

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 avril 2011 (21.04.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/045544 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/04 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/052181

(22) Date de dépôt international :
14 octobre 2010 (14.10.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0957218 15 octobre 2009 (15.10.2009) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMÉRIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280
Marcy L'etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BEAULIEU, Corinne [FR/FR]; 2 rue de Londres,
F-69140 Rillieux La Pape (FR). CHARRETIER,
Yannick [FR/FR]; Le Georges, F-69690 Courzieu (FR).
CHARRIER, Jean-Philippe [FR/FR]; 28 rue
Barthélémy Thimonnier, F-69160 Tassin La Demi-lune
(FR). CHATELLIER, Sonia [FR/FR]; 4 rue des
Vergers, F-01500 Ambergieu En Bugey (FR). DUFOUR,
Philippe [FR/FR]; 31 chemin de Vassieux, F-69300
Caluire Et Cuire (FR). FRANCESCHI, Christine
[FR/FR]; Les Portes de la Dombes II, 1 rue des
Carronières, F-01800 Meximieux (FR). GIRARD,
Victoria [FR/FR]; 30 rue Pierre Corneille, F-69006 Lyon
(FR). PONS, Sylvie [FR/FR]; 6 rue de la Boatière,
F-69290 Saint Genis Les Ollieres (FR).

(74) Mandataire : SPRUGNOLI, Claude; Biomérieux,
Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy L'etoile (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

— avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : METHOD FOR CHARACTERIZING AT LEAST ONE MICROORGANISM BY MEANS OF MASS SPECTROMETRY

(54) Titre : PROCEDE DE CARACTERISATION D'AU MOINS UN MICROORGANISME PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

(57) Abstract : The present invention relates to a method for characterizing at least one microorganism from a sample, said method including identifying said at least one microorganism and predetermining the typing properties, potential resistance to at least one antimicrobial, and virulence factor. Said method is characterized in that predetermining the typing properties, resistance to at least one antimicrobial, and virulence factor for said at least one microorganism is implemented by means of mass spectrometry through the use of proteins, peptides, and/or metabolites as markers of said typing properties, resistance to at least one antimicrobial, and virulence factor.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme issu d'un échantillon, comprenant l'identification dudit au moins un microorganisme et la détermination des propriétés de typage, résistance potentielle à au moins un antimicrobien et facteur de virulence, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence pour ledit au moins un microorganisme est mise en œuvre par spectrométrie de masse en utilisant des protéines, peptides et/ou métabolites en tant que marqueurs desdites propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence.



WO 2011/045544 A2

Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme par spectrométrie de masse

La présente invention concerne le domaine de la microbiologie. Plus précisément, l'invention concerne la caractérisation de microorganismes issus d'un échantillon en utilisant la spectrométrie de masse.

5 Depuis la découverte des microbes par Pasteur, les microorganismes sont étudiés par microscopie et analyses biochimiques. Ces méthodes traditionnelles sont souvent longues et fastidieuses et des alternatives analytiques ont très tôt été recherchées. C'est ainsi que l'analyse de bactéries par spectrométrie de masse a été initiée dès 1975 par J. Anhalt et C. Fenselau [1].

10 Ces travaux préliminaires ont été suivis par l'étude en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) d'acides gras de la paroi des microorganismes [2]. Cette méthode a été popularisée sous l'appellation anglo-saxonne de FAME pour Fatty Acid Methyl Ester. Elle constitue actuellement une méthode de référence pour les études taxonomiques. Son utilisation reste cependant
15 limitée à certains laboratoires spécialisés maîtrisant le traitement de l'échantillon par saponification, hydrolyse et dérivation.

En 1996, les travaux de M. Claydon et al [3] ainsi que de T. Krishnamurthy et P. Ross [4] ont montré la possibilité d'identifier différentes espèces bactériennes avec un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (acronyme de l'anglais Matrix
20 Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight). L'analyse associe l'acquisition d'un spectre de masse et l'interprétation d'un logiciel expert. Elle est extrêmement simple et peut être effectuée en quelques minutes. Cependant elle ne se diffuse que depuis très peu de temps dans les laboratoires d'analyses médicales [5]. Son utilisation clinique est actuellement limitée à l'identification d'espèces bactériennes et de levures.
25 Elle n'est utilisée ni pour le typage, ni pour l'identification des résistances aux antimicrobiens, ni pour l'analyse de la virulence.

Or la caractérisation des microorganismes est fondamentale tant dans le domaine clinique que le domaine industriel. Ainsi, par exemple, l'identification de résistances aux antimicrobiens tels que les antibiotiques, et la détection de facteurs de
30 virulence sont des éléments essentiels pour assurer une prise en charge optimale des patients. De même, le typage est crucial pour les études épidémiologiques et pour assurer la lutte contre les maladies nosocomiales.

D'autres procédés de spectrométrie de masse, notamment en tandem, ont été

proposés pour répondre à ces besoins. A titre d'exemple, il est possible de citer les travaux de C. Fenselau et al. pour l'identification de β -Lactamase avec un quadripôle-TOF (Q-TOF) [6], ceux de D. Ding et al. pour la détection d'entérotoxine staphylococcique C2 (facteur de virulence SEC2) avec un triple quadripôle [7], ou encore ceux de R. Everley et al. pour le typage de *Clostridium* avec un Q-TOF [8].

Cependant ces résultats de recherche ne sont pas applicables à une utilisation clinique de routine. Ils ont été obtenus avec des instruments de recherche nécessitant un personnel hautement qualifié. Les temps d'analyse, souvent supérieurs à une heure par échantillon, sont incompatibles avec la charge de travail d'un laboratoire d'analyse microbiologique. Enfin, les données obtenues par les différentes équipes répondent à une question spécifique, mais pas simultanément à l'ensemble des besoins cliniques.

Plus récemment S. Hofstadler et al. ont proposé un procédé répondant à l'ensemble des besoins cliniques [9]. Ils ont associé une amplification du génome microbien par PCR à une détection des produits de PCR par électrospray-TOF (ESI-TOF). Ce procédé est maintenant totalement automatisé [10]. Toutefois, il nécessite une amplification par PCR avec les défauts inhérents à la biologie moléculaire, à savoir coût des sondes, rendement d'extraction, etc.

Dans ce contexte, l'objectif de la présente invention est de proposer un procédé de caractérisation des microorganismes, à savoir identification et détermination des propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence, qui permette de palier les inconvénients des procédés de l'art antérieur, à savoir fournir un procédé peu coûteux, sans réactifs spécifiques à chaque espèce, notamment par rapport aux procédés de biologie moléculaire, donnant un résultat en un temps court, inférieur à une heure, et utilisable en clinique de routine, sans nécessiter un personnel hautement qualifié. De plus, l'ensemble du procédé de caractérisation des microorganismes peut être avantageusement réalisé avec un même spectromètre de masse, ce qui simplifie l'instrumentation du laboratoire d'analyse microbiologique.

