MALDI-TOF MS (Singhal et al., 2015).

A partir des informations obtenues par le détecteur, un spectre caractéristique appelé « empreinte de masse des peptides » (PMF pour Peptide Mass Fingerprint) est généré (Figure 3). Cette empreinte est ensuite comparée à une base de données. Certains pics de ces spectres sont spécifiques d'un genre ou d'une espèce bactérienne, et selon la qualité du spectre et la richesse de la base de données, l'identification peut se faire en quelques secondes à quelques minutes.

En microbiologie clinique, le MALDI-TOF MS permet, le plus souvent à partir d'une colonie bactérienne (Lavigne and Riegel, 2015; Rajakaruna et al., 2009), mais aussi à partir d'hémocultures (Moussaoui et al., 2010) ou d'échantillons d'urine (Ferreira et al., 2010), d'identifier le pathogène responsable de l'infection. Des protéines spécifiques sont aussi recherchées avec par exemple la présence de toxines comme la delta-toxine de *S. aureus* (Valour et al., 2015), de biomarqueurs tels que des protéines du ribosome de *Flavobacterium psychrophilum* (Fernández-Álvarez et al., 2018), d'activités enzymatiques particulières telles que l'action des carbapénémases pour l'identification des bactéries productrices de β -lactamases (Lasserre et al., 2015) ou encore de clones émergents avec des pics spécifiques de genres ou d'espèces mono-microbiennes (Lafolie et al., 2015).

Aujourd'hui, des systèmes comme par exemple le VITEK®MS (Biomérieux) équipent les laboratoires de microbiologie clinique et permettent une identification simple et rapide des bactéries. En effet, une étude menée en Chine sur 2266 isolats cliniques a montré l'efficacité de ce système avec une identification correcte dans 99,1% des cas, dont 96,8% avec une identification de l'espèce, et seulement 2,3% au niveau du genre (Luo et al., 2015).

2.3 Immunologie

2.3.1 L'évolution des techniques immunologiques

Au cours du développement de ces techniques immunologiques pour un usage en diagnostic, un des enjeux a été de concevoir des tests à la fois très sensibles et rapides, robustes et bon marché. Depuis les années 70 et l'apparition du test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), de nombreuses évolutions sont survenues, notamment avec l'utilisation de billes magnétiques immobilisant l'anticorps primaire (Liabakk et al., 1990). Ce type de technique a déjà été utilisé pour la détection de *Streptococcus pneumoniae* (Campuzano et al., 2010). Afin de fixer des anticorps de capture spécifiques à *S. pneumoniae* sur des billes magnétiques, des protéines A sont utilisées. Elles permettent en effet la liaison entre la bille et le domaine constant de l'anticorps. Ces derniers sont ensuite incubés avec la bactérie recherchée et un anticorps de détection couplé HRP (à une peroxydase de raifort) est ajouté. Ces complexes sont alors capturés par un champ magnétique à la surface d'électrodes en or et la détection se fait électrochimiquement par la réduction de peroxyde d'hydrogène en eau, en utilisant un intermédiaire de transfert d'électron (Figure 4).

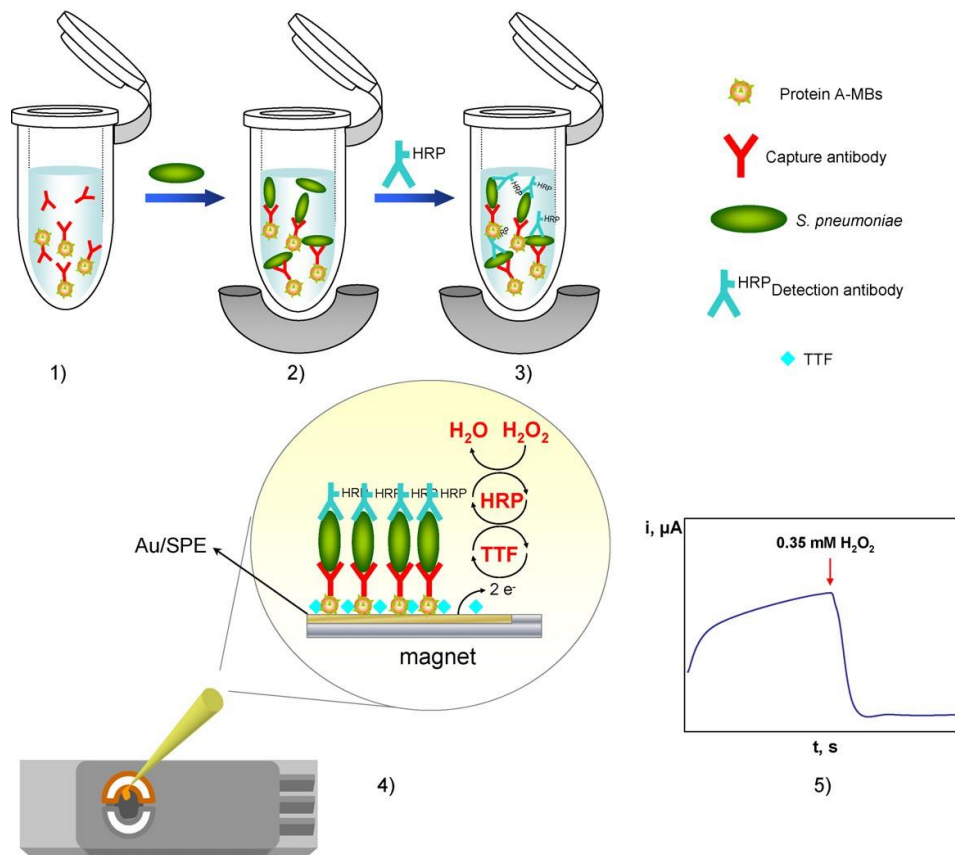


Figure 4 : Représentation schématique du principe de détection de bactéries par des anticorps fixés à des billes magnétiques (Campuzano et al., 2010).

Actuellement, ce principe de séparation par des particules magnétiques est utilisé par le système Access (Beckman-Coulter). D'autres systèmes automatisés sont également commercialisés comme Vidas® (Biomérieux), UniCel (Beckman-Coulter) ou encore Cobas® (Roche Diagnostic) en se basant sur une détection par chimiluminescence.

L'analyseur immunologique Kryptor

Des technologies de routines appliquées au diagnostic médical comme l'analyseur Kryptor, commercialisé par la société B.R.A.H.M.S. ont été développées. Il s'agit d'un système automatisé d'analyse immunologique qui se base sur une mesure de fluorescence émise lors de la reconnaissance entre un antigène et un anticorps marqué. Dans des échantillons biologiques complexes, il est parfois difficile de détecter et de quantifier des molécules en utilisant des fluorophores en raison de signaux non spécifiques ou des caractéristiques de la matrice. Pour s'affranchir des étapes de traitement des échantillons, le système Kryptor utilise la technologie TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission). Le cryptate d'euprécium fixé sur un anticorps spécifique de la cible va permettre de retarder l'émission de la fluorescence du fluorochrome le temps que les signaux non spécifiques soient éteints, et ainsi limiter les erreurs d'analyse.

Appliqué au diagnostic des infections, certains biomarqueurs peuvent être recherchés dans des fluides biologiques (Tableau III).

Tableau III : Paramètres biologiques ciblés pour la détection de bactériémie (Ozsurekci et al., 2016).

Matrice	Cibles biologiques	Résultats
Sang	• procalcitonine (PCT)	PCT : indicateur possible du diagnostic des infections du sang liées au cathéter chez les enfants
	• chaîne β libre de l'hormone chorio-gonadotrophique	
	• hormone chorio-gonadotropine	
	• alpha-foeto-protéine	
	• protéine plasmatique A associée à la grossesse	
	• antigène prostatique spécifique	

2.3.2 Les tests immunochromatographiques

Les tests immunochromatographiques se déroulent sur des membranes ou bandelettes de nitrocellulose. Plus connus sous leur dénomination anglaise « Lateral Flow Test », ils consistent à révéler visuellement la présence d'un antigène grâce à un anticorps spécifique marqué (avec des nanoparticules d'or ou des liposomes contenant du sélénium) (Figure 5). Ces tests rapides (moins de 15 minutes) sont utilisés dans de nombreuses applications.

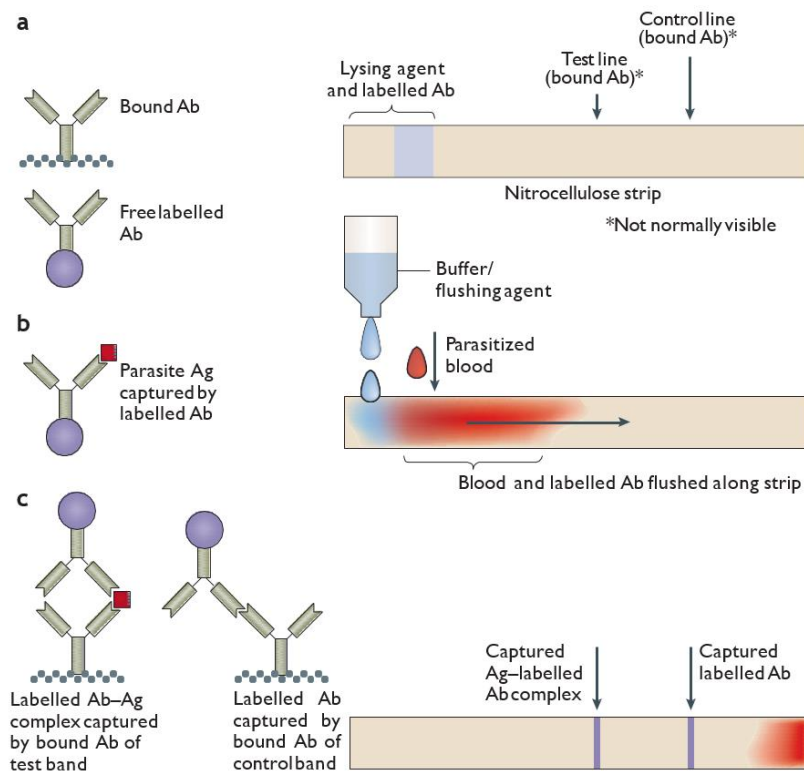


Figure 5 : Représentation schématique du principe d'un test immunochromatographique (Bell et al., 2006).

Les diagnostics cliniques basés sur la détection d'antigènes se font principalement à partir d'échantillons sanguins. De nombreux tests immunochromatographiques rapides adaptés au diagnostic des infections ont été développés (Duthie et al., 2016; Li et al., 2015).

La société Alere™ a développé toute une gamme de ce type de tests rapides (de 6 à 70 minutes selon le pathogène) pour la détection de SARM, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*... Certains de ces tests doivent nécessiter une étape de culture bactérienne préalable comme par exemple le test Clearview exact PBP2a (Alere™) ou le test RESIST-3 O.K.N. (Coris BioConcept, Gembloux, Belgique) qui utilise des colonies pures pour distinguer respectivement la résistance de *S. aureus* et des bactéries productrices de carbapénémases (Nonhoff et al., 2012;

Wareham and Abdul Momin, 2017). A l'inverse, d'autres tests peuvent se passer d'une culture sur boîte préalable comme le système Alere™ *H. pylori* Home test qui, à partir d'une seule goutte de sang, permet la détection d'anticorps anti *H. pylori* ou encore le test pour la détection de *Burkholderia pseudomallei* (responsable de la mélioïdose, une maladie infectieuse touchant les voies respiratoires et pouvant provoquer des septicémies), réalisé à partir d'échantillons de sérum (Phokrai et al., 2018).

2.4 Approche de biologie moléculaire pour le diagnostic de l'infection

bactérienne

Depuis la fin des années 80, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des maladies infectieuses est croissante. Ces techniques sont basées sur l'amplification d'un ou plusieurs gènes qui permettent l'identification d'une ou plusieurs bactéries dans un échantillon biologique. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet notamment d'identifier les pathogènes difficilement cultivables, ce qui en fait un outil de choix en diagnostic (Issartel et al., 2002; Punia et al., 2017; Yuasa et al., 1996).

2.4.1 ADNr 16S : cible universelle spécifique

Chez les bactéries, le ribosome est composé d'une grande sous-unité (50S) et d'une petite sous-unité (30S). L'ARN ribosomal 16S qui a pour fonction « la lecture de l'ARN messager » est retrouvé dans cette petite sous-unité. Le gène codant pour cet ARN est présent chez tous les organismes bactériens (Petti, 2007; Woese, 1987). Il contient environ 1500 paires de bases et est composé d'une alternance de régions conservées chez tous les procaryotes et de régions hypervariables notées V1 à V9 (Chakravorty et al., 2007). Les régions hypervariables n'ont pas de rôle fonctionnel important, donc leurs mutations neutres sont conservées au cours de l'évolution. Cette « signature » propre à chaque espèce bactérienne va permettre de différencier les bactéries après amplification et séquençage du gène (Figure 6).

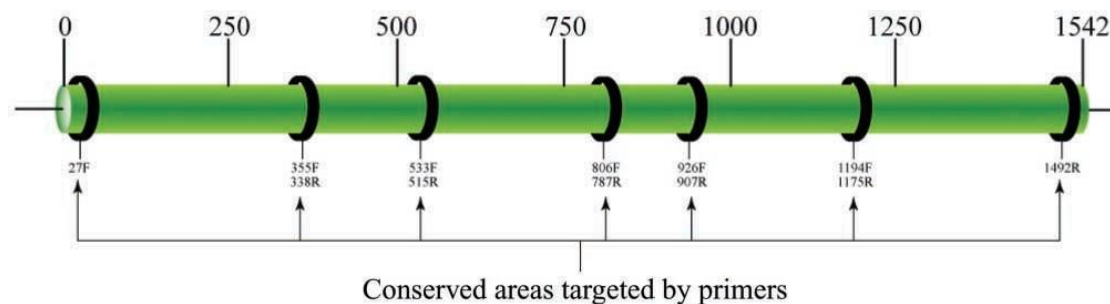


Figure 6 : Représentation schématique du gène codant pour l'ARNr 16S (Petti, 2007).

Les cercles noirs représentent les régions conservées utilisées pour l'amplification et le séquençage.

Une étude de Weisburg *et al.* a décrit des amorces dites « universelles » pour l'amplification de l'ADNr 16S codant pour l'ARNr 16S de toutes les espèces bactériennes (Weisburg et al., 1991). Depuis, de multiples amorces ont été décrites pour l'amplification de fragments spécifiques de ce gène (Tableau IV).

Tableau IV : Liste de quelques amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S.

Le nom des amorces correspond au nucléotide de départ sur l'ADNr 16S et « F » ou « R » (Forward ou Reverse) au sens de lecture de ces amorces.

Nom	Séquence (5' -> 3')	Référence
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Eden et al., 1991)
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Suzuki and Giovannoni, 1996)
338R	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	(Amann et al., 1990)
355F	GTAAAGTTTTCGCGCCTG	(Ovreås et al., 1997)
515R	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	(Dethlefsen et al., 2008)
533F	GTGCCAGCAGCCGCGTAA	(Henckel et al., 1999)
787R	CTACCAGGGTATCTAAT	(Engelbrektson et al., 2010)
805F	GGATTAGATACCCTGGTAGTC	(Youssef et al., 2009)
907R	AATTCCTTTGAGTTT	(Henckel et al., 1999)
926F	AACTCAAAGGAATTGACGG	(Ghyselinck et al., 2013)
1100R	AGGGTTGCGCTCGTTG	(Turner et al., 1999)
1175R	ACGTCRTCCCDCTTCCTC	(Bonder et al., 2012)
1194F	GAGGAAGGIGGGAIGACGT	(Horz et al., 2005)
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	(Suzuki and Giovannoni, 1996)

Pour amplifier une ou plusieurs régions hypervariables de l'ADNr 16S, un couple contenant une amorce F et une amorce R doivent être utilisées.

2.4.2 Amplification et détection de l'ADNr 16S

La PCR 16S peut être la méthode de diagnostic recommandée, en particulier pour la détection de *Chlamydia trachomatis* (Frej-Mądrzak et al., 2018). Cette technique peut également être dérivée en utilisant une amorce oligonucléotidique à double-amorçage, plus longue qu'une amorce classique, ce qui permet d'augmenter la spécificité de la réaction, et donc la sensibilité du diagnostic (Kommedal et al., 2012; Miller et al., 2016).

D'autres approches utilisant également l'ADNr 16S telles que l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) ont été développées pour le diagnostic infectieux. A partir d'un extrait d'ADN provenant d'un écouvillon ou d'une biopsie d'une plaie, la région V3 est amplifiée en utilisant des amorces universelles localisées sur les régions conservées qui la borde. La DGGE permet alors de séparer des amplicons non pas en fonction de leur taille, mais en fonction de leur séquence. Dans le cadre de cette étude, des profils de références de 11 espèces bactériennes ont été établis. La comparaison de ces profils avec les profils obtenus à partir des prélèvements poly-microbiens de patients a permis de confirmer l'identification des espèces obtenues par séquençage dans 82% des cas (Dunyach-Remy et al., 2014).

La métagénomique est une méthode qui repose sur le séquençage total ou partiel des ADN codants pour les ARNr 16S et la comparaison des séquences obtenues avec des bases de données. L'utilisation de cette technique dans des échantillons cliniques d'origines différentes a permis de mettre en évidence une bonne concordance d'identification avec la culture lorsque cette dernière est positive (91,8%) et permet de mettre en évidence la présence des bactéries non cultivables et de champignon (Abayasekara et al., 2017). De plus, Decuypere *et al.* ont mis en évidence l'intérêt et la complémentarité de l'utilisation de la métagénomique dans le diagnostic de la septicémie (Decuypere et al., 2016). En revanche, cette technique est limitée par la quantité d'ADN bactérien disponible dans l'extrait d'ADN total, l'interférence de la matrice (présence d'inhibiteurs) (Fredricks and Relman, 1998) ou encore la persistance de l'ADN bactérien après un traitement (Vrioni et al., 2008).

2.4.3 Autres séquences cibles

D'autres gènes comme les gènes de résistance, les gènes spécifiques à un genre ou à une espèce bactérienne comme les gènes de virulence peuvent faire l'objet d'une détection par PCR (Tableau V).

Tableau V : Exemple de gènes spécifiquement ciblés pour la détection de genres ou d'espèces bactériennes.

Gène cible	Catégorie	Micro-organisme	Référence
<i>ospA</i>	Facteur de virulence (protéine de membrane externe)	<i>Borrelia burgdorferi</i>	(Ivacic et al., 2007)
<i>rpoB</i>	Résistance aux antibiotiques	Mycobactéries non tuberculeuses	(Shin et al., 2008)
<i>rimM</i>	Facteur de maturation du ribosome	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> et <i>Mycobacterium bovis</i>	(Geojith et al., 2011; Zhu et al., 2009)
<i>lef</i>	Facteur de virulence (toxine)	<i>Bacillus anthracis</i>	(Irenge et al., 2010)
<i>cap</i>	Facteur de virulence (protéine de capsule)		
<i>femB</i>	Résistance aux antibiotiques	<i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méticilline	(Hanaki et al., 2011)
<i>mecA</i>	Résistance aux antibiotiques		
<i>qacA/B</i>	Pompe à efflux responsables de la résistance aux antiseptiques		
<i>smcL</i>	Facteur de virulence	<i>Listeria ivanovii</i>	(Wang et al., 2014)
<i>cepA</i>	Protéase / hydrolase	Streptocoques β -hémolytiques	(Cohen et al., 2015)

2.4.4 PCR multiplexe

La PCR multiplexe est un protocole d'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles par l'utilisation de plusieurs amorces différentes. Elle peut se faire en point final ou en temps réel. Dans le cadre du diagnostic de l'infection, la PCR multiplexe peut être effectuée pour rechercher différentes espèces bactériennes (Espy et al., 2006; Mackay, 2004; Welti et al., 2003) à partir du même échantillon clinique ou pour obtenir plusieurs informations sur le même micro-organisme, comme l'identification de l'agent pathogène, ainsi que sa capacité de résistance à certains antibiotiques. De nombreux gènes peuvent donc être ciblés par cette technique :

- des gènes de résistance aux antibiotiques (Kumari et al., 2018).
- des gènes de virulence (Furukawa et al., 2018; Knetsch et al., 2011; Neuendorf et al., 2016).
- des gènes spécifiques d'une bactérie permettant de différencier plusieurs espèces d'un même genre (Chae et al., 2017).

Par exemple, pour détecter la présence de SARM dans les brûlures infectées, Montazeri *et al.* ont utilisé la PCR multiplexe en ciblant trois gènes : ADNr 16S pour identifier l'espèce, *mecA* pour la résistance à la méticilline et *nuc* qui code pour la région spécifique du gène de la thermonucléase de *S. aureus* (Montazeri et al., 2015).

D'autre part, dans le cas des infections gastriques causées par *Helicobacter pylori*, il a été démontré que la PCR multiplexe (ciblant des fragments des gènes 16S de l'ADNr, *hpaA* et *ureA*) est plus rapide, plus sensible et plus spécifique que d'autres techniques diagnostiques conventionnelles (test rapide d'uréase, cultures et histologie). En effet, sur 230 patients testés par ces quatre méthodes, 140 présentaient une infection. La PCR a permis de rendre des résultats positifs dans 138 cas alors que le test rapide d'uréase qui présente le deuxième meilleur résultat a permis la détection de seulement 39 patients (Fadilah et al., 2016).

Depuis quelques années, plusieurs sociétés ont développé des kits « prêts à l'emploi » de PCR multiplexes spécifiques. Ces nouvelles méthodes de diagnostic moléculaire sont de plus en plus utilisées pour remédier au manque de sensibilité des cultures et permettre un diagnostic fiable en un minimum de temps. Actuellement, les systèmes commercialisés sont entièrement automatisés avec l'intégration des étapes d'extraction de l'ADN et d'amplification. L'utilisation de ces systèmes, comme par exemple le kit commercial GeneXpert® (Cepheid®), ne nécessite pas de compétences particulières en biologie moléculaire et les résultats sont obtenus en quelques heures.

Plus récemment, le diagnostic syndromique s'est développé (Tableau VI) et représente un réel enjeu dans la prise en charge des maladies infectieuses. Cette approche syndromique utilise le principe de la PCR multiplexe avec l'utilisation de plusieurs couples d'amorces différents dans la même réaction, à la fois pour l'identification de bactéries (mais aussi de levures, de parasites et de virus) et pour la détection de gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques. Elle consiste en la recherche simultanée de différents pathogènes pouvant être impliqués dans une infection, lorsqu'un patient présente des symptômes cliniques non spécifiques d'un agent. L'analyse des courbes de fusion à haute résolution des produits d'amplification permettra une identification simple et rapide des résultats des différentes PCR (Greub et al., 2016).

Cette approche syndromique a récemment été appliquée au diagnostic des infections du pied diabétique avec l'utilisation de l'Unyvero® (Curetis, Allemagne), système automatisé pour l'identification des pathogènes et la détection de gènes de résistance. Par comparaison avec la culture, l'étude de Duniach-Remy *et al.* a montré 66,7% de concordance entre les deux techniques avec, en plus, l'identification de pathogènes non détectés en culture. Ce système permet un diagnostic rapide (environ 5h) à partir de divers échantillons (tissus, liquides biologiques, os). Malgré tout, 75% des bactéries possiblement détectées (avec le panel ITI) le

sont uniquement au niveau du genre. Des difficultés à identifier correctement *P. mirabilis* ont également été rencontrées (Dunyach-Remy et al., 2018).

Tableau VI : Exemple de systèmes d'approches syndromiques commercialisés.

Système	Méthode	Panels commercialisés	Cibles	Gènes de résistance	Délai de résultats
Film array® (Biomérieux)	PCR multiplexe	Respiratoire	20 cibles (virus, bactéries)	/	1h
		Système nerveux central	20 cibles (virus, bactéries, levures)	/	
		Sepsis	24 cibles	3 gènes	
		Gastro-intestinal	22 cibles (bactéries, parasites, virus)	/	
		Infection ostéo-articulaire ¹	/	/	/
Unyvero® (Curetis)	PCR multiplexe	Respiratoire	21 cibles (bactéries)	17 gènes	4h30
		Sepsis	34 cibles (bactéries, champignons)	16 gènes	
		Infection intra-abdominale	28 cibles (bactéries, toxines)	22 gènes	
		Infection implants-tissus	29 cibles (bactéries, champignons)	17 gènes	
		Infection du système urinaire	25 cibles (bactéries)	15 gènes	
Prove-it® (Mobidiag)	PCR + hybridation sur sonde	Sepsis	30 cibles (bactéries)	2 gènes	4h30
		Infection ostéo-articulaire	33 cibles (bactéries)	3 gènes	3h30
e-plex® (GenMark)	PCR multiplexe microfluide	Respiratoire	17 cibles (virus, bactéries)	/	1h30
		Hémoculture Gram ⁺	20 cibles (bactéries)	4 gènes	
		Hémoculture Gram ⁻	21 cibles (bactéries)	6 gènes	
		Gastro-intestinal ¹	Bactéries, virus et parasites	/	
		Système nerveux central ¹	Bactéries, virus et champignons	/	
Verigene® (Nanosphere)	Biopuce	Respiratoire	16 cibles (bactéries)	/	2h
		Sepsis	22 cibles (bactéries)	9 gènes	2h30
		Gastro-intestinal	9 cibles	/	2h

¹ : Panels en développement.

2.4.5 Biopuces

Ces biopuces ont d'abord été développées dans le domaine de la génétique pour étudier le transcriptome en observant simultanément l'expression de plusieurs milliers de gènes dans une cellule ou un tissu donné (Schena et al., 1995). Cette technologie est basée sur le principe de l'hybridation entre deux fragments d'acide nucléique marqués sur des sondes immobilisées sur un support (Southern et al., 1999).

Adapté pour le diagnostic clinique, cette technique permet une détection multiplexe. Les biopuces ont été employées par exemple pour la détection de gènes de virulence (Chizhikov et al., 2001; Sotto et al., 2007), pour la détection de gènes de résistance (Galiana et al., 2017) mais aussi de l'ARN circulant qui peut être impliqué dans de nombreuses maladies (Huang et al.,

2018). Dans ce contexte, plusieurs types de biopuces sont actuellement commercialisés pour des applications dans le domaine de la sécurité alimentaire ou de la santé. Par exemple, il existe des biopuces pour la détection rapide des bactéries associées aux maladies parodontales (ParoCheck®, Greiner Bio-one GmbH, Germany) ou pour détecter et identifier les mycoplasmes (CytoInspect™, Greiner Bio-one GmbH, Germany). Ces biopuces sont aussi un très bon outil de détection de la résistance bactérienne aux antibiotiques avec le kit « Check-MDR CT103 array » (Check-Points Health B.V., Wageningen, Pays-Bas) (Cunningham et al., 2016; Cuzon et al., 2012), qui peut également être couplé à la détection de marqueurs de pathogénicité (*Staphylococcus aureus* Genotyping kit®, Alere™) (Sotto et al., 2012).

Plus récemment, le champ des biopuces s'est élargi avec l'immobilisation d'autres biomolécules comme par exemple les glucides (Park et al., 2007) ou même des cellules entières (Castel et al., 2006; Hart et al., 2009), également utilisées pour des applications de diagnostic infectieux (Disney and Seeberger, 2004; Hashimoto et al., 2018).

2.5 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est une technique utilisée pour l'étude qualitative et quantitative de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Des signaux sont émis par des cellules préalablement marquées par fluorescence lorsqu'elles coupent un ou plusieurs faisceaux lumineux au niveau de la chambre de lecture. Un procédé d'analyse optique puis informatique va permettre l'interprétation de ces signaux pour évaluer les cellules (taille, granulométrie, intensité relative de fluorescence...). Pour le diagnostic des infections, divers types d'échantillons peuvent être analysés (tissus, liquides biologiques...). Ces échantillons, souvent complexes de par la diversité des micro-organismes pouvant être présents, doivent nécessiter des tests précis pour une détection rapide et spécifique des pathogènes.

Actuellement, la technologie Luminex est basée sur l'utilisation de microsphères de polystyrène fonctionnalisées avec soit des oligonucléotides, des peptides ou des anticorps (Figure 7). Elle peut être utilisée dans la détection de résistances aux traitements (Pham et al., 2014) ou encore en infectiologie avec le couplage PCR multiplexe Luminex™ pour la détection de toxines de *Clostridium difficile* dans les selles (Leal et al., 2018).

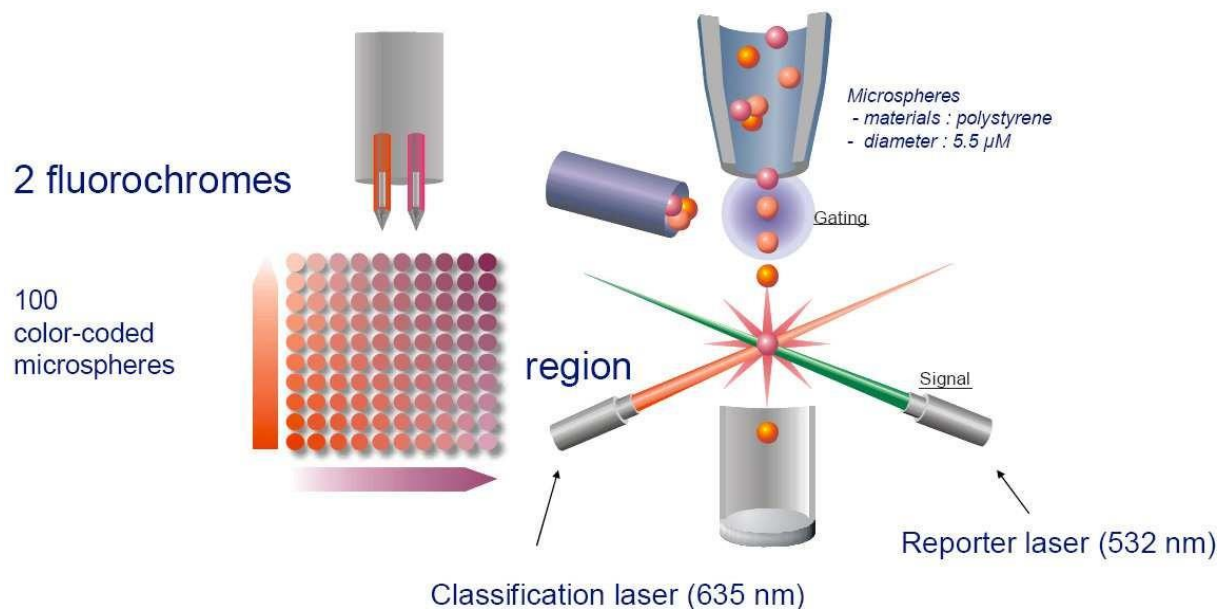


Figure 7 : Schéma du principe du Luminex™ (Zheng and He, 2012).

2.6 Récapitulatif des techniques actuelles de détection des pathogènes pour le diagnostic des infections

Toutes les techniques décrites jusqu'alors présentent des avantages et des inconvénients. Dans le cadre d'une revue sur la spectrométrie de masse, Singhal *et al.* ont résumé ces différentes techniques et ont présenté leurs caractéristiques (Singhal et al., 2015) (Tableau VII).

Tableau VII : Méthodes utilisées pour la détection et l'identification de bactéries en microbiologie clinique (Singhal et al., 2015).

Detection method	Advantages	Disadvantages
Conventional; culture on microbiological media and identification by biochemical tests	• Sensitive • Inexpensive	• Lengthy and time consuming process • Might require 24–48 h
Immunological-based methods	• Faster than conventional methods • Can detect both contaminating organisms and their toxins	• Not as specific, sensitive, and rapid as nucleic-acid based detection methods • Require large amounts of antigen • Developed for only a small number of microorganisms
Florescent <i>in situ</i> hybridization (FISH)	• Rapid detection and identification directly from slide smears • Fast and ease-of use of conventional staining methods combined with specificity of molecular methods	• Test limited by the availability of specific antigens for detection
Molecular based methods (i) Real-time PCR (ii) Multiplex-PCR	• Culturing of the sample is not required • Specific, sensitive, rapid, and accurate • Closed-tube system reduces the risk of contamination • Can detect many pathogens simultaneously	• A highly precise thermal cycler is needed • Trained laboratory personnel required for performing the test
DNA sequencing	• 16S rDNA and 18S rDNA sequencing are the gold standards • Can identify fastidious and uncultivable microorganisms	• Trained laboratory personnel and powerful interpretation softwares are required • Expensive • Not suitable for routine clinical use
Microarrays	• Large scale screening system for simultaneous diagnosis and detection of many pathogens	• Expensive • Trained laboratory personnel required
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay	• Can generate large copies of DNA in less than an hour • Easy to use • No sophisticated equipment is required	• Developed for only a small number of microorganisms as yet
Metagenomic assay	• Useful for random detection of pathogens	• Data acquisition and data analysis is time consuming • Trained laboratory personnel required
MALDI-TOF MS	• Fast • Accurate • Less expensive than molecular and immunological-based detection methods • Trained laboratory personnel not required	• High initial cost of the MALDI-TOF equipment

Qu'elles soient basées sur la culture bactérienne, sur la biologie moléculaire ou la spectrométrie de masse, toutes ces techniques peuvent actuellement être employées dans le cadre du diagnostic de l'infection et de l'identification du pathogène responsable. Toutefois, pour la plupart des pathologies, la culture reste la méthode de référence bien que de nombreuses études aient montré les limites de cette technique, notamment concernant le temps de pousse qui est un facteur clé dans la prise en charge des patients. Par conséquent, pour améliorer cette prise en charge, de nouvelles méthodes sont en constant développement et proposent des alternatives intéressantes pour le diagnostic clinique des infections.

3 Avancées dans le diagnostic des infections bactériennes

Récemment, ces différentes approches (culture, spectrométrie de masse et biologie moléculaire) ont connu de nombreux développements qui ont permis d'améliorer encore leur efficacité et leur rapidité. Certaines de ces techniques ont été conçues pour le diagnostic infectieux alors que d'autres ont jusqu'alors été développées pour des applications autres, mais pourraient néanmoins être utilisées dans ce cadre médical.

En plus de ces techniques désormais courantes, d'autres approches sont aussi détaillées dans cette revue comme la détection de métabolites volatils pouvant servir de biomarqueurs bactériens, l'utilisation de laboratoires sur puces ou encore de phages en tant que biosenseurs. Chacune de ces techniques est détaillée et son potentiel dans le diagnostic clinique des infections bactériennes est discuté et comparé aux méthodes actuelles. De plus, chaque approche a été évaluée avec ses avantages et inconvénients, ce qui montre bien le potentiel de ces techniques mais aussi les limites selon l'application, ainsi que des axes de recherche futurs pour améliorer encore l'efficacité du diagnostic.

**Publication n°1 : New technological insights in the
clinical diagnosis of bacterial infections**

Article en préparation

New technological insights in the clinical diagnosis of bacterial infections

Kevin Berrou^a, Catherine Dunyach-Remy^{b,c}, Jean-Philippe Lavigne^{b,c}, Axelle Cadere^a, Benoit Roig^a

^a Univ. Nîmes, EA7352 CHROME, Rue du Dr G. Salan, 30021, Nîmes Cedex 1, France.

^b Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047, Université Montpellier, UFR de Médecine, 30908 Nîmes Cedex 02, France.

^c Service de Microbiologie, CHU Nîmes, 30029 Nîmes Cedex 09, France.

Abstract

The diagnostic methods currently used in clinical microbiology are not sufficient for accurate and efficient determination of bacteria responsible for the pathology as well as for rapid patient management and appropriate use of antibiotic treatments. Every year, new technologies appear and their application to biological research and analysis methods has been developed. This literature review describes new technologies in the fields of bacterial culture, molecular biology, metabolomics and phage utilization. All these advances could be an effective support in clinicians' decisions making and thus for an improvement of patient care.

Keywords: Infectious diagnosis, emerging technologies, culture, molecular biology, metabolomics

1. Introduction

Nowadays, in clinical infectious diagnostic, the identification of the responsible agent can be relatively slow, which can lead to unsuitable treatment to hospitalized patients. This approach had lead in the past years to an overuse of antibiotics and to promote the antimicrobial resistance.

A rapid detection of bacteria responsible of an infection and the determination of their antibiotics susceptibility is a major challenge in clinical microbiology diagnostics.

The conventional clinical workflow is based in first bacterial identification by microbiological culture followed by an antibiotic susceptibility testing. The results can be delivered within 36-48 hours depending on the pathogen bacteria. These routine tools present some limitations such essential culture step, difficulties to detect uncultured pathogen and to isolate bacteria in some clinical situations such osteitis.

The last decades have shown major advances to detect pathogen and their antibiotic resistance genes, notably in molecular biology or in metabolomics with the use of the (RT)-PCR and MALDI-TOF-MS respectively. These tools still remained not sufficiently effective as they present limitations such as cost, prior knowledge of the target, essential culture step in some cases, difficulties to identify some pathogen species, lack of information on antibiotic resistance, etc.

The aim of this review is to focus on the more recent techniques developed for the clinical diagnosis improvement: the culture, the molecular biology, the metabolomics and the phage utilization as diagnosis tool.

2. Improvements in microbial diagnosis by culture

Generally, common practice for microbiological diagnosis of infection

includes microbiological sampling followed by bacterial culture. These cultures are performed with selective media, which allow the identification of the involved bacteria and the determination of their antibiotics susceptibility. These conventional methods remains the standard in many infection diagnoses. However, culture-based methods present two main drawbacks: (1) they are often time consuming. And it has been repeatedly demonstrated that time is a key factor in infection control, as treatments for infections are more effective when antimicrobial treatment is given early; (2) their sensitivity are also very limited (Dinarelli et al., 2017).

Clinicians are thus looking for new diagnostic tools that have the accuracy of current methods and allow faster results. Recently, new culture-based diagnostic methods have been evaluated for their potential in the detection and identification of bacterial pathogens.

2.1. Accelerate Pheno™ system

For sepsis (life-threatening organ dysfunction caused by an inappropriate host response to an infection) diagnosis, Accelerate Diagnostics developed a fully automated phenotypic sensitivity test. The Accelerate Pheno™ system, marketed since 2017, is able to identify and to quantify bacteria as well as their sensitivity to antibiotics and to determine the associated minimal inhibitory concentrations (MIC) (around 1h20 for identification and 5h20 more for antibiotic sensitivity if the blood cultures appear positive after 6 h of incubation). After sample preparation, bacteria are identified by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using two probes: one universal probe (labelled DNA oligonucleotide) to detect all bacteria and

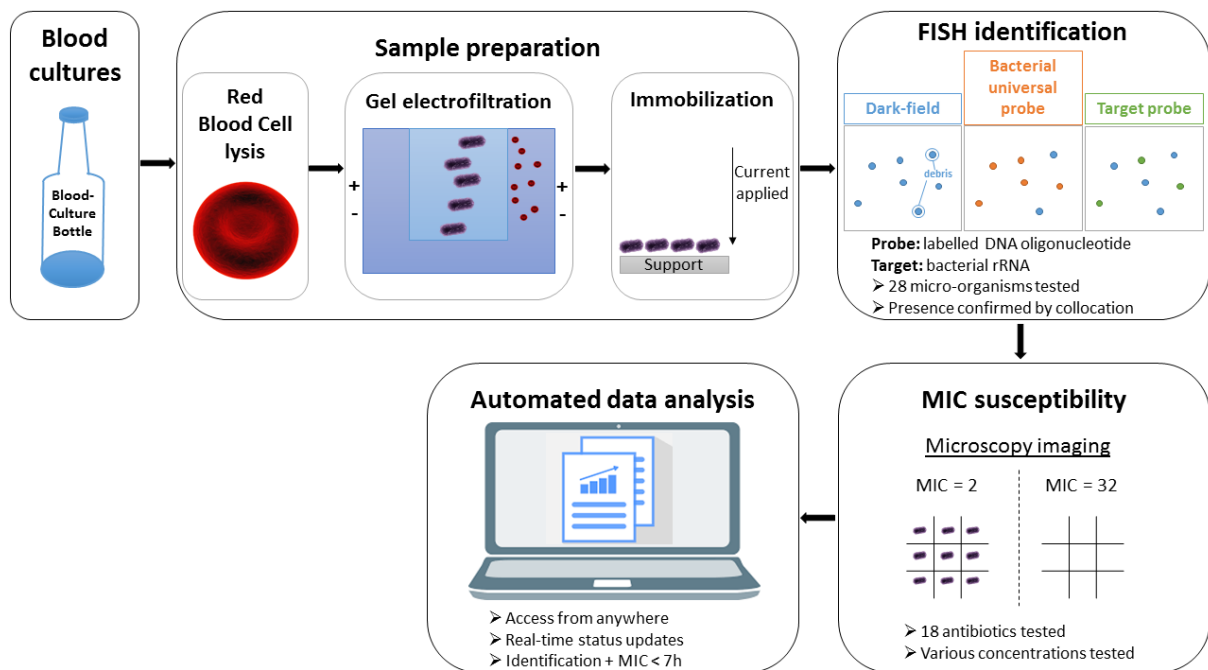


Figure 1. Principle of Accelerate Pheno™ system.

another one to target a specific bacterium by binding to bacterial rRNA. Their growth in the presence of various antibiotics is monitored by microscopy every 10 minutes (Figure 1).

Several recent studies have been published on the Accelerate Pheno™ system. Pantel *et al.* evaluated the performance of the system on a panel of Gram-negative clinical bacteria (105) with various antibiotic resistance. Results were confirmed by comparison with conventional cultural methods (bacterial identification by culture and VITEK® MS mass spectrometry and antibiotic susceptibility testing with VITEK® 2). All 105 bacteria tested were identified by Accelerate Pheno™ and antibiotic resistance was correctly determined in 94.6% of cases (Pantel *et al.*, 2018).

Similar study was carried out on 104 Gram-negative blood samples (Descours *et al.*, 2018) by using same process of control (culture, mass spectrometry and antibiotic susceptibility test). Results have matched at

96.2% and 93.7% for the identification of bacteria and the determination of antibiotic sensitivity respectively.

Other recent studies have also demonstrated the performance of the Accelerate Pheno™ system in a routine diagnostic context (Charnot-Katsikas *et al.*, 2018; Marschal *et al.*, 2017; Pancholi *et al.*, 2018). However, some limitations appeared, such as the lowest performance in identifying *Pseudomonas aeruginosa* or polymicrobial infections, and the limited number of possible investigated targets (28).

Despite the identified limitations, the system remains promising for rapid diagnosis of sepsis as well as a useful tool to adjust antimicrobial treatment and to improve patient management.

2.2. Culturomics

Culturomics is a recent technique, developed in 2012, that focuses the diversity of microbial flora. This technique was developed to cultivate some bacteria

that do not grow on conventional media. It consists of multiplying the culture conditions (up more than 200 for the same sample by varying incubation atmospheres, incubation temperatures, pH, nutrients, minerals, antibiotics or phages), coupled with a rapid screening of growing colonies using a high throughput identification technique (MALDI-TOF MS). When spectrometry is inconclusive, concerned colonies are identified by sequencing the 16S rRNA gene (Lagier et al., 2012a). Using this method, several studies have shown the identification of new bacterial species from the intestinal microbiota (Table 1).

All these studies have demonstrated that culturomics culture allowed to identify more bacterial species than molecular methods (metagenomics) and with a low overlap between these two techniques. They also underline the advantages of culturomics, in particular in the presence of low bacterial load (limiting factor for molecular method) (Dubourg et al., 2013). Indeed, the most effective metagenomics studies detect bacteria only in the presence of bacterial load greater than 10^6 bacteria per gram of faeces (Lagier et al., 2012b).

The method was also applied to the microbiota of diabetic foot infections. Jneid *et al.* studied samples from 43 patients and demonstrated the presence of 53 different bacterial species, 19 of which had never been isolated by other methods (Jneid et al., 2018). This study confirms the complementary of culturomics with the molecular methods in the exploration of complex microbiota.

However, culturomics remains limited in particular for hard-to-cultivate microorganisms and for anaerobic bacteria (Pfleiderer et al., 2013). There is still a lot of work of improvement to be done to develop and optimize the cultural conditions for each type of microbiota.

3. Diagnosis of infection by mass-spectrometry

For nearly ten years, MALDI-TOF has been used in clinical microbiology laboratories to replace biochemical diagnostic tests because as it has brought very significant improvement in diagnosis (Bessède et al., 2011; Bille et al., 2012; Patel, 2013).

Table 1.

Culturomics studies of intestinal microbiota and comparison with metagenomics.

<u>Culturomics</u>		<u>Metagenomics</u>	Overlap percentage	Comment	Reference
number of isolated colonies	number of bacterial species identified	number of bacterial species identified			
32500	340	282	15%	200 culture conditions used 70 necessary conditions 31 new species identified	(Lagier et al., 2012a)
12700	133	57	17%	88 culture conditions used 70 necessary conditions 11 new species identified	(Pfleiderer et al., 2013)
4000	39	18	5%	70 necessary conditions 1 new species identified	(Dubourg et al., 2013)

MALDI-TOF allows rapid identification of bacteria, while clinical proteomics is used instead to determine markers of a particular condition (e. g. healthy or sick).

3.1. Improvements and prospects in bacterial identification by MALDI-TOF

MALDI-TOF, conventionally based on the analysis of surface proteins of micro-organisms, generally requires bacterial pure colonies (from bacterial culture) for routine diagnosis. Comparing mass spectra of peptide with databases is a crucial step in identifying bacteria. For example, the MALDI-TOF MS failed to distinguish *E. coli* and *Shigella* spp. (Bizzini et al., 2010) that are phylogenetically related species. Therefore, recent development has been described improving the interest of the technique to identify pathogens. As example, MALDI-TOF have been shown to be able to differentiate three different *S. aureus* strains: methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA, sensitive to vancomycin (Liu et al., 2011)), Vancomycin-intermediately resistant *S. aureus* (VISA, vancomycin resistant strain) and a variant phenotype (between susceptible and resistant strains) called heterogeneous VISA (hVISA) (Hiramatsu et al., 1997). This last one is particularly difficult to identify by mass spectrometry (76%) and Asakura *et al.* have developed a more accurate machine-learning classifier for its discrimination from sensible and resistant *S. aureus* with 99% and 88% of sensitivity and specificity respectively (Asakura et al., 2018). This software, publicly available as hVISA classifier, could improve the treatment of MRSA infections.

In some cases, the use of mass spectrometry avoids the bacterial culture step and allows directly, from clinical samples, identification of bacteria and their

associated antibiotic resistance characters (Lasserre et al., 2015; March et al., 2015). Indeed, in bloodstream infections leading to septic shock, this technique, directly applied to positive blood cultures, significantly reduces testing time and is then associated with an increased proportion of patients receiving an adequate antibiotic treatment in less than 24 h (Lavigne et al., 2013; March et al., 2015; Vlek et al., 2012). Although faster, the technique is currently limited to the analysis of some biological fluid (blood culture, urinary samples...).

Another recent approach is MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA) for the rapid detection of antibiotic resistance. (Lange et al., 2014). Bacteria are incubated in a suitable environment with or without antibiotics. After a short incubation period (1 to 4 hours depending on the studies), the cells are lysed and spiked with an internal standard (to facilitate quantitative comparison). Although the technique provides a rapid response on the bacterium's ability to resist to antibiotics, it is not correlated with the MIC and does not explain the resistance mechanism. MBT-ASTRA, initially applied to identify antibiotics resistance of different *Klebsiella* species (Lange et al., 2014), was also used on anaerobic bacteria *Bacteroides fragilis* (Justesen et al., 2018). This approach is a relatively easy and inexpensive, but further studies are still needed to confirm their efficiency (Vrioni et al., 2018).

To answer the need for rapid diagnosis, SpiderMass technology was recently proposed. Inspired by the MALDI principle, it uses Resonant Infrared Laser Ablation (RIR-LA), coupled with mass spectrometry in a real-time *in vivo* analysis. This minimally invasive (only minor tissue damage), painless technique is based on the excitation of O-H bonds of water molecules

naturally present in most biological samples. Fatou *et al.* demonstrated in particular, the capacity to differentiate healthy, benign or cancerous regions owing to the property of SpiderMass to differentiate molecular models specific to each of these cellular phenotypes (Fatou et al., 2016). The same study demonstrated potential for applications in dermatology, cosmetology, food safety or drug metabolism and pharmacokinetic analysis (Fatou et al., 2018). Lipids are the molecules mainly studied by SpiderMass although, various metabolites have been also described. Masses ranging from 90-2000 m/z are currently being scanned but it may be possible to apply this technique to the detection of bacteria in wounds for example. It would of course be necessary to have adequate databases to identify pathogens *in vivo* and in real time.

Even if very promising, MALDI-TOF approach has important limitations. Some bacteria remain difficult to identify, either because of the lack of a specific spectral footprint or due to the absence of their reference profile in existing databases. In addition, this technique generally does not allow the identification of polymicrobial samples or the differentiation of bacterial clones of the same species. Finally, the characterization of the resistance or virulence of certain strains still remains limited.

3.2. Detection of clinical biomarkers by proteomics

Proteomics consists in studying the proteome of a cell or organism at a given point in time. It therefore characterizes a dynamic and complex system that evolves during the whole life of an organism. Used to obtain functional data such as protein location, identification of partner proteins

or binding sites to other molecules..., proteomics studies the signalling pathways involved in biological processes or in the occurrence of diseases. By comparing samples of healthy and sick people, it is possible to discover and validate protein biomarkers useful for screening diseases, monitoring of their evolution or evaluation of a treatment effectiveness (Edwards et al., 2018; Kuusela et al., 2017; Reddy et al., 2015; Tan et al., 2017).

Li *et al.* reported for example a study on the identification and characterization of specific proteins for different groups of children with active tuberculosis (ATB), latent tuberculosis (LTBI) and a healthy control group (Li et al., 2017). The analysis of plasma proteomes highlighted 318 different proteins between ATB and control, as well as 521 different proteins between LTBI and control. Forty-nine proteins were common to both groups, but expressed differently (data confirmed and validated by quantitative PCR and western blot). In this example, data acquired through proteomic provided a better understanding of the mechanism of infection associated with *Mycobacterium tuberculosis* and helped in the selection of relevant biomarkers for the detection of this pathogen.

Proteomic has sometimes been shown as limited by low molecular weight, hydrophobicity (Párraga-Niño et al., 2012), or low concentration of proteins. Appropriate sample preparation is therefore required. In general, based on maintaining the proteins in solutions allowing their extraction, followed by the separation step (gel electrophoresis or chromatography), conventional methods need hours of work, specific laboratory skills and may have a significant cost. New extraction and/or concentration techniques can be proposed to obtain a larger quantity of the molecule of interest or to eliminate interferences

causing background noise, making analysis more difficult.

3.3. Volatile metabolites

One of the approaches used for the identification of bacteria is based on the detection of specific volatile metabolites (Bos et al., 2013; Sethi et al., 2013). Detection and identification of microbial volatile compounds represents simple, sensitive and non-invasive methods for diagnostic (Bojko et al., 2011; Kataoka, 2015) which sometimes require prior concentration to extract the weakest compounds produced by bacteria. Concentration methods have been proposed in the literature like Solid Phase Micro-Extraction (SPME), initially developed for environmental applications (Arthur and Pawliszyn, 1990), and later adapted for clinical samples (Theodoridis et al., 2000; Ulrich, 2000). SPME has also been used for the recovery of strain-specific compounds that may be potentially used as biomarkers (Bos et al., 2013; Karami et al., 2018; Rees et al., 2018).

Another new SPME application for *in vivo* analysis is developed such as patches placed on and under the skin (to observe its permeability) or extracorporeal blood circulation systems to capture metabolites present in different biological fluids (Bessonneau et al., 2015a; Goryński et al., 2016; Musteata et al., 2008). Research has also suggested the use of these fibres to assess organ function through biochemical profiling, identification of potential biomarkers, drug monitoring and organ function monitoring during transplantation (Bojko et al., 2014; Goryński et al., 2016).

This fibre extraction technique was derived with thin film (TF-SPME) and applied to saliva analysis for the detection of prohibited substances (Bessonneau et al.,

2015b). Two different formats were used (coated blades and membranes) for LC-MS and GC-MS analyses. *In vivo* saliva sampling allows the rapid extraction (5 minutes) of a large number of metabolites with a wide range of polarity. This method has been validated for 49 prohibited substances with a limit of quantification between 0.004 and 0.98 $\mu\text{g.L}^{-1}$ depending on the compound with a very good accuracy. In addition, this study also validated the application of TF-SPME for the determination of endogenous steroids in saliva where analytes concentrations are substantially low. Therefore, it appears that this method can play an important role in drug testing as well as in medical applications such as disease detection or screening.

Derived from the SPME method, Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) consists of concentrating volatile or semi-volatile compounds on bars (called Twisters[®]) coated with polymeric phases (Baltussen et al., 1999). Compared to SPME, SBSE has a higher amount of available adsorbent phase, consequently increasing the amount of retained compounds (thus reducing detection limits) which lead a sensitivity up to 500 times higher (Baltussen et al., 1999). A recent study applied a SBSE method for the first time to the analysis of bacterial volatile and/or semi-volatile compounds produced by a reference strain of *S. aureus* (Berrou et al., 2018). This study showed the capacity and effectiveness of SBSE for the detection of bacterial metabolites.

4. New advances in molecular biology approaches

Molecular biology techniques to identify bacteria responsible of infections have been widely described in the literature, particularly the amplification of 16S rDNA,

specific to each species. In the context of infectious diagnosis, multiplex PCR were developed for simultaneous investigations of several target sequences (Welti et al., 2003). The most currently used, automated commercial systems such as the real time multiplex PCR GenExpert® (Cepheid®, USA) are used in clinical diagnostics. More recently, syndromic approaches were developed based on the principle of multiplex PCR by targeting the main pathogens responsible for a type of infection. Systems such as FilmArray® (Biomérieux, France) or Unyvero® (Curetis, Germany) can be used for the diagnosis of nervous system infections (Messacar et al., 2016), respiratory infections (Poritz et al., 2011) or osteitis and digestive infections (Dunyach-Remy et al., 2018). These systems, now found in laboratories for diagnostic support, allow a simple and rapid identification of pathogens infecting patients. However, these techniques are expensive, often sensitive to PCR inhibitors present in tested biological

samples and only identify the targeted microorganisms. Despite the use of these techniques in support of clinical diagnosis, there is still a need to improve diagnostic methods by proposing techniques to identify and quantify pathogens more quickly and accurately directly from clinical samples. To overcome these disadvantages, new molecular biology technologies have been developed and discussed for their application to the diagnosis of infections.

4.1. Droplet digital™ PCR system

Derived from real-time quantitative PCR, droplet digital PCR (ddPCR) is a new molecular technique that has improved sensitivity, specificity and precision parameters for the detection and analysis of low abundance nucleic acids (Hindson et al., 2011). It permits an accurate measurement of small variations in gene expression, and appears to be less sensitive

Table 2.
Applications of droplet digital PCR in infectious diagnosis.

Sample type	Target	Comment	Reference
Ocular swab	<i>C. trachomatis</i> kryptic plasmid	First example of the usefulness of the ddPCR method in clinical diagnosing infections	(Roberts et al., 2013)
Ocular swab	<i>C. trachomatis</i> kryptic plasmid	Plasmid copy number is not associated with disease severity	(Last et al., 2014)
Culture	16S rRNA and rpoB genes from <i>M. tuberculosis</i>	The high accuracy of the ddPCR makes this approach a potentially more robust technique for quantifying pathogens	(Devonshire et al., 2015)
Stool samples	16S and <i>cagA</i> genes of <i>H. pylori</i>	Non-invasive method of detection and quantification of pathogens	(Talarico et al., 2016)
Plasma	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> specific IS6110 sequence	ddPCR is a promising molecular tool to diagnose tuberculosis based on clinical blood samples (able to detect low levels of pathogen DNA)	(Yang et al., 2017)
Gastric tissue biopsies	23S rRNA gene of <i>H. pylori</i>	Determination the prevalence of clarithromycin-resistant	(Talarico et al., 2018)
Gastric mucus and stool samples	23S rRNA gene of <i>H. pylori</i>	ddPCR could detect genotypes associated with <i>H. pylori</i> clarithromycin resistance	(Sun et al., 2018)

to PCR inhibitors than quantitative PCR (Morisset et al., 2013). Its principle is based on water-oil emulsion droplet system in which the gene(s) of interest will be amplified (Pekin et al., 2011).

In infections field, this technique was first used for the detection of trachoma, a bacterial eye infection caused by *Chlamydia trachomatis* (Roberts et al., 2013). More recently, another application of ddPCR on *Helicobacter pylori* has revealed mutations conferring clarithromycin resistance (Talarico et al., 2018) (Table 2).

These studies demonstrated the higher sensitivity of ddPCR compared to cultural methods. It can be applied for an accurate quantification in a single gene or multiplex targeting mode from different type of clinical samples. Although not yet automated for routine use in clinical microbiology, the value of ddPCR in infectious diagnosis has been demonstrated in a review indicating that this technique allows more sensitive, accurate and

reproducible detection of low abundance pathogens, and may be a better choice than quantitative PCR for future clinical diagnosis (Li et al., 2018).

4.2. Next Generation Sequencing

Since its first introduction on the market in 2005, the new generation of sequencing technology (NGS) has been increasingly developed. This high throughput sequencing technique can produce huge amounts of sequencing data rapidly and at low-cost. It can be applied from clinical samples (biopsy or biological fluid), to identify genetic material (DNA, RNA) of any microorganism present in a sample. The advantage of this technique is the analysis of the whole genome of an organism in a single run. In case of infection, the DNA of the pathogen responsible is extracted and fully sequenced (Table 3), providing the identification of the micro-organism, but also information on its possible resistance to antibiotics or its virulence (Chan, 2016; Deurenberg et al., 2017).

Table 3.
Examples of the contribution of NGS in clinical applications.

Starting point	Sample type	Target	Results	Reference
<i>P. aeruginosa</i> is a multi-drug resistant microorganism	Cultures of clinical isolates of <i>P. aeruginosa</i>	Whole genome	Obtaining microbiological susceptibility data for meropenem, levofloxacin, and amikacin	(Kos et al., 2015)
Variation in nucleotide polymorphism between antibiotic sensitive and resistant strains, contributing to resistance mechanisms	Cultures of clinical isolates of <i>P. aeruginosa</i>	Whole genome	Identification of key mutations (flow pumping systems, cell wall, DNA replication and genes involved in the repair mechanism) of antibiotic resistance genes leading to genetic polymorphism.	(Ramanathan et al., 2017)
Suspicion of cardiac infection	Indigenous and prosthetic resected heart valve	V1 - V3 region of 16S rRNA	• Between 13 and 16 bacterial species per sample • 5 new species associated with infectious endocarditis	(Oberbach et al., 2017)
Diagnosis of neurobrucellosis in patients with very different symptoms	Cerebrospinal fluid	Whole DNA	Rapid diagnosis of neurobrucellosis compare to culture-based methods	(Fan et al., 2018)

The NGS overcomes the limitations of targeted diagnostic methods. Unlike PCR, it does not require prior knowledge or assumptions about the infection responsible pathogen (Brown et al., 2018). This method has therefore opened up the possibility of detecting new pathogens. Moreover, clinical samples can be analysed by NGS based on metagenomics approaches with 16S rRNA, in order to quickly identify bacterial species by avoiding a prior culture step (Lim et al., 2014). The NGS based on 16S rRNA analysis demonstrated improved reproducibility, quantification and efficiency in the identification of bacterial species and their relative abundance. This technique provides a more accurate analysis than cultural standard techniques (Cummings et al., 2016).

Both from 16S rRNA or the entire genome, NGS has demonstrated its ability to detect antibiotic resistance, new resistance genes (Kos et al., 2015), but also to detect new pathogens involved in infections (Oberbach et al., 2017).

However, one of the main current limitations of the NGS is the management of the amount of data generated that represent a real technical challenge and which may also raise ethical issues regarding data confidentiality. This challenge will be constant for users because as long as genomic methods continue to improve and develop new strategies (speed of execution, cost reduction and increased accuracy), they will increasingly be used to assist clinicians in their decision-making for infection diagnosis (Tang et al., 2017).

4.3. Nanopore technology

Nanopore technology was developed more than 20 years ago (Kasianowicz et al., 1996), but received more recently a high increase leading its use in diagnosis.

Inspired by nature and in particular by transmembrane exchanges, the nanopores used for sequencing are composed of proteins (for example α -hemolysin or MspA porine) (Butler et al., 2008; Kasianowicz et al., 1996) that placed on a synthetic membrane of polymers with high electrical resistance, form pores with a few nanometres diameter. The detection of the passage of oligonucleotides (DNA, RNA, aptamer) is achieved by measuring the ionic current passing through the pore: an empty pore corresponds to a high current; the presence of a macromolecule, such as DNA, reduces the flow of ions through the pore, and allows to detect the passage of an individual molecule. Numerous locks had to be removed to identify each of the base pairs of the molecule transported in the nanopore (Branton et al., 2008; Keyser, 2011; Montel, 2018).

These systems are marketed by Oxford Nanopore Technologies, which offers portable, automated devices for direct DNA sequencing without prior amplification. Results are obtained in real time and current technologies can sequence up to 2 million bases. Among them, MinION™ has recently been used for diagnostic applications. For example, MinION™ demonstrated a high speed in the detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Cao et al., 2016). Due to the use of specific databases, it allows the identification of the species, the strain as well as the detection of the resistance profiles of these bacteria (Tunnsjø et al., 2018). The technique was applied for the diagnosis of urinary tract infection (from urine samples), with results obtained in four hours (Schmidt et al., 2017). Compared to cultural method (gold standard bacterial analysis) or to the NGS Illumina MiSeq sequencer (Sanderson et al., 2017), MinION™ demonstrated better performances in providing information in

real time, and therefore in identifying the causes of the infection only a few minutes after sequencing has begun. However, it has been shown that high proportion of human DNA in the samples can prevent a complete genome analysis. To overcome such limitation, Charalampous *et al.* have proposed, in a study on respiratory tract infections, to implemented a human DNA depletion protocol, followed by cell lysis and bacterial DNA extraction in sputum (Charalampous et al., 2018). The results on the 41 samples studied found 96.6% agreement with the cultural standard method and allowed the identification of pathogens and their antibiotic resistance profile within six hours.

Another applications is the detection and quantification of proteins. Indeed, aptamers (synthetic oligonucleotides) specific to the target protein will be able to bind to this protein. When these aptamers pass through the nanopore, the disruption of the electric current will allow its detection. These aptamers may pass without first being bound to the target proteins. In this case, the current variation will be shorter because they will not be retained by the protein. In addition, non-target proteins cannot bind to aptamers that have affinities and selectivities with their target comparable to those of antibodies (Toulmé et al., 2007). These proteins are also too large to pass through these nanopores. In this way, the system can differentiate target proteins from non-target proteins with a high degree of sensitivity and specificity. Although no application has yet been described for the detection of bacterial proteins, this technique has already been applied directly to serum sample for the detection and quantification of a cancer biomarker (prostate-specific antigen) (Lin et al., 2017). Nevertheless, one study reports the use of nanopores for the direct detection of bacteria through electrochemical

interactions. In addition, with the use of peptides binding to targeted bacteria, the charge on the outer membrane will be modified, which will lead to a variation in electrical potential, indicating the specific detection of the targeted pathogen (Apetrei et al., 2016).

MinION™ seems a very promising technique in particular because of its rapidity and its very good sensitivity. However, it still needs to be improved in terms of bioinformatics for the detection of point mutations responsible for antibiotic resistance (Schmidt et al., 2017).

5. Development of microfluidics for lab-on-chip

Microfluidics is defined by Georges Whitesides as “a science of systems that treat or manipulate small quantities of fluid (10^{-9} to 10^{-18} litres) using channels whose dimensions vary from tens to hundreds of micrometres” (Whitesides, 2006). It can also be considered as a technology for the manufacture of laboratory devices. Practically, microfluidics, is not a diagnostic tool but a technology for developing diagnostic tools. Microfluidic-based systems are devices that contain a set of miniature components.

In biology, and more particularly for diagnostic applications, microfluidics has enabled the development of biochips. A microfluidic chip is a set of micro-channels engraved or moulded in a material (glass, silicon, polymer...). These micro-channels are connected to each other in a way to perform the intended function, and can analyse gases or fluids.

In recent years, there has been a significant increase in the use of biochips for diagnostic purposes. In this field, microfluidic chips have been developed to track pathogens,

identify foodborne microorganisms and discover new antimicrobial agents (Lei, 2012). Unlike conventional methods, microfluidic microarray technology has real advantages such as rapid detection, ease of use, cost-effectiveness, lower sample and reagent requirements, multiplexing capability, and high accuracy and reproducibility in pathogen identification (Huang et al., 2017; Nasser et al., 2018). For example, microfluidic technology has been used to develop a new approach to isolate bacteria from whole blood (Zelenin et al., 2015). Authors also proposed the possibility of carrying out genetic and antibiotic susceptibility tests. It is also suggested that this device can be combined with a filter structure to be integrated into lab-on-chip systems owing to the miniaturization and clustering of sample preparation, reagent handling, bioreaction and detection steps that are integrated into a single platform (Nasser et al., 2018).

Initially developed in genetics to observe the expression of several thousand genes in a given cell or tissue (Schna et al., 1995),

biochips were then developed with peptides, sugars or cells. Biochips have been designed to answer the need for automated and rapid analysis. Once miniature, these lab-on-chip are transportable and allow on-site/point of care analysis. Different applications have been described in the literature as show in the table 4.

These studies using smartphone infection detection show that coupling microfluids with recent advances in electronics can make some diagnoses simpler, faster and more accessible.

6. Use of phage as biosensor to detect infection

Bacteriophages are viruses that specifically infect and kill bacteria by intracellular lysis. The use of bacteriophages for both therapeutic (Lu and Koeris, 2011) and diagnostic purposes (Schofield et al., 2012) has already been described. As diagnostic tools, phages have many advantages, in particular because of their host specificity

Table 4.

Examples of applications of microfluidics in infectious diagnosis.

Technique	Sample type	Principle	Target(s)	Results	Reference
Smartphone-based detection with paper based microfluidic chips	Bacterial cultures	Latex particles conjugated to anti- <i>Salmonella</i> antibodies Digital image for the quantification of immunoagglutination	<i>Salmonella typhimurium</i>	LOD: 1 cell in 1 µL sample in less than 1 min	(Park et al., 2013)
Point-of-Care smartphone dongle	Whole blood	ELISA	HIV Syphilis	15 min	(Laksanasopin et al., 2015)
Sedimentation-based immunoassay	Stool	Detection of labelled antibodies by epifluorescent optical system	<i>E. coli</i> <i>Listeria</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	Detection in less than 20 min	(Phaneuf et al., 2016)
LOAD (DNA extraction + LAMP + RT Fluorescence)	Sputum and blood	Automatic sequence of steps by varying the centrifugation speed	<i>M. tuberculosis</i> <i>A. baumannii</i>	2 hours LOD: 10 ³ CFU.mL ⁻¹	(Loo et al., 2017)

LOAD: microfluidic platform lab-on-a-disc

LAMP: loop-mediated isothermal amplification

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

and high robustness (in relation to difficult environmental conditions such as exposure to temperature or pH variations, organic solvents, etc.). Low-cost and easy to produce, bacteriophages are able to distinguish between living and dead bacteria (Šuster et al., 2017).

Recently, several approaches using bacteriophages have been proposed in the literature. In particular, it was discussed how to use their lytic capacity to detect the presence of bacteria. For example, Šuster *et al.* described the use of phage K to detect two species of *Staphylococci* (*S. aureus* and *S. epidermidis*) involved in prosthetic joint infection (Šuster et al., 2017). The monitoring of the adenosine-5'-triphosphate (ATP) intracellular marker, released by cell lysis, (detected by bioluminescence with luciferase) allow a detection limit of 10^3 CFU.mL⁻¹ for a total analysis time of 4 hours.

Several tests and (bio)sensors based on the use of bacteriophages have been proposed and represent simple, reliable, economical and accurate tools for bacterial detection (Farooq et al., 2018). As example, De Plano *et al.* immobilized the phage St.au91VS5 on a mica surface for the detection of *S. aureus* (De Plano et al., 2017). Niyomdechcha *et al.* employed the M13 bacteriophage to the specific detection of *Salmonella* bacteria (Niyomdechcha et al., 2018). In this case, the authors showed the possibility of reuse of this biosensor 40 times and highlights its very good reproducibility.

Finally, the particular recognition between a bacteriophage and its target bacterium involves highly specific peptides. It is this specific recognition capacity that is also used to develop sensors that no longer target the bacterium, but rather certain specific proteins excreted as virulence factors. For example, a screening of phages grouped in banks was carried out to identify peptides

capable of specifically detecting cholera toxin CTX-B of *Vibrio cholerae* (Lim et al., 2018).

With these studies, it appears that bacteriophages have an interest in diagnosis as elements of recognition and detection of microorganisms.

7. Conclusion

The management of bacterial infections is undoubtedly one of the major health challenges. Causing millions of deaths every year, particularly due to increasing antibiotic resistance, current diagnostic methods based mainly on bacterial culture are no longer sufficient. There is therefore a considerable need for new technological tools able to carry out rapid and reliable tests. Indeed, clinical microbiology has become a major actor in the optimization of patient care as well as in the management of hospital costs.

To improve the diagnosis of infections, it is important to assess the diagnostic capacity of new methods, including the optimal type of sampling. Recent developments in bacterial culture, molecular biology, mass spectrometry and sampling lead to proposal of new analytical systems that can be applied to the detection of pathogenic bacteria. Each of these techniques has several advantages but also some limitations (Table 5) and depending on the type of infection or sample, the appropriate methods may vary. Therefore, a combination of several tools may be necessary for optimal diagnosis of infections.

New types of sensors based on the use of bacteriophages also have the potential to

Table 5.

Advantages and disadvantages of new analytical technologies potentially adapted in the clinic detection of bacterial infections.

Techniques	Advantages	Disadvantages	Time
Accelerate	• Directly from clinical specimens • Pathogen identification and antibioresistance with MIC estimation	• Limited number of targets per panel • Lowest performance in identifying polymicrobial infections	1h30 - 7h
Culturomics	• Large number of different bacteria isolated from a clinical sample • Complementary to metagenomic identification • More sensitive than molecular biology techniques	• Organization due to the many growing conditions • Time-consuming • Difficulties in analysing strict anaerobes • Requires identification by MALDI-TOF or 16S sequencing	From several hours to one month of incubation
NGS	• Directly from clinical specimens • Analysis of the entire genome of the micro-organism in a single step • Information on resistance and virulence	• Difficult identification of low abundant bacteria • Large amount of generated data requires adapted software	/
Nanopore	• Miniaturization of sequencing for on-site analyses of clinical samples • Identification of pathogens and their associated resistance • Protein detection and quantification	• Requires improvements in bioinformatics for data management • Requires adapted protocols for the depletion of human DNA • Significant error rate	few min - 6h
Droplet digital	• Less sensitive to PCR inhibitors than qPCR • Detection of weakly abundant nucleic acids • Pathogen identification and antibioresistance (depending on the primers used)	• High cost of probes and primers	2h30 - 6h
Lab-on-chip	• Large scale screening for simultaneous detection of many pathogens • Rapid and easy to use • Low sample quantity required • Directly from clinical specimens • Transportable for on-site analysis	• Precise design according to the targets • Expensive • Trained laboratory personnel required	20 min - 2 h
MALDI-TOF	• Fast • Accurate • Easy to use	• Databases sometimes limited • Difficulties in identifying some microorganisms • Bacterial culture required for routine diagnosis	Few min
Proteomics	• Biomarker research and validation	• Difficulty in detecting low protein abundance • Sample preparation (extraction + separation)	/
SpiderMass	• Real-time <i>in vivo</i> analysis • Differentiates cellular phenotypes	• Not adapted to the detection of microorganisms • No databases available	Few sec / few min
SPME	• Solvent-free • Analyte concentration • Easy to use • Possible use <i>in vivo</i>	• Low amount of adsorbent phase • Recovery of low molecular weight compounds • Fibre brittleness	1h - 3h
TF-SPME	• Robust and convenient <i>in vivo</i> sampling • Low matrix effect	• Requires solvent for liquid desorption	1h30
SBSE	• Solvent-free • High concentration capacity of analytes • Easy to use	• Differentiate phase compounds from VOCs • Selection of analytes by affinity with stir bars	1h - 7h
Phage biosensor	• Host specificity • Easy to produce • Good reproducibility	• No phage available for each bacterial target	1h - 4h

provide rapid and complete bacterial characterization. In addition, the use of nanotechnology and microfluidics has also permitted the miniaturization and merging of several techniques into a single system, promising to affect clinical protocols in the near future with the development of innovative care systems for rapid, cost-effective and, why not, personalized treatments. Future advance will therefore require greater automation of laboratory processes and rapid communication of results (for example via smartphones). These technological progresses will contribute to a better understanding of infections and provide to clinicians new therapeutic strategies.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The U1047 team belongs to the FHU InCh and is supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Nîmes métropole.

References

- Apetrei, A., Ciuca, A., Lee, J.-K., Seo, C.H., Park, Y., and Luchian, T. (2016). A Protein Nanopore-Based Approach for Bacteria Sensing. *Nanoscale Res Lett* *11*, 501.
- Arthur, C.L., and Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* *62*, 2145–2148.
- Asakura, K., Azechi, T., Sasano, H., Matsui, H., Hanaki, H., Miyazaki, M., Takata, T., Sekine, M., Takaku, T., Ochiai, T., et al. (2018). Rapid and easy detection of low-level resistance to vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* *13*, e0194212.
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., and Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J. Microcolumn Sep.* *11*, 737–747.
- Berrou, K., Dunyach-Remy, C., Lavigne, J.-P., Roig, B., and Cadiere, A. (2018). Multiple stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a tentative identification of bacterial volatile and/or semi-volatile metabolites. *Talanta* *195*, 245–250.
- Bessède, E., Angla-Gre, M., Delagarde, Y., Sep Hieng, S., Ménard, A., and Mégraud, F. (2011). Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* *17*, 533–538.
- Bessonneau, V., Zhan, Y., De Lannoy, I.A.M., Saldivia, V., and Pawliszyn, J. (2015a). In vivo solid-phase microextraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring blood eicosanoids time profile after lipopolysaccharide-induced inflammation in Sprague-Dawley rats. *J. Chromatogr. A* *1424*, 134–138.
- Bessonneau, V., Boyaci, E., Maciazek-Jurczyk, M., and Pawliszyn, J. (2015b). In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring. *Anal. Chim. Acta* *856*, 35–45.
- Bille, E., Dauphin, B., Leto, J., Bougnoux, M.-E., Beretti, J.-L., Lotz, A., Suarez, S., Meyer, J., Join-Lambert, O., Descamps, P., et al. (2012). MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin. Microbiol. Infect.* *18*, 1117–1125.
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., and Prod'homme, G. (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 1549–1554.
- Bojko, B., Cudjoe, E., Pawliszyn, J., and Wasowicz, M. (2011). Solid-phase microextraction. How far are we from clinical practice? *Trends Anal. Chem.* *30*, 1505–1512.
- Bojko, B., Gorynski, K., Gomez-Rios, G.A., Knaak, J.M., Machuca, T., Cudjoe, E., Spetzler, V.N., Hsin, M., Cypel, M., Selzner, M., et al. (2014). Low invasive in vivo tissue sampling for monitoring biomarkers and drugs during surgery. *Lab. Invest.* *94*, 586–594.

- Bos, L.D.J., Sterk, P.J., and Schultz, M.J. (2013). Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog.* 9, e1003311.
- Branton, D., Deamer, D.W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S.A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., et al. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26, 1146–1153.
- Brown, J.R., Bharucha, T., and Breuer, J. (2018). Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases. *J. Infect.* 76, 225–240.
- Butler, T.Z., Pavlenok, M., Derrington, I.M., Niederweis, M., and Gundlach, J.H. (2008). Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. *PNAS* 105, 20647–20652.
- Cao, M.D., Ganesamoorthy, D., Elliott, A., Zhang, H., Cooper, M., and Coin, L. (2016). Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION sequencing. *Gigascience* 019356.
- Chan, K.-G. (2016). Whole-genome sequencing in the prediction of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 14, 617–619.
- Charalampous, T., Richardson, H., Kay, G.L., Baldan, R., Jeanes, C., Rae, D., Grundy, S., Turner, D.J., Wain, J., Leggett, R.M., et al. (2018). Rapid Diagnosis of Lower Respiratory Infection using Nanopore-based Clinical Metagenomics. *BioRxiv* 387548.
- Charnot-Katsikas, A., Tesic, V., Love, N., Hill, B., Bethel, C., Boonlayangoor, S., and Beavis, K.G. (2018). Use of the Accelerate Pheno System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Pathogens in Positive Blood Cultures and Impact on Time to Results and Workflow. *J. Clin. Microbiol.* 56.
- Cummings, L.A., Kurosawa, K., Hoogstraal, D.R., SenGupta, D.J., Candra, F., Doyle, M., Thielges, S., Land, T.A., Rosenthal, C.A., Hoffman, N.G., et al. (2016). Clinical Next Generation Sequencing Outperforms Standard Microbiological Culture for Characterizing Polymicrobial Samples. *Clin. Chem.* 62, 1465–1473.
- De Plano, L.M., Carnazza, S., Messina, G.M.L., Rizzo, M.G., Marletta, G., and Guglielmino, S.P.P. (2017). Specific and selective probes for *Staphylococcus aureus* from phage-displayed random peptide libraries. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 157, 473–480.
- Descours, G., Desmurs, L., Hoang, T.L.T., Ibranosyan, M., Baume, M., Ranc, A.-G., Fuhrmann, C., Dauwalder, O., Salka, W., and Vandenesch, F. (2018). Evaluation of the Accelerate Pheno™ system for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria in bloodstream infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 1573–1583.
- Deurenberg, R.H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M.A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A.M.D., Raangs, E.C., Rosema, S., Veloo, A.C.M., et al. (2017). Reprint of “Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention.” *J. Biotechnol.* 250, 2–10.
- Devonshire, A.S., Honeyborne, I., Gutteridge, A., Whale, A.S., Nixon, G., Wilson, P., Jones, G., McHugh, T.D., Foy, C.A., and Huggett, J.F. (2015). Highly reproducible absolute quantification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by digital PCR. *Anal. Chem.* 87, 3706–3713.
- Dinarelli, S., Girasole, M., Kasas, S., and Longo, G. (2017). Nanotools and molecular techniques to rapidly identify and fight bacterial infections. *J. Microbiol. Methods* 138, 72–81.
- Dubourg, G., Lagier, J.C., Armougom, F., Robert, C., Hamad, I., Brouqui, P., and Raoult, D. (2013). The gut microbiota of a patient with resistant tuberculosis is more comprehensively studied by culturomics than by metagenomics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 637–645.
- Dunyach-Remy, C., Carrere, C., Marchandin, H., Schuldiner, S., Guedj, A.-M., Cellier, N., Cadière, A., Lechiche, C., Sotto, A., and Lavigne, J.-P. (2018). Performance of the automated multiplex PCR Unyvero implant and tissue infections system in the management of diabetic foot osteomyelitis. *Future Microbiol.*
- Edwards, R.J., Pyzio, M., Gierula, M., Turner, C.E., Abdul-Salam, V.B., and Sriskandan, S. (2018). Proteomic analysis at the sites of clinical infection with invasive *Streptococcus pyogenes*. *Sci Rep* 8, 5950.
- Fan, S., Ren, H., Wei, Y., Mao, C., Ma, Z., Zhang, L., Wang, L., Ge, Y., Li, T., Cui, L., et al. (2018). Next-generation sequencing of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of neurobrucellosis. *Int. J. Infect. Dis.* 67, 20–24.
- Farooq, U., Yang, Q., Ullah, M.W., and Wang, S. (2018). Bacterial biosensing: Recent advances in phage-based bioassays and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 118, 204–216.

- Fatou, B., Saudemont, P., Leblanc, E., Vinatier, D., Mesdag, V., Wisztorski, M., Focsa, C., Salz, M., Ziskind, M., and Fournier, I. (2016). In vivo Real-Time Mass Spectrometry for Guided Surgery Application. *Sci. Rep.* 6, 25919.
- Fatou, B., Saudemont, P., Duhamel, M., Ziskind, M., Focsa, C., Salz, M., and Fournier, I. (2018). Real time and in vivo pharmaceutical and environmental studies with SpiderMass instrument. *J. Biotechnol.* 281, 61–66.
- Goryński, K., Goryńska, P., Górka, A., Haręźlak, T., Jaroch, A., Jaroch, K., Lendor, S., Skobowiat, C., and Bojko, B. (2016). SPME as a promising tool in translational medicine and drug discovery: From bench to bedside. *J. Pharm. Biomed. Anal.*
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 83, 8604–8610.
- Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y., and Kobayashi, I. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350, 1670–1673.
- Huang, G., Huang, Q., Xie, L., Xiang, G., Wang, L., Xu, H., Ma, L., Luo, X., Xin, J., Zhou, X., et al. (2017). A rapid, low-cost, and microfluidic chip-based system for parallel identification of multiple pathogens related to clinical pneumonia. *Sci. Rep.* 7, 6441.
- Jneid, J., Cassir, N., Schuldiner, S., Jourdan, N., Sotto, A., Lavigne, J.-P., and La Scola, B. (2018). Exploring the Microbiota of Diabetic Foot Infections With Culturomics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 282.
- Justesen, U.S., Acar, Z., Sydenham, T.V., Johansson, Å., and ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections) (2018). Antimicrobial susceptibility testing of *Bacteroides fragilis* using the MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA). *Anaerobe.*
- Karami, N., Mirzajani, F., Rezadoost, H., Karimi, A., Fallah, F., Ghassempour, A., and Aliahmadi, A. (2018). Initial study of three different pathogenic microorganisms by gas chromatography-mass spectrometry. *F1000Res* 6, 1415.
- Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D., and Deamer, D.W. (1996). Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *PNAS* 93, 13770–13773.
- Kataoka, H. (2015). SPME techniques for biomedical analysis. *Bioanalysis* 7, 2135–2144.
- Keyser, U.F. (2011). Controlling molecular transport through nanopores. *J R Soc Interface* 8, 1369–1378.
- Kos, V.N., Déraspe, M., McLaughlin, R.E., Whiteaker, J.D., Roy, P.H., Alm, R.A., Corbeil, J., and Gardner, H. (2015). The Resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in Relationship to Phenotypic Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 427–436.
- Kuusela, P., Saraswat, M., Joenväärä, S., Kaartinen, J., Järvinen, A., and Renkonen, R. (2017). Changes in plasma protein levels as an early indication of a bloodstream infection. *PLoS ONE* 12, e0172987.
- Lagier, J.-C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fournous, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., et al. (2012a). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 1185–1193.
- Lagier, J.-C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., and Raoult, D. (2012b). Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 136.
- Laksanasopin, T., Guo, T.W., Nayak, S., Sridhara, A.A., Xie, S., Olowookere, O.O., Cadinu, P., Meng, F., Chee, N.H., Kim, J., et al. (2015). A smartphone dongle for diagnosis of infectious diseases at the point of care. *Sci Transl Med* 7, 273re1.
- Lange, C., Schubert, S., Jung, J., Kostrzewa, M., and Sparbier, K. (2014). Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J. Clin. Microbiol.* 52, 4155–4162.
- Lasserre, C., De Saint Martin, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., Naas, T., and Tandé, D. (2015). 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.* 53, 2163–2171.
- Last, A.R., Roberts, C. h, Cassama, E., Nabicassa, M., Molina-Gonzalez, S., Burr, S.E., Mabey, D.C.W., Bailey, R.L., and Holland, M.J. (2014). Plasmid copy number and disease severity in naturally occurring ocular *Chlamydia trachomatis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 52, 324–327.