A cette fin, l'invention propose un nouveau procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme issu d'un échantillon, comprenant l'identification dudit au moins un microorganisme et la détermination des propriétés de typage, résistance potentielle à au moins un antimicrobien et facteur de virulence, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et

facteur de virulence pour ledit au moins un microorganisme est mise en œuvre par spectrométrie de masse en utilisant des protéines, peptides et/ou métabolites en tant que marqueurs desdites propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence.

- 5 Ainsi, le procédé de l'invention est tel qu'au moins trois des propriétés de caractérisation d'un microorganisme sont mises en œuvre par la technique de spectrométrie de masse en utilisant, en tant que marqueurs, des protéines, peptides ou métabolites représentatifs des microorganismes à caractériser.

10 Les microorganismes qui peuvent être caractérisés par le procédé de l'invention sont tous des microorganismes, pathogènes ou non, rencontrés tant dans l'industrie que dans la clinique. Ce peut être des bactéries, des virus, des protozoaires ou des levures.

15 Par marqueurs des propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence, on entend des molécules, d'origine protéique ou métabolique, qui sont caractéristiques desdites propriétés.

20 Par typage d'un microorganisme, on entend la différenciation de plusieurs souches au sein d'une même espèce. Le typage a une valeur épidémiologique, le clinicien sait si la souche isolée chez le patient provient de la même source que d'autres souches apparemment identiques et isolées chez d'autres patients ou dans l'environnement. Cela permet ainsi de mettre en évidence un foyer infectieux au sein d'un hôpital ou lors d'une intoxication alimentaire. A titre d'exemples non limitatifs de marqueurs de propriétés de typage chez les bactéries, on peut citer des peptides présentant des mutations caractéristiques tels que les produits de transcription des gènes *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* et *recA* d'*Escherichia coli*, et ceux des gènes *arc*,
25 *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL* de *Staphylococcus aureus*. A titre d'exemples non limitatifs de marqueurs de propriétés de typage chez les protozoaires, on peut citer les produits du gène chitinase d'*Entamoeba histolytica* et *E. dispar*. A titre d'exemples non limitatifs de marqueurs de propriétés de typage chez les virus, on peut citer les produits du gène polymérase du virus de l'immunodéficience humaine. Enfin, à titre d'exemples
30 non limitatifs de marqueurs de propriétés de typage chez les levures, on peut citer les produits de transcription des fragments de gènes *aat1a*, *acc1*, *adp1*, *mpiB*, *syal*, *vps13*, et *zwf1b* de *Candida albicans*.

Par détermination de la résistance à au moins un antimicrobien, on entend la détermination de la susceptibilité d'un microorganisme à être détruit par un antimicrobien. Ainsi, si le microorganisme est une bactérie, l'antimicrobien contre lequel il peut développer une résistance est un antibiotique, si c'est un protozoaire, l'antimicrobien est un anti-parasitaire, si c'est un virus, l'antimicrobien est un anti-viral, et, si c'est une levure, l'antimicrobien est un anti-fongique. Les protéines impliquées dans les mécanismes de résistance vont différer selon la famille et l'espèce. A titre d'exemples non limitatifs de marqueurs de résistance à au moins un antibiotique utiles chez les bactéries, on peut citer les produits de transcription du gène *mecA* de *Staphylococcus aureus*, conférant une résistance à la Mécilline, et permettant d'indiquer si les souches sont méthicillino-résistantes (souches MRSA) ou bien méthicillino-sensibles (souches MSSA). On peut également citer la protéine TEM-2 qui permet d'indiquer si les souches d' *Escherichia coli* sont résistantes aux pénicillines mais sensibles à d'autres classes d'antibiotiques type céphalosporines ou carbapénèmes. Un autre marqueur est l'enzyme appelée KPC (pour *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase) qui confère une résistance aux carbapénèmes. Un autre exemple de marqueur de résistance pour *Staphylococcus aureus* est le profil métabolique représentatif de la résistance à la vancomycine tel que décrit par Alexander E. et al dans le poster « Metabolomics-based approach to antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* » présenté au congrès de l'ASMS, 2009. A titre d'exemple non limitatif de marqueurs de résistance à au moins un anti-parasitaire utile chez les protozoaires, on peut citer la superoxide dismutase contenant du fer (Fe-SOD) et la peroxyrédoxine dont l'expression accrue confère une résistance au métronidazole. A titre d'exemple non limitatif de marqueur de résistance à au moins un antiviral utile chez les virus, on peut citer les mutations de l'enzyme transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine, conférant une sensibilité diminuée aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse. Enfin, à titre d'exemple non limitatif de marqueurs de résistance à au moins un antifongique utile chez les levures, on peut citer la mutation de l'enzyme 1-3-b-D-glucane synthase de *Candida albicans*, conférant une sensibilité diminuée aux échinocandines. Pour autre exemple, on peut évoquer la résistance aux antifongiques azolés chez *Candida albicans*, en particulier la résistance au fluconazole. La cible du fluconazole est une enzyme, la lanostérol déméthylase,

impliquée dans la synthèse de l'ergostérol, constituant principal de la paroi fongique. La résistance au fluconazole peut être associée à l'apparition de mutations ponctuelles dans le gène *erg11* codant pour la lanostérol déméthylase.

Il convient de noter que les marqueurs spécifiques de la résistance sont également utilisables comme marqueurs de typage, comme mis en évidence par la Demanderesse.

Par détermination de la virulence d'un microorganisme, on entend l'évaluation du caractère pathogène, nocif et violent du microorganisme. A titre d'exemples non limitatifs de marqueur de virulence chez les bactéries, on peut citer la PVL (Panton-Valentine Leucocidine), toxine cytolytique à deux composantes synergiques (LukFet LukS), présente chez *Staphylococcus aureus*, qui est l'une des toxines les plus virulentes causant des atteintes cutanées, de la cellulite extensive, de l'ostéomyélite et des pneumonies nécrosantes, et est impliquée dans des surinfections virales. D'autres exemples comprennent l'Autolysine et la Pneumolysine présents chez *Streptococcus pneumoniae*, espèce responsable d'infections des voies respiratoires, de méningites et de bactériémies, ainsi que les toxines A et B de *Clostridium difficile*, bactérie commensale de l'intestin, lesquelles provoquent soit l'altération de la perméabilité de l'épithélium intestinal (toxine A), soit s'attaquent directement aux cellules de l'épithélium (toxine B), soit diminuent dans le temps le transit intestinal et l'absorption intestinale, provoquant une diarrhée (action combinée des toxines A et B). On peut aussi citer comme exemple les Shiga toxines Stx1 et Stx2 présentes chez *Escherichia coli*. Ces deux cytotoxines sont considérés comme des facteurs de virulence importants des *Escherichia coli* entérohémorragiques. Elles sont responsables de complications comme la colite hémorragique ou le syndrome hémolytique-urémique. A titre d'exemple non limitatif de marqueur de virulence chez les protozoaires, on peut citer des antioxydants (Fe-hydrogénase 2, peroxiredoxine, superoxyde dismutase) présents chez *Entamoeba histolytica*, espèce responsable de dysenterie, abcès hépatique. A titre d'exemple non limitatif de marqueur de virulence chez les virus, on peut citer le variant de la protéine Nef chez le virus de l'immunodéficience humaine de type 1, type plus pathogène chez l'être humain. Enfin, à titre d'exemple non limitatif de marqueur de virulence chez les levures, on peut citer la lipase 8 chez *Candida albicans*, espèce responsable de candidoses superficielles mais

aussi de candidoses septicémiques et disséminées.