- Lavigne, J.-P., Espinal, P., Dunyach-Remy, C., Messad, N., Pantel, A., and Sotto, A. (2013). Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? *Clin. Chem. Lab. Med.* 51, 257–270.
- Lei, K.F. (2012). Microfluidic systems for diagnostic applications: a review. *J. Lab. Autom.* 17, 330–347.
- Li, H., Bai, R., Zhao, Z., Tao, L., Ma, M., Ji, Z., Jian, M., Ding, Z., Dai, X., Bao, F., et al. (2018). Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases. *Biosci. Rep.* 38.
- Li, J., Sun, L., Xu, F., Xiao, J., Jiao, W., Qi, H., Shen, C., and Shen, A. (2017). Characterization of plasma proteins in children of different *Mycobacterium tuberculosis* infection status using label-free quantitative proteomics. *Oncotarget* 8, 103290–103301.
- Lim, J.M., Heo, N.S., Oh, S.Y., Ryu, M.Y., Seo, J.H., Park, T.J., Huh, Y.S., and Park, J.P. (2018). Selection of affinity peptides for interference-free detection of cholera toxin. *Biosens. Bioelectron.* 99, 289–295.
- Lim, Y.W., Evangelista, J.S., Schmieder, R., Bailey, B., Haynes, M., Furlan, M., Maughan, H., Edwards, R., Rohwer, F., and Conrad, D. (2014). Clinical insights from metagenomic analysis of sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 52, 425–437.
- Lin, Y., Ying, Y.-L., Shi, X., Liu, S.-C., and Long, Y.-T. (2017). Direct sensing of cancer biomarkers in clinical samples with a designed nanopore. *Chem. Commun. (Camb.)* 53, 11564–11567.
- Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S.E., Daum, R.S., Fridkin, S.K., Gorwitz, R.J., Kaplan, S.L., Karchmer, A.W., Levine, D.P., Murray, B.E., et al. (2011). Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin. Infect. Dis.* 52, e18-55.
- Loo, J.F.C., Kwok, H.C., Leung, C.C.H., Wu, S.Y., Law, I.L.G., Cheung, Y.K., Cheung, Y.Y., Chin, M.L., Kwan, P., Hui, M., et al. (2017). Sample-to-answer on molecular diagnosis of bacterial infection using integrated lab-on-a-disc. *Biosens. Bioelectron.* 93, 212–219.
- Lu, T.K., and Koeris, M.S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 524–531.
- March, G.A., García-Loygorri, M.C., Simarro, M., Gutiérrez, M.P., Orduña, A., and Bratos, M.A. (2015). A new approach to determine the susceptibility of bacteria to antibiotics directly from positive blood culture bottles in two hours. *J. Microbiol. Methods* 109, 49–55.
- Marschal, M., Bachmaier, J., Autenrieth, I., Oberhettinger, P., Willmann, M., and Peter, S. (2017). Evaluation of the Accelerate Pheno System for Fast Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing from Positive Blood Cultures in Bloodstream Infections Caused by Gram-Negative Pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2116–2126.
- Messacar, K., Breazeale, G., Robinson, C.C., and Dominguez, S.R. (2016). Potential clinical impact of the film array meningitis encephalitis panel in children with suspected central nervous system infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 86, 118–120.
- Montel, F. (2018). [DNA sequencing by nanopores: achievements and prospects]. *Med Sci (Paris)* 34, 161–165.
- Morisset, D., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K., and Žel, J. (2013). Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS ONE* 8, e62583.
- Musteata, F.M., de Lannoy, I., Gien, B., and Pawliszyn, J. (2008). Blood sampling without blood draws for in vivo pharmacokinetic studies in rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 907–912.
- Nasseri, B., Soleimani, N., Rabiee, N., Kalbasi, A., Karimi, M., and Hamblin, M.R. (2018). Point-of-care microfluidic devices for pathogen detection. *Biosens. Bioelectron.* 117, 112–128.
- Niyomdech, S., Limbut, W., Numnuam, A., Kanatharana, P., Charlermroj, R., Karoonuthaisiri, N., and Thavarungkul, P. (2018). Phage-based capacitive biosensor for *Salmonella* detection. *Talanta* 188, 658–664.
- Oberbach, A., Schlichting, N., Feder, S., Lehmann, S., Kullnick, Y., Buschmann, T., Blumert, C., Horn, F., Neuhaus, J., Neujahr, R., et al. (2017). New insights into valve-related intramural and intracellular bacterial diversity in infective endocarditis. *PLoS ONE* 12, e0175569.
- Pancholi, P., Carroll, K.C., Buchan, B.W., Chan, R.C., Dhiman, N., Ford, B., Granato, P.A., Harrington, A.T., Hernandez, D.R., Humphries, R.M., et al. (2018). Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial

Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 56.

Pantel, A., Monier, J., and Lavigne, J.-P. (2018). Performance of the Accelerate PhenoTM system for identification and antimicrobial susceptibility testing of a panel of multidrug-resistant Gram-negative bacilli directly from positive blood cultures. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1546–1552.

Park, T.S., Li, W., McCracken, K.E., and Yoon, J.-Y. (2013). Smartphone quantifies Salmonella from paper microfluidics. *Lab Chip* 13, 4832–4840.

Párraga-Niño, N., Colomé-Calls, N., Canals, F., Querol, E., and Ferrer-Navarro, M. (2012). A comprehensive proteome of Mycoplasma genitalium. *J. Proteome Res.* 11, 3305–3316.

Patel, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin. Infect. Dis.* 57, 564–572.

Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J.-C., Le Corre, D., Mazutis, L., Salem, C.B., Millot, F., El Harrak, A., Hutchison, J.B., Larson, J.W., et al. (2011). Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip* 11, 2156–2166.

Pfleiderer, A., Lagier, J.-C., Armougom, F., Robert, C., Vialettes, B., and Raoult, D. (2013). Culturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1471–1481.

Phaneuf, C.R., Mangadu, B., Piccini, M.E., Singh, A.K., and Koh, C.-Y. (2016). Rapid, Portable, Multiplexed Detection of Bacterial Pathogens Directly from Clinical Sample Matrices. *Biosensors (Basel)* 6.

Poritz, M.A., Blaschke, A.J., Byington, C.L., Meyers, L., Nilsson, K., Jones, D.E., Thatcher, S.A., Robbins, T., Lingenfelter, B., Amiot, E., et al. (2011). FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection. *PLoS ONE* 6, e26047.

Ramanathan, B., Jindal, H.M., Le, C.F., Gudimella, R., Anwar, A., Razali, R., Poole-Johnson, J., Manikam, R., and Sekaran, S.D. (2017). Next generation sequencing reveals the antibiotic resistant variants in the genome of Pseudomonas aeruginosa. *PLoS ONE* 12, e0182524.

Reddy, P.J., Ray, S., Sathe, G.J., Gajbhiye, A., Prasad, T.S.K., Rapole, S., Panda, D., and Srivastava, S. (2015). A comprehensive proteomic

analysis of totarol induced alterations in Bacillus subtilis by multipronged quantitative proteomics. *J. Proteomics* 114, 247–262.

Rees, C.A., Burklund, A., Stefanuto, P.-H., Schwartzman, J.D., and Hill, J.E. (2018). Comprehensive volatile metabolic fingerprinting of bacterial and fungal pathogen groups. *J. Breath Res.* 12, 026001.

Roberts, C.H., Last, A., Molina-Gonzalez, S., Cassama, E., Butcher, R., Nabicassa, M., McCarthy, E., Burr, S.E., Mabey, D.C., Bailey, R.L., et al. (2013). Development and evaluation of a next-generation digital PCR diagnostic assay for ocular Chlamydia trachomatis infections. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2195–2203.

Sanderson, N.D., Street, T.L., Foster, D., Swann, J., Atkins, B.L., Brent, A.J., McNally, M.A., Oakley, S., Taylor, A., Peto, T.E.A., et al. (2017). Real-time analysis of nanopore-based metagenomic sequencing from orthopaedic device infection. *BioRxiv* 220616.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467–470.

Schmidt, K., Mwaigwisya, S., Crossman, L.C., Doumith, M., Munroe, D., Pires, C., Khan, A.M., Woodford, N., Saunders, N.J., Wain, J., et al. (2017). Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 104–114.

Schofield, D.A., Sharp, N.J., and Westwater, C. (2012). Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens. *Bacteriophage* 2, 105–283.

Sethi, S., Nanda, R., and Chakraborty, T. (2013). Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 462–475.

Sun, L., Talarico, S., Yao, L., He, L., Self, S., You, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Guo, Y., Liu, G., et al. (2018). Droplet Digital PCR-Based Detection of Clarithromycin Resistance in Helicobacter pylori Isolates Reveals Frequent Heteroresistance. *J. Clin. Microbiol.* 56.

Šuster, K., Podgornik, A., and Cör, A. (2017). Quick bacteriophage-mediated bioluminescence assay for detecting Staphylococcus spp. in sonicate fluid of orthopaedic artificial joints. *New Microbiol.* 40, 190–196.

- Talarico, S., Safaeian, M., Gonzalez, P., Hildesheim, A., Herrero, R., Porras, C., Cortes, B., Larson, A., Fang, F.C., and Salama, N.R. (2016). Quantitative Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* from Stool using Droplet Digital PCR Reveals Variation in Bacterial Loads that Correlates with *cagA* Virulence Gene Carriage. *Helicobacter* 21, 325–333.
- Talarico, S., Korson, A.S., Leverich, C.K., Park, S., Jalikis, F.G., Upton, M.P., Broussard, E., and Salama, N.R. (2018). High prevalence of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance mutations among Seattle patients measured by droplet digital PCR. *Helicobacter* 23, e12472.
- Tan, X.T., Amran, F.B., Thayan, R., Ahmad, N., Jaafar, R., Haron, R., Abdullah, R., Bin Shamsuddin, S.R., Md Riffin, N.S.B., and Abdul-Rahman, P.S. (2017). Potential serum biomarkers associated with mild and severe leptospirosis infection: A cohort study in the Malaysian population. *Electrophoresis* 38, 2141–2149.
- Tang, P., Croxen, M.A., Hasan, M.R., Hsiao, W.W.L., and Hoang, L.M. (2017). Infection control in the new age of genomic epidemiology. *Am. J. Infect. Control* 45, 170–179.
- Theodoridis, G., Koster, E.H., and de Jong, G.J. (2000). Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 745, 49–82.
- Toulmé, J.-J., Da Rocha, S., Dausse, E., Azéma, L., Lebars, I., and Moreau, S. (2007). Les aptamères : du concept à l'outil. *Médecine Nucléaire* 31, 478–484.
- Tunnsjø, H.S., Kalyanasundaram, S., Charnock, C., Leegaard, T.M., and Moen, A.E.F. (2018). Challenges in the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus argenteus* by routine diagnostics. *APMIS* 126, 533–537.
- Ulrich, S. (2000). Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr. A* 902, 167–194.
- Vlek, A.L.M., Bonten, M.J.M., and Boel, C.H.E. (2012). Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS ONE* 7, e32589.
- Vrioni, G., Tsiamis, C., Oikonomidis, G., Theodoridou, K., Kapsimali, V., and Tsakris, A. (2018). MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann. Transl. Med.* 6, 240.
- Welti, M., Jatón, K., Altwegg, M., Sahli, R., Wenger, A., and Bille, J. (2003). Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45, 85–95.
- Whitesides, G.M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368–373.
- Yang, J., Han, X., Liu, A., Bai, X., Xu, C., Bao, F., Feng, S., Tao, L., Ma, M., and Peng, Y. (2017). Use of Digital Droplet PCR to Detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in Whole Blood-Derived DNA Samples from Patients with Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7.
- Zelenin, S., Hansson, J., Ardabili, S., Ramachandraiah, H., Brismar, H., and Russom, A. (2015). Microfluidic-based isolation of bacteria from whole blood for sepsis diagnostics. *Biotechnol. Lett.* 37, 825–830.

CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE SBSE POUR L'ANALYSE DE METABOLITES BACTERIENS

Actuellement, les approches classiquement utilisées pour le diagnostic microbiologique ne sont pas adaptées aux plaies de pied diabétique. En effet, les cultures bactériennes peuvent prendre plusieurs jours à plusieurs semaines et ne permettent pas de détecter tous les micro-organismes. Les analyses de métagénomique, bien que très puissantes, ne peuvent pas être utilisées en routine. De plus, elles ne permettent pas de prédire l'évolution de la plaie. En effet, deux plaies présentant une même écologie peuvent avoir des évolutions différentes. Il s'avère donc nécessaire de développer de nouvelles approches et de nouveaux outils, qui permettent à la fois de réaliser un diagnostic rapide, mais également de suivre l'évolution de ces plaies.

Ainsi, l'étude des composés volatils semble une démarche innovante pour la détection de bactéries. En effet, il a été montré l'importance de ces composés dans la communication entre les micro-organismes (Audrain et al., 2015; Farag et al., 2013; Jones and Elliot, 2017), avec l'induction d'effets biologiques tels que la modulation de l'expression génétique de gènes de virulences impliqués dans la mobilité bactérienne et dans la résistance aux antibiotiques (Kim et al., 2013). De plus, des méthodes non invasives ciblant ce type de composés ont déjà été utilisées en recherche, notamment pour la détection de cellules cancéreuses (Filipiak et al., 2008, 2010) ou de médicaments ou drogues dans des fluides biologiques (Kataoka, 2015; Snow, 2000). De nombreuses études soulignent également la pertinence de l'identification de composés volatils émis par les bactéries pour le diagnostic (Bos et al., 2013; Sethi et al., 2013), bien que rien n'ait encore été proposé pour l'étude des volatils bactériens dans des plaies chroniques.

Toutefois, le fait que les bactéries ne produisent que de faibles quantités de certaines de ces molécules, constitue un facteur limitant dans cette étude. Par conséquent, il est nécessaire de passer par une étape de concentration permettant une récupération maximale de ces composés. Bien qu'elle n'ait encore jamais été appliquée à une matrice bactérienne, la technique actuelle la plus efficace est la SBSE. Cette concentration sur des barreaux peut impliquer deux types de phases absorbantes : le PDMS (polydiméthylsiloxane) pour l'extraction de composés apolaires et l'EGS (éthylène-glycol silicone) pour les composés polaires.

La première partie de ce chapitre présentera le principe et les applications connues de la technique SBSE.

Dans la seconde partie, nous avons tout d'abord souhaité évaluer la possibilité d'extraire des métabolites bactériens volatils par SBSE et HSSE en employant les deux types de barreaux pour montrer l'intérêt de chacun pour cette application. Pour le développement de cette méthode, nous avons utilisé la souche de référence *S. aureus* ATCC 25923. Ensuite, une méthode optimale d'analyse par GC-MS a été déterminée en évaluant la phase de croissance bactérienne la plus adaptée à l'extraction de ces métabolites ainsi que la possibilité d'utiliser séparément ou simultanément les deux types de barreaux.

4.1 Principe et applications de la SBSE

4.1.1 Principe

L'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE) a été développée en 1999 par Baltussen *et al.* (Baltussen et al., 1999) afin de permettre le traitement d'échantillons de toutes natures (liquides, gazeux ou solides). Inspirée de la SPME (Solid Phase Micro-Extraction), la SBSE est une technique qui repose également sur le partage des analytes entre la matrice de l'échantillon et une phase polymérique spécifique supportée par un barreau aimanté (commercialisés par Gerstel sous le nom de « Twister® »). L'évolution vers la SBSE a été effectuée dans le but d'améliorer encore l'extraction de composés volatils. En effet, une des limites de la SPME est la faible quantité de polymère sur l'aiguille, ce qui restreint la quantité d'analytes extraits. Pour la SPME, le volume moyen de PDMS est inférieur à 0,5 μL alors qu'il est de 55 à 219 μL selon les barreaux en SBSE (Baltussen et al., 1999).

Pour effectuer une analyse par SBSE, un barreau aimanté est plongé dans la solution à analyser et agité pendant un temps défini sur une plaque d'agitation (Figure 8). Les molécules volatiles ou semi-volatiles présentes dans cette matrice vont alors s'adsorber sur les barreaux avec une affinité proportionnelle au coefficient de partage octanol/eau de la molécule. Après l'extraction, le barreau est récupéré, rincé avec de l'eau distillée afin d'éliminer les sels, les sucres, les protéines ou tout autre composant de l'échantillon pouvant interférer lors de l'analyse des composés organiques volatils (COVs). Les barreaux, placés dans un tube de désorption, sont ensuite introduit dans le TDU (Thermal Desorption Unit, Gerstel). Les composés retenus sur les barreaux seront alors désorbés thermiquement, cryofocalisés sur le CIS (Cooled Injection System, Gerstel) avant d'être transférés dans la colonne de GC pour l'analyse.

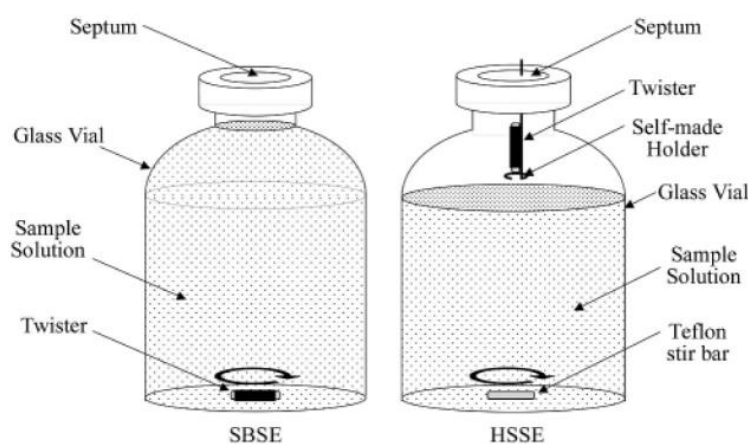


Figure 8 : Principe de l'extraction par SBSE ou HSSE (Ochiai et al., 2001).

Au départ développée et adaptée pour l'analyse d'échantillons liquides de par sa forme, cette technique a toutefois été testée avec succès pour des analyses de la phase gazeuse d'une matrice (Cavalli et al., 2003; Demyttenaere et al., 2003; Tienpont et al., 2000). Elle est alors nommée HSSE. L'extraction HSSE est effectuée en plaçant le barreau dans l'espace de tête du flacon (Figure 8). L'échantillon est habituellement agité afin de favoriser la présence de composés volatils dans la phase gazeuse.

4.1.2 Types de barreaux

Le barreau en verre (Figure 9) est enrobé d'un polymère de PDMS ou plus récemment, d'un copolymère PDMS/éthylène-glycol silicone (EGS). Tous deux permettent de retenir des composés apolaires. Différentes tailles existent selon les volumes d'extraction (par exemple 10 mm pour des volumes inférieurs à 50 mL et 40 mm pour des volumes jusqu'à 250 mL).

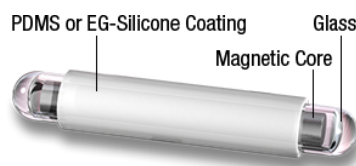


Figure 9 : Twister® (Gerstel).

En 2011, les barreaux EGS ont été développés par Gerstel (Nie and Kleine-Benne, 2011) pour étendre le spectre de polarité des composés retenus. En effet, ce barreau, même s'il a la capacité de capter les composés apolaires, a une meilleure affinité pour les composés polaires, notamment ceux qui peuvent former les liaisons hydrogènes (Elpa et al., 2014).

4.1.3 Applications

La SBSE est une technique utilisée dans de nombreux domaines aussi variés que l'environnement avec, comme application principale, la détection d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou de pesticides présents dans les eaux ou les sols (Kolahgar et al., 2002), mais aussi dans l'alimentaire pour la détection de composés volatils ou de pesticides (Bicchi et al., 2005; Sewenig et al., 2005). Cette méthode est également employée en pharmaceutique ou en biomédical pour, entre autre, la détection d'hormones ou de médicaments (Huang et al.,

2008). Concernant la détection de micro-organismes, la SBSE a déjà été utilisée pour l'identification de métabolites volatils produits par des levures et des champignons (Sadoudi et al., 2012; Wihlborg et al., 2008). Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a fait état d'une utilisation de la SBSE pour l'identification de composés volatils bactériens.

**Publication n°2 : Multiple stir bar sorptive extraction
combined with gas chromatography-mass
spectrometry analysis for a tentative identification of
bacterial volatile and/or semi-volatile metabolites**

Article publié dans Talanta



Multiple stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a tentative identification of bacterial volatile and/or semi-volatile metabolites

Kevin Berrou^a, Catherine Dunyach-Remy^{b,c}, Jean-Philippe Lavigne^{b,c}, Benoit Roig^a, Axelle Cadere^{a,*}

^a Univ. Nîmes, EA7352 CHROME, Rue du Dr G. Salan, 30021 Nîmes Cedex 1, France

^b Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047, Université Montpellier, UFR de Médecine, 30908 Nîmes, France

^c Department of Microbiology, CHU Nîmes, Université Montpellier, 30029 Nîmes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Stir bar sorptive extraction
Bacterial volatile compounds
Gas chromatography-mass spectrometry
Metabolite profile
Staphylococcus aureus

ABSTRACT

We propose a new approach combining the principles and advantages of stir bar sorptive extraction (SBSE) and headspace sorptive extraction (HSSE). Stir bars have so far never been used for the extraction of volatile/semi-volatile bacterial compounds. The effectiveness of two stir bars with polydimethylsiloxane (PDMS) or ethylene glycol/silicone (EGS) as sorbent was tested by performing sample extraction directly in gas chromatography (GC) vials containing bacterial cultures. Several combinations of desorption and extraction were tested at different growth times. When the extraction was carried out simultaneously with the EGS stir bar in headspace and the PDMS in the bacterial culture, the number of extracted compounds was significantly increased. Using both twistors increased the polarity range of the compounds found, and extraction at the end of the exponential phase of growth generated the best yields. This method was successfully applied to determine the production of 17 molecules by a strain of *Staphylococcus aureus*. In conclusion, this study paves the way for a new method for determining the volatile metabolite profile of bacteria, which can provide a promising innovative alternative in the identification of biomarkers.

1. Introduction

Analysis of volatile compounds is essential for environmental control (detection of micropollutants such as pesticides or endocrine disruptors) [1] and for the food industry (detection of aroma compounds, monitoring of food additives) [2,3].

More recently, the development of “omics” disciplines has paved the way for the use of metabolite biomarkers in diagnostics [4–7]. The principle is based on the observation that several diseases impact the metabolic profile of specific cells. The resulting metabolites can be used to track disease evolution [8].

Regardless of the field of application, the analysis of volatile compounds requires substantial consideration of the concentration and extraction of the compounds before their analysis. By using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), samples can be analysed from different matrices (gaseous, liquid or solid). For liquid matrices, liquid-liquid extraction has long been the method of choice. This extraction is based on the partition coefficient between two

solvents, one of which is non-polar [9]. Due to its potential toxic effect, the use of such solvents has been progressively abandoned and alternative “solvent-free” extraction techniques have been developed.

Among the alternative techniques, Solid Phase Microextraction (SPME) consists of a small amount of sorptive phase coated on a solid support (fibre) exposed to a sample, either in headspace [10] or immersed in a liquid [11]. After a determined time, allowing the adsorption of compounds, the fibre can be inserted directly into the chromatograph for thermal desorption to analyse volatile compounds [12] or, for non-volatile compounds, desorbed by an organic liquid [13].

In 1999, Baltussen [14] introduced a new sorption technique called Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE). Based on the same principle of SPME (partition of analytes between an aqueous matrix and a polymeric phase), SBSE increased the contact surface and improved the enrichment factor (defined as the analyte recovery in the extraction phase) [14].

SPME and SBSE proved to be more specific for volatile compounds

* Corresponding author.

E-mail address: axelle.cadere@unimes.fr (A. Cadere).

by placing the sorptive phase (fibre or bar) in the headspace instead of immersing it in the liquid. A previous study showed that the stir bar (HeadSpace Sorptive Extraction (HSSE)) [15] exhibited a better concentration capacity than fibre [16].

Currently, two types of coating phases are mainly used: polydimethylsiloxane (PDMS) to retain non-polar compounds; and ethylene glycol/silicone (EGS) to absorb polar compounds, especially those forming hydrogen bonds [17]. SBSE or HSSE methods have been deployed in many fields and on a large variety of matrices [18–23].

With the exception of Ochiai et al. (2013), who described a multi SBSE for odour compounds analysis, few studies have assessed the specificity of the two kinds of stir bars for larger screening.

Furthermore, bacterial strains have a distinct metabolism, leading to a production of specific volatile compounds [24–26]. The detection of these molecules represents a high interest in clinical diagnostics and in the monitoring of infections, but only a limited amount of research is available at this moment [27] and there is a need for new and innovative detection methods.

In this paper, we propose for the first time to assess an approach coupling the two bars (in SBSE or HSSE format) for the analysis of volatile or semi-volatile metabolites produced by bacteria.

In this first approach, the method was developed from a reference *Staphylococcus aureus* strain. Interestingly, *S. aureus* has already been successfully detected in cases of cystic fibrosis or pulmonary infections by the volatile biomarkers it produces [28,29]. Moreover, the volatile profile of this strain has been described in the literature [27]. Thus, it is a bacterial model particularly adapted to the development of new methods to detect volatile or semi-volatile metabolites.

2. Material and methods

2.1. Materials

SBSE and HSSE extractions were performed with 10 mm twister® magnetic stir bars coated with PDMS or EGS (both 0.5 mm film thickness). Stir bars were obtained from Gerstel and were conditioned prior to use according to the manufacturer's instructions. In order to control the identification of some compounds, standards were used: ethanol (99.8%) and acetic acid (99.8%) were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Acetaldehyde (99%), propan-2-one (99.8%), benzaldehyde (99%) and 3-methylbutanoic acid (99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). A standard mixture containing linear alkanes from C7 to C40 from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA) was used to evaluate the retention index (RI).

2.2. Culture conditions

S. aureus ATCC 25923 [30] was the reference strain used in this study. The strain was maintained as frozen stock on Microbank™ bead (Pro-Lab Diagnostic, Richmond Hill, Canada) at -80°C , and cultivated overnight onto Luria Bertani (LB) medium (tryptone (Fluka, Saint-Louis, USA), yeast extract (Amresco, Solon, USA) and sodium salt (Panreac, Barcelona, Spain)) at 37°C with shaking at 210 rpm. From this culture, sterile 20 mL glass vials sealed with PTFE/Silicone screw caps (Agilent, Santa-Clara, USA) containing a magnetic stirrer and 10 mL of LB medium were inoculated at 0.1 uDO mL^{-1} and placed at 37°C under shaking at 600 rpm.

Growth was monitored by spectrophotometry at 600 nm every hour for 24 h. Each experiment was performed in triplicate.

2.3. SBSE/HSSE extraction procedure

Several extraction conditions were tested to determine the contribution of each stir bar in order to determine the performance of a simultaneous extraction (PDMS and EGS in the same vial) compared to a series of separate extractions (one twister per vial). In all cases, PDMS

and EGS twisters were inserted into liquid cultures of LB medium and in headspace, respectively, at the beginning of the experiment ($t = 0 \text{ h}$), and remained for 3, 6 or 9 h of culture at 37°C and shaking at 600 rpm. When EGS twister was used alone, an inert and sterile magnetic bar was added into the culture to facilitate the volatilisation of organic compounds and shake the culture.

After exposure, the stir bars were removed from the bacterial culture. The PDMS twister was rinsed with ultrapure water and blotted with a lint-free tissue before being placed in a glass thermal desorption tube. The EGS twister was directly placed into a glass thermal desorption tube.

To eliminate the compounds present in the media, the same experiments were performed on LB medium alone in three replicates in the same conditions as the sample. These conditions are defined as control.

2.4. GC-MS analysis

The analytical system was composed of an Agilent 7890 B gas chromatograph coupled to an Agilent 5977 A mass spectrometer with an MPS autosampler, a thermal desorption unit (TDU) and a cooled injection system (CIS) (Gerstel). The data acquisition software MSD Chemstation F.01.00 (Agilent) was used to program the GC-MS. The gas chromatograph was fitted with a VF-WAXms fused silica capillary column ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$, Agilent) and was used with helium as carrier gas at 0.8 mL min^{-1} . The tube was thermally desorbed in the TDU at 220°C (suitable temperature for both bars, recommended by the supplier) for 5 min.

Two desorption conditions were tested: (i) a separate desorption, with one stir bar per tube, (ii) or a simultaneous desorption, with PDMS and EGS in the same tube. After desorption, volatile or semi-volatile compounds were focalised on the CIS at -10°C for 2 min, ramped to 250°C at a heating rate of $12^{\circ}\text{C per second}$, and finally held for 2.5 min in splitless mode to ensure complete desorption of analytes. The column temperature was initially kept at 40°C for 7 min and then increased from 40° to 240°C at $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$, the temperature was maintained for 3 min. Then the sample was introduced into the ion source of the Agilent 5977 A mass spectrometer. The transfer line temperature was set at 250°C and ion source temperature at 230°C . Ions were generated by a 70 eV electron beam. Masses were acquired from m/z 33–500 amu.

2.5. Data processing and statistical analysis

All peaks were integrated using MassHunter Qualitative Analysis software B.06.00 (Agilent Technologies). This software deconvolutes the chromatograms, separating the co-eluted compounds. Compounds were then identified by their mass spectra by using the National Institute of Standard and Technologies (NIST) and the Wiley7 reference libraries.

Compounds identified present in at least two out of three replicates were conserved for the analysis. Compounds found in the controls were not considered.

For each compound available in the databases, the retention index was determined using the one previously obtained on a polar column, as described by Van Den Dool and Kratz [31]. A maximum relative deviation of 2.5% from literature values was accepted to identify bacterial compounds (Supplement material, Table S1).

3. Results and discussion

3.1. Assessment of SBSE for the concentration and extraction of volatile and semi-volatile bacterial metabolites

The first objective was to determine the efficiency of the two types of stir bars (PDMS and EGS) for a tentative identification of *S. aureus* metabolites. Each bar was exposed individually to a culture of *S. aureus*

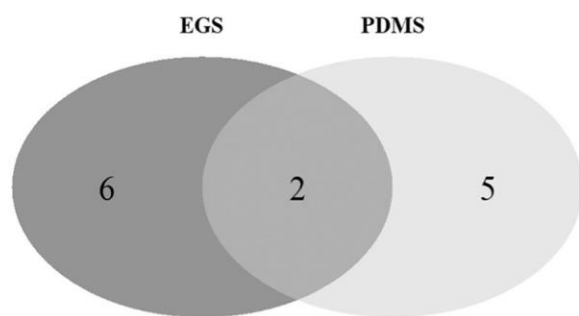


Fig. 1. Distribution of the number of volatile and semi-volatile compounds produced by *S. aureus* and extracted with each stir bar. Venn diagram illustrating the degree of overlap of extracted and identified volatile and semi-volatile compounds between the two twisters. The central section in grey represents the compounds that are found by both stir bars. Specific compounds extracted by EGS twister are in dark grey while those extracted with PDMS are in light grey.

for 6 h. Then, the bars were desorbed separately in the TDU and the identified compounds were compared using a Venn diagram (Fig. 1). A total of 13 compounds were detected (Table 1): eight were extracted with the EGS twister and seven with the PDMS twister. Only two compounds were retained by both EGS and PDMS stir bars.

These results are in agreement with the literature. Baltussen et al. explained that the octanol-water partition coefficient (K_{ow}) and the amount of sorptive phase coated on the bar are the main parameters influencing the extraction [14]. The PDMS phase has also been described to preferentially adsorb compounds with K_{ow} between 2 and 3 [14], while the EGS phase was developed for compounds with moderate polar profiles. Due to its silicone-based nature, the EGS twister can retain analytes with a wider range of polarity and with a significant increase in the recovery of molecules with K_{ow} smaller than 2 while maintaining satisfactory capabilities for extraction of apolar/slightly polar compounds [32].

Interestingly, two compounds were extracted by the two phases: acetic acid and 4-methylquinoline, although the extraction yields between methods showed a better affinity for one of the two phases: 80% of acetic acid ($K_{ow} = -0.17$) was extracted by the EGS twister and 87% of 4-methylquinoline ($K_{ow} = 2.61$) by the PDMS twister.

The results showed that the SBSE method allowed extraction of a large range of bacterial metabolites. The two kinds of stir bars were complementary; EGS extracting the polar compounds and PDMS the apolar ones.

3.2. Optimization of extraction method

Bacterial growth comprises three phases: a lag phase, an exponential phase and a stationary phase (Fig. 2). Three extraction times

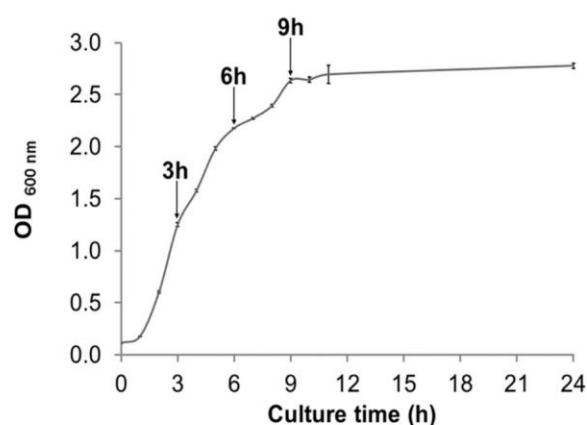


Fig. 2. Selected extraction times of *S. aureus*. Growth curve of *S. aureus* in GC vials was followed by optical density measurement at 600 nm. The data shown average obtained from three independent experiments with error bars representing standard deviation.

corresponding (i) to the middle of exponential phase (3 h), (ii) to the end of exponential phase and the beginning of the stationary phase (6 h) and (iii) to the stationary phase (9 h) were selected to determine the best conditions between the exposure time and the number of extracted metabolites.

The experiment was carried out in triplicate for each point with simultaneous extraction and desorption (Chromatograms available in Supplement material, Fig. S1). Only the compounds found in at least two of the three replicates were considered (Fig. 3).

After 3 h of growth, 16 volatile and/or semi-volatile compounds found in *S. aureus* cultures could be identified, while 22 and 23 compounds were found after 6 and 9 h, respectively. The difference between the number of compounds found at 3 h and 6 h of extraction was statistically significant ($p = 0.039$). No significant difference was observed between 6 h and 9 h ($p = 0.882$).

Among the compounds extracted after 6 h, two were not detected after 9 h, probably due to either a total or partial consumption during growth, or a modification of their production during the bacterial growth (with a decrease during the stationary phase) as previously shown for formic acid [33]. Similarly, of the 23 compounds extracted after 9 h, three were not detected after 6 h. However, two of them were identified in one of the three replicates and were thus not considered. One explanation could be the low production of these metabolites, making it difficult to detect the signal against the background noise.

Therefore, the final protocol requires some handling (positioning and removal of the stir bars in the vial, followed by their rinsing, drying and positioning in the desorption tube) for a total extraction time of 6 h. Compared to other more common extraction techniques focussed on a specific bacterial growth time, the proposed protocol is longer but lead

Table 1

Identification and main characteristics of the volatile and semi-volatile compounds extracted by each twister. K_{ow} values were obtained by the software EPI SUITE. Compounds recovered on the EGS twister have low range K_{ow} from -4.15 to 2.61 while those extracted with the PDMS have higher range K_{ow} from 0.4 to 4.09 .

Compound	Formula	Retention time (min)	Molecular weight (g.mol ⁻¹)	Log K_{ow}	EGS peak area	PDMS peak area
Acetaldehyde	C ₂ H ₄ O	5.932	44.0	-0.34	5,087,208	/
Propan-2-one	C ₃ H ₆ O	6.886	58.0	-0.24	243,238	/
Ethanol	C ₂ H ₆ O	9.031	46.0	-0.31	647,891	/
1-methyl-1-propylhydrazine	C ₄ H ₁₂ N ₂	12.097	88.1	-0.21	326,360	/
3-methylbutan-1-ol	C ₅ H ₁₂ O	15.331	88.1	1.16	/	499,654
Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	20.237	60.0	-0.17	3,249,288	822,073
Formic acid	C ₂ H ₄ O	21.412	46.0	-0.54	3,694,860	/
Undecan-2-one	C ₁₁ H ₂₂ O	22.585	170.2	4.09	/	117,805
1,3,5,7-Tetraazatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decane	C ₆ H ₁₂ N ₄	27.478	140.1	-4.15	1,483,838	/
4-methylquinoline	C ₁₀ H ₉ N	30.033	143.1	2.61	138,612	901,885
3-phenylpyridine	C ₁₁ H ₉ N	31.555	155.1	2.57	/	129,777
Isoquinoline-1-carbonitrile	C ₁₀ H ₆ N ₂	32.811	154.1	1.69	/	1,363,594
Quinoline-4-carbaldehyde	C ₁₀ H ₇ NO	33.968	157.1	0.4	/	2,442,258

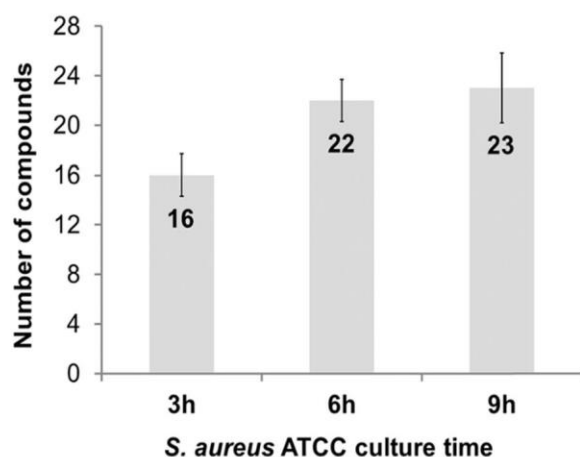


Fig. 3. Number of *S. aureus* metabolites identified by GC-MS after simultaneous PDMS/EGS extraction at different points during bacterial growth. Errors bars indicate the standard deviation of the identification of the compounds in the three independent replicates.

to an overall metabolic profile over the full growth period of the bacteria. Such process avoids small biological variations and significantly increases the number of compounds detected.

3.3. Impact of simultaneous or separated extraction and desorption

Finally, we assessed the impact of separate (one bar per vial) versus simultaneous (two bars in the same vial, with the EGS in headspace and the PDMS in liquid culture for 6 h) extraction. The results are presented in Fig. 4.

In separate extraction (test 1 A), 13 bacterial volatile and/or semi-volatile compounds were identified by GC-MS: six extracted from the EGS twister, four from the PDMS and three from the two bars.

In simultaneous extraction (test 1B), 20 compounds were extracted (10 from the EGS, six from the PDMS and four from the two bars). Simultaneous extraction allowed extraction and tentative identification of significantly more compounds than separate extraction ($p = 0.007$) (Fig. 4A and B). This difference could be explained by the fact that the PDMS twister, at the bottom of the vial, captures the heavier and more apolar molecules, thus increasing the available surface of coating phase of the EGS stir bar thus promoting the adhesion of a large number of volatile and light compounds (Table 2).

The simultaneous extraction and desorption was tested (test 2, Fig. 4). Simultaneous desorption (220 °C) detected 22 molecules, but compared to test 1B, no statistical significant difference ($p = 0.768$) was observed (Chromatograms available in Supplement material, Fig. S2).

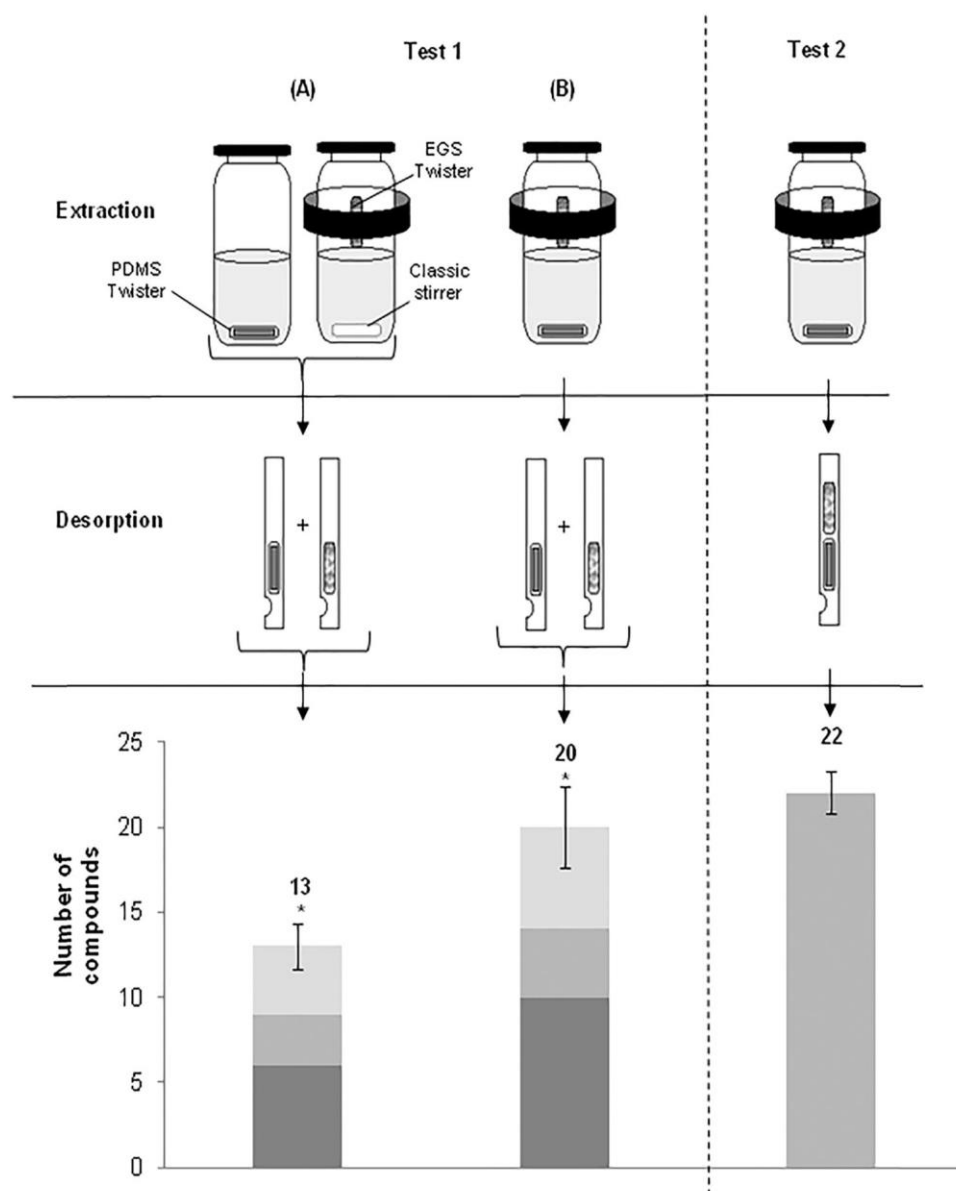


Fig. 4. Schema and results of separate or simultaneous extraction and desorption. The histograms are stacked with the compounds found with EGS twister in dark grey, while those found with PDMS twister are in light grey; in grey, molecules extracted with these two stir bars are visible. The significant difference between tests is indicated by a star. Errors bars indicate the standard deviation of the identification of the compounds in the three independent replicates. “Test 1” compares the efficiency of separate extraction (two vials/two bars - A) and a simultaneous one (one vial/two bars - B) with a separate desorption. “Test2” implements a simultaneous extraction (one vial/two bars) followed by a simultaneous desorption.

Table 2
Identified compounds of each extracted and desorbed condition.

Compound	Retention Time (min)	Molecular weight (g.mol ⁻¹)	Henry LC (Pa.m ³ .mol ⁻¹)	Test 1 A	Test 1 B	Test 2
Acetaldehyde ²	5.930	44.0	6.76	EGS	EGS	Both
2-methylpropanal ¹	6.814	72.1	1.82×10^1			
Propan-2-one ¹	6.876	58.0	3.55	EGS	EGS	Both
Methyl acetate ¹	6.998	74.0	1.17×10^1		EGS	Both
Prop-2-enal	7.250	56.0	1.24×10^1		EGS	
Ethanol ¹	9.044	46.0	5.07×10^{-1}	EGS	EGS	Both
(methylsulfanyl)methane	10.806	94.0	1.23×10^2		PDMS	
1-methyl-1-propylhydrazine ¹	12.094	88.1	1.24×10^{-2}	EGS	EGS	Both
4-methylheptan-2-one ¹	15.320	128.2	2.07×10^1		PDMS	Both
3-methylbutan-1-ol	15.331	88.1	1.43	PDMS		
(methyltrisulfanyl)methane ¹	18.775	126.0	1.89×10^2		EGS	Both
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine ¹	20.123	136.1	5.28×10^{-1}			Both
Acetic acid ¹	20.306	60.0	1.45×10^{-2}	Both	Both	Both
Formic acid ¹	21.527	46.0	1.69×10^{-2}	EGS	Both	Both
Benzaldehyde ²	21.697	106.0	2.71		EGS	Both
Undecan-2-one	22.585	170.2	6.44	PDMS		
2-hydroxybenzaldehyde ¹	23.456	122.0	5.68×10^{-1}			Both
3-methylbutanoic acid ¹	23.719	102.1	8.44×10^{-2}		EGS	Both
Acetamide ¹	25.051	59.0	1.13×10^{-3}			Both
1,3,5,7-Tetraazatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decane ¹	27.463	140.1	1.66×10^{-4}	EGS	EGS	Both
4-methylquinazoline	29.714	144.1	3.18×10^{-2}		PDMS	
4-methylquinoline ²	30.039	143.1	1.67×10^{-1}	Both	Both	Both
Decanoic acid ²	31.546	172.1	1.36×10^{-1}			Both
3-phenylpyridine ¹	31.565	155.1	4.83×10^{-2}	PDMS	PDMS	Both
Isoquinoline-1-carbonitrile ¹	32.788	154.1	6.74×10^{-4}	Both	Both	Both
Quinoline-4-carbaldehyde ²	33.961	157.1	8.21×10^{-4}	PDMS	PDMS	Both
1H-indole ¹	33.974	117.0	5.35×10^{-2}		PDMS	Both

The tests shown here correspond to those described in Fig. 3 with the different extraction and desorption conditions. ¹produced compounds and ²consumed compounds.

3.4. Analysis of the volatiles and semi-volatiles identified

Table 2 shows all the compounds detected in the different tests. A total of 22 volatiles and/or semi-volatiles were obtained and identified under optimal SBSE/HSSE extraction conditions (test 2).

In order to identify products consumed or produced by *S. aureus*, the areas of the peaks of interest were compared with the controls (data not shown). Seventeen volatile or semi-volatile compounds were produced by *S. aureus*, while five were consumed (acetaldehyde, benzaldehyde, 4-methylquinoline, decanoic acid and quinoline-4-carbaldehyde). Among the 17 produced compounds, nine were also present in the controls but their area was markedly increased during the test (from 22% to 630%). Similarly, four out of the five consumed compounds showed a decreased area varying from 30% (for acetaldehyde) to 86% (for benzaldehyde). Only quinoline-4-carbaldehyde showed a small variation, with an area decreasing by 2%.

Interestingly, five compounds (prop-2-enal, (methylsulfanyl)methane, 3-methylbutan-1-ol, undecan-2-one and 4-methylquinazoline) were not found in test 2. This could be explained by the fact that (i) these compounds have very small areas in separate desorption and (ii) when twisters were desorbed simultaneously, the background noise increased. The area of these compounds was also below the detection limit. In contrast, two compounds were not detected in test 1B but only in simultaneous desorption: 2-hydroxybenzaldehyde and 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine. These two compounds were detected with the PDMS and EGS stir bars in test 1B, but their concentrations were too low and these compounds were detected only once out of three replicates. The desorption of the bars simultaneously in test 2, increased the concentration retained by the two twisters enough to overcome the background noise.

Finally, 22 compounds were detected by SBSE/HSSE method, of which 17 were produced and five were consumed. Regarding the 17 compounds produced, seven have already been described as produced by *S. aureus*, although one of them, the indole, is controversially described as either produced or consumed by the bacterium [25,34–38]. The major advance of the method described is the potential

identification, for the first time to our knowledge, of 10 new metabolites produced by *S. aureus*: methyl acetate, 1-methyl-1-propylhydrazine, 4-methylheptan-2-one, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, formic acid, 2-hydroxybenzaldehyde, acetamide, 1,3,5,7-tetraazatricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane, 3-phenylpyridine and isoquinoline-1-carbonitrile. Their role and interest in clinical practice must be evaluated in the future.

4. Conclusion

This paper presents an original method for the tentative identification of bacterial volatile and/or semi-volatile metabolites. It is based on the use of a SBSE/HSSE multi-extraction procedure with two complementary sorptive PDMS and EGS stir bars. To our knowledge, this is the first time this technique has been applied to extract bacterial metabolites. The main objective of this study was to evaluate the potential of this technique by using a screening of a single bacterial strain. Development of the method was obtained by (1) inserting both twisters in the same vial: the PDMS stir bar at the bottom (liquid phase) and the EGS in headspace of the vial, and (2) a simultaneous desorption in the TDU. Exposure time of the bars with the culture medium was observed to be more efficient (detection of the highest number of bacterial metabolites) towards the end of exponential growth phase. These experiments demonstrated that simultaneous extraction with EGS twister in headspace and PDMS in liquid phase, combined with simultaneous desorption, was the most suitable conditions for the extraction and identification of bacterial metabolites by GC-MS of strains grown in vials. By applying all these parameters, we define a first tentative SBSE/HSSE metabolite profile of *S. aureus*, which contains 17 molecules probably produced by this bacterium.

Therefore, this method will be applied to other bacterial strains in order to identify and to establish their volatile and semi-volatile metabolic profiles. Once identified, specific metabolites of each strain could be quantified and be used as biomarker to monitor the infections.

Acknowledgements

The U1047 team belongs to the FHU InCh and is supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Nîmes métropole. We would like to thank Sarah Kabani and Sarah Fourchraud for editorial assistance.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.talanta.2018.11.042.

References

- [1] C. Martínez, N. Ramírez, V. Gómez, E. Pocurull, F. Borrull, Simultaneous determination of 76 micropollutants in water samples by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 116 (2013) 937–945.
- [2] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, Applications of solid-phase microextraction in food analysis, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35–62.
- [3] J. Moreno-García, T. García-Martínez, M.C. Millán, J.C. Mauricio, J. Moreno, Proteins involved in wine aroma compounds metabolism by a *Saccharomyces cerevisiae* flor-velum yeast strain grown in two conditions, *Food Microbiol.* 51 (2015) 1–9.
- [4] N.H. Snow, Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 445–455.
- [5] S. Ulrich, Solid-phase microextraction in biomedical analysis, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167–194.
- [6] W. Filipiak, A. Sponring, T. Mikoviny, C. Ager, J. Schubert, W. Miekisch, A. Amann, J. Troppmair, Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro, *Cancer Cell Int.* 8 (2008) 17.
- [7] W. Filipiak, A. Sponring, A. Filipiak, C. Ager, J. Schubert, W. Miekisch, A. Amann, J. Troppmair, TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells in vitro, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 19 (2010) 182–195.
- [8] R. Madsen, T. Lundstedt, J. Trygg, Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis, *Anal. Chim. Acta* 659 (2010) 23–33.
- [9] H. Sereshti, S. Samadi, M. Jalali-Heravi, Determination of volatile components of green, black, oolong and white tea by optimized ultrasound-assisted extraction-dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1280 (2013) 1–8.
- [10] N. Stoppacher, B. Kluger, S. Zeilinger, R. Krška, R. Schuhmacher, Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS, *J. Microbiol. Methods* 81 (2010) 187–193.
- [11] C.-H. Wang, H. Su, J.-H. Chou, M.-Z. Huang, H.-J. Lin, J. Shiea, Solid phase microextraction combined with thermal-desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput pharmacokinetics assays, *Anal. Chim. Acta* 1021 (2018) 60–68.
- [12] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [13] A. Roszkowska, M. Tascon, B. Bojko, K. Goryński, P.R. Dos Santos, M. Cypel, J. Pawliszyn, Equilibrium ex vivo calibration of homogenized tissue for *in vivo* SPME quantitation of doxorubicin in lung tissue, *Talanta* 183 (2018) 304–310.
- [14] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [15] B. Tienpont, F. David, C. Bicchì, P. Sandra, High capacity headspace sorptive extraction, *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 577–584.
- [16] C. Bicchì, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted Arabica coffee and coffee brew, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 449–459.
- [17] N. Ochiai, K. Sasamoto, T. Ieda, F. David, P. Sandra, Multi-stir bar sorptive extraction for analysis of odor compounds in aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 1315 (2013) 70–79.
- [18] R. Wihlborg, D. Pippitt, R. Marsili, Headspace sorptive extraction and GC-TOFMS for the identification of volatile fungal metabolites, *J. Microbiol. Methods* 75 (2008) 244–250.
- [19] D. Elpa, E. Durán-Guerrero, R. Castro, R. Natera, C.G. Barroso, Development of a new stir bar sorptive extraction method for the determination of medium-level volatile thiols in wine, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1867–1872.
- [20] G. Zhao, Y. Chen, S. Wang, J. Yu, X. Wang, F. Xie, H. Liu, J. Xie, Simultaneous determination of 11 monohydroxylated PAHs in human urine by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Talanta* 116 (2013) 822–826.
- [21] C. Huertas, J. Morillo, J. Usero, I. Gracia-Manarillo, Validation of stir bar sorptive extraction for the determination of 24 priority substances from the European Water Framework Directive in estuarine and sea water, *Talanta* 72 (2007) 1149–1156.
- [22] A. Prieto, O. Zuloaga, A. Usobiaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of several persistent organic pollutants in water samples, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 40–49.
- [23] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 774 (2013) 51–60.
- [24] S. Schulz, J.S. Dickschat, Bacterial volatiles: the smell of small organisms, *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 814–842.
- [25] R.M.S. Thorn, D.M. Reynolds, J. Greenman, Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains in vitro, *J. Microbiol. Methods* 84 (2011) 258–264.
- [26] A.D. Wilson, M. Baietto, Advances in electronic-nose technologies developed for biomedical applications, *Sensors* 11 (2011) 1105–1176.
- [27] L.D.J. Bos, P.J. Sterk, M.J. Schultz, Volatile metabolites of pathogens: a systematic review, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003311.
- [28] W. Filipiak, A. Sponring, M.M. Baur, A. Filipiak, C. Ager, H. Wiesenhofer, M. Nagl, J. Troppmair, A. Amann, Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Microbiol.* 12 (2012) 113.
- [29] A.H. Neerincx, B.P. Geurts, J. van Loon, V. Tiemes, J.J. Jansen, F.J.M. Harren, L. a.J. Kluijtmans, P.J.F.M. Merkus, S.M. Cristescu, L.M.C. Buydens, R.A. Wevers, Detection of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients using breath VOC profiles, *J. Breath Res.* 10 (2016) 046014.
- [30] J. Mesureur, S. Ranaldi, V. Monnin, V. Girard, S. Arend, M. Welker, D. O'Callaghan, J.-P. Lavigne, A. Keriell, A simple and safe protocol for preparing Brucella samples for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry analysis, *J. Clin. Microbiol.* 54 (2016) 449–452.
- [31] H. Van Den Dool, P.D. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography, *J. Chromatogr. A* 11 (1963) 463–471.
- [32] B. Sgorbini, C. Cagliero, C. Cordero, E. Libertò, P. Rubiolo, M.R. Ruosi, C. Bicchì, New medium-to-high polarity twister coatings for liquid and vapour phase sorptive extraction of matrices of vegetable origin, *J. Chromatogr. A* 1265 (2012) 39–45.
- [33] M. Leibig, M. Liebeke, D. Mader, M. Lalk, A. Peschel, F. Götz, Pyruvate formate lyase acts as a formate supplier for metabolic processes during anaerobiosis in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 193 (2011) 952–962.
- [34] R.A. Allardyce, V.S. Langford, A.L. Hill, D.R. Murdoch, Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), *J. Microbiol. Methods* 65 (2006) 361–365.
- [35] J.M. Scotter, R.A. Allardyce, V.S. Langford, A. Hill, D.R. Murdoch, The rapid evaluation of bacterial growth in blood cultures by selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS) and comparison with the BacT/ALERT automated blood culture system, *J. Microbiol. Methods* 65 (2006) 628–631.
- [36] J. Zhu, H.D. Bean, Y.-M. Kuo, J.E. Hill, Fast detection of volatile organic compounds from bacterial cultures by secondary electrospray ionization-mass spectrometry, *J. Clin. Microbiol.* 48 (2010) 4426–4431.
- [37] M.K. Storer, K. Hibbard-Melles, B. Davis, J. Scotter, Detection of volatile compounds produced by microbial growth in urine by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), *J. Microbiol. Methods* 87 (2011) 111–113.
- [38] M. Jünger, W. Vautz, M. Kuhns, L. Hofmann, S. Ulbricht, J.I. Baumbach, M. Quintel, T. Perl, Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: a new identification tool for human pathogenic bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 2603–2614.

4.3 Supplementary material

Supplementary Table S1. Additional data for compounds identification.

Compound	Retention Time (min)	Calculated RI	Literature RI	Main ions of experimental mass spectra
Acetaldehyde	5.930	804	714	44, 43, 41, 42
2-methylpropanal	6.814	843	842	41, 72, 39, 38
Propan-2-one	6.876	845	818	43, 58, 42
Methyl acetate	6.998	851	864	43, 74, 59
Prop-2-enal	7.250	862	851	56, 55, 39
Ethanol	9.044	939	940	45, 46, 43, 42, 41
(methyldisulfanyl)methane	9.980	1014	1039	94, 79, 47, 46
1-methyl-1-propylhydrazine	12.094	1067	- ¹	59, 43, 88, 58, 42, 41
4-methylheptan-2-one	15.320	1204	1197	43, 58, 59, 85, 41
3-methylbutan-1-ol	15.331	1205	1202	55, 70, 41, 42, 39, 57
(methyltrisulfanyl)methane	18.775	1379	1376	126, 79, 45, 47, 64, 111, 80
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	20.123	1456	1450	135, 136, 42, 108, 107, 39
Acetic acid	20.306	1466	1479	43, 45, 60, 42
Formic acid	21.527	1540	1510	46, 45, 44
Benzaldehyde	21.697	1550	1534	106, 105, 77, 51
Undecan-2-one	22.585	1605	1598	58, 43, 71, 59, 41
2-hydroxybenzaldehyde	23.456	1662	1680	122, 121, 65, 104, 93, 76, 39
3-methylbutanoic acid	23.719	1680	1655	60, 43, 41, 87, 45, 39
Acetamide	25.051	1771	1773	59, 44, 43, 42, 40
1,3,5,7-Tetraazatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decane	27.463	1947	- ¹	42, 140, 85, 112, 41
4-methylquinazoline	29.714	2125	- ¹	144, 129, 117, 76, 103, 102, 143
4-methylquinoline	30.039	2152	2108	143, 115, 142, 116, 144
Decanoic acid	31.546	2276	2281	73, 60, 129, 87
3-phenylpyridine	31.565	2278	2243	155, 154, 102, 127, 128
Isoquinoline-1-carbonitrile	32.788	2390	- ¹	154, 127, 103, 155
Quinoline-4-carbaldehyde	33.961	2500	- ¹	157, 129, 128, 102, 101, 75
1H-indole	33.974	2502	2451	117, 90, 63, 118

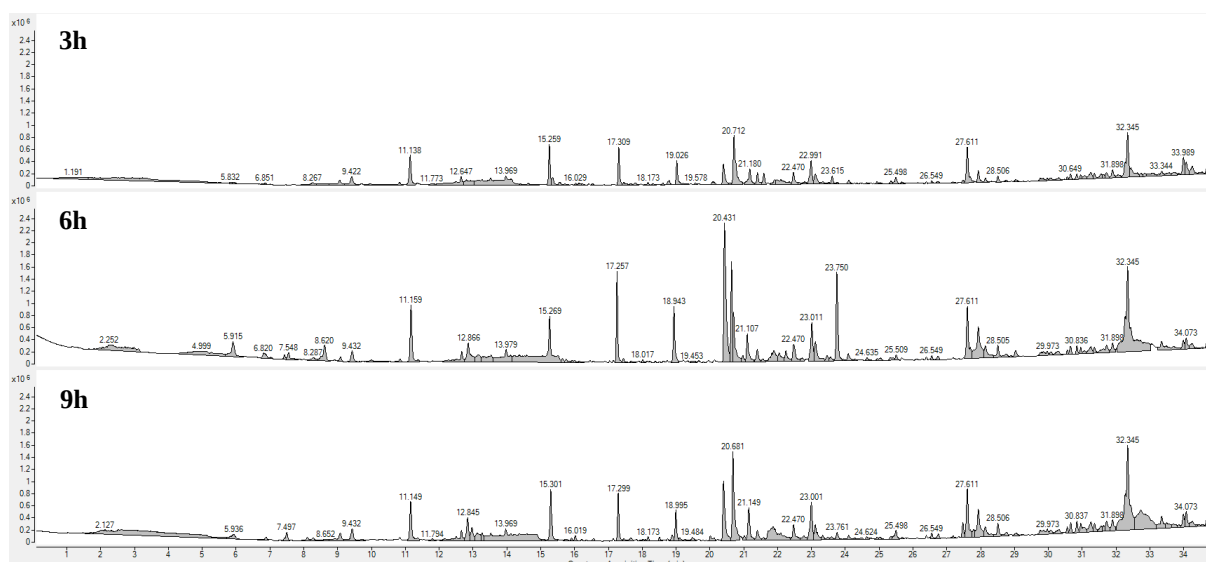
RI: Retention Index

Literature RI were obtained from NIST Webbook

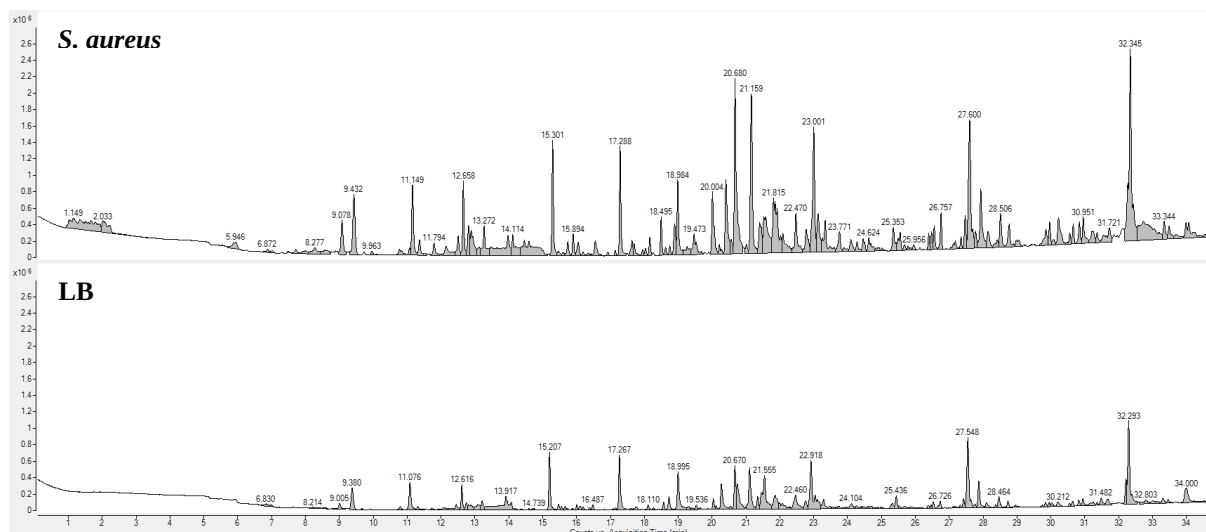
¹: Not available in database under the conditions used

Main ions are presented according to their intensity, from the highest to the lowest

Two compounds showed a variation in retention indices greater than 2.5% (acetaldehyde and propan-2-one). The use of analytical standards allowed to confirm their identification.



Supplementary Figure S1. Examples of total ion chromatograms obtained after deconvolution for one of the replicates with 3h, 6h and 9h of extraction by SBSE/HSSE in a *S. aureus* culture.



Supplementary Figure S2. Comparison of total ion chromatograms obtained after deconvolution under conditions of simultaneous extraction and desorption. The SBSE/HSSE extractions was performed for 6 hours in *S. aureus* cultures as well as for the LB controls.

4.4 Conclusion

Cette étude a démontré la possibilité d'extraire et de concentrer des métabolites volatils et semi-volatils produits par les bactéries. La méthode développée couple l'extraction SBSE avec l'extraction HSSE, en utilisant les deux types de phase dont la complémentarité a également été démontrée. En effet, seuls 15% des métabolites identifiés sont communément extraits par les deux barreaux. La méthode optimale d'extraction a été définie en réalisant les étapes d'extraction et de désorption simultanément, avec une récupération des métabolites bactériens en fin de phase exponentielle de croissance. En appliquant ces paramètres, un premier profil métabolique obtenu par SBSE/HSSE contenant 17 molécules a pu être proposé. A notre connaissance, c'est la première fois que cette technique est appliquée pour extraire des métabolites bactériens.

CHAPITRE 2 : COMPARAISON DE DEUX METHODES D'EXTRACTION

Après avoir démontré la capacité du couplage SBSE/HSSE pour la concentration et l'analyse de métabolites volatils et semi-volatils bactériens, la question a été de savoir si cette technique était la plus adaptée. En effet, la technique actuelle de concentration de volatils bactériens est la SPME (Chen et al., 2017; Julák et al., 2003; Preti et al., 2009; Tait et al., 2014). Elle fera l'objet d'une présentation de son principe et de ses applications dans la première partie de ce chapitre.

Appliquée depuis plusieurs années à différents types d'analyses, elle paraît être la technique privilégiée. Toutefois, le développement plus récent de la SBSE et les premières études menées avec cette technique ont montré un net avantage pour les barreaux qui possèdent une plus grande capacité d'adsorption.

Par conséquent, afin de vérifier s'il est avantageux d'utiliser la SBSE/HSSE plutôt que la SPME, nous avons comparé l'apport de ces deux techniques pour la récupération de métabolites produits par la souche de référence *S. aureus* ATCC 25923. De plus, du fait de la complexité des chromatogrammes obtenus et de la présence de composés à la fois dans le témoin (milieu seul) et dans les cultures bactériennes, une méthodologie a été mise en place pour discriminer statistiquement les composés produits par les bactéries de ceux qui sont consommés ou faisant seulement partie du milieu de culture. Par ailleurs, jusqu'alors d'autres méthodes d'extraction suivies d'une analyse par GC-MS avaient été employées afin de définir un profil métabolique volatil pour cette bactérie. Nous avons donc discuté de l'apport de la SBSE pour la détection de nouveaux composés bactériens volatils et semi-volatils, avec pour objectif d'améliorer la connaissance de ce profil métabolique et de découvrir de potentiels nouveaux biomarqueurs de cette bactérie.

Enfin, ce chapitre résumera les caractéristiques de chacune de ces deux techniques d'extraction sur phase.

5.1 Principe et applications de la SPME

5.1.1 Principe

Développée en 1990 par Arthur et Pawliszyn dans le but d'améliorer l'analyse de molécules en la rendant plus rapide, plus aisée à mettre en œuvre et plus sensible, la SPME est une technique d'extraction de composés volatils ou semi-volatils (Arthur and Pawliszyn, 1990). Elle permet une pré-concentration de composés provenant d'échantillons liquides, solides ou gazeux sur une fibre (Figure 10) et ne nécessite ni préparation d'échantillon, ni solvant.

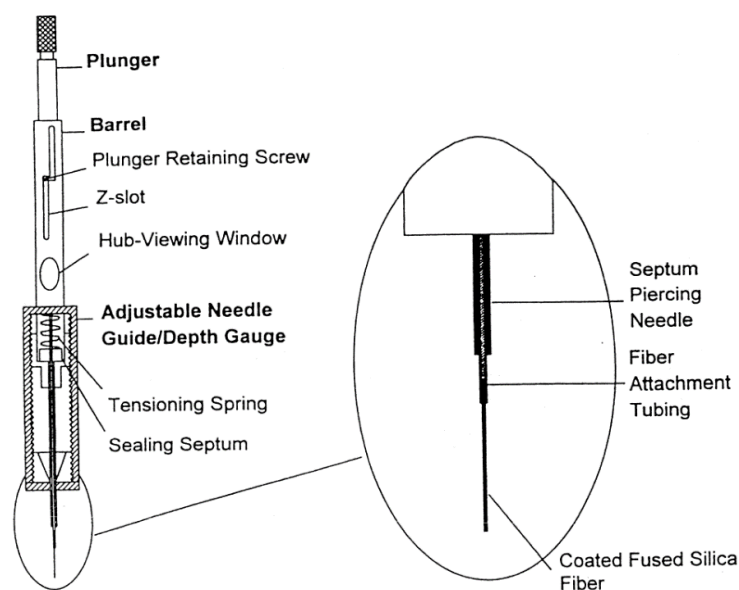


Figure 10 : Dispositif de SPME (Zhang et al., 1994).

Cette extraction peut se faire dans l'espace gazeux (headspace) d'un vial contenant l'échantillon ou alors directement immergé dans celui-ci (extraction liquide). Elle est automatisée à l'aide d'un passeur d'échantillon (MPS, Gerstel). La fibre « chargée » est ensuite introduite dans le TDU. Les composés extraits par la fibre sont alors désorbés thermiquement, cryofocalisés sur le CIS puis transférés dans la colonne GC pour analyse.

5.1.2 Sélection des analytes

D'une façon générale, la nature de la fibre va conditionner la nature des analytes retenus. Par conséquent, la SPME ne conduit pas à l'extraction totale des analytes présents dans l'échantillon, mais seulement à l'extraction d'une fraction de ceux-ci. En effet, seuls les composés ayant une affinité pour la fibre s'y adsorbent. Ainsi, de nombreux paramètres peuvent

influencer sur la quantité extraite tels que le temps de contact avec l'échantillon, la température de chauffage et l'agitation. En effet, le chauffage des échantillons permet d'augmenter la diffusion des analytes. Toutefois, un chauffage trop important pourra conduire à la dégradation des composés d'intérêt, et donc à des résultats erronés.

Il existe plusieurs types de revêtements polymériques selon la nature des analytes recherchés. En tout, sept types différents sont disponibles. Ils sont renseignés dans le Tableau VIII qui présente également leurs propriétés (Burgot and Pellerin, 2003; Vas and Vékey, 2004) (Sigma, guide de sélection pour les fibres SPME SUPELCO) et leurs principaux champs d'application (Mester and Sturgeon, 2005; Mester et al., 2001).

Tableau VIII : Types de fibres SPME commercialisées.

Nature du revêtement	Epaisseur (µm)	Composés extraits		Température maximale d'utilisation (°C)	Application analytique	Nature des composés analysés
		Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Polarité			
PDMS	100	60-275	Non polaire	280	GC/HPLC	Volatils (arômes, parfums, additifs alimentaires...)
	30	80-500		280		Semi-volatils non polaires
	7	125-600		340		Semi-volatils non polaires de haute masse moléculaire
PDMS/DVB	65 ^a	50-300	Bipolaire	270	GC	Volatils polaires, amines et nitro-aromatiques
	60			270	HPLC	Toutes applications
PA	85	80-300	Polaire	320	GC/HPLC	Semi-volatils polaires (phénols)
CAR/PDMS	85 ^a	30-225	Bipolaire	320	GC	Gaz et volatils
	75			320		
CW/DVB	70 ^a	40-275	Polaire	265	GC	Analytes polaires (alcools, aromatiques...)
	65			265		
CW/TPR	50		Polaire	240	HPLC	Surfactants anioniques
DVB/PDMS/CAR	50/30 ^a	40-275	Bipolaire	270	GC	Volatils et semi-volatils (arômes, parfums...)

^a : Fibres existant en Stable flex (fibres flexibles, moins fragiles que les autres modèles).

PDMS : polydiméthylsiloxane ; DVB : diméthylbenzène ; PA : polyacrylate ; CAR : Carboxen ; CW : Carbowax ; TPR : Template Resine.

Le choix du polymère se fait principalement en fonction de l'analyte recherché (polarité et volatilité) et l'affinité qui en résulte entre la phase stationnaire et le composé d'intérêt se traduit par une certaine sélectivité. Cette sélectivité sera le principal paramètre gouvernant la sensibilité de cette technique (Prikryl and Sevcik, 2008).

5.1.3 Applications

Initialement développée pour l'analyse de différentes classes de composés chimiques (HAP, COV, pesticides, phénols, arômes...) provenant d'échantillons liquides, la technique de prélèvement par SPME a été étendue à l'analyse de matrices complexes alimentaires, environnementales (sols, air...) ou encore biologiques (Pawliszyn, 1999). Aujourd'hui, le champ d'application de cette méthode est vaste avec de nombreuses applications recensées pour l'analyse biomédicale (Souverain et al., 2004), l'environnement (Boyaci et al., 2016), l'agroalimentaire (Kataoka et al., 2000), la biologie, la toxicologie, la pharmacie et la chimie légale (Gambelunghe et al., 2015; Lord and Pawliszyn, 2000; Snow, 2000; Theodoridis et al., 2000).

Concernant le diagnostic médical, la SPME a déjà été testée pour la détection d'acides gras volatils d'origine bactérienne provenant d'exsudats cliniques (pus, épanchements, ponctions, hématomes...) (Julák et al., 2003). Cette étude a comparé les résultats obtenus par SPME avec la culture bactérienne et a mis en évidence la présence de 20,5% de faux-négatifs avec la technique pasteurienne. Cette technique d'identification de composés volatils peut donc aider au diagnostic préliminaire de la détection de bactéries dans des échantillons cliniques. Ces mêmes conclusions ont été effectuées pour une étude sur les selles de patients sains et malades. Les variations entre les COVs détectés selon les échantillons est une indication de la présence de bactéries et donc de maladie gastro-intestinale, avec dans ce cas, plus particulièrement de *Clostridium difficile* et *Campylobacter jejuni* (Garner et al., 2007).

**Publication n°3 : Comparison of stir bar sorptive
extraction and solid phase micro-extraction for
determining volatile and/or semi-volatile
metabolite profile of *Staphylococcus aureus***

Article soumis à Journal of Chromatography A

Comparison of stir bar sorptive extraction and solid phase micro-extraction for determining volatile and/or semi-volatile metabolite profile of *Staphylococcus aureus*

Kevin Berrou^a, Catherine Dunyach-Remy^{b,c}, Jean-Philippe Lavigne^{b,c}, Benoit Roig^a, Axelle Cadierne^a

^a Univ. Nîmes, EA7352 CHROME, Rue du Dr G. Salan, 30021, Nîmes Cedex 1, France.

^b Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047, Université Montpellier, UFR de Médecine, 30908 Nîmes Cedex 02, France.

^c Service de Microbiologie, CHU Nîmes, 30029 Nîmes Cedex 09, France.

Abstract

For the analysis of volatile bacterial compounds, solid phase micro extraction (SPME) is currently the most widely used metabolite concentration technique. Recently, the potential of stir bar sorptive extraction (SBSE) for this application has been demonstrated. These two approaches were therefore used in combination with gas-chromatography coupled with mass-spectrometry (GC-MS) for the analysis of volatile and semi-volatile bacterial compounds produced by *Staphylococcus aureus*. In both cases, SPME and SBSE enrichment was carried out in two coating phases. A whole analytical and statistical process was developed to differentiate the produced from the consumed metabolites by this bacterium. The results obtained with SBSE and SPME were compared and showed the recovery of 90% of the compounds by SBSE. In addition, we were able to detect the production of 12 volatile/semi-volatile compounds by *S. aureus*, six of which had never been described before. The extraction by SBSE showed higher concentration capacities and greater sensibility than SPME concerning bacterial compounds, suggesting that this technique may therefore become the new preferred option for bacterial volatile and semi-volatile compounds analysis.

Keywords: Gas chromatography-mass spectrometry, Stir bar sorptive extraction, Solid phase micro-extraction, *Staphylococcus aureus*, Bacterial metabolite analysis

1. Introduction

The analysis of volatile compounds is a major challenge in the field of the environment and medical diagnosis. Molecules such as halogenated organic compounds, phthalates, polycyclic aromatic hydrocarbons or polyalkoxylated alcohols have been used as markers and biomarkers for pollution characterisation [1] or bacterial identification, respectively [2–4].

Microbial volatile compounds (MVCs) are intermediates and end-products of various metabolic pathways [5]. These metabolites (alone or in mixtures) are involved in specific mediating microbial interactions [6]. Indeed, MVCs are engaged in the communication between microorganisms and their living environment.

The identification of volatile organic compounds (VOCs) is usually performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) [7], either directly (headspace analysis [8]) or after extraction. VOCs can be extracted in various ways such as liquid-liquid extraction [9] or solid phase extraction using C18 or silica gel columns [10]. Interestingly, small molecular weight substances released by microorganisms have been often overlooked, particularly those produced by bacteria, partly because of the lack of appropriate adsorption and detection technologies [6]. Thus, techniques combining extraction and concentration have been developed to increase detection sensitivity. Solid phase micro-extraction (SPME) [11] is the most commonly used technique [12–14]. It consists of the adsorption of VOCs on a fibre followed by thermal or chemical desorption. Baltussen et al. [15] have developed a derivative of this technique, called stir bar sorptive extraction (SBSE). This method improved the concentration capacity of VOCs by increasing the amount of adsorbent phase and has already been applied to the detection of MVCs produced by yeasts or fungi [16,17].

Using several methods of sample preparation and extraction (liquid-liquid or headspace concentration) combined with analytical

techniques (GC-MS, IMS, SIFT-MS, PTR-MS, SESI-MS... [18,19]), various studies were performed to characterize the volatile metabolites produced by *Staphylococcus aureus*. However, none of these investigations was able to accurately determine the metabolic profile of *S. aureus*. Indeed, there are conflicting studies on the identification of compounds produced by bacteria [3], and most of these studies do not attempt to be exhaustive and focus only on a few compounds or families of compounds. This can be explained by the complexity of the bacterial matrices as well as the culture medium (its autoclaving process forming several VOCs [20]).

In a recent work (with the reference strain of *S. aureus*), we showed that SBSE and headspace sorptive extraction (HSSE) can also be used simultaneously for the extraction and concentration of volatile and semi-volatile bacterial metabolites [21].

This paper describes the use of a SBSE/HSSE method with GC-MS analysis for the determination of MVCs profile of *S. aureus* and the comparison with a current extraction method (SPME).

2. Material and methods

2.1. Materials

SPME extractions were performed with four types of fibres (100 µm polydimethylsiloxane (PDMS), 65 µm PDMS/Divinylbenzene (PDMS/DVB), 75 µm carboxen/PDMS (CAR/PDMS), 50/30 µm DVB/CAR/PDMS) and purchased from Supelco (Supelco Inc., Bellefonte, USA). SBSE and HSSE extractions were performed with 10 mm twister[®] magnetic stir bars coated with PDMS or ethylene glycol/silicone (EGS) (both 0.5 mm film thickness) obtained from Gerstel GmbH (Mülheim an der Ruhr, Germany). Stir bars and fibres were conditioned prior to use according to the manufacturer's instructions. In order to control the identification of some compounds, analytical standards were used: ethanol (99.8%) and acetic acid (99.8%) were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

Acetaldehyde (99%), propan-2-one (99.8%), benzaldehyde (99%) and 3-methylbutanoic acid (99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). A standard mixture containing linear alkanes from C7 to C40 from Sigma-Aldrich was used to evaluate the linear retention index (LRI).

2.2. Culture conditions

S. aureus ATCC 25923 [22] was the reference strain used in this study. The strain was maintained as frozen stock on Microbank™ bead (Pro-Lab Diagnostic, Richmond Hill, Canada) at -80°C, and cultivated overnight onto Luria Bertani (LB) medium (tryptone (Fluka, Saint-Louis, USA), yeast extract (Amresco, Solon, USA) and sodium salt (Panreac, Barcelona, Spain)) at 37°C with shaking at 210 rpm. From this culture, 12 replicates were performed for each condition in sterile 20 mL glass vials sealed with PTFE/Silicone screw caps (Agilent, Santa-Clara, USA) containing 10 mL of LB medium were inoculated at 0.1 uDO.mL⁻¹. A control with LB medium (12 replicates) was carried out under the same conditions.

2.3. Headspace-SPME extraction procedure

The vials were incubated in the MPS agitator for 6 h before extraction at 37°C with shaking at 250 rpm. Then, the SPME fibre was inserted in the vial headspace and *S. aureus* VOCs were extracted for 30 min at 250 rpm. After the extraction, the fibre was desorbed in the TDU for 90 sec at 220°C (mean temperature adapted to the four fibres in the preliminary tests) and then, in the subsequent experiments, at 250°C (PDMS/DVB) or 270°C (CAR/PDMS). Between two extractions, the fibre is reconditioned in the injector for 5 min at the temperature recommended by the supplier.

2.4. SBSE/HSSE extraction procedure

PDMS and EGS twisters were inserted into liquid cultures of LB medium and in the

headspace at the beginning of the experiment for a simultaneous extraction for 6 h of culture at 37°C and under shaking at 600 rpm. After exposure, the stir bars were removed from the bacterial culture. The PDMS twister was rinsed with ultrapure water and blotted with a lint-free tissue before being placed in a glass thermal desorption tube. The EGS twister was placed directly into the same tube for a simultaneous desorption. In parallel, the procedure was performed (12 replicates) in control condition (only LB medium) in order to tentatively identify the compounds from the medium.

2.5. GC-MS analysis

The analytical system was composed of an Agilent 7890 B gas chromatograph coupled to an Agilent 5977 A mass spectrometer with a MultiPurpose Sampler (MPS), a thermal desorption unit (TDU) and a cooled injection system (CIS) (Gerstel). The data acquisition software MSD Chemstation F.01.00 (Agilent Technologies, Les Ulis, France) was used to program the GC-MS. The gas chromatograph was fitted with a VF-WAXms fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, Agilent) and was used with helium as carrier gas at 0.8 mL.min⁻¹.

The tube was desorbed in the TDU at 220°C (suitable temperature for both bars, recommended by the supplier) for 5 min. After desorption, VOCs were focalised on the CIS at -10°C during 2 min, ramped to 250°C at a heating rate of 12°C per second, and finally held for 2.5 min in splitless mode to ensure complete desorption of analytes. The column temperature was initially kept at 40°C for 7 min and then increased from 40 to 240°C at 8°C.min⁻¹, the temperature was maintained during 3 min. Then, the sample was introduced into the ion source of the Agilent 5977 A mass spectrometer. The transfer line temperature was set at 250°C and ion source temperature at 230°C. Ions were generated by a 70eV electron beam. Masses were acquired from m/z 33-500 amu.

2.6. Data processing and statistical analysis

All peaks were integrated using MassHunter Qualitative Analysis software B.06.00 (Agilent Technologies). This software deconvolutes the chromatograms, separating the co-eluted VOCs. Compounds were then identified by their mass spectra by using the National Institute of Standard and Technologies (NIST) and the Wiley7 reference libraries.

The identified compounds present in at least 9 out of 12 replicates were retained for analysis. Compounds found only in the controls were not considered.

The LRI of a compound is the normalization of its retention time on a gas chromatographic column with respect to a homologous series of n-alkanes, thus converting this retention time into a constant independent of the chromatographic system used. For each compound available in database, the retention index was determined using the one previously obtained on a polar column, as described by Van Den Dool and Kratz [23]. A maximum relative deviation of 2.5% (in the range of the values used in reviews [5,24]) from literature values was accepted to identify bacterial compounds.

3. Results and discussion

3.1. Methodology for identifying compounds

The methodology to tentatively identify MVCs is based on several step as illustrated in Figure 1. Because of the complexity of the chromatogram of a bacterial culture, a first step consists of a mathematical processing (deconvolution) of each chromatographic peak to identify those corresponding to a co-elution and to draw mass spectra corresponding to each individual peak. At the same time, a comparison of the mass spectra obtained with the NIST and the Wiley databases was performed to give a first list of identified compounds: around 240 compounds per sample. Then, the compounds linked to the decomposition the adsorbent phases (e.g. compounds containing siloxane and polyethylene glycol units) were removed, resulting to a second list of about 60 compounds. To ensure a robust identification, mass spectrum of each compound was checked with databases, the LRI was calculated and compared with the LRI of the literature (NIST Chemistry WebBook). Compound with a maximum relative deviation of no more than 2.5% were retained leading to a third list of 19 potential bacterial metabolites.