Il convient de noter que les marqueurs spécifiques de la virulence sont également utilisables comme marqueur de typage, comme mis en évidence par la Demanderesse.

5 Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre pour caractériser des bactéries, ledit antimicrobien étant alors un antibiotique, ce qui constitue un mode de réalisation de l'invention. Ainsi, par exemple, à titre de bactéries pouvant caractérisées selon le procédé de l'invention, on peut citer :

- *Escherichia coli* en utilisant TEM-2 comme marqueur de résistance et de
10 typage, ainsi que Shiga toxins, OmpA comme marqueur de virulence et de typage.

- *Enterococcus faecalis* et *faecium* en utilisant VanA et VanB pour la résistance et le typage, ainsi que ESP (Enterococcal Surface Protein) pour la virulence et le typage, ou bien

- *Staphylococcus aureus* en utilisant la protéine appelée Immunoglobulin G-
15 binding protéine A (également appelée protéine A) pour le typage, la protéine PBP2a pour la résistance, voire le typage, ainsi que la protéine PVL pour la virulence, voire également le typage.

A titre d'autres microorganismes pouvant être caractérisés selon le procédé de l'invention, on peut citer :

20 - *Candida albicans* en utilisant l'enzyme 1-3-b-D-glucane synthase ou bien l'enzyme lanostérol déméthylase comme marqueur de résistance et de typage, ainsi que la lipase 8 comme marqueur de virulence et de typage.

L'échantillon sur lequel le procédé de l'invention peut être mis en œuvre est tout échantillon susceptible de contenir un microorganisme cible. L'échantillon peut
25 être d'origine biologique, soit animale, végétale ou humaine. Il peut alors correspondre à un prélèvement de fluide biologique (sang total, sérum, plasma, urine, liquide céphalo-rachidien, sécrétion organique, par exemple), un prélèvement tissulaire ou des cellules isolées. Ce prélèvement peut être utilisé tel quel dans la mesure où les marqueurs de caractérisation des microorganismes sont disponibles dans l'échantillon
30 testé, ou bien il peut subir préalablement à l'analyse, une préparation de type enrichissement, extraction, concentration, purification, culture, selon des méthodes connues de l'homme du métier.

L'échantillon peut être d'origine industrielle, soit, selon une liste non exhaustive un prélèvement d'air, un prélèvement d'eau, un prélèvement effectué sur une surface, une pièce ou un produit manufacturé, un produit d'origine alimentaire. Parmi les échantillons d'origine alimentaire, on peut citer de façon non exhaustive un échantillon de produit lacté (yaourts, fromages,), de viande, de poisson, d'œuf, de fruit, de légume, d'eau, de boisson (lait, jus de fruits, soda, etc). Ces échantillons d'origine alimentaire peuvent aussi provenir de sauces ou de plats élaborés. Un échantillon alimentaire peut enfin être issu d'une alimentation destinée aux animaux, telle que notamment des farines animales.

10 Lorsque les marqueurs de caractérisation des microorganismes sont d'origine protéique, en amont de la détection par spectrométrie de masse, l'échantillon à analyser est préférentiellement traité au préalable pour générer des peptides à partir de l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon pour fragmenter ces protéines en peptides, par exemple par digestion avec une enzyme protéolytique (protéase), ou par
15 action d'un réactif chimique. En effet, le clivage des protéines peut être fait par un traitement physico-chimique, par un traitement biologique ou par une combinaison des deux traitements. Parmi les traitements utilisables, on peut citer le traitement par des radicaux hydroxyle, notamment avec de l' H_2O_2 . Le traitement par les radicaux hydroxyle provoque une coupure des liaisons peptidiques qui se fait de manière
20 aléatoire sur n'importe quelle liaison peptidique de la protéine. La concentration en radicaux hydroxyle conditionne le nombre de clivages opérés et donc la longueur des fragments peptidiques obtenus. D'autres traitements chimiques peuvent également être utilisés comme, par exemple, le traitement au bromure de cyanogène (CNBr) qui scinde spécifiquement les liaisons peptidiques au niveau du groupe carboxylique des résidus
25 méthionyle. Il est également possible de réaliser un clivage acide partiel au niveau des résidus aspartyle par chauffage à 1000°C d'une solution de protéines dans de l'acide trifluoroacétique.

Le traitement des protéines par digestion enzymatique est néanmoins préféré par rapport au traitement physico-chimique car il préserve davantage la structure des
30 protéines, et est plus facile à contrôler. Par « digestion enzymatique », on entend l'action simple ou combinée d'une ou de plusieurs enzymes dans des conditions de réaction appropriées. Les enzymes effectuant la protéolyse, appelées protéases, coupent

les protéines à des endroits spécifiques. Chaque protéase reconnaît généralement une séquence d'acides aminés au sein desquels elle effectue toujours la même coupure. Certaines protéases reconnaissent un seul acide aminé ou une séquence de deux acides aminés entre lesquels elles opèrent un clivage, d'autres protéases ne reconnaissent que
5 des séquences plus longues. Ces protéases peuvent être des endoprotéases ou des exoprotéases. Parmi les protéases connues on peut citer, comme décrit dans WO2005/098071 :

- les enzymes spécifiques comme la trypsine qui scinde la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique des résidus Arg et Lys, l'endolysine qui clive la liaison
10 peptidique du groupe -CO des lysines, la chymotrypsine qui hydrolyse la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique des résidus aromatiques (Phe, Tyr et Trp), la pepsine qui coupe au niveau du groupe NH₂ des résidus aromatiques (Phe, Tyr et Trp), la protéase V8 de la souche V8 de *Staphylococcus aureus* qui clive la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique du résidu Glu ;

- 15 - les enzymes non-spécifiques comme la thermolysine provenant de la bactérie *Bacillus thermoproteolyticus* qui hydrolyse la liaison peptidique du groupe NH₂ des acides aminés hydrophobes (Xaa-Leu, Xaa-Ile, Xaa-Phe), la subtilisine et la pronase qui sont des protéases bactériennes qui hydrolysent pratiquement toutes les liaisons et peuvent transformer les protéines en oligopeptides dans des conditions de réaction
20 contrôlées (concentration en enzyme et durée de réaction).