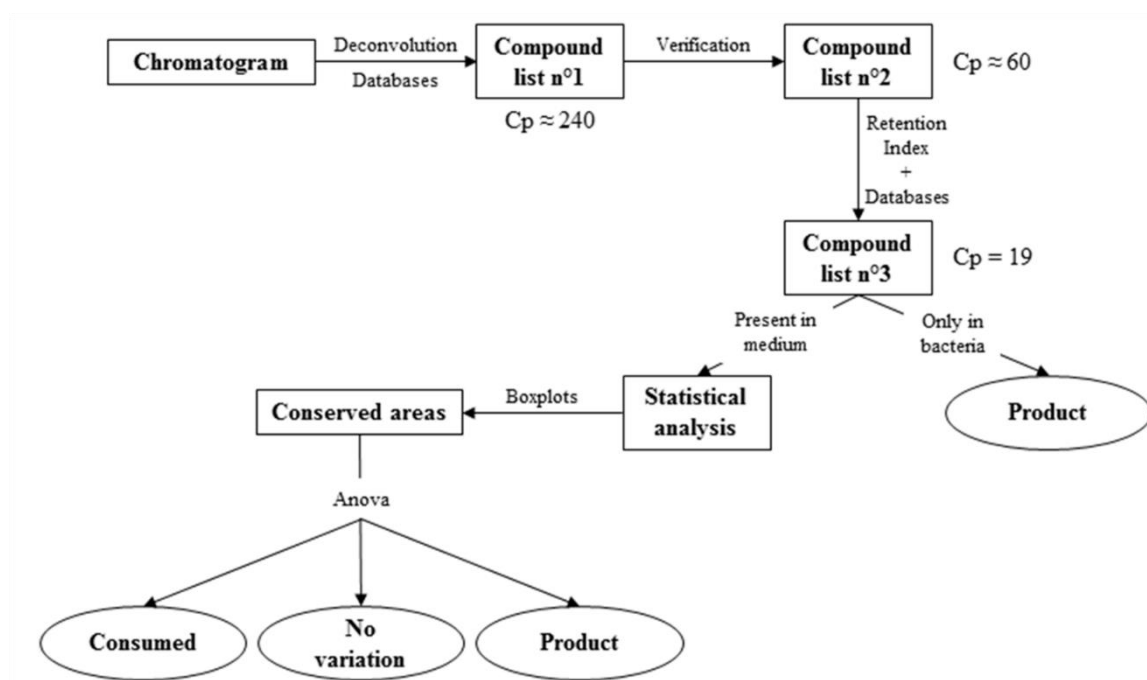


Figure 1. Graphical summary of the methodology treatment of GC data.

Finally, these metabolites were compared with the compounds identified in control conditions.

Compounds only found in bacterial culture were considered as produced by *S. aureus*.

For compounds found under both conditions, a statistical analysis of the peaks areas was performed. Area distribution was assessed using boxplots and outliers were eliminated. The variation of area was observed to determine if the compound is produced (observed area higher than the area of the medium) or consumed (observed area lower than the area of the medium). The significance of the area variation was assessed by a one-way Anova test with a p-value < 0.05.

Conversely, an average area for bacterial culture lower than control indicated a consumption of the volatile/semi-volatile compound by the bacterium.

3.2. Efficiency of each extraction method (SPME and SBSE)

The efficiency of SPME fibres and SBSE bars to extract MVCs from a bacteria culture were tested.

After a preliminary assay of four SPME fibres on a same bacterial sample, only the PDMS/DVB and CAR/PDMS fibres were retained due to their wide recovery of the molecules (91%, data not shown).

For SBSE, we previously observed that the simultaneous use of two different stir bars (PDMS + EGS) improved the extraction of bacterial metabolites [21].

Figure 2 represents the distribution of the number of volatile/semi-volatile compounds extracted in *S. aureus* cultures by SBSE or SPME (SPME results combine analyses of both fibres types). The number of identified compounds were then compared using a Venn diagram and the compound names of each intersection of this graphic were indicated.

The SBSE method extracted and identified 17 compounds while the SPME method found only four molecules (figure 2). Two out of the four molecules identified using fibres were also detected by SBSE. A total of 19 different metabolites were identified in *S. aureus* cultures, and 90% of which were extracted via magnetic stir bars highlighting the benefits of this method.

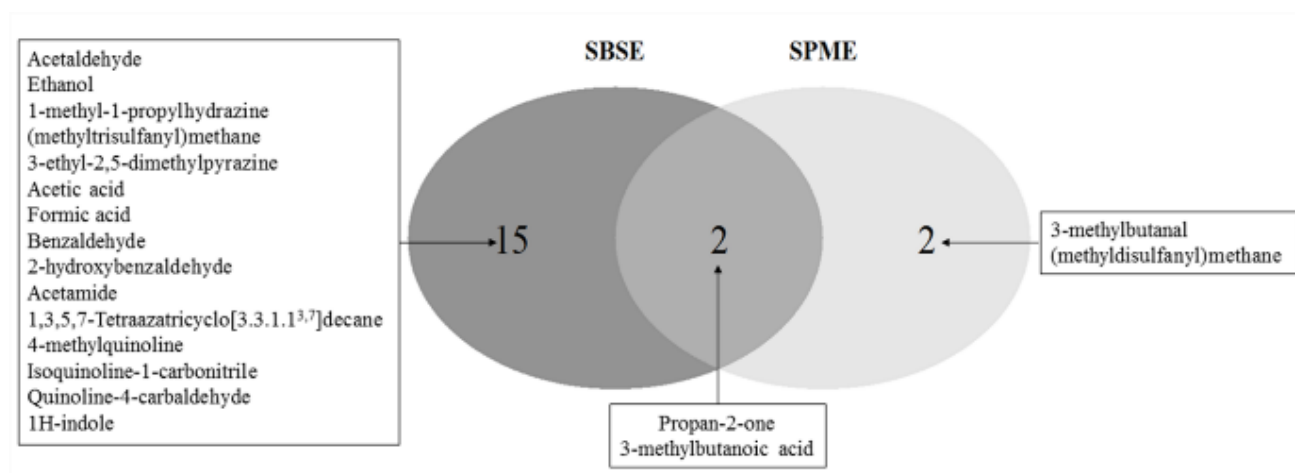


Figure 2. Distribution of the number of volatile/semi-volatile compounds found in *S. aureus* cultures and extracted by SBSE or SPME. Venn diagram illustrating the degree of overlap of extracted and identified compounds between the SBSE and the SPME methods. The central section in grey represents the compounds that are found by both methods. Specific compounds extracted by SBSE are in dark grey while those extracted by SPME are in light grey.

Our results are in agreement with the previous studies showing a better efficiency of stir bar due to the larger volume of phase available on stir bar compared to fibres, thus increasing the extraction capacity of volatile/semi-volatile compounds [15,25].

All these results demonstrated the relevance of SBSE for the extraction of bacterial metabolites from liquid cultures.

3.3. Validation of the tentative identification

As shown in Figure 1, the tentative identification of the compounds is based not only on the mass spectra but also with retention index and, for some compounds, analytical standards.

All the results were compiled in the Table 1.

Table 1

Compound tentatively identified in a *S. aureus* culture by SBSE or SPME - GC-MS and their statistical variation between culture and control.

Volatile / Semi-volatile metabolite	Identification			Characterisation		
	LRI ^a		Percentage Δ LRI	Area variation	p-value	Produced / consumed by <i>S. aureus</i>
	Measured	Literature				
Acetaldehyde ^c	803	714	12.5%	↘	3.12×10^{-3}	Consumed
Propan-2-one ^c	843	818	3.1%	↗	4.80×10^{-5}	Produced
3-methylbutanal	866	876	1.1%	↘	6.38×10^{-8}	Consumed
Ethanol ^c	938	940	0.2%	↗	5.32×10^{-6}	Produced
(methyldisulfanyl)methane	1059	1039	1.9%	↘	2.92×10^{-4}	Consumed
1-methyl-1-propylhydrazine	1066	- ^b				Produced
(methyltrisulfanyl)methane	1376	1376	0.0%	↗	3.38×10^{-2}	Produced
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	1454	1450	0.3%			Produced
Acetic acid ^c	1464	1479	1.0%	↗	7.54×10^{-3}	Produced
Formic acid	1531	1510	1.4%	↗	4.89×10^{-6}	Produced
Benzaldehyde ^c	1542	1534	0.5%	↘	1.97×10^{-4}	Consumed
3-methylbutanoic acid ^c	1645	1655	0.6%			Produced
2-hydroxybenzaldehyde	1702	1680	1.3%	↗	2.41×10^{-7}	Produced
Acetamide	1767	1773	0.3%			Produced
1,3,5,7-Tetraazatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decane	1946	- ^b		↗	1.88×10^{-3}	Produced
4-methylquinoline	2152	2108	2.1%	↗	6.90×10^{-1}	No variation
Isoquinoline-1-carbonitrile	2391	- ^b		↗	6.12×10^{-1}	No variation
Quinoline-4-carbaldehyde	2500	- ^b		↗	5.37×10^{-1}	No variation
1H-indole	2502	2451	2.1%	↗	2.76×10^{-2}	Produced

^a LRI: Linear Retention Index

-^b: LRI not available in the literature

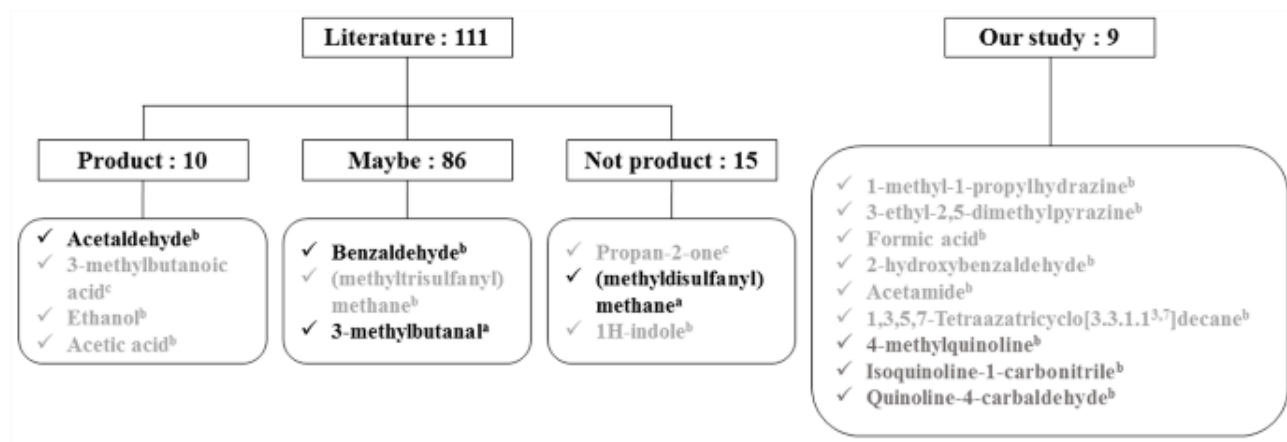
^c: Metabolites that have additionally been confirmed by analysis of standards

Percentage Δ LRI: Percentage change between theoretical and calculated values

↗: Positive area variation (i.e. mean peak area detected in bacterial culture above that of the control)

↘: Negative area variation (i.e. mean peak area detected in bacterial culture below that of the control)

Figure 3. SBSE contribution to the detection of volatile/semi-volatile metabolites produced by *S. aureus*. In light grey: produced compounds; in dark grey: medium compounds and in black: consumed compounds. ^a detected by SPME, ^b detected by SBSE and ^c detected by both methods.



The comparison of calculated LRI with LRI available in the literature (with a maximum variation threshold of 2.5%) confirmed the tentative identification of 17 out of 19 MVCs. Only acetaldehyde and propan-2-one were found outside this threshold with respectively 12.5% and 3.1% deviation. However, the use of analytical standards, which showed a similar retention time, confirms the presence of these two compounds. The highly volatile nature of these two compounds and the difficulties in analysing them under GC conditions [26] may explain this greater variation in LRI values.

3.4. Statistical analysis to determine the compounds consumed and produced by *S. aureus*

The comparison of the compounds extracted from the bacteria culture and those from the control condition showed that only four were found in the bacterial culture (1-methyl-1-propylhydrazine, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, 3-methylbutanoic acid and acetamide) and thus produced by *S. aureus*.

For the other 15 compounds detected in both control and bacterial culture, the analysis process defined in Fig. 1 was applied. Twelve replicates were sampled and analysed and an Anova test was performed (Table 1).

Three compounds did not show significant variation, which means they came from the LB medium (4-methylquinoline, isoquinoline-1-carbonitrile and quinoline-4-carbaldehyde).

Some compounds showed significant differences (p-values less than 0.05) between the control and the bacterial culture. In particular, four area variations showed a decrease in surface between control and *S. aureus* culture, and associated p-values were significant, corresponding to compounds consumed by the bacterium (acetaldehyde, 3-methylbutanal, (methyldisulfanyl)methane and benzaldehyde).

Other tentatively identified compounds showed a significant positive area variation, illustrating a production of these metabolites. Specifically, eight were identified as being produced by *S. aureus* (propan-2-one, ethanol, (methyltrisulfanyl)methane, acetic acid, formic acid, 2-hydroxybenzaldehyde, 1,3,5,7-Tetraazatricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane and 1H-indole).

For the propan-2-one, a p-value was indicated because this compound was found in the control, but only in SBSE. Indeed, in SPME, it was only detected in bacterial culture.

A total of 12 MCVs were tentatively identified as being produced by *S. aureus*.

3.5. Discussion

Bos et al. [3] compiled in a review 15 studies on volatile bacterial metabolites produced by *S. aureus*. They identified 111 compounds and classified them into three main groups: produced compounds, not produced compound, compounds with conflicting results or showing little evidence. Despite the number of studies, only 10 metabolites were considered as produced by the bacterium, 86 metabolites were still awaiting confirmation and 15 have been specifically researched in *S. aureus* culture and never recovered.

The comparison of the literature with our results are summarized in Figure 3 on the basis of the three same groups.

Ten compounds tentatively identified by our method have already been described in the literature. Seven of them are in agreement with the previous works (3-methylbutanoic acid, ethanol and acetic acid as produced compounds, (methyldisulfanyl)methane as not produced and benzaldehyde, 3-methylbutanal and (methyltrisulfanyl)methane as potentially produced or consumed).

The three other did not match with the literature. Regarding acetaldehyde, its highly volatile nature makes it difficult to detect and quantify under these conditions [26]. So, this compound is found in our study as consumed by *S. aureus*. In addition, propan-2-one and 1H-indole, that has been described controversially [27–33] have been found as produced compound. Contradictory results between the studies might be explain by several variables like the different strains of *S. aureus* used, the growth medium and the parameters of cultures, the measurements performed at different time points of growth and the type of method used for the volatile extraction.

Furthermore, the SBSE method proposed in our study detected nine new molecules from *S. aureus* cultures, namely: 1-methyl-1-propylhydrazine, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, formic acid, 2-hydroxybenzaldehyde, acetamide, 1,3,5,7-Tetraazatricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane,

4-methylquinoline, isoquinoline-1-carbonitrile and quinoline-4-carbaldehyde. The six first ones were produced by *S. aureus* while the last three ones were only found in the culture medium.

The SBSE extraction method has therefore increased the volatile and semi-volatile metabolic profile of *S. aureus* by providing new information. In addition, the data processing methodology implemented makes it possible not only to accurately identify the volatile compounds, but also to statistically determine whether these compounds were produced, consumed or simply derived from the culture medium.

4. Conclusion

The aim of this work was to compare the SBSE to the SPME extraction technique to analyse a volatile and semi-volatile bacterial metabolic profile. The SPME extraction using PDMS/DVB and CAR/PDMS fibres allowed to extract four volatile metabolites (all already described in the literature), while the SBSE extraction using EGS and PDMS twistors[®] allowed to extract 17 volatile and semi-volatile metabolites from a bacterial culture medium. SBSE has therefore a better extraction capacity than SPME. We also demonstrated the robustness of the method by analysing 12 independent replicates and developing a process for the treatment of obtained GC data that has shown its effectiveness in statistically determining the compounds produced by bacteria.

The comparison of metabolite found with the current literature highlighted that on the 17 metabolites tentatively identified, six have never been described previously.

Thus, SBSE can proposed a more accurate and complete bacterial volatile and semi-volatile metabolic profiles leading to a greater number of bacterial specific markers. These metabolic profiles obtained by SBSE represent a powerful approach for the characterization of different strains, which could serve as a decision support

system for clinical diagnosis of infectious diseases.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The U1047 team belongs to the FHU InCh and is supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Nîmes métropole.

References

- [1] A.T. Lebedev, D.M. Mazur, O.V. Polyakova, D.S. Kosyakov, A.Y. Kozhevnikov, T.B. Latkin, I. Andreeva Yu, V.B. Artaev, Semi volatile organic compounds in the snow of Russian Arctic islands: Archipelago Novaya Zemlya, *Environ. Pollut.* 239 (2018) 416–427.
- [2] C.A. Rees, A. Burklund, P.-H. Stefanuto, J.D. Schwartzman, J.E. Hill, Comprehensive volatile metabolic fingerprinting of bacterial and fungal pathogen groups, *J. Breath Res.* 12 (2018) 026001.
- [3] L.D.J. Bos, P.J. Sterk, M.J. Schultz, Volatile metabolites of pathogens: a systematic review, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003311.
- [4] A.H. Neerincx, B.P. Geurts, J. van Loon, V. Tiemes, J.J. Jansen, F.J.M. Harren, L.A.J. Kluijtmans, P.J.F.M. Merkus, S.M. Cristescu, L.M.C. Buydens, R.A. Wevers, Detection of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients using breath VOC profiles, *J. Breath Res.* 10 (2016) 046014.
- [5] N. Stoppacher, B. Kluger, S. Zeilinger, R. Krska, R. Schuhmacher, Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS, *J. Microbiol. Methods.* 81 (2010) 187–193.
- [6] M.C. Lemfack, J. Nickel, M. Dunkel, R. Preissner, B. Piechulla, mVOC: a database of microbial volatiles, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) D744–D748.
- [7] S. Schulz, J.S. Dickschat, Bacterial volatiles: the smell of small organisms, *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 814–842.
- [8] J.M. Zechman, S. Aldinger, J.N. Labows, Characterization of pathogenic bacteria by automated headspace concentration-gas chromatography, *J. Chromatogr.* 377 (1986) 49–57.
- [9] J. Julák, E. Stránská, E. Procházková-Francisci, V. Rosová, Blood cultures evaluation by gas chromatography of volatile fatty acids, *Med. Sci. Monit.* 6 (2000) 605–610.
- [10] A. Keszler, E. Forgács, L. Kótai, J.A. Vizcaíno, E. Monte, I. García-Acha, Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 421–424.
- [11] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [12] G. Preti, E. Thaler, C.W. Hanson, M. Troy, J. Eades, A. Gelperin, Volatile compounds characteristic of sinus-related bacteria and infected sinus mucus: analysis by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 877 (2009) 2011–2018.
- [13] J. Julák, E. Procházková-Francisci, E. Stránská, V. Rosová, Evaluation of exudates by solid phase microextraction-gas chromatography, *J. Microbiol. Methods.* 52 (2003) 115–122.
- [14] J. Chen, J. Tang, H. Shi, C. Tang, R. Zhang, Characteristics of volatile organic compounds produced from five pathogenic bacteria by headspace-solid phase micro-extraction/gas chromatography-mass spectrometry, *J. Basic Microbiol.* 57 (2017) 228–237.
- [15] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [16] R. Wihlborg, D. Pippitt, R. Marsili, Headspace sorptive extraction and GC-TOFMS for the identification of volatile fungal metabolites, *J. Microbiol. Methods.* 75 (2008) 244–250.
- [17] M. Sadoudi, R. Tourdot-Maréchal, S. Rousseaux, D. Steyer, J.-J. Gallardo-Chacón, J. Ballester, S. Vichi, R. Guérin-Schneider, J. Caixach, H. Alexandre, Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts, *Food Microbiol.* 32 (2012) 243–253.
- [18] S. Sethi, R. Nanda, T. Chakraborty, Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases, *Clin. Microbiol. Rev.* 26 (2013) 462–475.

- [19] P. Martinez-Lozano Sinues, E. Landoni, R. Miceli, V.F. Dibari, M. Dugo, R. Agresti, E. Tagliabue, S. Cristoni, R. Orlandi, Secondary electrospray ionization-mass spectrometry and a novel statistical bioinformatic approach identifies a cancer-related profile in exhaled breath of breast cancer patients: a pilot study, *J. Breath Res.* 9 (2015) 031001.
- [20] A.B. DeMilo, C.-J. Lee, D.S. Moreno, A.J. Martinez, Identification of volatiles derived from *Citrobacter freundii* fermentation of a trypticase soy broth, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 607–612.
- [21] K. Berrou, C. Dunyach-Remy, J.-P. Lavigne, B. Roig, A. Cadiere, Multiple stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a tentative identification of bacterial volatile and/or semi-volatile metabolites, *Talanta*. (2018).
- [22] J. Mesureur, S. Ranaldi, V. Monnin, V. Girard, S. Arend, M. Welker, D. O’Callaghan, J.-P. Lavigne, A. Keriél, A simple and safe protocol for preparing *Brucella* samples for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry analysis, *J. Clin. Microbiol.* 54 (2016) 449–452.
- [23] H. Van Den Dool, P.D. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography, *J. Chromatogr. A*. 11 (1963) 463–471.
- [24] I.-Y. Eom, S. Risticovic, J. Pawliszyn, Simultaneous sampling and analysis of indoor air infested with *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae) by solid phase microextraction, thin film microextraction and needle trap device, *Anal. Chim. Acta*. 716 (2012) 2–10.
- [25] N. Ochiai, K. Sasamoto, T. Ieda, F. David, P. Sandra, Multi-stir bar sorptive extraction for analysis of odor compounds in aqueous samples, *J. Chromatogr. A*. 1315 (2013) 70–79.
- [26] Q. Ye, D. Zheng, L. Liu, L. Hong, Rapid analysis of aldehydes by simultaneous microextraction and derivatization followed by GC-MS, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1607–1612.
- [27] J.M. Scotter, R.A. Allardyce, V.S. Langford, A. Hill, D.R. Murdoch, The rapid evaluation of bacterial growth in blood cultures by selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS) and comparison with the BacT/ALERT automated blood culture system, *J. Microbiol. Methods*. 65 (2006) 628–631.
- [28] J. Zhu, H.D. Bean, Y.-M. Kuo, J.E. Hill, Fast detection of volatile organic compounds from bacterial cultures by secondary electrospray ionization-mass spectrometry, *J. Clin. Microbiol.* 48 (2010) 4426–4431.
- [29] M. Jünger, W. Vautz, M. Kuhns, L. Hofmann, S. Ulbricht, J.I. Baumbach, M. Quintel, T. Perl, Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: a new identification tool for human pathogenic bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 2603–2614.
- [30] R.M.S. Thorn, D.M. Reynolds, J. Greenman, Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains in vitro, *J. Microbiol. Methods*. 84 (2011) 258–264.
- [31] M.E. Dolch, C. Hornuss, C. Klocke, S. Praun, J. Villinger, W. Denzer, G. Schelling, S. Schubert, Volatile organic compound analysis by ion molecule reaction mass spectrometry for Gram-positive bacteria differentiation, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (2012) 3007–3013.
- [32] R.A. Allardyce, A.L. Hill, D.R. Murdoch, The rapid evaluation of bacterial growth and antibiotic susceptibility in blood cultures by selected ion flow tube mass spectrometry, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 55 (2006) 255–261.
- [33] M.K. Storer, K. Hibbard-Melles, B. Davis, J. Scotter, Detection of volatile compounds produced by microbial growth in urine by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), *J. Microbiol. Methods*. 87 (2011) 111–113.

5.3 Conclusion

La SPME ainsi que la SBSE ont été développées dans le but d'améliorer l'analyse de molécules en la rendant plus rapide, plus aisée à mettre en œuvre et plus sensible. Lors de cette étude, ces deux techniques ont été utilisées pour identifier des métabolites bactériens. Douze réplicats indépendants ont été réalisés pour une identification statistiquement fiable. Nous avons alors démontré l'intérêt de la SBSE qui a permis de retrouver près de 90% des composés identifiés. De plus, il apparaît que la méthode appliquée a permis d'identifier de nouveaux composés, encore jamais décrits comme étant produits par *S. aureus*.

Enfin, chacune de ces techniques présente de nombreux avantages mais aussi quelques inconvénients qui sont listés dans le Tableau IX, avec les facteurs pouvant influencer l'extraction ou la désorption des fibres ou des barreaux.

Tableau IX: Caractéristiques des techniques d'extraction sur phase.

	SPME	SBSE
Phases disponibles	7	2
Réutilisation	50 à 100 (selon application)	50 à 100 (selon application)
Volume de phase	0,5 µL	55 à 219 µL (selon la taille du barreau)
Concentrations minimales détectées	De l'ordre du ng.L ⁻¹	Inférieure au ng.L ⁻¹ (Baltussen et al., 1999)
Avantages	• Pas de préparation d'échantillon (Arthur and Pawliszyn, 1990) • Solvent-free • Automatisable • Faible coût • Fiabilité accrue de l'échantillonnage (Ulrich, 2000) • Conservation de la structure moléculaire de l'analyte • Limite les interférences avec les molécules non-volatiles de l'échantillon • Dérivatisation possible	• Meilleure sensibilité qu'en SPME (×500) (Baltussen et al., 1999) → Rétention des analytes dans l'ensemble de la masse du barreau • Solvent-free • Faible coût • Détection simple de fragments caractéristiques de chaque phase : → Siloxane pour PDMS et polyéthylène glycol / éther couronne / dioxalane pour EGS • Faible perte de composés thermosensibles : → Possibilité de désorption à de faibles températures • Dérivatisation possible
Inconvénients	• Fragilité des fibres : → Détérioration à des températures élevées • Diminution de la reproductibilité en passant de l'extraction headspace à liquide : → A cause de la présence de sels, du pH, de solvants... (Burgot and Pellerin, 2003)	• Usage limité du barreau EGS en liquide : → Dégradation de la phase (Ochiai et al., 2013) • Moins efficace en désorption chimique
Paramètres affectants l'extraction ou la désorption	• Type de phase • Diamètre de la fibre • Temps d'extraction • Température d'extraction • Vitesse d'agitation	• Type de phase • Temps d'extraction • Présence de NaCl : → Améliore la récupération de composés polaires (Ochiai et al., 2006; Quintana et al., 2007) → Diminue la récupération des composés apolaires (Chaves et al., 2007; Huertas et al., 2007) • Présence de solvant organique : → Minimise les pertes d'analytes hydrophobes (Brossa et al., 2004; Kolahgar et al., 2002; Prieto et al., 2007) → Diminue l'efficacité de l'extraction pour les composés polaires (Macnamara et al., 2009) • Vitesse d'agitation : → Recommandée entre 500 et 800 tour.min⁻¹ (Quintana et al., 2007; Yu et al., 2009) → Si plus élevée, usure précoce (Yu and Hu, 2009) • Temps et température de désorption (Prieto et al., 2007; Sánchez-Avila et al., 2010)

CHAPITRE 3 : APPLICATION *IN VITRO* A UN MODELE DE PLAIE CHRONIQUE

Au niveau d'une plaie chronique de pied diabétique, de nombreuses espèces bactériennes peuvent former un microbiote complexe dans lequel certains micro-organismes contribuent à la persistance de la lésion et à son évolution, passant de plaie colonisée (grade 1) à plaie infectée (grade 2). Les méthodes développées dans les deux premières publications ont mis en évidence la pertinence de la SBSE pour l'extraction et la concentration des métabolites volatils et semi-volatils bactériens, ainsi qu'une méthode d'analyse statistique permettant de distinguer spécifiquement les métabolites produits. Toutefois, jusqu'alors, ces développements ont été effectués sur un milieu de culture classique de laboratoire (milieu LB). Cette étape préliminaire fera l'objet de la première partie de ce chapitre, et ne prend pas part à la publication que nous avons souhaité orienter vers l'application au diagnostic.

En effet, pour se rapprocher des conditions d'une plaie, un milieu appelé WLM (Wound Like Medium) adapté de la publication de DeLeon *et al.* (2014) a été utilisé. Ce milieu mime l'environnement d'une plaie et permet la culture simultanée de plusieurs micro-organismes. Il constitue un modèle *in vitro* proche des conditions retrouvées dans une colonisation ou une infection de pied diabétique.

Par conséquent, dans cette publication, nous avons premièrement défini les temps de culture adaptés à l'extraction SBSE/HSSE en milieu WLM pour chacune des bactéries. Puis, dans un second temps, nous avons identifié, après analyse par GC-MS, les métabolites volatils produits par ces cinq espèces bactériennes fréquemment retrouvées dans des plaies chroniques (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *P. mirabilis*). Ensuite, un travail en co-culture a été réalisé avec trois souches de bactéries des espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* dans le but d'évaluer la capacité de cette méthode à retrouver les métabolites volatils et semi-volatils produit par chaque bactérie dans un mélange complexe. De plus, ce travail donne des premiers éléments pour valider si l'approche développée est potentiellement applicable au niveau des plaies chroniques, et si elle permettrait un suivi de l'évolution de la plaie de colonisation à infection.

Dans un dernier temps, nous avons comparé les résultats obtenus avec les deux conditions de culture (LB et WLM) afin de déterminer quels sont les métabolites dont la production ne dépend pas des conditions de culture.

6.1 Volatils et semi-volatils produits par les six souches en milieu LB

Pour ces six souches bactériennes (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* CC45, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *P. mirabilis*), une analyse des composés volatils microbiens (MVCs) a été réalisée sur un milieu LB dans des conditions similaires à celles décrites p. 94-95. Le suivi de la croissance de ces bactéries a été effectué par comptage au Coulter Counter (Beckman) comme décrit p. 94 (Figure 11).

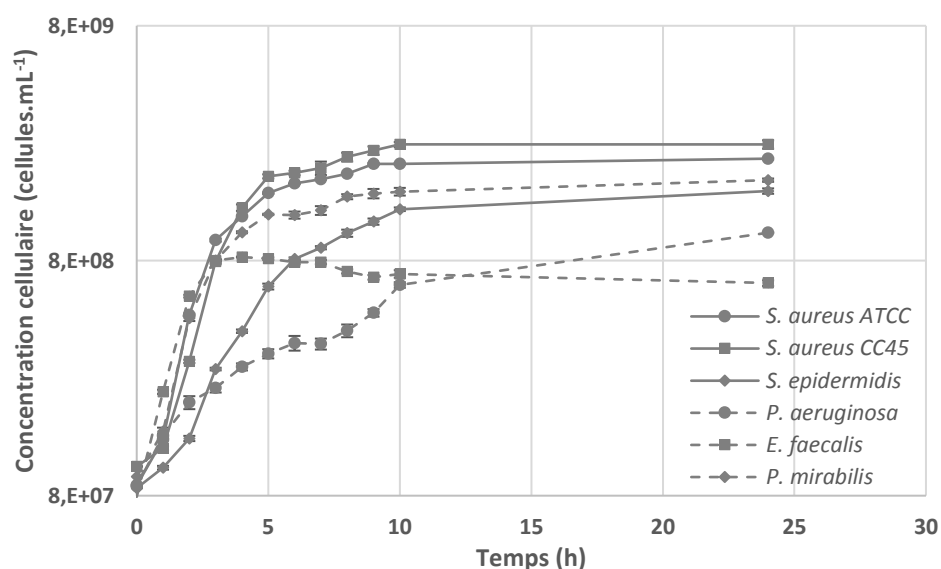


Figure 11 : Croissance bactérienne en milieu LB.

Les phases exponentielles et stationnaires sont atteintes en quelques heures, les extractions des MVCs ont été effectuées dès le début de la culture ($t = 0h$) et pendant 6 h, ce qui correspond à l'ensemble de la phase de croissance des bactéries. Ensuite, après une extraction simultanée par SBSE/HSSE et une analyse par GC-MS, 53 volatils différents ont été identifiés comme étant produits par au moins une des six souches étudiées (Tableau X).

Tableau X : Analyse GC-MS des métabolites volatils bactériens produits par plusieurs souches cliniques en milieu LB et extraits par SBSE/HSSE.

Volatile compounds	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i> CC45	<i>S.</i> <i>epidermidis</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>P.</i> <i>mirabilis</i>
(2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol	X	X			X	X
(E)-5-methyl-2-phenylhex-2-enal	X		X	X	X	
(E)-dodec-8-en-1-ol						X
(methyl-disulfanyl)methane	X					X
(methyltrisulfanyl)methane			X			X
1-(1,3-thiazol-2-yl)ethanone	X					
1,3,5,7-Tetraazatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decane	X	X	X	X		
1,4-xylene	X					
1H-indole	X		X	X	X	
1-phenylethanone	X	X	X	X		X
2,3,5-trimethyl-6-(3-methylbutyl)pyrazine	X					
2,3,5-trimethylpyrazine	X					
2,4-dimethylquinazoline		X	X	X	X	
2,5-dimethylpyrazine		X				
2,6-diethylpyrazine		X				
2-ethyl-6-methylpyrazine	X					
2-ethylhexan-1-ol			X		X	
2-hydroxybenzaldehyde		X				
2-methyl-5-propan-2-ylpyrazine		X				
2-phenylethanol					X	X
2-phenylpyrimidine			X			
3,5-diethyl-2-methylpyrazine		X				
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine		X				
3-methylbutan-1-ol		X				X
3-methylbutanoic acid	X	X	X		X	X
3-methylsulfanylpropan-1-ol						X
3-phenylfuran	X		X	X	X	
3-phenylpyridine			X			
4,6-dimethylheptan-2-one			X	X	X	
4-methylheptan-2-one			X			
4-methylquinazoline				X		X
4-methylquinoline			X			
5-hexyloxolan-2-one					X	
acetic acid	X	X			X	X
dec-9-en-1-ol						X
decan-1-ol					X	X
decanoic acid					X	
diphenylmethanone				X		
dodecan-1-ol						X
ethanol				X	X	
isoquinoline-1-carbonitrile		X				
nonan-1-ol						X
nonan-4-one				X		
octan-1-ol						X
phenol		X		X		
phenylmethanol		X		X	X	X
quinoline		X				
tetradecan-1-ol						X
tridecan-2-one				X		
undec-1-ene				X		
undecan-1-ol						X
undecan-2-one				X		
undecan-4-one				X		
53	14	17	14	17	15	19

**Publication n°4 : Application of stir bar sorptive
extraction for the determination of volatile and semi-
volatile bacterial profiles using *in vitro* model of
chronic wound**

Article en préparation

Application of stir bar sorptive extraction for the determination of volatile and semi-volatile bacterial profiles using *in vitro* model of chronic wound

Kevin Berrou^a, Catherine Dunyach-Remy^{b,c}, Isabelle Sanchez^d, Jean-Philippe Lavigne^{b,c}, Benoit Roig^a, Axelle Cadierne^{a,*}

^a Univ. Nîmes, EA7352 CHROME, Rue du Dr G. Salan, 30021, Nîmes Cedex 1, France.

^b Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1047, Université Montpellier, UFR de Médecine, 30908 Nîmes Cedex 02, France.

^c Service de Microbiologie, CHU Nîmes, 30029 Nîmes Cedex 09, France.

^d INRA, Centre de Recherche de Montpellier – UMR MISTEA : 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France.

Abstract

This study focused on the establishment of the volatile and semi-volatile metabolic profile by SBSE-GC-MS of five clinical bacterial species cultivated in a medium mimic the environment of a chronic wound in monocultures and co-cultures. The specific production of microbial volatile compounds (MVCs) allowed the determination of distinctive profiles for each of these strains. Moreover, this technique is a powerful tool because it has allowed to distinguish not only bacteria of the same genus (*S. aureus* and *S. epidermidis*) but also of the same species but with different virulence profiles (*S. aureus* ATCC and CC45). The application of this method to a co-culture of three *Staphylococcus* showed that 83% of the MVCs identified in monocultures were also found in co-culture, thus demonstrating the relevance of this approach to differentiate bacteria from a complex mixture. With this study, we are therefore confirming that SBSE is a promising tool for the detection and monitoring of infections that can affect chronic wounds and a potential way to distinguish bacteria involved in colonization and in infection.

Keywords: Gas chromatography-mass spectrometry, Stir bar sorptive extraction, Bacterial metabolite analysis, Wound like model, Microbial volatile compounds, Clinical bacterial strains, Chronic wound

1. Introduction

Chronic wounds and particularly diabetic foot ulcers, are a major health problem [1]. The prevalence in diabetic patients is 25% [2–4] and in 40 to 80% of these cases, these lesions can lead to infection [5]. The polymicrobial nature of these chronic wounds [6] and the variable clinical signs [7] make the identification of infection challenging. Nowadays, the microbial diagnostic tool available is the conventional clinical culture [1], with all the limitations characteristic to its practice (time consuming, low sensitivity, ...). As a result, effective strategies for the microbiota analysis are still lacking. It is then reasonable to believe that improved microbial detection and identification methods could further assist the clinician in dealing with this important health issue.

One of the approaches used for the identification of bacteria is based on the detection of specific volatile metabolites [8,9]. Indeed, the microbial volatile compounds (MVCs) can play a key role in communication between microorganisms [10,11]. For example, the production of 2,3-butanedione and glyoxylic acid by *Bacillus subtilis* induce a modulation of the gene expression involved in the mobility and the antibiotic resistance of *Escherichia coli* [12]. Moreover, MVCs can be specifically produced by a bacterium leading to their used for diagnosis : for example for hydrogen cyanide, the methylthiocyanate, the 2-nonanone, the 2,4-dimethyl-1-heptene and the 2-aminoacetophenone produced by *Pseudomonas aeruginosa* [13–16] for respiratory infections diagnostic or p-menth-1-en-8-ol specifically produced by *Vibrio cholerae* [17] for the diagnosis of the gastrointestinal infections.

Detection and identification of MVCs represents a simple, sensitive and non-

invasive method for diagnostic [18,19]. However, a major drawback remains the quantity of the metabolites produced by the microorganisms. Indeed, under wound conditions, bacteria may be present in small quantities with a low concentration of volatile compounds and it is therefore necessary to concentrate them to improve their detection. The development of support coating to carry out a solid-phase microextraction (SPME) allowed to concentrate volatile compounds such as drugs from biological samples [19,20] or to recover MVCs from breath samples [21]. However, yield of concentration remains limited for particular samples (such as wound of diabetic patient) because of small surface of capture and time required for the capture [22]. In previous work, a method based on the extraction of MVCs using simultaneously the stir bar sorptive extraction (SBSE) and the headspace sorptive extraction (HSSE) [23] was developed. The comparison with SPME have highlighted a better capability of extraction over a longer period of time and higher potential of extraction of lower concentrated compounds [24].

Thus, in this study, we proposed the application of the SBSE/HSSE method for the detection of MVCs of five clinical strains found in chronic wounds. To be closer to the conditions of an *in vitro* wound, a culture medium called wound like medium (WLM) has been used [25].

The profile of MVCs of each clinical strain was first determined on the *in vitro* wound model described by DeLeon et al, 2014. Second, the method was applied to a WLM co-culture of three strains of *Staphylococcus* (*S. aureus* ATCC, *S. aureus* CC45 and *S. epidermidis*) to assess their identification ability in relation to the overall MVC profile.

2. Material and methods

2.1. Materials

SBSE and HSSE extractions were performed with 10 mm twister® magnetic stir bars coated with polydimethylsiloxane (PDMS) or ethylene glycol / silicone (EGS) (both 0.5 mm film thickness). Stir bars were obtained from Gerstel and were conditioned prior to use according to the manufacturer's instructions. A standard mixture containing linear alkanes from C7 to C40 from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA) was used to evaluate the linear retention index (LRI).

2.2. Culture conditions and monitoring of bacterial growth

The strain used in this study and kindly provided by CHU of Nîmes are *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [26] (a reference strain considered as a colonizing bacterium in wounds), *Staphylococcus aureus* CC45 (an infecting strain found in a grade 3 diabetic foot wound), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Proteus mirabilis*. Except *S. aureus* ATCC, the other strains were isolated from clinical sample.

Two growth media were used: the Luria Bertani (LB) composed with tryptone (Fluka, Saint-Louis, USA), yeast extract (Amresco, Solon, USA) and sodium salt (Panreac, Barcelona, Spain), and the wound-like medium (WLM) composed with 45% Bolton broth (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), 50% bovine serum (Eurobio, Montpellier, France) and 5% lacked horse red blood cells (Eurobio, Montpellier, France). The WLM medium was optimized with the use of bovine serum instead of plasma as suggested by DeLeon et al., 2014 to avoid coagulation problems.

The strains were maintained as frozen stock on Microbank™ bead (Pro-Lab Diagnostic, Richmond Hill, Canada) at -80°C, and cultivated overnight onto LB medium at 37°C with shaking at 210 rpm. Six replicates were performed for each strain in sterile 20 mL glass vials sealed with PTFE/Silicone screw caps (Agilent, Santa-Clara, USA), culture conditions limiting oxygen supply. Each vial containing a magnetic stirrer and 10 mL of WLM were inoculated at 0.1 uDO.mL⁻¹ and placed at 37°C under shaking at 600 rpm. For co-cultures, two vials containing a magnetic stirrer and 10 mL of WLM were inoculated in the same proportions (0.1 uDO.mL⁻¹ for each strain) with the three *Staphylococcus* in the same conditions as above.

The monitoring of bacterial growth was performed by using a particle counter (Multisizer 3, Beckman Coulter, Brea, USA). Bacterial cultures samples were diluted in ISOTONE® II (Beckman Coulter, Brea, USA) to obtain concentrations below 5.10⁵ cells.mL⁻¹. An aperture probe with a 30 µm orifice was used and the particle counter was calibrated using manufacturer-recommended beads (Coulter CC Size Standard L3, Beckman Coulter, Brea, USA: nominal 3 µm latex beads). The total volume analysed by the particle counter was 100 µL.