Plusieurs protéases peuvent être utilisées de façon simultanée, si leurs modes d'action sont compatibles, ou elles peuvent être utilisées de façon successive. Dans le cadre de l'invention, la digestion de l'échantillon est, de préférence, réalisée par action d'une enzyme protéase, par exemple la trypsine.

25 La génération de peptides à l'aide d'un réactif chimique ou d'une protéase, peut être obtenu par simple réaction en solution. Elle peut également être mise en œuvre avec un four à micro-ondes [11], ou sous pression [12], ou bien encore avec un dispositif à ultrasons [13]. Dans ces trois derniers cas, le protocole sera beaucoup plus rapide.

30 Parmi les peptides ainsi obtenus, les peptides spécifiques de la protéine, sont nommés peptides protéotypiques. Ce sont eux qui seront dosés par spectrométrie de masse.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les marqueurs de caractérisation sont des protéines du microorganisme à caractériser. En particulier, lesdites protéines sont digérées en peptides, de préférence par une enzyme, de préférence encore par la trypsine.

5 De même, l'échantillon contenant des marqueurs de caractérisation d'origine protéique peut également être préalablement traité à des fins de purification. Lorsque les marqueurs sont d'origine protéique, ce traitement préalable de purification peut être mis en œuvre avant ou après l'étape de génération de peptides tels que décrits précédemment.

10 Le traitement préalable de purification d'échantillon est largement connu de l'homme du métier et pourra notamment mettre en œuvre des techniques de centrifugation, de filtration, d'électrophorèse ou de chromatographie. Ces techniques séparatives peuvent être utilisées seules ou combinées entre elles pour obtenir une séparation multidimensionnelle. Par exemple, une chromatographie
15 multidimensionnelle peut être utilisée en associant une séparation par chromatographie d'échange d'ions à une chromatographie en phase inverse, comme décrit par T. Fortin et al. [14], ou H. Keshishian et al. [15]. Dans ces publications, le milieu chromatographique peut être en colonne ou en cartouche (extraction en phase solide).

La fraction électrophorétique ou chromatographique (ou le temps de rétention
20 en chromatographie mono ou multidimensionnelle) des peptides protéotypiques est caractéristique de chaque peptide et la mise en œuvre de ces techniques permet donc de sélectionner le ou les peptides protéotypiques à doser. Un tel fractionnement des peptides générés permet d'accroître la spécificité du dosage ultérieur par spectrométrie de masse.

25 Une alternative aux techniques d'électrophorèse ou de chromatographie, pour le fractionnement des peptides, consiste à purifier spécifiquement les N-glycopeptides ([16] et demande de brevet WO 2008/066629). Néanmoins, une telle purification ne permet que la quantification des peptides ayant subi une modification post-traductionnelle de type N-glycosylation. Or toutes les protéines ne sont pas glycosylées,
30 ce qui limite donc son utilisation.

La spectrométrie de masse à mettre en œuvre dans le procédé de l'invention est largement connue de l'homme du métier comme un outil puissant pour l'analyse et

la détection de différents types de molécules. De façon générale, tout type de molécule pouvant être ionisée peut être détecté en fonction de sa masse moléculaire à l'aide d'un spectromètre de masse. Selon la nature de la molécule à détecter, d'origine protéique ou métabolique, certaines technologies de spectrométrie de masse peuvent être plus adaptées. Néanmoins, quelque soit la méthode de spectrométrie de masse utilisée pour la détection, cette dernière comprend une étape d'ionisation de la molécule cible en ions dits moléculaires, dans le cas présent une étape d'ionisation des marqueurs de caractérisation, et une étape de séparation des ions moléculaires obtenus en fonction de leur masse.

10 Tous les spectromètres de masse comportent donc :

 i) une source d'ionisation destinée à ioniser les marqueurs présents dans l'échantillon à analyser, c'est-à-dire à conférer une charge positive ou négative à ces marqueurs;

 ii) un analyseur de masse destiné à séparer les marqueurs ionisés, ou ions moléculaires, en fonction de leur ratio masse sur charge (m/z) ;

 iii) un détecteur destiné à mesurer le signal produit soit directement par les ions moléculaires, soit par des ions produits à partir des ions moléculaires, comme détaillés ci-après.

 L'étape d'ionisation nécessaire pour la mise en œuvre d'une spectrométrie de masse peut être mise en œuvre par tout procédé connu de l'homme du métier. La source d'ionisation permet d'amener les molécules à doser sous un état gazeux et ionisé. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et seront utilisés en fonction du résultat recherché et des molécules analysées. On peut citer, notamment :

 - l'ionisation électronique (EI), l'ionisation chimique (CI) et la désorption-ionisation chimique (DCI)

 - le bombardement par atomes rapides (FAB), atomes métastables (MAB) ou ions (SIMS, LSIMS)

30 - le couplage plasma inductif (ICP)

 - l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI)

- l'électronébulisation ou électrospray (ESI)

- la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), activée par une surface (SELDI) ou sur silicium (DIOS)

- l'ionisation-désorption par interaction avec espèces métastables (DART)

5 Notamment, l'ionisation peut être mise en œuvre comme suit : l'échantillon contenant les molécules cibles est introduit dans une source d'ionisation, où les molécules sont ionisées à l'état gazeux et ainsi transformées en ions moléculaires qui correspondent aux molécules initiales. Une source d'ionisation de type électrospray (ESI pour ElectroSpray Ionisation) permet d'ioniser une molécule tout en la faisant
10 passer d'un état liquide à un état gazeux. Les ions moléculaires obtenus correspondent alors aux molécules présentes à l'état liquide, avec en mode positif un, deux, voire trois protons supplémentaires ou plus et sont donc porteurs de une, deux, voire trois charges ou plus. Par exemple, lorsque la molécule cible est une protéine, une ionisation des peptides protéotypiques obtenus après fractionnement de la protéine cible, grâce à une
15 source de type électrospray fonctionnant en mode positif, conduit à des ions polypeptidiques à l'état gazeux, avec un, deux, voire trois protons supplémentaires ou plus et qui sont donc porteurs de une, deux, voire trois charges ou plus, et permet un passage d'un état liquide à un état gazeux [17]. Ce type de source est particulièrement bien adapté, lorsque les molécules cibles ou peptides protéotypiques obtenus sont
20 préalablement séparées par chromatographie liquide en phase inverse. Néanmoins, le rendement d'ionisation des molécules présentes dans l'échantillon peut varier en fonction de la concentration et de la nature des différentes espèces en présence. Ce phénomène se traduit par un effet matrice bien connu de l'homme de l'art.