For all experiments, a control with WLM medium (6 replicates) was carried out under the same conditions.

2.3. SBSE/HSSE extraction procedure

Magnetic stirrers were removed and twistors were inserted in each vial for a simultaneous extraction in liquid (PDMS) and in headspace (EGS) during 6 h at the end of the exponential growth at 37°C and shaking at 600 rpm. These stir-bars were placed at various times depending of the

bacterial growth. For co-cultures, the same extraction procedure was applied and chosen time was that of the strain with the slowest growth.

After exposure, the stir bars were removed from the bacterial culture. The PDMS twister was rinsed with ultrapure water and blotted with a lint-free tissue before being placed in a glass thermal desorption tube. The EGS twister was directly placed into the same tube for a simultaneous desorption.

To constitute the experimental blank, the same experiments were performed on WLM medium alone (one for each extraction time) as described above. These conditions are defined as control.

2.4. GC-MS analysis

The analytical system was composed of an Agilent 7890B gas chromatograph coupled to an Agilent 5977A mass spectrometer with an MPS autosampler, a thermal desorption unit (TDU) and a cooled injection system (CIS) (Gerstel). The data acquisition software MSD Chemstation F.01.00 (Agilent) was used to program the GC-MS. The gas chromatograph was fitted with a VF-WAXms fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, Agilent) and was used with helium as carrier gas at 0.8 mL.min⁻¹. To thermally desorb the tube, the initial TDU temperature was set to 40°C and then heated to 220°C (suitable temperature for both bars, recommended by the supplier) at 50°C.min⁻¹ and held for 3 min. After desorption, volatile compounds were focalized on the CIS at -10°C during 1 min, ramped to 250°C at a heating rate of 12°C per second, and finally held for 2.5 min in solvent vent with a purge flow to split vent of 20 mL.min⁻¹ at 3 min. The column temperature was initially kept at 40°C for 7 min and then

increased from 40 to 240° C at 8°C.min⁻¹, the temperature was maintained during 3 min. Then the sample was introduced into the ion source of the Agilent 5977A mass spectrometer. The transfer line temperature was set at 250°C and ion source temperature at 230°C. Ions were generated by a 70eV electron beam. Masses were acquired from m/z 33 to 500 amu.

2.5. Data processing and statistical analysis

All peaks were integrated using MassHunter Qualitative Analysis software B.06.00 (Agilent Technologies). This software deconvolutes the chromatograms, separating the co-eluted volatile organic compounds. Compounds were then identified by their mass spectra by using the National Institute of Standard and Technologies (NIST) and the Wiley7 references library.

Compounds identified present in at least 5 out of 6 replicates were conserved for the analysis of pure cultures. For co-cultures, only the compounds found in the two replicates were conserved. Compounds identified in the controls were not considered.

For each compound available in databases, the LRI was determined using the one previously obtained on a polar column, as described by Van Den Dool and Kratz [27]. A maximum relative deviation of 2.5% from literature values was tolerated to identify volatile compounds.

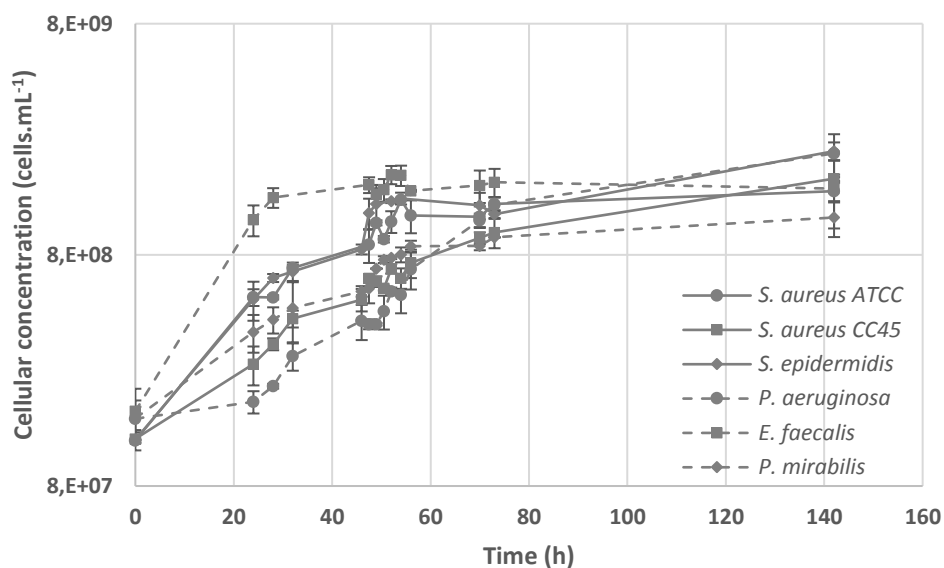


Figure 1. Bacterial growth in WLM medium.

Statistical analysis and metabolic network were performed using RStudio software with specific packages: igraph, dplyr, tidyr, ggplot2, FactoMineR and raster.

For co-cultures, the extraction time chosen was 64-70 hours as it corresponds to the growth of the slowest strain (*S. aureus* CC45).

3. Results and discussion

3.1. Monitoring of bacterial growth

Growth in WLM medium of the five bacteria strains was monitored (Fig. 1). Based on such curves and on our previous works [23], time to start the extraction was identified (for a total duration of 6 hours) as shown in Table 1.

Table 1

Starting time for extraction of MVCs from each strain.

Strain	Extraction starting time
<i>E. faecalis</i>	24-30h
<i>S. aureus</i> ATCC, <i>S. epidermidis</i> and <i>P. mirabilis</i>	48-54h
<i>S. aureus</i> CC45 and <i>P. aeruginosa</i>	64-70h

3.2. Statistical analysis to identify produced compounds

To identify volatile/semi-volatile metabolites produced by bacteria, the statistical methodology described in a previous study [24] was used (Fig. 2).

The process was applied on the compounds identified (using mass spectra and LRI after comparison with NIST Webbook) in at least 5 out of 6 replicates (LRI comparison available in Supplement Table S1). The areas of the chromatographic peaks found both in bacterial cultures and controls were compared. An Anova test was then performed to statistically discriminate if the detected compounds were produced, consumed or did not show any variation. Compounds only identified in bacterial

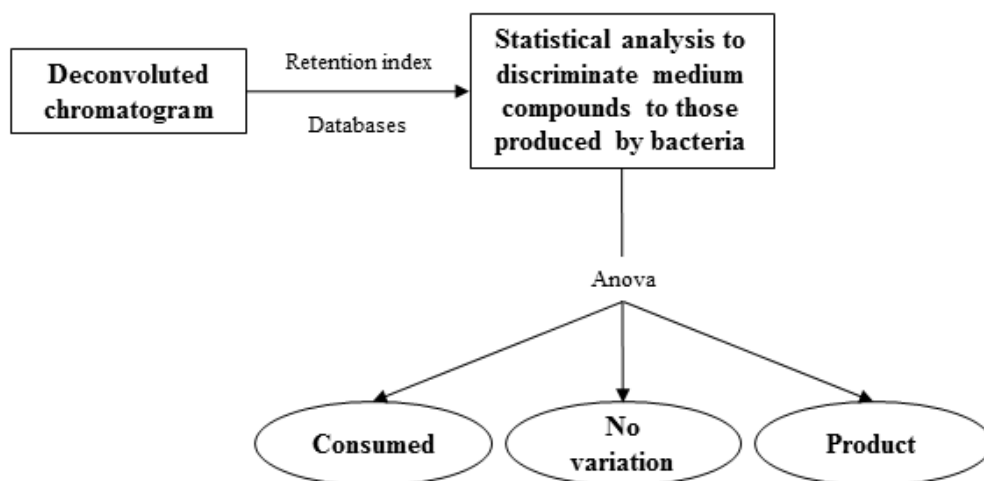


Figure 2. Statistical methodology to clearly identify microbial volatile and semi-volatile compounds produced by bacteria.

cultures were considered as produced MVCs.

By applying this statistical methodology with an Anova test, p-values were calculated for the six strains (Tab. 2). On this table, only compounds showing an increase in their area between the control and the bacterial culture were statistically evaluated. Only MVCs showing significant increase of their area were conserved for the determination of metabolic profile of the bacteria.

3.3. Microbial volatile identification in a wound environment

Following the GC-MS analysis and statistical treatment, 65 volatile bacterial metabolites could be identified as being produced by at least one of the six strains studied (Supplement Table S2), with a large variation in the number of compounds found (between 12 and 27 volatile compounds identified depending on the strain). To clearly identify specific metabolites from each strain, the detected

compounds were linked as a metabolic network (Fig. 3).

This representation highlights the volatile metabolites common to several strains or specific to each bacterium: 2 for *S. aureus* ATCC, 2 for *S. aureus* CC45, 7 for *S. epidermidis*, 12 for *P. aeruginosa*, 6 for *E. faecalis* and 7 for *P. mirabilis*.

In addition, different profiles for each of the three strains of *Staphylococcus* was obtained showing the potential of the SBSE/HSSE approach to differentiate not only bacterial genus, but also bacterial species.

Finally, the results demonstrate the ability to specifically make the difference between two similar strains varying only by their virulence. Indeed, *S. aureus* ATCC is a reference strain considered as colonizing wounds, whereas *S. aureus* CC45 is an infective clinical strain found in infected chronic wound. Figure 3 shows clearly the identification of strains specific metabolites.

Table 2.

Statistical comparison by an Anova analysis of the compounds identified in bacterial cultures and control.

Identified microbial volatile compounds	p-values					
	<i>S. aureus</i> ATCC vs control	<i>S. aureus</i> CC45 vs control	<i>S. epidermidis</i> vs control	<i>P. aeruginosa</i> vs control	<i>E. faecalis</i> vs control	<i>P. mirabilis</i> vs control
2,6,6-trimethylcyclohexene-1-carbaldehyde			6.20×10^{-1}		$4.19 \times 10^{-4} *$	
2-ethylhexan-1-ol		$1.11 \times 10^{-3} *$	$5.88 \times 10^{-5} *$			1.72×10^{-1}
oct-1-en-3-ol			$1.79 \times 10^{-2} *$		$5.77 \times 10^{-5} *$	
4,4,7a-trimethyl-6,7-dihydro-5H-1-benzofuran-2-one			1.23×10^{-1}			
2_6-di(propan-2-yl)naphthalene		7.85×10^{-1}	$8.16 \times 10^{-3} *$	1.15×10^{-1}		
4-(1,5,5-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-6-yl)but-3-en-2-one			3.53×10^{-1}			
tridecan-3-one			$2.31 \times 10^{-2} *$			
quinoline-4-carbaldehyde		$3.30 \times 10^{-2} *$				
(5Z)-6_10-dimethylundeca-5_9-dien-2-one			$8.58 \times 10^{-3} *$		1.68×10^{-1}	
acetic acid		$6.93 \times 10^{-6} *$				
1-phenylethanone		5.06×10^{-1}		$3.36 \times 10^{-2} *$		
1_3-ditert-butylbenzene		$1.47 \times 10^{-6} *$	8.46×10^{-1}	$5.80 \times 10^{-4} *$		
diphenylmethanone		$1.27 \times 10^{-2} *$	$2.03 \times 10^{-3} *$			$2.35 \times 10^{-6} *$
phenylmethanol			$5.47 \times 10^{-5} *$		$8.81 \times 10^{-4} *$	$7.98 \times 10^{-7} *$
4_7_7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-3-one		5.76×10^{-1}	$7.99 \times 10^{-5} *$		4.13×10^{-1}	
decane		5.58×10^{-1}	$1.81 \times 10^{-6} *$			
dodecane		6.94×10^{-1}			4.62×10^{-1}	
2-pentylfuran			5.63×10^{-1}			
1H-indole		$5.63 \times 10^{-3} *$	1.85×10^{-1}	$1.69 \times 10^{-2} *$		$3.14 \times 10^{-2} *$
2,5-dimethylpyrazine			5.40×10^{-1}			
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine			6.57×10^{-1}		9.34×10^{-1}	
5-methyl-2-phenylpyrimidine		2.67×10^{-1}	$4.09 \times 10^{-2} *$	$2.80 \times 10^{-3} *$		3.04×10^{-1}
4-methylquinazoline			2.29×10^{-1}	$1.17 \times 10^{-3} *$		
quinoline			$1.83 \times 10^{-4} *$			
4-methylquinoline			$3.09 \times 10^{-2} *$	$3.24 \times 10^{-2} *$		
(E)-4-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)but-3-en-2-one			5.67×10^{-1}			

Significant differences are indicated by a star (*).

3.4. Co-cultures

The SBSE/HSSE was applied to co-culture experiment in order to evaluate the potential of identification of bacteria in more complex samples. The detection of specific volatile metabolites to each strain in a mixture could help to follow the evolution of wounds from colonization to infection.

In this work, co-culture was performed in duplicate with three strains of

Staphylococcus, two of which are *S. aureus* with different virulence. Thirty two volatile or semi-volatile compounds were identified and among them 29 are similar to MVCs found in the monocultures which represents 83% of similarity (detailed list of identified compounds in supplement table S3). The remaining three compounds were potential new MVCs (1-isocyano-3-methylbenzene, 2,6-ditert-butyl-4-chlorophenol and 1-(4,6,8-trimethylazulen-1-yl)ethanone),

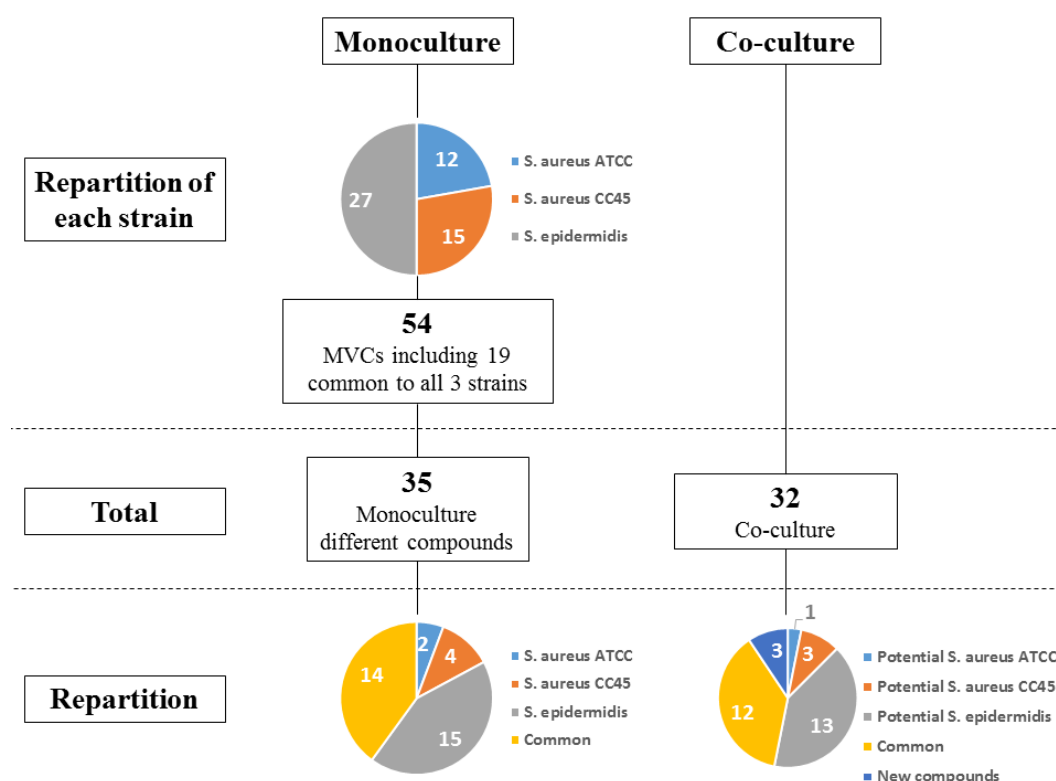


Figure 4. Comparison of MVCs produced by three species of *Staphylococcus* in monocultures and co-cultures.

of MVCs produced by bacteria cultivated in a WLM medium, designed to mimic wound conditions. These experiments were performed in mono and co-culture to evaluate the effectiveness of this approach. In monocultures, 65 MVCs were detected, 36 of which were strain-specific leading the possibility to identify each strain from the volatile and semi-volatile metabolites they produce. However, many studies have shown that chronic wound infections are polymicrobial. We therefore evaluated the production and the possibility of distinguishing several strains of the same genus in co-culture. Three *Staphylococcus* strains were studied in co-culture. Thirty-two compounds were produced by at least one of these three bacteria and 29 were common to metabolites found in monoculture (for a similarity of 83%). This high similarity between monoculture and co-culture proves the robustness of the

method. Indeed, even in a complex bacterial mixture, most of the volatiles identified in monoculture could be recovered, demonstrating their potential as biomarkers in chronic wounds. A strategy for identifying bacteria present in chronic wounds could then be to develop a non-invasive device adapted to the wound to capture the volatile molecules emitted. If bacterial concentrations were then too low for accurate identification, another way would be to collect a biological sample (*e.g.* a biopsy) and perform pre-enrichment in the WLM before concentrating the volatile compounds present by a coupled SBSE/HSSE method. The bacteria present could then be identified through a unique combination of volatile metabolites specific to each strain.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The U1047 team belongs to the FHU InCh and is supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Nîmes métropole.

References

- [1] D.D. Rhoads, R.D. Wolcott, Y. Sun, S.E. Dowd, Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 2535–2550.
- [2] N. Messad, L. Landraud, B. Canivet, G. Lina, J.-L. Richard, A. Sotto, J.-P. Lavigne, E. Lemichez, French Study Group on the Diabetic Foot, Distribution of *edn* in *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers, *Clin. Microbiol. Infect.* 19 (2013) 875–880.
- [3] E. Senneville, M. Brière, C. Neut, N. Messad, G. Lina, J.-L. Richard, A. Sotto, J.-P. Lavigne, The French Study Group on the Diabetic Foot, First report of the predominance of clonal complex 398 *Staphylococcus aureus* strains in osteomyelitis complicating diabetic foot ulcers: a national French study, *Clin Microbiol Infect.* 20 (2014) O274–O277.
- [4] N. Singh, D.G. Armstrong, B.A. Lipsky, Preventing foot ulcers in patients with diabetes, *JAMA.* 293 (2005) 217–228.
- [5] A. Sotto, J.-L. Richard, N. Jourdan, C. Combescure, N. Bouziges, J.-P. Lavigne, Nîmes University Hospital Working Group on the Diabetic Foot (GP30), Miniaturized oligonucleotide arrays: a new tool for discriminating colonization from infection due to *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers, *Diabetes Care.* 30 (2007) 2051–2056.
- [6] R.D. Wolcott, J.D. Hanson, E.J. Rees, L.D. Koenig, C.D. Phillips, R.A. Wolcott, S.B. Cox, J.S. White, Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing, *Wound Repair Regen.* (2016).
- [7] B.A. Lipsky, A.R. Berendt, J. Embil, F. De Lalla, Diagnosing and treating diabetic foot infections, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 20 Suppl 1 (2004) S56–64.
- [8] L.D.J. Bos, P.J. Sterk, M.J. Schultz, Volatile metabolites of pathogens: a systematic review, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003311.
- [9] S. Sethi, R. Nanda, T. Chakraborty, Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases, *Clin. Microbiol. Rev.* 26 (2013) 462–475.
- [10] S.E. Jones, M.A. Elliot, *Streptomyces* Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours, *Trends Microbiol.* 25 (2017) 522–531.
- [11] M.A. Farag, H. Zhang, C.-M. Ryu, Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles, *J. Chem. Ecol.* 39 (2013) 1007–1018.
- [12] K. Kim, S. Lee, C.-M. Ryu, Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance, *Nature Communications.* 4 (2013) 1809.
- [13] B. Enderby, D. Smith, W. Carroll, W. Lenney, Hydrogen cyanide as a biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the breath of children with cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.* 44 (2009) 142–147.
- [14] V. Shestivska, A. Nemec, P. Dřevínek, K. Sovová, K. Dryahina, P. Španěl, Quantification of methyl thiocyanate in the headspace of *Pseudomonas aeruginosa* cultures and in the breath of cystic fibrosis patients by selected ion flow tube mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 2459–2467.
- [15] A.J. Scott-Thomas, M. Syhre, P.K. Pattemore, M. Epton, R. Laing, J. Pearson, S.T. Chambers, 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung, *BMC Pulm. Med.* 10 (2010) 56.
- [16] S.U. Savelev, J.D. Perry, S.J. Bourke, H. Jary, R. Taylor, A.J. Fisher, P.A. Corris, M. Petrie, A. De Soya, Volatile biomarkers of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and noncystic fibrosis bronchiectasis, *Lett. Appl. Microbiol.* 52 (2011) 610–613.
- [17] C.E. Garner, S. Smith, P.K. Bardhan, N.M. Ratcliffe, C.S.J. Probert, A pilot study of faecal volatile organic compounds in faeces from cholera patients in Bangladesh to determine their utility in disease diagnosis, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103 (2009) 1171–1173.
- [18] B. Bojko, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, M. Wasowicz, Solid-phase microextraction. How far

are we from clinical practice?, Trends Anal. Chem. 30 (2011) 1505–1512.

[19] H. Kataoka, SPME techniques for biomedical analysis, Bioanalysis. 7 (2015) 2135–2144.

[20] N.H. Snow, Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices, J. Chromatogr. A. 885 (2000) 445–455.

[21] A.H. Neerincx, B.P. Geurts, J. van Loon, V. Tiemes, J.J. Jansen, F.J.M. Harren, L.A.J. Kluijtmans, P.J.F.M. Merkus, S.M. Cristescu, L.M.C. Buydens, R.A. Wevers, Detection of Staphylococcus aureus in cystic fibrosis patients using breath VOC profiles, J. Breath Res. 10 (2016) 046014.

[22] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, J. Microcolumn Sep. 11 (1999) 737–747.

[23] K. Berrou, C. Dunyach-Remy, J.-P. Lavigne, B. Roig, A. Cadere, Multiple stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a tentative identification of bacterial volatile and/or semi-volatile metabolites, Talanta. 195 (2018) 245–250.

[24] K. Berrou, C. Dunyach-Remy, J.-P. Lavigne, B. Roig, A. Cadere, Comparison of stir bar sorptive extraction and solid phase micro-extraction for determining volatile and/or semi-volatile metabolite profile of Staphylococcus aureus, J. Chromatogr. A (submitted). (2019).

[25] S. DeLeon, A. Clinton, H. Fowler, J. Everett, A.R. Horswill, K.P. Rumbaugh, Synergistic interactions of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in an in vitro wound model, Infect. Immun. 82 (2014) 4718–4728.

[26] J. Mesureur, S. Ranaldi, V. Monnin, V. Girard, S. Arend, M. Welker, D. O'Callaghan, J.-P. Lavigne, A. Keriell, A simple and safe protocol for preparing Brucella samples for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry analysis, J. Clin. Microbiol. 54 (2016) 449–452.

[27] H. Van Den Dool, P.D. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography, J. Chromatogr. A. 11 (1963) 463–471.

6.3 Supplementary material

Supplement Table S1

Comparison between calculated and literature LRI.

Volatile compounds	Calculated LRI	Literature LRI	Volatile compounds	Calculated LRI	Literature LRI
(2E,4E)-deca-2,4-dienal	1817	1800	cyclohexanol	1401	1376
(5Z)-6,10-dimethylundeca-5,9-dien-2-one	1852	1855	decan-1-ol	1755	1714
(methyldisulfanyl)methane	1060	1039	decane	977	1000
(methyltrisulfanyl)methane	1374	1376	diphenylmethanone	2536	2505
1,3-ditert-butylbenzene	1412	1426	dodecan-1-ol	1957	1961
1,7-Dimethylspiro[4.5]decane	1898	na	ethanol	912	940
1-methyl-3-propan-2-ylbenzene	1251	1263	hexadecan-1-ol	2371	2365
1-phenylethanone	1662	1669	hexan-1-ol	1349	1360
1H-imidazole	2226	2200	nonan-1-ol	1650	1643
1H-indole	2476	2446	nonan-2-ol	1503	1521
2,3,5-trimethyl-6-ethylpyrazine	1511	1501	nonan-2-one	1376	1387
2,3,5-Trimethylpyrazine	1411	1408	nonan-4-one	1308	1322
2,6,6-trimethylcyclohexene-1-carbaldehyde	1629	1599	oct-1-en-3-ol	1437	1451
2,6-di(propan-2-yl)naphthalene	2174	2214	octan-1-ol	1549	1558
2,6-diethylpyrazine	1462	1444	octan-2-one	1277	1297
2-ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine	1511	1501	octan-3-one	1242	1240
2-ethyl-5-methylpyrazine	1394	1392	pentadecan-2-ol	2107	2092
2-ethylhexan-1-ol	1475	1484	pentadecan-2-one	2018	2021
2-methylbutanoic acid	1663	1655	phenylmethanol	1879	1880
2-pentylfuran	1209	1217	quinoline	1966	1942
2-phenylethanol	1918	1915	quinoline-4-carbaldehyde	2495	na
3,5-diethyl-2-methylpyrazine	1494	1503	tetradecan-2-one	1871	1874
3-methylbutan-1-ol	1211	1229	tridecan-2-ol	1908	1898
3-methylbutanoic acid	1666	1655	tridecan-2-one	1808	1814
3-methylsulfanylpropan-1-ol	1719	1715	tridecan-3-one	1772	1755
3-phenylpyridine	2270	2243	tridecan-4-ol	1865	na
4,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-3-one	1525	1531	tridecan-4-one	1739	na
4-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-butanone	1840	1854	undec-1-ene	1113	1135
4-methylphenol	2081	2078	undecan-2-ol	1706	1706
4-methylquinazoline	2120	na	undecan-2-one	1591	1598
4-methylquinoline	2146	2108	undecan-4-ol	1666	1672
5-methyl-2-phenylpyrimidine	2339	na	undecan-4-one	1518	1518
acetic acid	1461	1479			

na: not available in the literature

All compounds have a percentage change of less than 2.5% except ethanol. Its identification was therefore verified by the use of a standard.

Supplement Table S2

GC-MS analysis of bacterial volatile metabolites produced by several clinical strains in WLM medium and extracted by SBSE/HSSE.

Volatile compounds	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i> CC45	<i>S.</i> <i>epidermidis</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>P.</i> <i>mirabilis</i>
(2E,4E)-deca-2,4-dienal					X	
(5Z)-6,10-dimethylundeca-5,9-dien-2-one			X			
(methyldisulfanyl)methane						X
(methyltrisulfanyl)methane						X
1,3-ditert-butylbenzene		X		X		
1,7-Dimethylspiro[4.5]decane		X				
1-methyl-3-propan-2-ylbenzene			X		X	
1-phenylethanone			X	X	X	
1H-imidazole				X		
1H-indole		X		X		X
2,3,5-trimethyl-6-ethylpyrazine			X			
2,3,5-Trimethylpyrazine	X		X			
2,6,6-trimethylcyclohexene-1-carbaldehyde					X	
2,6-di(propan-2-yl)naphthalene			X			
2,6-diethylpyrazine			X		X	
2-ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine	X					
2-ethyl-5-methylpyrazine	X	X	X			
2-ethylhexan-1-ol		X	X			
2-methylbutanoic acid	X		X			
2-pentylfuran					X	
2-phenylethanol					X	X
3,5-diethyl-2-methylpyrazine	X					
3-methylbutan-1-ol	X	X				X
3-methylbutanoic acid	X	X				X
3-methylsulfanylpropan-1-ol						X
3-phenylpyridine						X
4,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-3-one			X			
4-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-butanone	X		X			
4-methylphenol					X	
4-methylquinazoline				X		
4-methylquinoline			X	X		
5-methyl-2-phenylpyrimidine			X	X		
acetic acid	X	X	X		X	
cyclohexanol					X	
decan-1-ol						X
decane			X			
diphenylmethanone		X	X			X
dodecan-1-ol						X
ethanol		X	X	X	X	
hexadecan-1-ol						X
hexan-1-ol					X	X
nonan-1-ol					X	
nonan-2-ol				X		
nonan-2-one				X		
nonan-4-one				X		
oct-1-en-3-ol			X		X	
octan-1-ol					X	X
octan-2-one	X	X	X			

octan-3-one	X	X	X			X
pentadecan-2-ol				X		
pentadecan-2-one				X		X
phenylmethanol		X	X		X	X
quinoline			X			
quinoline-4-carbaldehyde		X				
tetradecan-2-one	X	X	X			
tridecan-2-ol				X		X
tridecan-2-one			X	X	X	X
tridecan-3-one			X			
tridecan-4-ol				X		
tridecan-4-one				X		
undec-1-ene				X		
undecan-2-ol				X		
undecan-2-one			X	X		X
undecan-4-ol				X		
undecan-4-one				X		
65	12	15	27	22	17	20

Supplement Table S3

Volatile and semi-volatile compounds extracted by SBSE/HSSE in WLM in monocultures and co-cultures of *Staphylococcus*.

Volatile compounds	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i> CC45	<i>S.</i> <i>epidermidis</i>	Co-culture
(5Z)-6,10-dimethylundeca-5,9-dien-2-one			X	X
1-(4,6,8-trimethylazulen-1-yl)ethanone				X
1,3-ditert-butylbenzene		X		X
1,7-Dimethylspiro[4.5]decane		X		
1H-indole		X		X
1-isocyano-3-methylbenzene				X
1-methyl-3-propan-2-ylbenzene			X	X
1-phenylethanone			X	X
2,3,5-trimethyl-6-ethylpyrazine			X	
2,3,5-Trimethylpyrazine	X		X	
2,6-di(propan-2-yl)naphthalene			X	X
2,6-diethylpyrazine			X	X
2,6-ditert-butyl-4-chlorophenol				X
2-ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine	X			
2-ethyl-5-methylpyrazine	X	X	X	X
2-ethylhexan-1-ol		X	X	X
2-methylbutanoic acid	X		X	X
3,5-diethyl-2-methylpyrazine	X			X
3-methylbutan-1-ol	X	X		X
3-methylbutanoic acid	X	X		X
4-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-butanone	X		X	X
4,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-3-one			X	
4-methylquinoline			X	X
5-methyl-2-phenylpyrimidine			X	X
acetic acid	X	X	X	X
decane			X	X
diphenylmethanone		X	X	X
ethanol		X	X	X
oct-1-en-3-ol			X	X
octan-2-one	X	X	X	X
octan-3-one	X	X	X	X
phenylmethanol		X	X	X
quinoline			X	X
quinoline-4-carbaldehyde		X		
tetradecan-2-one	X	X	X	X
tridecan-2-one			X	X
tridecan-3-one			X	X
undecan-2-one			X	X
38	12	15	27	32

6.4 Comparaison des deux milieux

Les MVCs spécifiques identifiés dans les deux milieux ont été combinés pour obtenir un premier profil métabolique spécifique à chaque souche. La production de certains composés est liée à la fois aux conditions de cultures et à la souche étudiée. En effet, quatre composés (3,5-diethyl-2-methylpyrazine ; quinoline ; 3-phenylpyridine et nonan-1-ol) ont été retrouvés comme étant spécifique d'une souche en LB et d'une autre en WLM (cf Tableau X p. 92-93 et Supplement Table S2 p. 88-89). Par exemple, le nonan-1-ol est produit par *P. mirabilis* en LB tandis qu'il est produit par *E. faecalis* en WLM. Par conséquent, ces molécules ne semblent pas pertinentes comme potentiel biomarqueur.

Afin d'évaluer les composés ayant le plus d'importance dans la détermination de biomarqueurs candidats, les deux milieux ont été comparés (Tableau XI). Cinquante-trois composés différents ont été détectés en LB et 65 en WLM.

Tableau XI : Comparaison des métabolites volatils retrouvés dans les milieux LB et WLM.

	Total compounds	LB compounds	WLM compounds	Compounds common to both media	Common percentage	Compounds common to both media
<i>S. aureus</i> ATCC	26	14	12	3	12%	acetic acid, 2,3,5-trimethylpyrazine, 3-methylbutanoic acid
<i>S. aureus</i> CC45	32	17	15	4	13%	phenylmethanol, acetic acid, 3-methylbutan-1-ol, 3-methylbutanoic acid
<i>S. epidermidis</i>	41	14	27	3	7%	1-phenylethanone, 4-methylquinoline, 2-ethylhexan-1-ol
<i>P. aeruginosa</i>	39	17	22	9	23%	1-phenylethanone, 1H-indole, 4-methylquinazoline, ethanol, nonan-4-one* , tridecan-2-one, undec-1-ene* , undecan-2-one, undecan-4-one*
<i>E. faecalis</i>	32	15	17	4	13%	2-phenylethanol, acetic acid, ethanol, phenylmethanol
<i>P. mirabilis</i>	38	18	20	10	26%	(methyldisulfanyl)methane, (methyltrisulfanyl)methane, 2-phenylethanol, 3-methylbutan-1-ol, 3-methylbutanoic acid, 3-methylsulfanylpropan-1-ol* , decan-1-ol, dodecan-1-ol* , octan-1-ol, phenylmethanol

*En **gras**, les composés uniquement retrouvés dans les deux milieux de culture pour la souche concernée.

Dans le Tableau XI, il est indiqué à la fois le nombre total de composés produit par la bactérie sur les deux milieux de culture (LB et WLM), le nombre de composés identifiés dans chacun de ces milieux et enfin le nombre de composés communs aux deux milieux. En gras, les composés spécifiques d'une souche et retrouvés dans les deux milieux de culture. Par exemple, *S. aureus* ATCC 25923 produit 26 composés, dont seulement trois sont communs au LB et au WLM.

Ces trois composés (acetic acid, 2,3,5-trimethylpyrazine and 3-methylbutanoic acid) représentent alors 12% des MVCs de cette souche. Par conséquent, même si le nombre de métabolites produits par chacune des souches est comparable entre les milieux, le nombre de composés communs entre LB et WLM varie en fonction de la souche considérée entre 7 et 26%. Très peu de MVCs sont donc communs aux deux milieux. Cette variabilité pourrait indiquer une dépendance de la production de métabolites volatils aux conditions environnementales, ce qui rend l'identification de biomarqueurs potentiels très dépendante de l'environnement.

Toutefois, dans ce même tableau, les composés en gras correspondent aux métabolites volatils bactériens uniquement présents chez une souche et dans les deux conditions de culture. Ils n'ont jamais été retrouvés comme étant produits par une autre des six souches. Par conséquent, il est possible de considérer ces composés comme étant des marqueurs forts, car produits spécifiquement et dans des conditions différentes.

Certains de ces composés ont déjà été décrits dans la littérature ou dans la base de données BVC (<http://bioinformatics.charite.de/mvoc>) (Lemfack et al., 2014) (Tableau XII).

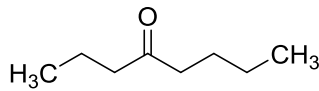
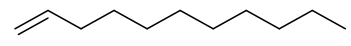
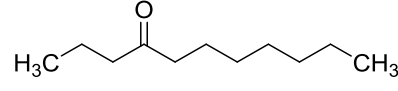
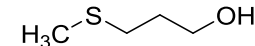
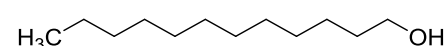
Jusqu'à présent, le nonan-4-one a seulement été identifié comme produit par des champignons (Ezra et al., 2004; Sánchez-Ortiz et al., 2016). Il s'agit donc de la première description de ce composé produit par une bactérie. De la même manière, le undecan-4-one n'a, à notre connaissance, pas encore été décrit comme étant produit par un micro-organisme. Ces deux composés sont donc très intéressants comme potentiels biomarqueurs de *P. aeruginosa*.

Ensuite, le 3-methylsulfanylpropan-1-ol, ici produit par *P. mirabilis*, a déjà été identifié chez plusieurs autres micro-organismes potentiellement présents dans les plaies chroniques (Schulz and Dickschat, 2007; Splivallo et al., 2007a, 2007b; Tracey and Britz, 1989), de même que le dodecan-1-ol (Elgaali et al., 2002; Ercolini et al., 2009; Tait et al., 2014). Ils ne peuvent donc pas être utilisés seuls en tant que biomarqueurs. Toutefois, ces composés pourraient être

importants pour l'identification de la bactérie car ils font partie d'un panel de molécules qui lui, formerait une empreinte moléculaire volatile qui serait spécifique d'un micro-organisme.

Enfin, concernant le undec-1-ene, alors que certaines études considèrent cette molécule comme potentiel biomarqueur de *P. aeruginosa*, d'autres recherches font état de la production de ce composé par d'autres bactéries (Blom et al., 2011; Bos et al., 2013; Briard et al., 2016; Giorgio et al., 2015; Labows et al., 1980; Preti et al., 2009; Yusuf et al., 2015). Il apparaît alors comme ayant un effet hémolytique. En effet, une quantité minimale de 75 mg permet la lyse des globules rouges présents dans une gélose au sang, sans contact (Giorgio et al., 2015). Le suivi de la production de ce composé, bien que non spécifique d'une espèce bactérienne, pourrait avoir un intérêt dans le diagnostic de la plaie de pied diabétique de par son activité biologique. Il serait un potentiel facteur de virulence pouvant indiquer une aggravation de la plaie.

Tableau XII : Informations sur les potentiels biomarqueurs identifiés.

Volatile compounds	Producing microorganisms	Detection techniques	Observations	References
<u>Nonan-4-one</u>  $C_9H_{18}O$ CAS n°: 4485-09-0 142.1 g.mol⁻¹	<i>Xylaria</i> sp.¹ <i>Muscodor</i> sp.¹	SPME-GC-MS SPME-GC-MS		(Sánchez-Ortiz et al., 2016) (Ezra et al., 2004)
<u>Undec-1-ene</u>  $C_{11}H_{22}$ CAS n°: 821-95-4 154.1 g.mol⁻¹	<i>P. aeruginosa</i> <i>Burkholderia</i> sp., <i>C. uda</i>, <i>E. coli</i>, <i>Pseudomonas</i> sp., <i>S. plymuthica</i>, <i>C. violaceum</i> <i>P. brassicacearum</i>, <i>P. putida</i>	GC-MS Desorption tube - GC-MS SPME-GC-MS	Potential biomarker Production of undec-1-ene dependant of culture media Able to lyse red blood cells	(Bos et al., 2013; Briard et al., 2016; Labows et al., 1980; Preti et al., 2009; Yusuf et al., 2015) (Blom et al., 2011) (Giorgio et al., 2015)
<u>Undecan-4-one</u>  $C_{11}H_{22}O$ CAS n°: 14476-37-0 170.1 g.mol⁻¹	/	/	/	/
<u>3-methylsulfanylpropan-1-ol</u>  $C_4H_{10}OS$ CAS n°: 505-10-2 106.1 g.mol⁻¹	<i>Citrobacter</i> sp, <i>Bacillus</i> sp, <i>Alcaligenes</i> sp, <i>Enterobacter</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp Lactic bacteria <i>Tuber melanosporum</i>¹, <i>Tuber borchii</i>¹	/ Liquid / Liquid GC-MS SBSE-GC-MS		(Schulz and Dickschat, 2007) (Tracey and Britz, 1989) (Splivallo et al., 2007a, 2007b)
<u>Dodecan-1-ol</u>  $C_{12}H_{26}O$ CAS n°: 112-53-8 186.2 g.mol⁻¹	<i>C. divergens</i>, <i>P. fragi</i> <i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i> <i>S. sonnei</i>, <i>S. typhimurium</i>, <i>S. paratyphi</i>, <i>E. coli</i>, <i>E. cloacae</i>, <i>E. aerogenes</i>, <i>C. freundii</i>	SPME-GC-MS SPME-GC-MS SPME-GC-MS	Markers for Gram-negative enteric bacteria	(Ercolini et al., 2009) (Tait et al., 2014) (Elgaali et al., 2002)

¹: Fungi

DISCUSSION GENERALE

L'une des complications majeures du diabète est l'apparition de plaies situées au niveau du pied. Ces plaies, classées selon plusieurs grades, peuvent évoluer vers la guérison ou vers l'infection. Leur diagnostic est souvent difficile et leur prise en charge demeure complexe et nécessite une approche pluridisciplinaire (Lavigne et al., 2016).

Actuellement, outre la culture bactérienne qui reste le standard dans de nombreuses analyses, plusieurs autres techniques basées sur différentes approches de biologie moléculaire, d'immunochromatographie ou encore de spectrométrie de masse peuvent être utilisées dans le cadre du diagnostic microbiologique. Toutefois, toutes ces approches présentent certaines limites comme la nécessité d'effectuer des cultures (jusqu'à plusieurs jours de délai) avant de pouvoir identifier les bactéries par spectrométrie de masse, la présence d'ADN humain et d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons biologiques qui restreignent l'application des techniques de biologie moléculaire. Ces techniques sont donc difficilement applicables au niveau de la plaie, et c'est pourquoi l'établissement du diagnostic d'une plaie du pied chez le patient diabétique se base principalement sur un diagnostic clinique et sur la culture.

Plusieurs études utilisant des approches de métagénomique ont permis d'identifier avec succès de nombreuses bactéries présentes dans les plaies chroniques (Redel et al., 2013; Rhoads et al., 2012; Wolcott et al., 2016). Toutefois, ces approches ne permettent pas d'obtenir des informations suffisantes pour la détermination de l'espèce bactérienne et de la souche ou du profil de virulence. De plus, ces techniques ne permettent pas le suivi de l'évolution de la lésion. Il n'y a donc pas, à l'heure actuelle, de moyen de prévoir le changement d'état de la plaie (passage de colonisation à infection).

Pour répondre à ces problématiques de l'identification bactérienne et du suivi de la plaie, une approche métabolique nous a semblé pertinente puisque l'étude des métabolites permet à la fois l'identification du micro-organisme par les molécules spécifiques (biomarqueurs) qu'il produit, mais aussi de caractériser la dynamique des populations microbiennes en effectuant un suivi en temps réel de l'environnement de la plaie. En effet, l'identification seule du microbiote ne suffit pas. Il peut y avoir de possibles modifications du métabolisme bactérien sans que la composition du microbiote ne soit affectée, comme par exemple avec la production de

métabolites ayant des fonctions de communication, de virulence ou encore de défense (O'Connor, 2015; Rutherford and Bassler, 2012; Vining, 1990).

Il nous a alors semblé intéressant de développer des approches ciblant les métabolites bactériens pour une identification spécifique des micro-organismes fréquemment retrouvés dans des plaies chroniques de pied diabétique. Ce travail s'est focalisé sur l'identification de composés volatils produits par des bactéries. En effet, ces MVCs ont déjà été décrits pour leur implication dans des fonctions biologiques de communication et de virulence (Audrain et al., 2015; Jones and Elliot, 2017). Toutefois, un des inconvénients est la quantité limitée de ces molécules qui peuvent être retrouvées au niveau de la plaie, conséquence d'une faible charge bactérienne.

Dans ce but, nous avons tout d'abord étudié la possibilité d'utiliser la SBSE pour concentrer les volatils et semi-volatils bactériens à partir de la souche de référence de *S. aureus*. En effet, cette technique est actuellement la plus efficace pour l'extraction et la concentration (Baltussen et al., 1999), mais n'a encore jamais été appliquée aux composés produits par les bactéries. Les deux types de barreaux actuellement commercialisés ont été testés et ont alors montré une complémentarité évidente avec la récupération de composés polaires par l'EGS et de composés apolaires par le PDMS. Cette extraction par SBSE a aussi comme avantage de permettre une récupération des analytes sur plusieurs heures, apportant ainsi une vision plus globale du métabolisme bactérien.

Cette méthode couplant la SBSE/HSSE a donc démontré son efficacité concernant les MVCs. Toutefois, la SPME est habituellement la technique employée pour ce type d'analyse. La question a alors été de savoir si l'utilisation de la SBSE avait un intérêt et si elle apportait des informations nouvelles par rapport à la SPME. Nous avons donc décidé de comparer ces deux techniques, toujours en prenant comme modèle *S. aureus* ATCC 25923. Ainsi, l'apport de la SBSE a été clairement démontré puisque cette méthode a permis la récupération de près de 90% des analytes identifiés. De plus, contrairement à la SPME, cette nouvelle méthode d'extraction de MVCs a permis de mettre en évidence la production de nouveaux composés, augmentant ainsi d'une part les connaissances du profil métabolique de cette bactérie, mais aussi la possibilité de découvrir de nouveaux biomarqueurs potentiels.

Une fois l'intérêt de la SBSE établi, cette méthode a été appliquée à cinq espèces bactériennes fréquemment retrouvées dans les plaies chroniques (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*,

E. faecalis et *P. mirabilis*). L'objectif était ici de déterminer la possibilité de distinguer plusieurs bactéries par les composés volatils qu'elles produisent. Une étude préliminaire en milieu LB a montré la présence de métabolites propres à chaque bactérie. Ensuite, cette même étude a été menée en milieu WLM pour se rapprocher, *in vitro*, des conditions d'une plaie. Là encore, des composés spécifiques ont pu être identifiés. Ce milieu WLM a aussi été choisi car il permet la co-culture. En effet, dans un souci d'être de plus en plus proche d'une plaie chronique, le travail en co-culture est indispensable puisque la majorité des plaies sont infectées simultanément par plusieurs micro-organismes. Cette étude a été réalisée avec trois souches de *Staphylococcus* (deux *S. aureus* et une *S. epidermidis*). Malgré la proximité phylogénétique, il était encore possible de distinguer, via les MVCs identifiés, chacune de ces bactéries. De plus, en comparant aux cultures individuelles, 83% des composés ont été retrouvés en co-culture, ce qui démontre la robustesse et l'efficacité de cette approche par SBSE/HSSE même dans un mélange complexe. Il est également intéressant de voir que deux mêmes espèces présentant des profils de virulence différents (*S. aureus* ATCC colonisante et *S. aureus* CC45 infectante) peuvent être distinguées. En effet, deux mêmes espèces peuvent avoir une pathogénicité différente, seulement par une modification de leur métabolisme. Par exemple, il a été montré la présence d'un phage dans le génome de *S. aureus* isolés dans des plaies de pied diabétique. Ce phage va déréguler le métabolisme du fer, ce qui semble atténuer la virulence bactérienne et favoriser la colonisation (Messad et al., 2015).

D'autre part, en comparant les composés identifiés en LB et en WLM, il apparaît que les conditions environnementales influencent la production de métabolites. Ainsi, pour être robuste dans l'identification d'une souche bactérienne, il sera nécessaire d'utiliser une combinaison de métabolites spécifiques.

De plus, une meilleure connaissance des métabolites produits et de leur cinétique devrait permettre de prédire l'évolution de ces plaies, et notamment le passage d'une colonisation à une infection. Afin de pallier la principale limitation qui est la concentration de métabolites sur la plaie, l'utilisation du milieu WLM, comme milieu de pré-enrichissement semble pertinente car il permet la co-culture.

La prochaine étape de ce développement de méthode sera de tester l'analyse des métabolites volatils sur des biofilms. En effet, c'est le mode de vie privilégié par les bactéries dans les plaies chroniques. Des travaux sont actuellement menés au CHU de Nîmes pour l'utilisation du WLM

dans le cadre de biofilm. Il serait alors envisageable de développer une approche combinant ces biofilms et l'analyse des molécules émises par les bactéries pour se rapprocher encore plus d'une plaie chronique. La méthodologie pourra ensuite être validée sur des échantillons de patients (écouvillon ou tissulaire) en couplant l'approche de métabolomique à des approches de génomiques. De plus, il sera également intéressant d'étudier la présence et l'impact de métabolites produits par les cellules du patient sur la production des métabolites bactériens.

ANNEXE : Utilisation de la chromatographie liquide pour l'identification de métabolites bactériens

**Publication n°5 : Identification de métabolites
spécifiques de bactéries isolées de plaies chroniques
par chromatographie liquide couplée à la
spectrométrie de masse en tandem**

1. Introduction

L'une des complications majeures du diabète est l'apparition de plaies situées au niveau du pied. En effet, ce trouble métabolique engendre artérite diabétique, ischémie et neuropathie (Bowler et al., 2001; Jeffcoate et al., 2008) qui, associées à une lésion corporelle, vont favoriser la survenue de plaies. Ces plaies peuvent évoluer vers la guérison ou vers l'infection (détectées dans 40 à 80% des cas (Sotto et al., 2007)). Lorsque les signes cliniques d'une infection deviennent visibles, des procédures telles que le débridement, l'antibiothérapie et l'utilisation de pansements appropriés est nécessaire (Percival et al., 2008, 2015). Toutefois, si ce processus d'infection est détecté tardivement, cela peut avoir des conséquences graves pour le patient, pouvant aller jusqu'à la perte de membres ou même au décès. Il est donc extrêmement important de mettre au point des méthodes rapides de détection des micro-organismes présents dans les plaies, ainsi que des méthodes de suivi de ces plaies, avant que la colonisation bactérienne n'évolue en infection.

Actuellement, la principale méthode de diagnostic employée pour la détection de bactéries dans les plaies chroniques reste la culture, qui est une méthode souvent lente et insuffisamment précise (Melendez et al., 2010). Des avancées en biologie moléculaire sont développées mais présentent néanmoins certaines limites comme la nécessité de connaître la cible, ou alors la présence dans l'échantillon d'inhibiteurs de PCR ou d'une quantité importante d'ADN humain (Rimbara et al., 2013). Ces techniques ne sont donc pas totalement adaptées au diagnostic

microbiologique d'une plaie chronique de pied diabétique.

Dans cette étude, nous proposons une alternative en nous intéressant aux métabolites produits par des bactéries retrouvées dans des plaies chroniques. En effet, l'étude du profil métabolique d'un organisme peut permettre d'identifier de potentiels marqueurs métaboliques spécifiques, appliqués pour la caractérisation de diverses maladies ou pathogènes (Lau et al., 2015; Olivier and Loots, 2012; Zhang et al., 2015). Ce développement de méthode nécessite de mieux connaître le métabolisme des bactéries présentes sur la plaie. En effet, si pour certaines espèces, le métabolisme carboné central est particulièrement bien décrit (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), pour d'autres comme *Proteus mirabilis* ou *Enterococcus faecalis*, aucune information n'est disponible.

Dans ce papier, nous proposons d'essayer d'identifier les principaux métabolites des bactéries présentes et d'évaluer si certains d'entre eux peuvent servir de biomarqueur de présence de certaines bactéries. La démarche envisagée est basée sur un screening des métabolites produits en suivant l'évolution de pics au cours du temps par HPLC-UV et leur identification ciblée par spectrométrie de masse.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Culture bactérienne

Les souches utilisées sont *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Mesureur et al., 2016), *Staphylococcus aureus* CC45, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Proteus mirabilis*. Toutes les souches sont

Tableau 1

Programmes de gradient HPLC-UV pour l'analyse des métabolites bactériens en utilisant deux colonnes analytiques différentes.

Temps (min)	Phase mobile A (%)	Phase mobile B (%)	Débit (mL.min ⁻¹)
Colonne A : Rezex ROA Organic Acid H⁺ (300 mm × 7,8 mm ; dp : 8 µm)			
0	100	/	0,6
40	100	/	0,6
Colonne B : Xbridge BEH300 (50 mm × 4,6 mm ; dp : 3,5 µm)			
0	100		0,4
2	100		0,4
10	90	10	0,4
40	40	60	0,4
42		100	0,4
44		100	0,4
46	100		0,4
68	100		0,4

fournies par le CHU de Nîmes et, hormis *S. aureus* ATCC (souche de référence), les autres ont été isolées à partir d'échantillons cliniques. A partir de colonies récupérées sur boîte de Pétri, des précultures ont été réalisées en Erlenmeyer dans 25 mL de milieu de Luria-Bertani (LB) composé de tryptone (Fluka, Saint-Louis, USA), d'extrait de levure (Amresco, Solon, USA) et de NaCl (Panreac, Barcelona, Spain), puis incubés toute la nuit à 37°C sous agitation à 210 rpm. Une mesure de la densité optique (DO) à 600 nm a ensuite été effectuée pour estimer les concentrations cellulaires, ce qui a permis de réaliser les cultures bactériennes en Erlenmeyer en ensemençant 100 mL de LB à 0,1 uDO.mL⁻¹. Celles-ci ont alors été incubées à 37°C et 210 rpm, et la croissance a été suivie par des mesures de DO pendant 26 heures.

2.2.Echantillonnage

A chacun des 14 points de croissance, 2,4 mL ont été prélevés et centrifugés pendant 10 min à 10000 g. Les surnageants ont été récupérés et filtrés avec des filtre-seringue

en acétate de cellulose de 0,2 µm de diamètre. Le filtrat alors obtenu a été placé dans des vials HPLC et conservé à -20°C.

2.3.Analyse par HPLC-UV

Les échantillons contenant les métabolites bactériens ont été séparés et analysés par HPLC (Hewlett Packard Series 1050 / HPLC 1100, Agilent Technologies). Deux types de séparations chromatographiques ont été utilisés : la première basée sur l'utilisation d'une colonne Rezex ROA Organic Acid H⁺ (Phenomenex) et la seconde impliquant une colonne XBridge BEH300 (Waters), toutes deux thermostatées à 40°C dans un four (HPLC 1100, Agilent Technologies). Concernant la colonne Rezex, la phase mobile était constituée d'un mélange de 20% d'acétonitrile (grade HPLC, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) et d'acide formique à 8 mM (98%, Fluka, Saint-Louis, USA) en eau ultra pure. Pour la colonne BEH300, la phase mobile était constituée de 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA, 100%, VWR, Leuven, Belgique) en eau

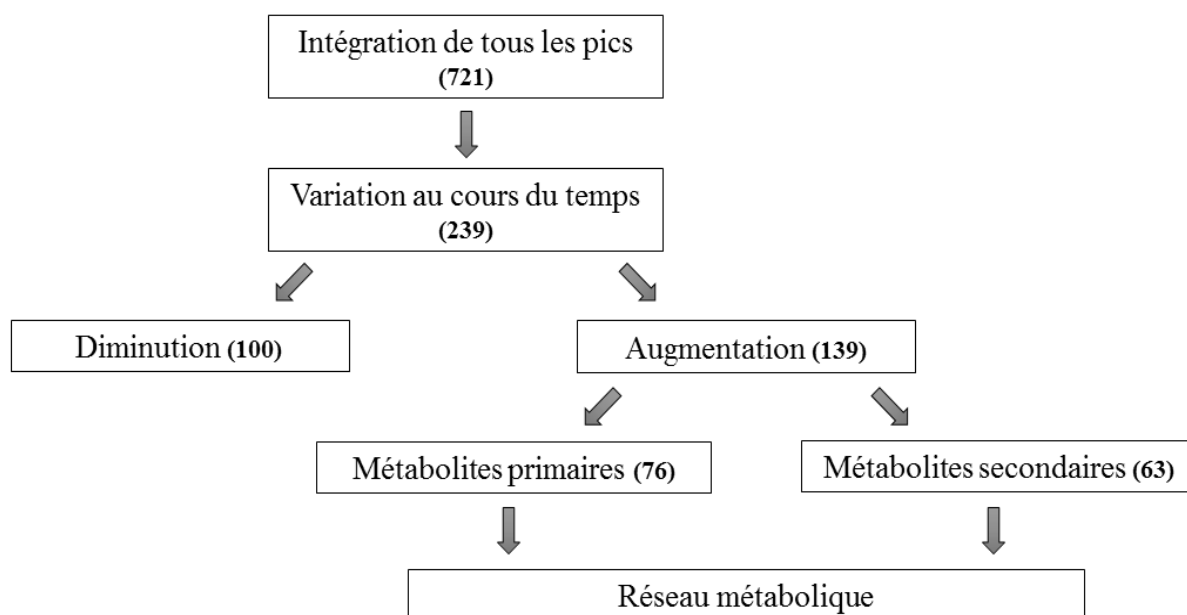


Figure 1. Processus analytique de traitement des données HPLC. Entre parenthèse, le nombre total de pics retrouvés pour les six souches avec les deux colonnes.

ultra pure (A) ou en acétonitrile (B). Un gradient d'élution a été réalisé comme le montre le Tableau 1. Des aliquots de 20 μ L et de 10 μ L ont respectivement été injectés dans les colonnes Rezex et BEH300. La détection des composés est réalisée avec un détecteur UV (HPLC 1100, Agilent Technologies) mesurant l'absorbance à 254 nm.

2.4. Traitement des données

Les chromatogrammes ont été traités par le logiciel HP 1100 (Hewlett Packard) et intégrés manuellement. Le réseau métabolique a été réalisé à l'aide du logiciel RStudio avec les packages spécifiques : igraph, ggplot2, dplyr et tidyr.

3. Résultats et discussion

3.1. Méthodologie

Le suivi de l'évolution de la concentration bactérienne (Supplément F1) a montré que la phase stationnaire a été atteinte pour ces

six souches en moins de 24 heures. Par conséquent, le suivi de la production de métabolites sur cette durée va pouvoir donner une représentation globale du métabolisme de ces bactéries durant toutes les phases de croissance.

La méthodologie mise en place a consisté en l'intégration de tous les pics détectés en UV présents à chacun des 14 points de mesure pour chaque souche (Fig. 1). Ensuite, seuls les pics présentant une variation de leur aire au cours de la croissance de la bactérie ont été conservés. Ils ont été séparés selon que cette variation soit positive ou négative. Si elle était négative, les molécules associées à ces pics ont été considérées comme consommées par la bactérie. Au contraire, pour une variation positive, l'évolution de l'aire du pic est rapprochée de la courbe de croissance de la bactérie (Fig. 2) pour déterminer si le métabolite impliqué est primaire (s'il suivait la croissance) ou secondaire (en décalé de la croissance).

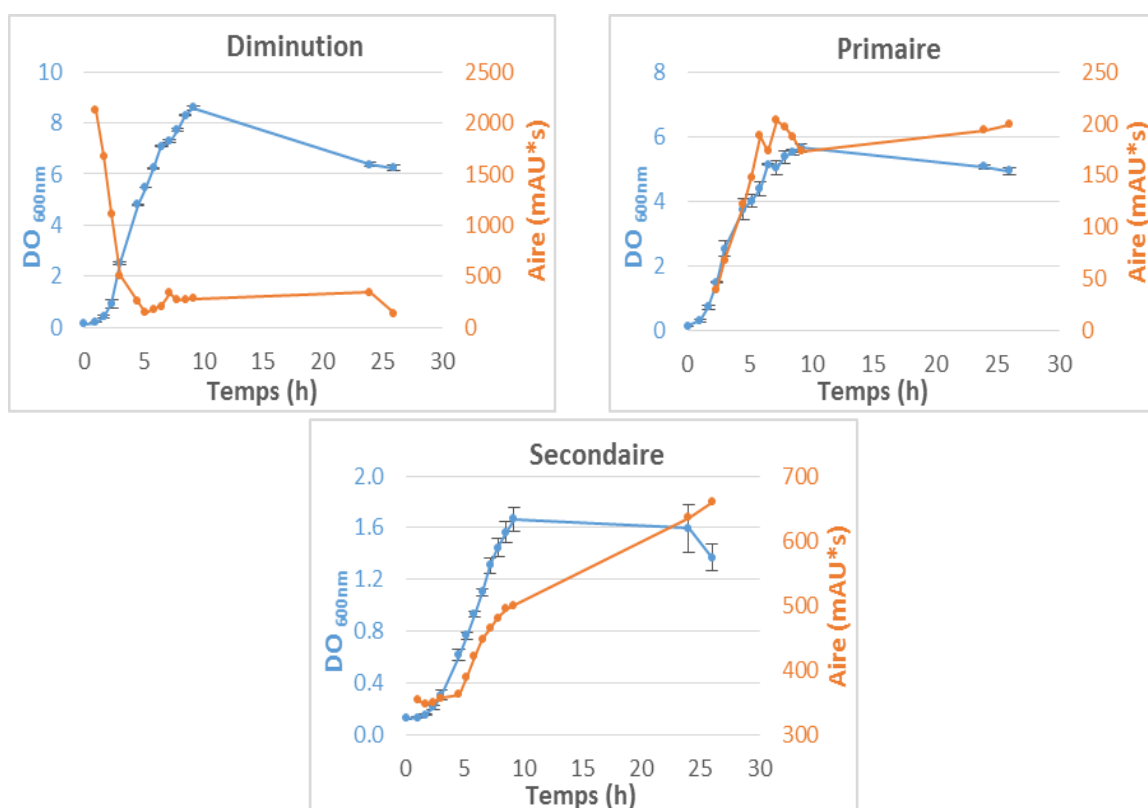


Figure 2. Exemples de graphiques utilisés pour distinguer les différents types de métabolites. En bleu, les courbes de croissance bactérienne. En orange, l'évolution de l'aire du pic intégré. Diminution : métabolite 5,61 détecté chez *S. aureus* CC45 avec la colonne BEH300. Primaire : métabolite 30,86 identifié comme primaire chez *P. mirabilis* avec la colonne Rezex. Secondaire : métabolite 30,86 identifié comme secondaire chez *S. epidermidis* avec la colonne BEH300.

Au total, en prenant en compte les deux colonnes et toutes les souches, 721 pics ont été intégrés. Parmi eux, seuls 239 (33%) ont montré une variation de leur aire au cours de la croissance bactérienne. Plus précisément, 100 composés ont présenté une aire qui diminuait au cours du temps et ont alors été considérés comme

consommés, et 139 pics ont présenté une augmentation de leur aire au cours du temps et ont été considérés comme produits. Les métabolites produits ont alors pu être répartis entre métabolites primaires (76) et secondaires (63).

Tableau 2

Récapitulatif du nombre de métabolites détectés par HPLC-UV selon la colonne et la souche bactérienne.

		Intégrés	Variation	Augmentation	Diminution	Métabolites primaires	Métabolites secondaires	Métabolites spécifiques
<i>S. aureus</i> <i>ATCC</i>	Rezex	18	11	5	6	4	1	5
	BEH300	103	27	18	9	11	7	
<i>S. aureus</i> <i>CC45</i>	Rezex	17	8	5	3	3	2	4
	BEH300	79	22	11	11	7	4	
<i>S. epidermidis</i>	Rezex	14	8	2	6	1	1	3
	BEH300	106	17	8	9	2	6	
<i>P. aeruginosa</i>	Rezex	17	8	5	3	4	1	20
	BEH300	117	37	25	12	9	16	
<i>E. faecalis</i>	Rezex	12	5	1	4	1	0	2
	BEH300	89	20	6	14	5	1	
<i>P. mirabilis</i>	Rezex	17	11	9	2	6	3	37
	BEH300	132	65	44	21	23	21	
TOTAL		721	239	139	100	76	63	71

3.2. Métabolites détectés selon les conditions

Parmi les 239 composés qui présentaient une variation de leur aire au cours du temps, 79% ont été séparés par la colonne BEH300 (Tab. 2). Cette différence entre les deux colonnes peut s'expliquer par le type de composés retenus par chacune. En effet, la colonne BEH300, en retenant préférentiellement les peptides et composés apolaires est beaucoup moins spécifique que la Rezex qui permet principalement la rétention des acides organiques. De plus, il est possible de remarquer la forte proportion de métabolites détectés qui sont produits par *P. mirabilis* à hauteur de 38% (53/139). En comparaison, *E. faecalis* ne produit que 5% des composés détectés (7/139). Parmi ces composés variant au cours de la croissance bactérienne, certains sont communs à plusieurs bactéries tandis que d'autres sont spécifiques d'une souche. De plus, une classification différente peut être attribuée

pour un même pic retrouvé chez plusieurs bactéries. Par exemple, certains métabolites détectés ont présenté une augmentation de leur aire pour une souche tandis que pour une autre bactérie, l'aire du composé diminuait. Pour la suite de l'étude, seuls les pics dont l'aire a augmenté au cours de la croissance de la bactérie ont été conservés.

3.3. Comparaison des souches

Tous les pics détectés présentant une variation positive de leur aire ont été associés entre les différentes souches en fonction de leur temps de rétention (TR). Cette méthode permet d'une part de regrouper les bactéries en fonction des métabolites produits, et d'autre part de faire rapidement ressortir les métabolites spécifiques d'une souche (Fig. 3).

A partir de ce réseau, il a pu être mis en évidence des composés spécifiques à

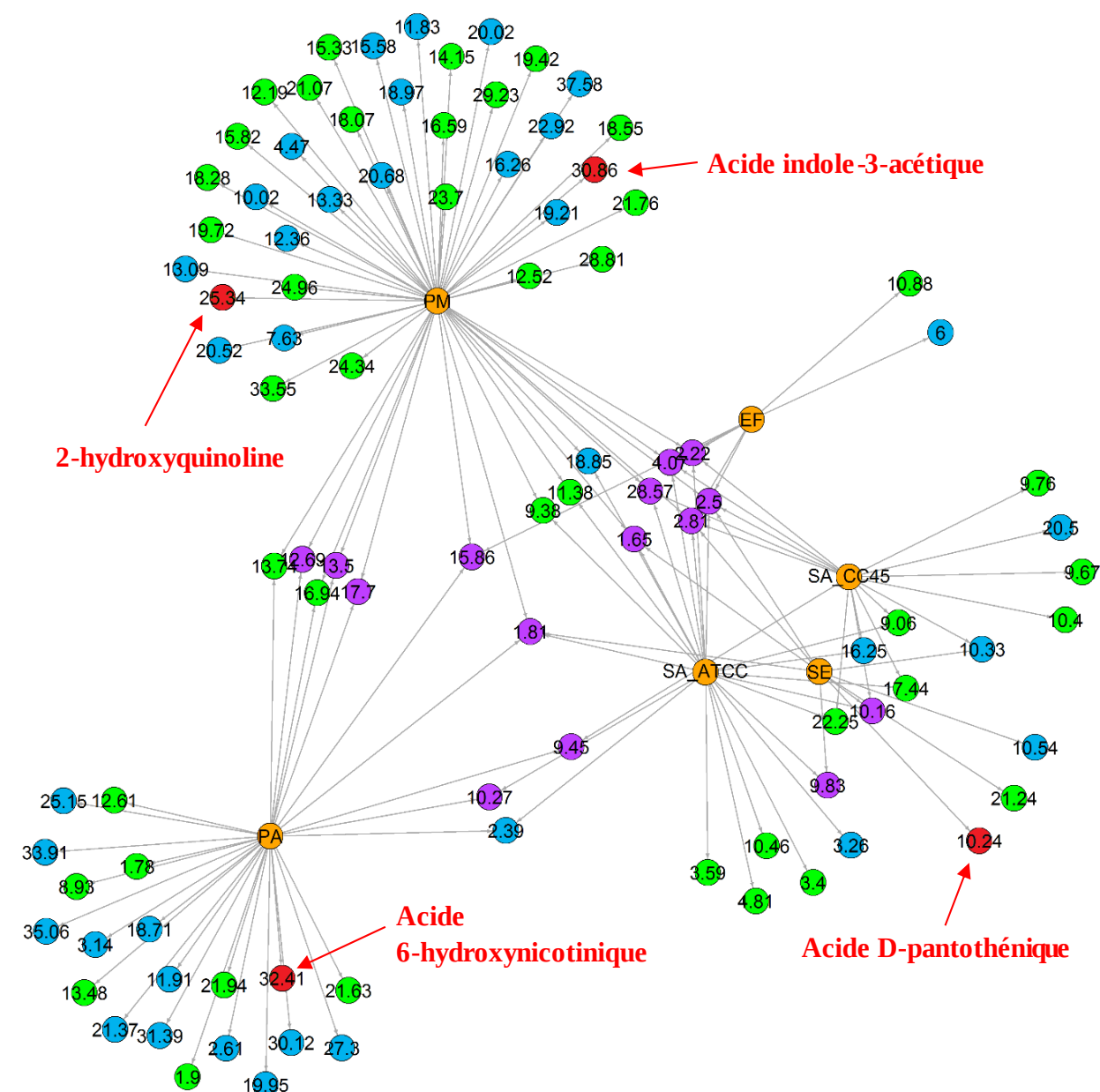


Figure 3. Réseau de métabolites produits par les six souches et détectés par HPLC-UV avec deux colonnes. Les métabolites sont référencés par leur TR moyen. Les souches bactériennes sont indiquées en jaune, les métabolites primaires en vert, les métabolites secondaires en bleu, les métabolites qui sont classés comme primaires ou secondaires selon la bactérie en violet et les métabolites identifiés en rouge. **SA ATCC** : *S. aureus* ATCC 25923, **SA CC45** : *S. aureus* CC45, **SE** : *S. epidermidis*, **PA** : *P. aeruginosa*, **EF** : *E. faecalis*, **PM** : *P. mirabilis*.

chacune de ces souches. En effet, 5 sont spécifiques de *S. aureus* ATCC, 4 de *S. aureus* CC45, 3 de *S. epidermidis*, 20 de *P.*

aeruginosa, 2 de *E. faecalis* et 37 de *P. mirabilis* (Tab. 2). Cette approche a donc permis de distinguer non seulement des

genres bactériens (par exemple *Proteus* de *Pseudomonas*), mais aussi des espèces (avec *S. aureus* et *S. epidermidis*) ainsi que de différencier des bactéries au sein d'une même espèce (*S. aureus* ATCC et CC45).

Ces métabolites spécifiques peuvent alors être considérés comme potentiellement biomarqueurs de ces différentes souches. Après cette pré-sélection des composés d'intérêt, l'étape suivante a été d'identifier ces métabolites par spectrométrie de masse.

Le début de cette caractérisation a été entrepris avec l'aide du centre commun de spectrométrie de masse (CCSM) de Lyon qui nous a permis d'identifier quatre composés spécifiques. Il s'agit de l'acide indole-3-acétique et du 2-hydroxyquinoline (respectivement les métabolites primaires 30,86 et 25,34 de *P. mirabilis*), de l'acide D-pantothénique (métabolite secondaire 10,24 de *S. epidermidis*) et de l'acide 6-hydroxynicotinique (métabolite primaire 32,41 de *P. aeruginosa*). L'acide indole-3-acétique présente la particularité d'avoir

uniquement été décrit chez *Serratia plymuthica* (Liu et al., 2010), une espèce phylogénétiquement proche de *P. mirabilis* (Paradis et al., 2005). A ce jour, l'identification d'autres potentiels biomarqueurs par LC-MS/MS est en cours.

D'autre part, afin de déterminer si cette approche permettait de discriminer des bactéries d'un même genre et d'une même espèce, les résultats obtenus pour les trois bactéries du genre *Staphylococcus* ont été exploités sous la forme d'un diagramme de Venn (Fig. 4). Ainsi, même si sur le réseau ces trois espèces sont proches, une distinction peut être réalisée en fonction de leur profil métabolique. En effet, seuls trois composés sont communs à l'ensemble des espèces de *Staphylococcus* et une distinction claire peut être réalisée entre deux souches d'une même espèce suggérant que, par cette approche, des différences métaboliques peuvent être mises en évidence entre une souche colonisante et une souche infectante.

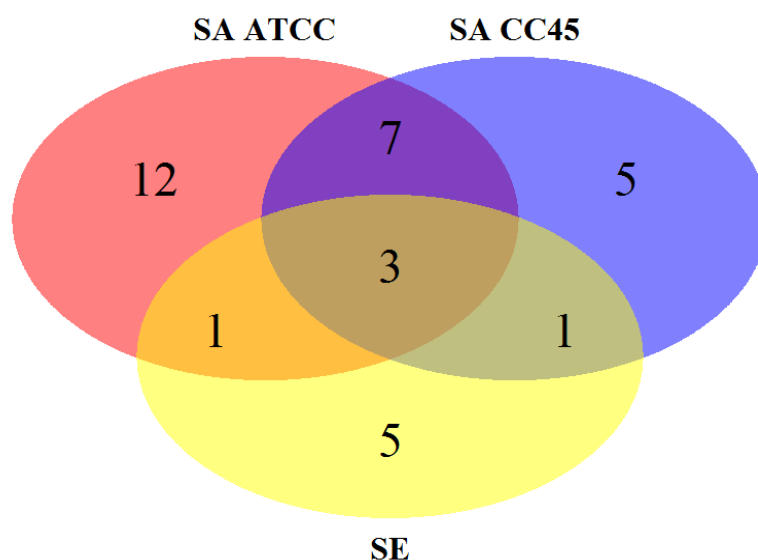


Figure 4. Diagramme de Venn comparant le nombre de métabolites produits au sein de du genre *Staphylococcus* et détectés par HPLC-UV. **SA ATCC** : *S. aureus* ATCC 25923, **SA CC45** : *S. aureus* CC45, **SE** : *S. epidermidis*

4. Conclusion

Cette approche sans *a priori* par HPLC-UV a permis de mettre en évidence des composés produits spécifiquement par une bactérie. Cette sélection préalable va pouvoir faciliter le travail d'identification réalisé par spectrométrie de masse. En effet, en appliquant exactement les mêmes conditions de séparation chromatographique à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), il va être possible de détecter ces mêmes pics, et d'y associer une masse, une formule brute et même une identification complète dans certains cas. A l'heure actuelle, quatre d'entre eux ont déjà été identifiés. Les données obtenues jusqu'alors démontrent la pertinence de cette approche métabolique pour la différenciation *in vitro* de bactéries. Il est en effet possible de distinguer des genres et des espèces différentes par les métabolites qu'elles produisent, mais également des profils de virulence différents de deux espèces de *S. aureus*, l'un décrit comme colonisant (*S. aureus* ATCC 25923) et l'autre comme infectant les plaies chroniques (*S. aureus* CC45).

Après avoir identifié de potentiels biomarqueurs, cette méthode pourra être appliquée à des co-cultures pour vérifier si les profils métaboliques sont retrouvés lorsque plusieurs espèces coexistent et potentiellement interagissent dans un même environnement. Une fois ces marqueurs métaboliques identifiés, ils pourront servir de biomarqueurs de la présence de ces souches dans des échantillons cliniques.

Références

Bowler, P.G., Duerden, B.I., and Armstrong, D.G. (2001). Wound microbiology and associated

approaches to wound management. Clin. Microbiol. Rev. 14, 244–269.

Jeffcoate, W.J., Lipsky, B.A., Berendt, A.R., Cavanagh, P.R., Bus, S.A., Peters, E.J.G., van Houtum, W.H., Valk, G.D., Bakker, K., and International Working Group on the Diabetic Foot (2008). Unresolved issues in the management of ulcers of the foot in diabetes. Diabet. Med. 25, 1380–1389.

Lau, S.K.P., Lam, C.-W., Curreem, S.O.T., Lee, K.-C., Lau, C.C.Y., Chow, W.-N., Ngan, A.H.Y., To, K.K.W., Chan, J.F.W., Hung, I.F.N., et al. (2015). Identification of specific metabolites in culture supernatant of Mycobacterium tuberculosis using metabolomics: exploration of potential biomarkers. Emerg. Microbes Infect. 4, e6.

Liu, X., Jia, J., Atkinson, S., Cámara, M., Gao, K., Li, H., and Cao, J. (2010). Biocontrol potential of an endophytic Serratia sp. G3 and its mode of action. World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 1465–1471.

Melendez, J.H., Frankel, Y.M., An, A.T., Williams, L., Price, L.B., Wang, N.-Y., Lazarus, G.S., and Zenilman, J.M. (2010). Real-time PCR assays compared to culture-based approaches for identification of aerobic bacteria in chronic wounds. Clin. Microbiol. Infect. 16, 1762–1769.

Mesureur, J., Ranaldi, S., Monnin, V., Girard, V., Arend, S., Welker, M., O'Callaghan, D., Lavigne, J.-P., and Kerié, A. (2016). A simple and safe protocol for preparing Brucella samples for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry analysis. J. Clin. Microbiol. 54, 449–452.

Olivier, I., and Loots, D.T. (2012). A metabolomics approach to characterise and identify various Mycobacterium species. J. Microbiol. Methods 88, 419–426.

Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Bélanger, S.D., Martel, E.A., Boudreau, D.K., Picard, F.J., Ouellette, M., Roy, P.H., and Bergeron, M.G. (2005). Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 2013–2025.

Percival, S.L., Woods, E., Nutekpor, M., Bowler, P., Radford, A., and Cochrane, C. (2008). Prevalence of silver resistance in bacteria isolated from diabetic foot ulcers and efficacy of silver-containing wound dressings. Ostomy Wound Manage. 54, 30–40.

Percival, S.L., McCarty, S.M., and Lipsky, B. (2015). Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Adv. Wound Care (New Rochelle)* 4, 373–381.

Rimbara, E., Sasatsu, M., and Graham, D.Y. (2013). PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods Mol. Biol.* 943, 279–287.

Sotto, A., Richard, J.-L., Jourdan, N., Combescure, C., Bouziges, N., Lavigne, J.-P., and Nîmes University Hospital Working Group on the Diabetic Foot (GP30) (2007). Miniaturized oligonucleotide arrays: a new tool for discriminating colonization from infection due to *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 30, 2051–2056.

Zhang, A., Sun, H., Yan, G., Wang, P., and Wang, X. (2015). Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic. *Biomed Res. Int.* 2015, 354671.

Données complémentaires

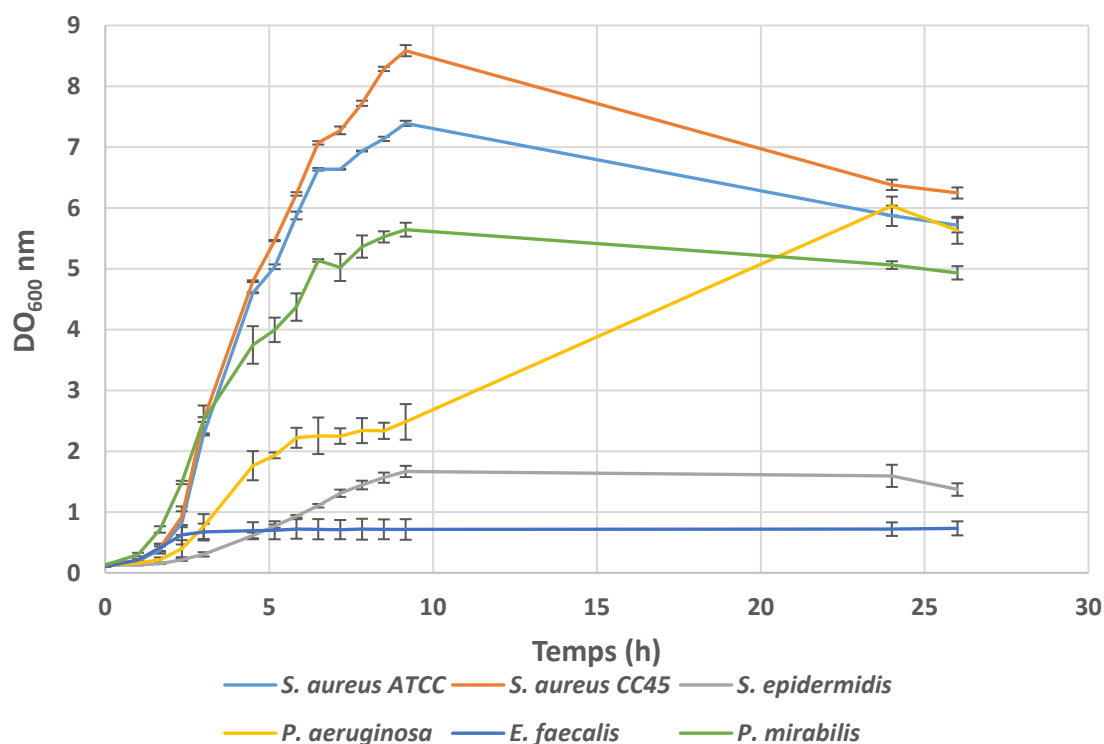


Figure F1. Croissance des six souches en milieu LB

Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types observés sur trois réplicats indépendants.

Le suivi de l'évolution de la concentration bactérienne a permis de déterminer les différentes phases de croissance qui pourront être utilisées pour connaître le type de métabolites produits par la bactérie. En effet, selon la phase de croissance de la bactérie, différents métabolites peuvent être retrouvés avec des métabolites primaires dont la concentration va augmenter en même temps que la croissance et des métabolites secondaires dont l'augmentation de la concentration va être décalée de la croissance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abayasekara, L.M., Perera, J., Chandrasekharan, V., Gnanam, V.S., Udunuwara, N.A., Liyanage, D.S., Bulathsinhala, N.E., Adikary, S., Aluthmuhandiram, J.V.S., Thanaseelan, C.S., et al. (2017). Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: a comparative study. *BMC Infect. Dis.* 17, 631.
- Abdulrazak, A., Bitar, Z.I., Al-Shamali, A.A., and Mobasher, L.A. (2005). Bacteriological study of diabetic foot infections. *J. Diabetes Complicat.* 19, 138–141.
- Ademiluyi, S.A., Rotimi, V.O., Coker, A.O., Banjo, T.O., and Akinyanju, O. (1988). The anaerobic and aerobic bacterial flora of leg ulcers in patients with sickle-cell disease. *J. Infect.* 17, 115–120.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919–1925.
- Apelqvist, J., Bakker, K., van Houtum, W.H., Schaper, N.C., and International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF) Editorial Board (2008). Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot: based upon the International Consensus on the Diabetic Foot (2007) Prepared by the International Working Group on the Diabetic Foot. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24 Suppl 1, S181-187.
- Arthur, C.L., and Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62, 2145–2148.
- Audrain, B., Farag, M.A., Ryu, C.-M., and Ghigo, J.-M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 222–233.
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., and Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J. Microcolumn Sep.* 11, 737–747.
- Bell, D., Wongsrichanalai, C., and Barnwell, J.W. (2006). Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nat. Rev. Microbiol.* 4, S7-20.
- Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., Sgorbini, B., David, F., and Sandra, P. (2005). Dual-phase twistors: a new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A* 1094, 9–16.
- Blom, D., Fabbri, C., Connor, E.C., Schiestl, F.P., Klauser, D.R., Boller, T., Eberl, L., and Weiskopf, L. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.* 13, 3047–3058.
- Bonder, M.J., Abeln, S., Zaura, E., and Brandt, B.W. (2012). Comparing clustering and pre-processing in taxonomy analysis. *Bioinformatics* 28, 2891–2897.
- Bos, L.D.J., Sterk, P.J., and Schultz, M.J. (2013). Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog.* 9, e1003311.
- Bowler, P.G., and Davies, B.J. (1999). The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. *Int. J. Dermatol.* 38, 573–578.

- Bowler, P.G., Duerden, B.I., and Armstrong, D.G. (2001). Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 244–269.
- Boyaci, E., Goryński, K., Viteri, C.R., and Pawliszyn, J. (2016). A study of thin film solid phase microextraction methods for analysis of fluorinated benzoic acids in seawater. *J Chromatogr A* 1436, 51–58.
- Bravo-Molina, A., Linares-Palomino, J.P., Lozano-Alonso, S., Asensio-García, R., Ros-Díe, E., and Hernández-Quero, J. (2016). Influence of wound scores and microbiology on the outcome of the diabetic foot syndrome. *J. Diabetes Complicat.* 30, 329–334.
- Briard, B., Heddergott, C., and Latgé, J.-P. (2016). Volatile Compounds Emitted by *Pseudomonas aeruginosa* Stimulate Growth of the Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *MBio* 7, e00219.
- Brook, I. (1991). Microbiological studies of decubitus ulcers in children. *J. Pediatr. Surg.* 26, 207–209.
- Brossa, L., Marcé, R.M., Borrull, F., and Pocurull, E. (2004). Determination of Endocrine Disruptors in Environmental Water Samples by Stir Bar Sorptive Extraction-Liquid Desorption - Large Volume Injection-Gas Chromatography. *Chromatographia* 61, 61–65.
- Budding, A.E., Hoogewerf, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., and Savelkoul, P.H.M. (2016). Automated Broad-Range Molecular Detection of Bacteria in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* 54, 934–943.
- Burgot, G., and Pellerin, F. (2003). Microextraction en phase solide (SPME) | Techniques de l'Ingénieur.
- Cain, T.C., Lubman, D.M., Weber, W.J., and Vertes, A. (1994). Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 8, 1026–1030.
- Campuzano, S., de Ávila, B.E.-F., Yuste, J., Pedrero, M., García, J.L., García, P., García, E., and Pingarrón, J.M. (2010). Disposable amperometric magnetoimmunosensors for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1225–1230.
- Castel, D., Pitaval, A., Debily, M.-A., and Gidrol, X. (2006). Cell microarrays in drug discovery. *Drug Discov. Today* 11, 616–622.
- Cavalli, J.-F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., and Loiseau, A.-M. (2003). Comparison of static headspace, headspace solid phase microextraction, headspace sorptive extraction, and direct thermal desorption techniques on chemical composition of French olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7709–7716.
- Chae, H., Han, S.J., Kim, S.-Y., Ki, C.-S., Huh, H.J., Yong, D., Koh, W.-J., and Shin, S.J. (2017). Development of a One-Step Multiplex PCR Assay for Differential Detection of Major *Mycobacterium* Species. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2736–2751.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., and Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 69, 330–339.
- Charles, P.G.P., Uçkay, I., Kressmann, B., Emonet, S., and Lipsky, B.A. (2015). The role of anaerobes in diabetic foot infections. *Anaerobe* 34, 8–13.