25 Une source d'ionisation MALDI permettra d'ioniser des molécules, à partir d'un échantillon à l'état solide.

L'analyseur de masse dans lequel est mis en œuvre l'étape de séparation des marqueurs ionisés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) est tout analyseur de masse connu de l'homme du métier. On peut citer les analyseurs basse résolution, du type quadripôle ou quadrupôle (Q), piège à ions 3D (IT) ou linéaire (LIT), également
30 appelés trappe ionique, et les analyseurs haute résolution, permettant de mesurer la masse exacte des analytes et qui utilisent notamment le secteur magnétique couplé à un secteur électrique, le temps de vol (TOF).

La séparation des ions moléculaires en fonction de leur ratio m/z peut être mise en œuvre une seule fois (spectrométrie de masse simple ou MS), ou bien plusieurs séparations MS successives peuvent être menées. Lorsque deux séparations MS successives sont réalisées, l'analyse est appelée MS/MS ou MS^2 . Lorsque trois
5 séparations MS successives sont réalisées, l'analyse est appelée MS/MS/MS ou MS^3 et plus généralement, lorsque n séparations MS successives sont réalisées, l'analyse est appelée MS^n .

Parmi les techniques mettant en œuvre plusieurs séparations successives, les modes SRM (Selected Reaction Monitoring) en cas de détection ou dosage d'une seule
10 molécule cible, ou bien MRM (Multiple Reaction Monitoring) en cas de détection ou dosage de plusieurs molécules cibles, sont des utilisations particulières de séparation MS^2 . De même le mode MRM^3 est une utilisation particulière de séparation en MS/MS/MS. On parle alors de spectrométrie de masse ciblée.

Dans le cas d'une détection en mode MS simple, c'est le rapport masse/charge
15 des ions moléculaires obtenus qui est corrélé à la molécule cible à détecter.

Dans le cas d'une détection en mode MS/MS, essentiellement deux étapes sont ajoutées, par rapport à un dosage MS qui sont :

- i) une fragmentation des ions moléculaires, alors appelés ions précurseurs, pour donner des ions dit ions fragments de 1^{ère} génération, et
20
- ii) une séparation des ions dit ions fragments de 1^{ère} génération en fonction de leur masse $(m/z)_2$, le rapport $(m/z)_1$ correspondant au rapport (m/z) des ions précurseurs.

C'est alors le rapport masse/charge des ions fragments de 1^{ère} génération ainsi obtenus qui est corrélé à la molécule cible à détecter. Par ion fragment de première
25 génération, on entend un ion issu de l'ion précurseur, suite à une étape de fragmentation et dont le rapport masse sur charge m/z est différent de l'ion précurseur.

Les couples $(m/z)_1$ et $(m/z)_2$ sont baptisés transitions et sont représentatifs des ions caractéristiques à détecter.

Le choix des ions caractéristiques qui sont détectés pour être corrélés à la
30 molécule cible est effectué par l'homme du métier selon les méthodes standards. Leur sélection conduira avantageusement aux dosages les plus sensibles, les plus spécifiques et les plus robustes possibles, en termes de reproductibilité et fiabilité. Dans les

méthodes développées pour la sélection de peptides protéotypiques $(m/z)_1$, et de fragment de première génération $(m/z)_2$, le choix est essentiellement basé sur l'intensité de la réponse. Pour plus de détails, on pourra se référer à V. Fusaro et al. [18]. Des logiciels commerciaux, tels que les logiciels MIDAS et MRM Pilote d'Applied Biosystems ou encore MRMAid [19] pourront être utilisés par l'homme de l'art pour lui permettre de prédire tous les couples de transitions possibles. Il pourra également être fait appel à une base de données nommée PeptideAtlas, construite par F. Desiere et al. [20] pour compiler l'ensemble des transitions MRM de peptides décrites par la communauté scientifique. Cette base PeptideAtlas est disponible en accès libre sur internet. Pour des molécules non protéiques, il est également possible d'utiliser des bases de données, telles que par exemple celle accessible au travers du logiciel Cliiquid de la société Applied Biosystems (Etats Unis d'Amérique).

Une approche alternative pour sélectionner les peptides protéotypiques, $(m/z)_1$ et $(m/z)_2$, consiste à utiliser les spectres de fragmentation MS/MS obtenus à l'occasion d'autres travaux. Ces travaux peuvent être, par exemple, les phases de découverte et d'identification des biomarqueurs par analyse protéomique. Cette approche a été proposée par Thermo Scientific lors de réunion utilisateurs [19]. Elle permet de générer une liste de transitions candidates à partir des peptides identifiés expérimentalement par le logiciel SIEVE (Thermo Scientific). Certains critères ont été détaillés par J. Mead et al. [19] pour le choix des ions $(m/z)_1$ et $(m/z)_2$ et sont détaillés ci-après :

- Les peptides avec des sites de clivage interne, c'est-à-dire avec de la Lysine ou de l'Arginine interne, doivent être évités, sauf si la Lysine ou l'Arginine est suivie par de la Proline,
- Les peptides avec de l'Asparagine ou de la Glutamine doivent être évités car ils peuvent se désaminer,
- Les peptides avec de la Glutamine ou de l'Acide Glutamique en N-terminal doivent être évités car ils peuvent se cycliser spontanément,
- Les peptides avec de la Méthionine doivent être évités car ils peuvent être oxydés,
- Les peptides avec de la Cystéine doivent être évités car ils peuvent être modifiés de façon non reproductible lors d'une éventuelle étape de dénaturation, réduction et blocage des fonctions thiols,

- Les peptides avec de la Proline peuvent être considérés comme favorables parce qu'ils produisent généralement des fragments intenses en MS/MS avec un seul pic très majoritaire. Cependant, un seul fragment très majoritaire ne permet pas de valider l'identité de la transition dans un mélange complexe. En effet, seule la
5 présence simultanée de plusieurs fragments caractéristiques permet de vérifier que l'ion précurseur recherché est bien détecté,
- Les peptides ayant une Proline adjacente au C-terminal (position n-1) ou en seconde position par rapport au C-terminal (position n-2) sont à éviter car, dans ce cas, la taille du peptide fragment de première génération est généralement
10 considérée comme trop petite pour être suffisamment spécifique,
- La sélection de fragments ayant une masse supérieure au précurseur est à privilégier pour favoriser la spécificité. Pour cela, il faut sélectionner un ion précurseur dichargé et sélectionner l'ion fragment de première génération le plus intense ayant une masse supérieure au précurseur, c'est à dire un ion fragment de première
15 génération monochargé.