- Chaves, A.R., Silva, S.M., Queiroz, R.H.C., Lanças, F.M., and Queiroz, M.E.C. (2007). Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 850, 295–302.
- Chen, J., Tang, J., Shi, H., Tang, C., and Zhang, R. (2017). Characteristics of volatile organic compounds produced from five pathogenic bacteria by headspace-solid phase micro-extraction/gas chromatography-mass spectrometry. *J. Basic Microbiol.* 57, 228–237.
- Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K., and Levy, D.D. (2001). Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3258–3263.
- Claydon, M.A., Davey, S.N., Edwards-Jones, V., and Gordon, D.B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 14, 1584–1586.
- Cohen, D.M., Russo, M.E., Jaggi, P., Kline, J., Gluckman, W., and Parekh, A. (2015). Multicenter Clinical Evaluation of the Novel Alere i Strep A Isothermal Nucleic Acid Amplification Test. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2258–2261.
- Cunningham, S.A., Vasoo, S., and Patel, R. (2016). Evaluation of the Check-Points Check MDR CT103 and CT103 XL Microarray Kits by Use of Preparatory Rapid Cell Lysis. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1368–1371.
- Cuzon, G., Naas, T., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., and Nordmann, P. (2012). 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.* 67, 1865–1869.
- Daltrey, D.C., Rhodes, B., and Chattwood, J.G. (1981). Investigation into the microbial flora of healing and non-healing decubitus ulcers. *J. Clin. Pathol.* 34, 701–705.
- Dang, C.N., Prasad, Y.D.M., Boulton, A.J.M., and Jude, E.B. (2003). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the diabetic foot clinic: a worsening problem. *Diabet. Med.* 20, 159–161.
- Decuypere, S., Meehan, C.J., Van Puyvelde, S., De Block, T., Maltha, J., Palpouguini, L., Tahita, M., Tinto, H., Jacobs, J., and Deborggraeve, S. (2016). Diagnosis of Bacterial Bloodstream Infections: A 16S Metagenomics Approach. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004470.
- DeLeon, S., Clinton, A., Fowler, H., Everett, J., Horswill, A.R., and Rumbaugh, K.P. (2014). Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound model. *Infect. Immun.* 82, 4718–4728.
- Demyttenaere, J.C.R., Moriña, R.M., and Sandra, P. (2003). Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. *Journal of Chromatography A* 985, 127–135.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., and Relman, D.A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 6, e280.
- Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., Prescott, H.C., Martinez, F.J., Curtis, J.L., Lama, V.N., and Huffnagle, G.B. (2014). Analysis of culture-dependent versus culture-independent techniques for identification of bacteria in clinically obtained bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3605–3613.

- Dinarelli, S., Girasole, M., Kasas, S., and Longo, G. (2017). Nanotools and molecular techniques to rapidly identify and fight bacterial infections. *J. Microbiol. Methods* 138, 72–81.
- Disney, M.D., and Seeberger, P.H. (2004). The use of carbohydrate microarrays to study carbohydrate-cell interactions and to detect pathogens. *Chem. Biol.* 11, 1701–1707.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Dowd, S.E., Sun, Y., Secor, P.R., Rhoads, D.D., Wolcott, B.M., James, G.A., and Wolcott, R.D. (2008). Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.* 8, 43.
- Dunyach-Remy, C., Cadière, A., Richard, J.-L., Schuldiner, S., Bayle, S., Roig, B., Sotto, A., and Lavigne, J.-P. (2014). Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE): a promising tool to diagnose bacterial infections in diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab.* 40, 476–480.
- Dunyach-Remy, C., Carrere, C., Marchandin, H., Schuldiner, S., Guedj, A.-M., Cellier, N., Cadière, A., Lechiche, C., Sotto, A., and Lavigne, J.-P. (2018). Performance of the automated multiplex PCR Unyvero implant and tissue infections system in the management of diabetic foot osteomyelitis. *Future Microbiol.*
- Duthie, M.S., Orcullo, F.M., Abbelana, J., Maghanoy, A., and Balagon, M.F. (2016). Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3267–3275.
- Eden, P.A., Schmidt, T.M., Blakemore, R.P., and Pace, N.R. (1991). Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 324–325.
- Elgaali, H., Hamilton-Kemp, T.R., Newman, M.C., Collins, R.W., Yu, K., and Archbold, D.D. (2002). Comparison of long-chain alcohols and other volatile compounds emitted from food-borne and related Gram positive and Gram negative bacteria. *J. Basic Microbiol.* 42, 373–380.
- Elpa, D., Durán-Guerrero, E., Castro, R., Natera, R., and Barroso, C.G. (2014). Development of a new stir bar sorptive extraction method for the determination of medium-level volatile thiols in wine. *J. Sep. Sci.* 37, 1867–1872.
- Engelbrektson, A., Kunin, V., Wrighton, K.C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., and Hugenholtz, P. (2010). Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *ISME J* 4, 642–647.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., and Villani, F. (2009). Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1990–2001.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., et al. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 165–256.
- Ezra, D., Hess, W.M., and Strobel, G.A. (2004). New endophytic isolates of *Muscador albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology* 150, 4023–4031.

- Fadilah, N., Hanafiah, A., Razlan, H., Wong, Z.Q., Mohamed Rose, I., and Rahman, M.M. (2016). Multiplex PCR for detection of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsies with lower inflammatory score. *Br. J. Biomed. Sci.* 73, 180–187.
- Farag, M.A., Zhang, H., and Ryu, C.-M. (2013). Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *J. Chem. Ecol.* 39, 1007–1018.
- Fernández-Álvarez, C., Torres-Corral, Y., and Santos, Y. (2018). Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Proteomics* 170, 59–69.
- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., González-Avila, M., Cembrero-Fuciños, D., Herrero-Hernández, A., González-Buitrago, J.M., and Muñoz-Bellido, J.L. (2010). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2110–2115.
- Filipiak, W., Sponring, A., Mikoviny, T., Ager, C., Schubert, J., Miekisch, W., Amann, A., and Troppmair, J. (2008). Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro. *Cancer Cell Int.* 8, 17.
- Filipiak, W., Sponring, A., Filipiak, A., Ager, C., Schubert, J., Miekisch, W., Amann, A., and Troppmair, J. (2010). TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells in vitro. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 19, 182–195.
- Fosse-Edorh, S., Mandereau-Bruno, L., and Regnault, N. (2015). Le poids des complications liées au diabète en France en 2013. Synthèse et perspectives. *Bull. Epidémiol. Hebd.* 619–625.
- Fredricks, D.N., and Relman, D.A. (1998). Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2810–2816.
- Frej-Mądrzak, M., Gryboś, A., Gryboś, M., Teryks-Wołyniec, D., Jama-Kmiecik, A., Sarowska, J., and Choroszy-Król, I. (2018). PCR diagnostics of *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic infection by women. *Ginekol. Pol.* 89, 115–119.
- Furukawa, M., Goji, N., Janzen, T.W., Thomas, M.C., Ogunremi, D., Blais, B., Misawa, N., and Amoako, K.K. (2018). Rapid detection and serovar identification of common *Salmonella enterica* serovars in Canada using a new pyrosequencing assay. *Can. J. Microbiol.* 64, 75–86.
- Galiana, A., Coy, J., Gimeno, A., Guzman, N.M., Rosales, F., Merino, E., Royo, G., and Rodríguez, J.C. (2017). Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections. *PLoS ONE* 12, e0177627.
- Gambelunghe, C., Rossi, R., Aroni, K., Gili, A., Bacci, M., Pascali, V., and Fucci, N. (2015). Norcocaine and cocaethylene distribution patterns in hair samples from light, moderate, and heavy cocaine users. *Drug Test Anal.*
- Garner, C.E., Smith, S., de Lacy Costello, B., White, P., Spencer, R., Probert, C.S.J., and Ratcliffe, N.M. (2007). Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *FASEB J.* 21, 1675–1688.

- Geojith, G., Dhanasekaran, S., Chandran, S.P., and Kenneth, J. (2011). Efficacy of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the laboratory identification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a resource limited setting. *J. Microbiol. Methods* *84*, 71–73.
- Gerding, D.N. (1995). Foot infections in diabetic patients: the role of anaerobes. *Clin. Infect. Dis.* *20 Suppl 2*, S283-288.
- Ghyselinck, J., Pfeiffer, S., Heylen, K., Sessitsch, A., and De Vos, P. (2013). The effect of primer choice and short read sequences on the outcome of 16S rRNA gene based diversity studies. *PLoS ONE* *8*, e71360.
- Gilchrist, B., and Reed, C. (1989). The bacteriology of chronic venous ulcers treated with occlusive hydrocolloid dressings. *Br. J. Dermatol.* *121*, 337–344.
- Giorgio, A., De Stradis, A., Lo Cantore, P., and Iacobellis, N.S. (2015). Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Microbiol.* *6*, 1056.
- Gradon, J., and Adamson, C. (1995). *Infections of Pressure Ulcers: Management and Controversies. : Infectious Diseases in Clinical Practice.*
- Greub, G., Sahli, R., Brouillet, R., and Jaton, K. (2016). Ten years of R&D and full automation in molecular diagnosis. *Future Microbiol* *11*, 403–425.
- Hammer, N.D., Cassat, J.E., Noto, M.J., Lojek, L.J., Chadha, A.D., Schmitz, J.E., Creech, C.B., and Skaar, E.P. (2014). Inter- and intraspecies metabolite exchange promotes virulence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* *16*, 531–537.
- Hanaki, K., Sekiguchi, J., Shimada, K., Sato, A., Watari, H., Kojima, T., Miyoshi-Akiyama, T., and Kirikae, T. (2011). Loop-mediated isothermal amplification assays for identification of antiseptic- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Methods* *84*, 251–254.
- Hart, T., Zhao, A., Garg, A., Bolusani, S., and Marcotte, E.M. (2009). Human Cell Chips: Adapting DNA Microarray Spotting Technology to Cell-Based Imaging Assays. *PLoS One* *4*.
- Hartemann-Heurtier, A., Robert, J., Jacqueminet, S., Ha Van, G., Golmard, J.L., Jarlier, V., and Grimaldi, A. (2004). Diabetic foot ulcer and multidrug-resistant organisms: risk factors and impact. *Diabet. Med.* *21*, 710–715.
- Hashimoto, M., Numata, M., Yatsushiro, S., Ido, Y., Tanaka, M., Kajimoto, K., and Kataoka, M. (2018). Pseudo-Infected Red Blood Cell Beads as Positive Control for Cell Microarray Chip-Based Detection of *Plasmodium*-Infected RBCs. *J. Parasitol.* *104*, 283–288.
- Henckel, T., Friedrich, M., and Conrad, R. (1999). Molecular Analyses of the Methane-Oxidizing Microbial Community in Rice Field Soil by Targeting the Genes of the 16S rRNA, Particulate Methane Monooxygenase, and Methanol Dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol* *65*, 1980–1990.
- Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., and Lay, J.O. (1996). Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *10*, 1227–1232.

- Horz, H.P., Vianna, M.E., Gomes, B.P.F.A., and Conrads, G. (2005). Evaluation of Universal Probes and Primer Sets for Assessing Total Bacterial Load in Clinical Samples: General Implications and Practical Use in Endodontic Antimicrobial Therapy. *J Clin Microbiol* 43, 5332–5337.
- Huang, X., Yuan, D., and Huang, B. (2008). Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection. *Talanta* 75, 172–177.
- Huang, Z.-K., Yao, F.-Y., Xu, J.-Q., Deng, Z., Su, R.-G., Peng, Y.-P., Luo, Q., and Li, J.-M. (2018). Microarray Expression Profile of Circular RNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Active Tuberculosis Patients. *Cell. Physiol. Biochem.* 45, 1230–1240.
- Huertas, C., Morillo, J., Usero, J., and Gracia-Manarillo, I. (2007). Validation of stir bar sorptive extraction for the determination of 24 priority substances from the European Water Framework Directive in estuarine and sea water. *Talanta* 72, 1149–1156.
- Imirzalioglu, C., Sethi, S., Schneider, C., Hain, T., Chakraborty, T., Mayser, P., and Domann, E. (2014). Distinct polymicrobial populations in a chronic foot ulcer with implications for diagnostics and anti-infective therapy. *BMC Res Notes* 7, 196.
- Irengue, L.M., Durant, J.-F., Tomaso, H., Pilo, P., Olsen, J.S., Ramisse, V., Mahillon, J., and Gala, J.-L. (2010). Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 1179–1192.
- Issartel, B., Gauduchon, V., Chalabreysse, L., Célar, M., Ninet, J., Lepidi, H., Etienne, J., and Vandenesch, F. (2002). Clinically and histologically silent Q fever endocarditis accidentally diagnosed by PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 113–114.
- Ivacic, L., Reed, K.D., Mitchell, P.D., and Ghebranious, N. (2007). A LightCycler TaqMan assay for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 137–143.
- James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. deLancey, Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W., and Stewart, P.S. (2008). Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 16, 37–44.
- Jeffcoate, W.J., and Harding, K.G. (2003). Diabetic foot ulcers. *Lancet* 361, 1545–1551.
- Jeffcoate, W.J., Lipsky, B.A., Berendt, A.R., Cavanagh, P.R., Bus, S.A., Peters, E.J.G., van Houtum, W.H., Valk, G.D., Bakker, K., and International Working Group on the Diabetic Foot (2008). Unresolved issues in the management of ulcers of the foot in diabetes. *Diabet. Med.* 25, 1380–1389.
- Johnson, S., Lebahn, F., Peterson, L.R., and Gerding, D.N. (1995). Use of an anaerobic collection and transport swab device to recover anaerobic bacteria from infected foot ulcers in diabetics. *Clin. Infect. Dis.* 20 Suppl 2, S289-290.
- Jones, S.E., and Elliot, M.A. (2017). *Streptomyces* Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours. *Trends Microbiol.* 25, 522–531.
- Julák, J., Procházková-Francisci, E., Stránská, E., and Rosová, V. (2003). Evaluation of exudates by solid phase microextraction-gas chromatography. *J. Microbiol. Methods* 52, 115–122.
- Karchmer, A.W., and Gibbons, G.W. (1994). Foot infections in diabetes: evaluation and management. *Curr Clin Top Infect Dis* 14, 1–22.

- Kataoka, H. (2015). SPME techniques for biomedical analysis. *Bioanalysis* 7, 2135–2144.
- Kataoka, H., Lord, H.L., and Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* 880, 35–62.
- Kim, K., Lee, S., and Ryu, C.-M. (2013). Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. *Nature Communications* 4, 1809.
- Knetsch, C.W., Bakker, D., de Boer, R.F., Sanders, I., Hofs, S., Kooistra-Smid, A.M.D., Corver, J., Eastwood, K., Wilcox, M.H., and Kuijper, E.J. (2011). Comparison of real-time PCR techniques to cytotoxigenic culture methods for diagnosing *Clostridium difficile* infection. *J. Clin. Microbiol.* 49, 227–231.
- Kolahgar, B., Hoffmann, A., and Heiden, A.C. (2002). Application of stir bar sorptive extraction to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *J Chromatogr A* 963, 225–230.
- Kollef, M.H. (2008). Broad-spectrum antimicrobials and the treatment of serious bacterial infections: getting it right up front. *Clin. Infect. Dis.* 47 Suppl 1, S3-13.
- Kommedal, Ø., Simmon, K., Karaca, D., Langeland, N., and Wiker, H.G. (2012). Dual priming oligonucleotides for broad-range amplification of the bacterial 16S rRNA gene directly from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1289–1294.
- Kumari, R., Banerjee, T., and Anupurba, S. (2018). Molecular detection of drug resistance to ofloxacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* by using multiplex allele-specific PCR. *J Infect Public Health* 11, 54–58.
- Kuti, E.L., Patel, A.A., and Coleman, C.I. (2008). Impact of inappropriate antibiotic therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia and blood stream infection: a meta-analysis. *J Crit Care* 23, 91–100.
- Labows, J.N., McGinley, K.J., Webster, G.F., and Leyden, J.J. (1980). Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 12, 521–526.
- Lafolie, J., Sauget, M., Cabrolier, N., Hocquet, D., and Bertrand, X. (2015). Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? *J. Hosp. Infect.* 90, 208–212.
- Laine, L., Perry, J.D., Lee, J., Oliver, M., James, A.L., De La Foata, C., Halimi, D., Orenge, S., Galloway, A., and Gould, F.K. (2009). A novel chromogenic medium for isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from the sputa of cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 8, 143–149.
- Lasserre, C., De Saint Martin, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., Naas, T., and Tandé, D. (2015). 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.* 53, 2163–2171.
- Lavery, L.A., Armstrong, D.G., and Harkless, L.B. (1996). Classification of diabetic foot wounds. *J Foot Ankle Surg* 35, 528–531.

- Lavery, L.A., Armstrong, D.G., Murdoch, D.P., Peters, E.J.G., and Lipsky, B.A. (2007). Validation of the Infectious Diseases Society of America's diabetic foot infection classification system. *Clin. Infect. Dis.* 44, 562–565.
- Lavigne, J.-P., and Riegel, P. (2015). [Mass spectrometry in bacteriology]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 73, 113–125.
- Lavigne, J.-P., Dunyach-Rémy, C., and Sotto, A. (2016). Ostéite du pied diabétique. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2016, 55–60.
- Leal, S.M., Popowitch, E.B., Levinson, K.J., John, T.M., Lehman, B., Rios, M.B., Gilligan, P.H., and Miller, M.B. (2018). Quantitative Thresholds Enable Accurate Identification of *Clostridium difficile* Infection by the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel. *J. Clin. Microbiol.* 56.
- Lemfack, M.C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., and Piechulla, B. (2014). mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res* 42, D744–D748.
- Li, W., Liu, Y., Zhao, Y., Tao, R., Li, Y., and Shang, S. (2015). Rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in children with pneumonia by an immuno-chromatographic antigen assay. *Sci Rep* 5, 15539.
- Liabakk, N.-B., Nustad, K., and Espevik, T. (1990). A rapid and sensitive immunoassay for tumor necrosis factor using magnetic monodisperse polymer particles. *Journal of Immunological Methods* 134, 253–259.
- Liebeke, M., and Lalk, M. (2014). *Staphylococcus aureus* metabolic response to changing environmental conditions - a metabolomics perspective. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 222–229.
- Lipsky, B.A., Berendt, A.R., Embil, J., and De Lalla, F. (2004). Diagnosing and treating diabetic foot infections. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 20 Suppl 1, S56-64.
- Lipsky, B.A., Berendt, A.R., Cornia, P.B., Pile, J.C., Peters, E.J.G., Armstrong, D.G., Deery, H.G., Embil, J.M., Joseph, W.S., Karchmer, A.W., et al. (2012). 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin. Infect. Dis.* 54, e132-173.
- Lord, H., and Pawliszyn, J. (2000). Microextraction of drugs. *J Chromatogr A* 902, 17–63.
- Luo, Y., Siu, G.K.H., Yeung, A.S.F., Chen, J.H.K., Ho, P.L., Leung, K.W., Tsang, J.L.Y., Cheng, V.C.C., Guo, L., Yang, J., et al. (2015). Performance of the VITEK MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid bacterial identification in two diagnostic centres in China. *J. Med. Microbiol.* 64, 18–24.
- Mackay, I.M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 190–212.
- Macnamara, K., Leardi, R., and McGuigan, F. (2009). Comprehensive investigation and optimisation of the main experimental variables in stir-bar sorptive extraction (SBSE)-thermal desorption-capillary gas chromatography (TD-CGC). *Anal. Chim. Acta* 636, 190–197.
- Melendez, J.H., Frankel, Y.M., An, A.T., Williams, L., Price, L.B., Wang, N.-Y., Lazarus, G.S., and Zenilman, J.M. (2010). Real-time PCR assays compared to culture-based approaches for identification of aerobic bacteria in chronic wounds. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1762–1769.

- Messad, N., Landraud, L., Canivet, B., Lina, G., Richard, J.-L., Sotto, A., Lavigne, J.-P., Lemichez, E., and French Study Group on the Diabetic Foot (2013). Distribution of *edn* in *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers. *Clin. Microbiol. Infect.* *19*, 875–880.
- Messad, N., Prajsnar, T.K., Lina, G., O’Callaghan, D., Foster, S.J., Renshaw, S.A., Skaar, E.P., Bes, M., Dunyach-Remy, C., Vandenesch, F., et al. (2015). Existence of a Colonizing *Staphylococcus aureus* Strain Isolated in Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes* *64*, 2991–2995.
- Mester, Z., and Sturgeon, R. (2005). Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* *60*, 1243–1269.
- Mester, Z., Sturgeon, R., and Pawliszyn, J. (2001). Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* *56*, 233–260.
- Miller, R.J.H., Chow, B., Pillai, D., and Church, D. (2016). Development and evaluation of a novel fast broad-range 16S ribosomal DNA PCR and sequencing assay for diagnosis of bacterial infective endocarditis: multi-year experience in a large Canadian healthcare zone and a literature review. *BMC Infect. Dis.* *16*, 146.
- Montazeri, E.A., Khosravi, A.D., Jolodar, A., Ghaderpanah, M., and Azarpira, S. (2015). Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR. *Burns* *41*, 590–594.
- Moussaoui, W., Jaulhac, B., Hoffmann, A.-M., Ludes, B., Kostrzewa, M., Riegel, P., and Prévost, G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin. Microbiol. Infect.* *16*, 1631–1638.
- Napolitano, L.M. (2005). Emerging issues in the diagnosis and management of infections caused by multi-drug-resistant, gram-positive cocci. *Surg Infect (Larchmt)* *6 Suppl 2*, S-5-22.
- Neuendorf, M., Guadarrama-Gonzalez, R., Lamik, B., and MacKenzie, C.R. (2016). A prospective study of two isothermal amplification assays compared with real-time PCR, CCNA and toxigenic culture for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *BMC Microbiol.* *16*, 19.
- Ng, L.S.Y., Kwang, L.L., Yeow, S.C.S., and Tan, T.Y. (2008). Anaerobic culture of diabetic foot infections: organisms and antimicrobial susceptibilities. *Ann. Acad. Med. Singap.* *37*, 936–939.
- Nie, Y., and Kleine-Benne, E. (2011). Gerstel Application Note 3/2011, <http://www.gerstel.com/pdf/pgc-an-2011-03.pdf>.
- Nonaka, L., Inubushi, A., Shinomiya, H., Murase, M., and Suzuki, S. (2010). Differences of genetic diversity and antibiotics susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital, river and coastal seawater. *Environ Microbiol Rep* *2*, 465–472.
- Nonhoff, C., Roisin, S., Hallin, M., and Denis, O. (2012). Evaluation of Clearview Exact PBP2a, a new immunochromatographic assay, for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LL-MRSA). *J. Clin. Microbiol.* *50*, 3359–3360.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Takino, M., Yamashita, S., Daishima, S., Heiden, A., and Hoffman, A. (2001). Determination of trace amounts of off-flavor compounds in drinking water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. *Analyst* *126*, 1652–1657.

- Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H., and Nakamura, S. (2006). Fast screening of pesticide multiresidues in aqueous samples by dual stir bar sorptive extraction-thermal desorption-low thermal mass gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1130, 83–90.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Ieda, T., David, F., and Sandra, P. (2013). Multi-stir bar sorptive extraction for analysis of odor compounds in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1315, 70–79.
- O'Connor, S.E. (2015). Engineering of Secondary Metabolism. *Annu. Rev. Genet.* 49, 71–94.
- Ovreås, L., Forney, L., Daae, F.L., and Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63, 3367–3373.
- Oyibo, S.O., Jude, E.B., Tarawneh, I., Nguyen, H.C., Harkless, L.B., and Boulton, A.J. (2001). A comparison of two diabetic foot ulcer classification systems: the Wagner and the University of Texas wound classification systems. *Diabetes Care* 24, 84–88.
- Ozsürekci, Y., Oktay Arıkan, K., Bayhan, C., Karadağ-Öncel, E., Emre Aycan, A., Gürbüz, V., Hasçelik, G., and Ceyhan, M. (2016). Can procalcitonin be a diagnostic marker for catheter-related blood stream infection in children? *J Pediatr (Rio J)* 92, 414–420.
- Park, S., Lee, M.-R., and Shin, I. (2007). Fabrication of carbohydrate chips and their use to probe protein-carbohydrate interactions. *Nat Protoc* 2, 2747–2758.
- Patterson, S.D., and Aebersold, R.H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* 33 *Suppl*, 311–323.
- Pawliszyn, J. (1999). *Applications of Solid Phase Microextraction* (Royal Society of Chemistry).
- Perry, C.R., Pearson, R.L., and Miller, G.A. (1991). Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am* 73, 745–749.
- Petti, C.A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1108–1114.
- Pham, C.D., Bolden, C.B., Kuykendall, R.J., and Lockhart, S.R. (2014). Development of a Luminex-based multiplex assay for detection of mutations conferring resistance to Echinocandins in *Candida glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* 52, 790–795.
- Phokrai, P., Karoonboonyanan, W., Thanapattarapairoj, N., Promkong, C., Dulsuk, A., Koosakulnirand, S., Canovali, S., Indrawattana, N., Jutrakul, Y., Wuthiekanun, V., et al. (2018). A Rapid Immunochromatography Test Based on Hcp1 Is a Potential Point-of-Care Test for Serological Diagnosis of Melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 56.
- Preti, G., Thaler, E., Hanson, C.W., Troy, M., Eades, J., and Gelperin, A. (2009). Volatile compounds characteristic of sinus-related bacteria and infected sinus mucus: analysis by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 877, 2011–2018.
- Price, L.B., Liu, C.M., Melendez, J.H., Frankel, Y.M., Engelthaler, D., Aziz, M., Bowers, J., Rattray, R., Ravel, J., Kingsley, C., et al. (2009). Community analysis of chronic wound bacteria using 16S rRNA gene-based pyrosequencing: impact of diabetes and antibiotics on chronic wound microbiota. *PLoS ONE* 4, e6462.

- Prieto, A., Zuloaga, O., Usobiaga, A., Etxebarria, N., and Fernández, L.A. (2007). Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of several persistent organic pollutants in water samples. *J. Chromatogr. A* 1174, 40–49.
- Prikryl, P., and Sevcik, J.G.K. (2008). Characterization of sorption mechanisms of solid-phase microextraction with volatile organic compounds in air samples using a linear solvation energy relationship approach. *J Chromatogr A* 1179, 24–32.
- Punia, H., Gathwala, G., Dhaulakhandi, D.B., and Aamir, M. (2017). Diagnosis of neonatal sepsis using 16S rRNA polymerase chain reaction. *Trop Doct* 47, 336–339.
- Quintana, J.B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., and Prada-Rodríguez, D. (2007). Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1174, 27–39.
- Rajakaruna, L., Hallas, G., Molenaar, L., Dare, D., Sutton, H., Encheva, V., Culak, R., Innes, I., Ball, G., Sefton, A.M., et al. (2009). High throughput identification of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF-MS of intact cells. *Infect. Genet. Evol.* 9, 507–513.
- Ramakant, P., Verma, A.K., Misra, R., Prasad, K.N., Chand, G., Mishra, A., Agarwal, G., Agarwal, A., and Mishra, S.K. (2011). Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? *Diabetologia* 54, 58–64.
- Rasamiravaka, T., Dessay, M., Niry Manantsoa, S., Olivat Rakoto-Alson, A., and Rasamindrakotroka, A. (2011). La place de l'examen direct des prélèvements bactériologiques dans le diagnostic des infections bactériennes. *Bio trib. mag.* 41, 13–17.
- Raymakers, J.T., Houben, A.J., van der Heyden, J.J., Tordoir, J.H., Kitslaar, P.J., and Schaper, N.C. (2001). The effect of diabetes and severe ischaemia on the penetration of ceftazidime into tissues of the limb. *Diabet. Med.* 18, 229–234.
- Redel, H., Gao, Z., Li, H., Alekseyenko, A.V., Zhou, Y., Perez-Perez, G.I., Weinstock, G., Sodergren, E., and Blaser, M.J. (2013). Quantitation and composition of cutaneous microbiota in diabetic and nondiabetic men. *J. Infect. Dis.* 207, 1105–1114.
- Rhoads, D.D., Wolcott, R.D., Sun, Y., and Dowd, S.E. (2012). Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 2535–2550.
- Richard, J.-L., Sotto, A., Jourdan, N., Combescure, C., Vannereau, D., Rodier, M., Lavigne, J.-P., and Nîmes University Hospital Working Group on the Diabetic Foot (GP30) (2008). Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab.* 34, 363–369.
- Richard, J.-L., Lavigne, J.-P., Got, I., Hartemann, A., Malgrange, D., Tsirtsikolou, D., Baleyrier, A., and Senneville, E. (2011). Management of patients hospitalized for diabetic foot infection: results of the French OPIDIA study. *Diabetes Metab.* 37, 208–215.
- Rutherford, S.T., and Bassler, B.L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., and Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed

by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiol.* 32, 243–253.

Sánchez-Avila, J., Quintana, J., Ventura, F., Tauler, R., Duarte, C.M., and Lacorte, S. (2010). Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: an effective tool for determining persistent organic pollutants and nonylphenol in coastal waters in compliance with existing Directives. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 103–112.

Sánchez-Ortiz, B.L., Sánchez-Fernández, R.E., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., and Macías-Rubalcava, M.L. (2016). Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1313–1325.

Schelli, K., Zhong, F., and Zhu, J. (2017). Comparative metabolomics revealing *Staphylococcus aureus* metabolic response to different antibiotics. *Microb Biotechnol* 10, 1764–1774.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467–470.

Schulz, S., and Dickschat, J.S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.* 24, 814–842.

Seipke, R.F. (2015). Strain-level diversity of secondary metabolism in *Streptomyces albus*. *PLoS ONE* 10, e0116457.

Senneville, E., Brière, M., Neut, C., Messad, N., Lina, G., Richard, J.-L., Sotto, A., Lavigne, J.-P., and The French Study Group on the Diabetic Foot (2014). First report of the predominance of clonal complex 398 *Staphylococcus aureus* strains in osteomyelitis complicating diabetic foot ulcers: a national French study. *Clin Microbiol Infect.* 20, O274–O277.

Sethi, S., Nanda, R., and Chakraborty, T. (2013). Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 462–475.

Sewenig, S., Bullinger, D., Hener, U., and Mosandl, A. (2005). Comprehensive authentication of (E)-alpha(beta)-ionone from raspberries, using constant flow MDGC-C/P-IRMS and enantio-MDGC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 53, 838–844.

Shanmugam, P., M, J., and Susan S, L. (2013). The bacteriology of diabetic foot ulcers, with a special reference to multidrug resistant strains. *J Clin Diagn Res* 7, 441–445.

Shin, J.-H., Lee, H.-K., Cho, E.-J., Yu, J.-Y., and Kang, Y.-H. (2008). Targeting the *rpoB* gene using nested PCR-restriction fragment length polymorphism for identification of nontuberculous mycobacteria in hospital tap water. *J. Microbiol.* 46, 608–614.

Singh, N., Armstrong, D.G., and Lipsky, B.A. (2005). Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 293, 217–228.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., and Viridi, J.S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6.

Snow, N.H. (2000). Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J. Chromatogr. A* 885, 445–455.

- Sonnenwirth, A.C. (1972). Evolution of anaerobic methodology. *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1295–1298.
- Sotto, A., Richard, J.-L., Jourdan, N., Combescure, C., Bouziges, N., Lavigne, J.-P., and Nîmes University Hospital Working Group on the Diabetic Foot (GP30) (2007). Miniaturized oligonucleotide arrays: a new tool for discriminating colonization from infection due to *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 30, 2051–2056.
- Sotto, A., Richard, J.-L., Messad, N., Molinari, N., Jourdan, N., Schuldiner, S., Sultan, A., Carrière, C., Canivet, B., Landraud, L., et al. (2012). Distinguishing colonization from infection with *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers with miniaturized oligonucleotide arrays: a French multicenter study. *Diabetes Care* 35, 617–623.
- Southern, E., Mir, K., and Shchepinov, M. (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nat. Genet.* 21, 5–9.
- Souverain, S., Rudaz, S., and Veuthey, J.-L. (2004). Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 801, 141–156.
- Splivallo, R., Bossi, S., Maffei, M., and Bonfante, P. (2007a). Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction. *Phytochemistry* 68, 2584–2598.
- Splivallo, R., Novero, M., Berteà, C.M., Bossi, S., and Bonfante, P. (2007b). Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 175, 417–424.
- Suzuki, M.T., and Giovannoni, S.J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 625–630.
- Tait, E., Perry, J.D., Stanforth, S.P., and Dean, J.R. (2014). Identification of volatile organic compounds produced by bacteria using HS-SPME-GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* 52, 363–373.
- Tentolouris, N., Petrikos, G., Vallianou, N., Zachos, C., Daikos, G.L., Tsapogas, P., Markou, G., and Katsilambros, N. (2006). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infected and uninfected diabetic foot ulcers. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 186–189.
- Theodoridis, G., Koster, E.H., and de Jong, G.J. (2000). Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 745, 49–82.
- Tienpont, B., David, F., Bicchi, C., and Sandra, P. (2000). High capacity headspace sorptive extraction. *J. Microcolumn Sep.* 12, 577–584.
- Tracey, R.P., and Britz, T.J. (1989). Freon 11 extraction of volatile metabolites formed by certain lactic Acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1617–1623.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P., and Palmer, J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 327–338.
- Ulrich, S. (2000). Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr. A* 902, 167–194.
- Valour, F., Rasigade, J.-P., Trouillet-Assant, S., Gagnaire, J., Bouaziz, A., Karsenty, J., Lacour, C., Bes, M., Lustig, S., Bénet, T., et al. (2015). Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a

diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 568.e1-11.

Varaiya, A.Y., Dogra, J.D., Kulkarni, M.H., and Bhalekar, P.N. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in diabetic foot infections. *Indian J Pathol Microbiol* 51, 370–372.

Vas, G., and Vékey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J Mass Spectrom* 39, 233–254.

Vining, L.C. (1990). Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 395–427.

Vrioni, G., Pappas, G., Priavali, E., Gartzonika, C., and Levidiotou, S. (2008). An eternal microbe: *Brucella* DNA load persists for years after clinical cure. *Clin. Infect. Dis.* 46, e131-136.

Wang, Y., Wang, Y., Xu, H., Dai, H., Meng, S., and Ye, C. (2014). Rapid and sensitive detection of *Listeria ivanovii* by loop-mediated isothermal amplification of the *smcL* gene. *PLoS ONE* 9, e115868.

Wareham, D.W., and Abdul Momin, M.H.F. (2017). Rapid Detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Evaluation of the Resist-3 O.K.N. (OXA-48, KPC, NDM) Lateral Flow Multiplexed Assay. *J. Clin. Microbiol.* 55, 1223–1225.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.

Welti, M., Jatón, K., Altwegg, M., Sahli, R., Wenger, A., and Bille, J. (2003). Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45, 85–95.

Wihlborg, R., Pippitt, D., and Marsili, R. (2008). Headspace sorptive extraction and GC-TOFMS for the identification of volatile fungal metabolites. *J. Microbiol. Methods* 75, 244–250.

Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271.

Wolcott, R.D., Gontcharova, V., Sun, Y., and Dowd, S.E. (2009). Evaluation of the bacterial diversity among and within individual venous leg ulcers using bacterial tag-encoded FLX and Titanium amplicon pyrosequencing and metagenomic approaches. *BMC Microbiol.* 9, 226.

Wolcott, R.D., Hanson, J.D., Rees, E.J., Koenig, L.D., Phillips, C.D., Wolcott, R.A., Cox, S.B., and White, J.S. (2016). Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen.* 24, 163–174.

Wolska, K., Kot, B., and Jakubczak, A. (2012). Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitals in siedlce (Poland). *Braz. J. Microbiol.* 43, 274–282.

Xu, Y., Larsen, L.H., Lorenzen, J., Hall-Stoodley, L., Kikhney, J., Moter, A., and Thomsen, T.R. (2017). Microbiological diagnosis of device-related biofilm infections. *APMIS* 125, 289–303.

Youssef, N., Sheik, C.S., Krumholz, L.R., Najar, F.Z., Roe, B.A., and Elshahed, M.S. (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5227–5236.

Yu, C., and Hu, B. (2009). Sol-gel polydimethylsiloxane/poly(vinylalcohol)-coated stir bar sorptive extraction of organophosphorus pesticides in honey and their determination by large volume injection GC. *J Sep Sci* 32, 147–153.

Yu, C., Yao, Z., and Hu, B. (2009). Preparation of polydimethylsiloxane/beta-cyclodextrin/divinylbenzene coated “dumbbell-shaped” stir bar and its application to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic sulfur heterocycles compounds in lake water and soil by high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 641, 75–82.

Yuasa, Y., Yoshiie, K., Takasaki, T., Yoshida, H., and Oda, H. (1996). Retrospective survey of chronic Q fever in Japan by using PCR to detect *Coxiella burnetii* DNA in paraffin-embedded clinical samples. *J Clin Microbiol* 34, 824–827.

Yusuf, N., Zakaria, A., Omar, M.I., Shakaff, A.Y.M., Masnan, M.J., Kamarudin, L.M., Abdul Rahim, N., Zakaria, N.Z.I., Abdullah, A.A., Othman, A., et al. (2015). In-vitro diagnosis of single and poly microbial species targeted for diabetic foot infection using e-nose technology. *BMC Bioinformatics* 16, 158.

Zhang, Z., Yang, M.J., and Pawliszyn, J. (1994). Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Anal. Chem.* 66, 844A-853A.

Zheng, W., and He, L. (2012). Multiplexed Immunoassays. *Advances in Immunoassay Technology*, Dr. Norman H. L. Chiu (Ed.) ISBN: 978-953-51-0440-7.

Zhu, R.-Y., Zhang, K.-X., Zhao, M.-Q., Liu, Y.-H., Xu, Y.-Y., Ju, C.-M., Li, B., and Chen, J.-D. (2009). Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *J. Microbiol. Methods* 78, 339–343.

RESUME : Développement d'outils innovants pour l'étude de l'infection chronique

Un des enjeux majeurs dans la gestion de la plaie de pied diabétique est l'obtention d'informations permettant d'anticiper l'évolution de ces infections. Actuellement, il n'existe pas d'outils suffisamment efficaces qui permettent de distinguer une plaie colonisée d'une plaie infectée. L'approche proposée est basée sur discrimination de plusieurs bactéries fréquemment retrouvées dans les plaies chroniques de pied diabétique à partir de leur profil métabolique, et plus particulièrement des métabolites volatils qu'elles produisent. En effet, le dynamisme du métabolisme bactérien serait à même de mettre en évidence les changements qui s'opèrent dans la plaie. Dans un premier temps, une nouvelle méthodologie de concentration des métabolites volatils par Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) a été développée. Elle est basée sur l'utilisation de barreaux qui sont placés à la fois dans le milieu de culture et en espace de tête, suivie d'une analyse par GC-MS. La méthode a ensuite été comparée avec une autre méthode de concentration utilisant des fibres (la SPME) et a montré une meilleure capacité de concentration, permettant ainsi une détection plus sensible. Cette méthodologie a ensuite été utilisée pour suivre la production métabolique de six souches bactériennes cultivées dans des conditions mimant la plaie chronique. Grâce à leur profil métabolique, il a été possible de distinguer des espèces bactériennes. De plus, de manière plus surprenante, il a été possible de distinguer deux souches de *Staphylococcus aureus* présentant des profils de virulence différents. Enfin, une étude en co-culture a mis en évidence que 83% des métabolites produits en culture simple étaient retrouvés, prouvant l'intérêt de la méthodologie pour distinguer des souches bactériennes d'une même espèce au sein d'une plaie.

Mots clés : Infection chronique, Microbiote, Métabolite volatil bactérien, Stir bar sorptive extraction

ABSTRACT: Development of innovative tools for the study of chronic infection

One of the major challenges in the management of diabetic foot wounds is to obtain information to anticipate the evolution of these infections. Currently, there are no sufficiently effective tools to distinguish a colonized wound to an infected wound. The proposed approach is based on the discrimination of several bacteria frequently found in chronic diabetic foot wounds from their metabolic profile, and more specifically the volatile metabolites they produce. Indeed, the dynamism of bacterial metabolism would be able to highlight the changes that are occurring in the wound. First, a new methodology for the concentration of volatile metabolites by Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) was developed. It is based on the use of stir bars that are placed both in the culture medium and in headspace, followed by GC-MS analysis. The method was then compared with another concentration method using the fibres (SPME) and we highlighted a better concentration capacity with a more sensitive detection. This methodology was then used to monitor the metabolic production of six bacterial strains grown under conditions mimicking the chronic wound. Their metabolic profile allowed us to distinguish bacterial species. Moreover, more surprisingly, it was possible to distinguish two strains of *Staphylococcus aureus* with different virulence profiles. Finally, a co-culture was performed and we showed that 83% of the metabolites produced in simple culture were found, proving the interest of the methodology to distinguish bacterial strains of the same species within a wound.

Keywords: Chronic infection, Microbiota, Bacterial volatile metabolite, Stir bar sorptive extraction