La fragmentation des ions précurseurs sélectionnés est mise en œuvre dans une cellule de fragmentation telle que les modèles de type triple quadripôle [21], ou de type trappe ionique [22], ou encore de type temps de vol (TOF) [23], lesquels permettent également la séparation des ions. La ou les fragmentations seront
20 classiquement réalisées par collision avec un gaz inerte tel que l'argon ou l'azote, au sein d'un champ électrique, par photo-excitation ou photodissociation à l'aide d'une source lumineuse intense, collision avec des électrons ou espèces radicalaires, par application d'une différence de potentiel, par exemple dans un tube de temps de vol, ou par tout autre mode d'activation. Les caractéristiques du champ électrique
25 conditionnent l'intensité et la nature de la fragmentation. Ainsi, le champ électrique appliqué en présence d'un gaz inerte, par exemple dans un quadripôle, conditionne l'énergie de collision apportée aux ions. Cette énergie de collision sera optimisée, par l'homme du métier, pour accroître la sensibilité de la transition à doser. A titre d'exemple, il est possible de faire varier l'énergie de collision entre 5 et 180 eV en q2
30 dans un spectromètre de masse AB SCIEX QTRAP® 5500 de la société Applied Biosystems (Foster City, Etats Unis d'Amérique). De même, la durée de l'étape de

collision et l'énergie d'excitation au sein, par exemple, d'une trappe ionique seront optimisées, par l'homme du métier, pour conduire au dosage le plus sensible. A titre d'exemple, il est possible de faire varier cette durée, baptisée temps d'excitation, entre 0,010 et 50 ms et l'énergie d'excitation entre 0 et 1 (unité arbitraire) en Q3 dans un spectromètre de masse AB SCIEX QTRAP® 5500 de la société Applied Biosystems.

Enfin, la détection des ions caractéristiques sélectionnés se fait de façon classique, notamment grâce à un détecteur et à un système de traitement. Le détecteur collecte les ions et produit un signal électrique dont l'intensité dépend de la quantité d'ions collectée. Le signal obtenu est ensuite amplifié pour qu'il puisse être traité informatiquement. Un ensemble informatique de traitement des données permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.

Le principe du mode SRM, ou encore du mode MRM, est de sélectionner spécifiquement un ion précurseur, de le fragmenter, puis de sélectionner spécifiquement l'un de ses ions fragments. Pour de telles applications, des dispositifs du type triple quadripôle ou des hybrides triple quadripôle à trappe ionique sont généralement utilisés.

Dans le cas d'un dispositif triple quadripôle (Q1q2Q3) utilisé en mode MS², en vue du dosage ou de la détection d'une protéine cible, le premier quadripôle (Q1) permet de filtrer les ions moléculaires, correspondant aux peptides protéotypiques caractéristiques de la protéine à doser et obtenus lors d'une étape antérieure de digestion, en fonction de leur ratio masse sur charge (m/z). Seuls les peptides ayant le ratio masse/charge du peptide protéotypique recherché, ratio appelé (m/z)₁, sont transmis dans le deuxième quadripôle (q2) et jouent le rôle d'ions précurseurs pour la fragmentation ultérieure. L'analyseur q2 permet de fragmenter les peptides de ratio masse/charge (m/z)₁ en ions fragments de première génération. La fragmentation est généralement obtenue par collision des peptides précurseurs avec un gaz inerte, comme de l'azote ou de l'argon dans q2. Les ions fragments de première génération sont transmis dans un troisième quadripôle (Q3) qui filtre les ions fragments de première génération en fonction d'un ratio masse sur charge spécifique, ratio appelé (m/z)₂. Seuls les ions fragments de première génération ayant le ratio masse/charge d'un fragment caractéristique du peptide protéotypique recherché (m/z)₂ sont transmis dans le détecteur pour être détectés, voire quantifiés.

Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, en relation avec la sélection de l'ion précurseur d'une part et de la sélection de l'ion fragment de première génération d'autre part. La spectrométrie de masse en mode SRM ou MRM est donc avantageuse pour la quantification

5 Lorsque la spectrométrie de masse mise en œuvre dans le procédé de l'invention est une spectrométrie de masse en tandem (MS^2 , MS^3 , MS^4 ou MS^5), plusieurs analyseurs de masse peuvent être couplés entre eux. Par exemple, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à
10 ions ou le FT-ICR, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

Selon des modes de réalisation préférés de l'invention, le procédé de l'invention comprend une ou plusieurs des caractéristiques suivantes :

- la spectrométrie de masse, mise en œuvre pour les propriétés de typage, de
15 résistance potentielle à au moins un antimicrobien et facteur de virulence, est une spectrométrie de type MS/MS, ce qui a pour avantage de générer un fragment spécifique de la molécule à détecter ou à quantifier, et ainsi d'apporter une grande spécificité à la méthode de dosage ;

- la spectrométrie MS/MS est de la MRM, ce qui a pour avantage d'utiliser un
20 temps de cycle d'analyse dans le spectromètre de masse de quelques dizaines de millisecondes, ce qui permet de détecter ou de quantifier avec une grande sensibilité, et de façon multiplexée, un grand nombre de molécules différentes ;

- la détermination des propriétés de typage, résistance à un antimicrobien et
25 facteur de virulence est mise en œuvre dans le même appareil de spectrométrie de masse, de préférence simultanément, ce qui a pour avantage de réduire le temps d'analyse et le coût de l'instrument, cela facilite également le traitement et le rendu des résultats.

Outre la détermination des propriétés de typage, résistance à un antimicrobien et facteur de virulence, il convient d'identifier le ou les microorganismes présents dans
30 l'échantillon à tester.

Les procédés d'identification de microorganismes sont largement connus de l'homme du métier, comme décrit par exemple par Murray P. R. et al. dans Manuel of

Clinical Microbiology, 2007, 9^{ème} édition, et en particulier dans le Vol. I, Section III, chapitres 15 et 16 pour les bactéries et levures, Vol. II, Section VI, chapitre 82 pour les virus, et Vol. II, Section X, chapitre 135 pour les protozoaires. A titre d'exemple de procédés classiques d'identification, on peut citer la détermination du profil biologique, en utilisant par exemple les cartes d'identification du Vitek 2 (bioMérieux), ou bien encore en utilisant des techniques de biologie moléculaire avec des critères d'identification basés sur l'étude de la présence de certains gènes, sur l'étude de leur séquence.

L'identification peut être mise en œuvre directement à partir de l'échantillon dans lequel on effectue l'identification, ou bien les microorganismes contenus dans l'échantillon peuvent être cultivés par des méthodes bien connues de l'homme du métier avec des milieux de culture et des conditions de culture optimales adaptées en fonction des espèces de microorganismes à rechercher, comme décrit par Murray P.R. et al. dans Manuel of Clinical Microbiology, 2007, 9^{ème} édition, Vol. I, Section III, chapitre 14, et en particulier dans le Vol. I, Section IV, chapitre 21 pour les bactéries, Vol. II, Section VI, chapitre 81 pour les virus, Vol. II, Section VIII, chapitre 117 pour les levures, et Vol. II, Section X, chapitre 134 pour les protozoaires.

Ainsi, de façon générale, dans le cas d'une identification par une méthode biochimique d'une bactérie dans un prélèvement, il faut d'abord l'obtenir en culture pure, par exemple après ensemencement sur gélose. La biologie moléculaire (PCR) peut dans certains cas s'appliquer directement à l'échantillon à analyser.

Au lieu de cultiver les microorganismes, ces derniers peuvent être concentrés par capture directement dans l'échantillon au moyen de surfaces actives. Un tel procédé a été décrit par W.-J. Chen et al. [11] qui ont capturé différentes espèces bactériennes à l'aide de billes magnétiques avec une surface activée au $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$. Une capture par d'autres moyens est également possible, telle qu'une capture par des lectines [24], ou par des anticorps [25], ou encore par de la Vancomycine [26]. La capture permet de concentrer les microorganismes et ainsi de réduire ou même de supprimer l'étape de culture. Il s'en suit un gain de temps considérable.

L'identification peut également être mise en œuvre par spectrométrie de masse, selon les techniques décrites précédemment, de préférence par MS, par MS/MS, ou bien par MS suivie d'une spectrométrie de type MS/MS, ce qui constitue un mode

de réalisation de l'invention. Dans ce cas également, l'échantillon peut être soumis préalablement à une étape de culture telle qu'un ensemencement sur gélose.

L'utilisation d'un procédé d'identification par MS est avantageux car il peut être réalisé en quelques minutes et qu'il nécessite un spectromètre de masse avec un seul analyseur, c'est à dire un instrument moins complexe qu'un spectromètre de masse en tandem utilisé en MS/MS.

L'utilisation d'un procédé d'identification par MS suivi d'une spectrométrie de type MS/MS est également avantageuse. Elle permet de s'assurer de l'identité des ions observé en MS, ce qui augmente la spécificité de l'analyse.

L'utilisation d'un procédé d'identification par MS/MS de type MRM présente l'avantage d'être plus sensible et plus simple que les approches MS puis MS/MS traditionnelle. Ce procédé ne nécessite ni logiciel performant pour traiter l'information entre l'acquisition du spectre MS et du spectre MS/MS, ni changement du réglage des paramètres machines pour enchaîner des spectres MS puis MS/MS.

Le procédé d'identification par MS peut être mis en œuvre avec une source électrospray sur échantillon brut, comme décrit par S. Vaidyanathan et al. [27] ou encore par R. Everley et al. [8] après séparation chromatographique. Différentes gammes de m/z permettent alors d'identifier les microorganismes. S. Vaidyanathan et al. ont utilisé une fenêtre entre 200 et 2000 Th et R. Everley et al. une fenêtre entre 620 et 2450 Th. Les spectres de masse peuvent également être déconvolués pour accéder à la masse des protéines indépendamment de leur état de charge. R. Everley et al. ont ainsi exploité les masses entre environ 5 000 et 50 000 Da. De façon alternative, le procédé d'identification par MS peut être également mis en œuvre à l'aide d'un MALDI-TOF, comme décrit par Claydon et al [3] et T. Krishnamurthy et P. Ross [4]. L'analyse associe l'acquisition d'un spectre de masse et l'interprétation d'un logiciel expert. Elle est extrêmement simple et peut être effectuée en quelques minutes. Ce procédé d'identification se répand actuellement dans les laboratoires d'analyse médicale [28].

L'identification de bactéries par MS puis MS/MS via leurs protéines présentes dans l'échantillon, a été largement appliquée par de nombreuses équipes. A titre d'exemple, il est possible de citer les travaux récents de Manes N. et al. [29] qui ont étudié le peptidome de *Salmonelle enterica*, ou les travaux de R. Nandakumar et al.

[30] ou de L. Hernychova et al. [31] qui ont étudié le protéome de bactéries après digestion des protéines avec de la trypsine. L'approche classique consiste à i) acquérir un spectre MS, ii) sélectionner successivement chaque ion précurseur observé sur le spectre MS avec un signal intense, iii) fragmenter successivement chaque ion précurseur et acquérir son spectre MS/MS, iv) interroger des bases de données protéiques telles que SWISS-PROT ou NCBI, aux travers de logiciels tels que Mascot (Matrix Science, Londres, Royaume-Uni) ou SEQUEST (Thermo Scientific, Waltham, Etats-Unis d'Amérique), pour identifier le peptide ayant une forte probabilité de correspondre au spectre MS/MS observé. Cette méthode peut conduire à l'identification d'un microorganisme si une protéine ou un peptide caractéristique de l'espèce est identifié.

Selon encore un autre mode de réalisation, l'identification dudit au moins un microorganisme est mis en œuvre par un procédé classique d'identification et le procédé de l'invention comprend une étape supplémentaire de confirmation de l'identification dudit au moins un microorganisme, laquelle étape de confirmation est mise en œuvre par spectrométrie de masse, selon les techniques décrites précédemment pour l'identification de microorganismes.

Selon un mode de réalisation particulier, la spectrométrie de masse de l'étape de confirmation est une spectrométrie de masse de type MS/MS, de préférence une MRM.

Un des avantages de l'utilisation de la spectrométrie de masse réside en ce qu'elle est particulièrement utile pour quantifier des molécules, dans le cas présent les marqueurs des propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien. Pour ce faire, on utilise l'intensité de courant détectée, laquelle est proportionnelle à la quantité de molécule cible. L'intensité de courant ainsi mesurée pourra servir de mesure quantitative permettant de déterminer la quantité de molécule cible présente, laquelle est caractérisée par son expression en unités du Système International (SI) de type mol/m^3 ou kg/m^3 , ou par les multiples ou sous-multiples de ces unités, ou par les dérivées usuelles des unités SI, y compris leurs multiples ou sous-multiples. A titre d'exemple non limitatif, les unités telles que ng/ml ou fmol/l sont des unités caractérisant une mesure quantitative.

Un calibrage est néanmoins nécessaire pour pouvoir corrélérer l'aire du pic mesurée, correspondant à l'intensité de courant induit par les ions détectés, à la quantité de molécule cible à doser. Pour cela, les calibrages classiquement utilisés en spectrométrie de masse pourront être mis en œuvre, dans le cadre de l'invention. Les dosages MRM sont classiquement calibrés à l'aide de standards externes ou, de préférence, à l'aide de standards internes tels que décrits par T. Fortin et al. [14]. Dans le cas où la molécule cible est un peptide protéotypique, permettant de doser une protéine d'intérêt, la corrélation entre la mesure quantitative et la quantité de peptide protéotypique cible, et par la suite de protéine d'intérêt, est obtenue en étalonnant le signal mesuré par rapport à un signal étalon pour lequel la quantité à doser est connue. L'étalonnage peut être réalisé au moyen d'une courbe d'étalonnage, par exemple obtenue par injections successives de peptide protéotypique étalon à différentes concentrations (étalonnage externe), ou de façon préférentielle, par étalonnage interne en utilisant un peptide lourd, comme standard interne, par exemple conformément aux méthodes AQUA, QconCAT ou PSAQ détaillées ci-après. Par « peptide lourd », on entend un peptide correspondant au peptide protéotypique, mais dans lequel un ou plusieurs atomes de carbone 12 (^{12}C) est (sont) remplacé(s) par du carbone 13 (^{13}C), et/ou un ou plusieurs atomes d'azote 14 (^{14}N) est (sont) remplacé(s) par de l'azote 15 (^{15}N).

L'utilisation de peptides lourds, comme standards internes (AQUA), a également été proposée dans la demande de brevet US 2004/0229283. Le principe est de synthétiser artificiellement des peptides protéotypiques avec des acides aminés comportant des isotopes plus lourds que les isotopes naturels usuels. De tels acides aminés sont obtenus, par exemple, en remplaçant certains des atomes de carbone 12 (^{12}C) par du carbone 13 (^{13}C), ou en remplaçant certains des atomes d'azote 14 (^{14}N) par de l'azote 15 (^{15}N). Le peptide artificiel (AQUA) ainsi synthétisé a rigoureusement les mêmes propriétés physicochimiques que le peptide naturel (à l'exception d'une masse plus élevée). Il est généralement ajouté, à une concentration donnée, à l'échantillon, en amont du dosage par spectroscopie de masse, par exemple entre le traitement entraînant le clivage des protéines de l'échantillon d'intérêt et le fractionnement des peptides obtenus après l'étape de traitement. De ce fait, le peptide AQUA est co-purifié avec le peptide naturel à doser, lors du fractionnement des peptides. Les deux peptides sont

donc injectés simultanément dans le spectromètre de masse, pour le dosage. Ils subissent alors les mêmes rendements d'ionisation dans la source. La comparaison des aires de pic des peptides naturels et AQUA, dont la concentration est connue, permet de calculer la concentration du peptide naturel et de remonter ainsi à la concentration de la

5 protéine à doser. Une variante de la technique AQUA a été proposée par J.-M. Pratt et al. [32] sous le nom de QconCat. Cette variante est également décrite dans la demande de brevet WO 2006/128492. Elle consiste à concaténer différents peptides AQUA et à produire le polypeptide artificiel sous forme de protéine recombinante lourde. La protéine recombinante est synthétisée avec des acides aminés comportant des isotopes

10 lourds. De cette façon, il est possible d'obtenir un standard pour calibrer le dosage simultané de plusieurs protéines à moindre coût. Le standard QconCAT est ajouté dès le début, en amont du traitement entraînant le clivage des protéines et avant les étapes de fractionnement des protéines, de dénaturation, de réduction puis de blocage des fonctions thiols des protéines, si celles-ci sont présentes. Le standard QconCAT subit

15 donc le même cycle de traitement entraînant le clivage des protéines que la protéine naturelle, ce qui permet de tenir compte du rendement de l'étape de traitement entraînant le clivage des protéines. En effet, le traitement, notamment par digestion, de la protéine naturelle peut ne pas être complet. Dans ce cas l'utilisation d'un standard AQUA conduirait à sous-estimer la quantité de protéine naturelle. Pour un dosage

20 absolu, il peut donc être important de tenir compte des rendements de traitement entraînant le clivage des protéines. Cependant, V. Brun et al. [33] ont montré que, parfois, les standards QconQAT ne reproduisaient pas exactement le rendement de traitement notamment par digestion de la protéine naturelle, sans doute du fait d'une conformation tridimensionnelle différente de la protéine QconCAT.

25 V. Brun et al. [33] ont alors proposé d'utiliser une méthode baptisée PSAQ et décrite dans la demande de brevet WO 2008/145763. Dans ce cas, le standard interne est une protéine recombinante, ayant la même séquence que la protéine naturelle mais synthétisée avec des acides aminés lourds. La synthèse est réalisée ex-vivo avec des acides aminés lourds. Ce standard a rigoureusement les mêmes propriétés

30 physicochimiques que la protéine naturelle (à l'exception d'une masse plus élevée). Il est ajouté dès le début, avant l'étape de fractionnement des protéines, lorsque cette dernière est présente. Il est donc co-purifié avec la protéine native, lors de l'étape de

fractionnement des protéines. Il présente le même rendement de traitement, notamment par digestion, que la protéine native. Le peptide lourd obtenu après clivage est également co-purifié avec le peptide naturel, si une étape de fractionnement des peptides est réalisée. Les deux peptides sont donc injectés simultanément dans le spectromètre de masse, pour être dosé quantitativement. Ils subissent alors les mêmes rendements d'ionisation dans la source. La comparaison des aires de pic des peptides naturels et des peptides de référence dans la méthode PSAQ permet de calculer la concentration de la protéine à doser en tenant compte de la totalité des étapes du procédé de dosage.

L'ensemble de ces techniques, à savoir AQUA, QconCAT ou PSAQ ou toute autre technique de calibrage, utilisée dans des dosages par spectrométrie de masse et en particulier dans les dosages MRM ou MS, pourront être mises en œuvre pour effectuer le calibrage, dans le cadre de l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention permet la caractérisation de *Staphylococcus aureus*.

En particulier, la caractérisation de *Staphylococcus aureus* met en œuvre au moins un peptide comme suit :

1. pour le typage :

au moins un peptide appartenant à la protéine A de séquence SEQ ID N° 1 suivante :

MKKKNIYSIRKLGVGIASVTLLISGGVTPAANAAQHDEAQQNAFYQVL
NMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSPKADAQQNKF
NKDQQSAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQA
PKADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAK
KLNESQAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSA
NLLAEAKKLNDAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLK
DDPSVSKEILAEAKKLNDAPKEDNNKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKED
NKKPGKEDGNKPGKEDNKKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKED
GNKPGKEDGNGVHVVKPGDTVNDIAKANGTTADKIAADNKLADKNMIKP
GQELVVDKKQPANHADANKAALPETGEENPFIGTTVFGGLSLALGAALL
AGRRREL

lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID

N°2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°1
2	DDPSQSANVLGEAQK	70-84
3	DQQSAFYEILNMPNLNEEQR	103-122
4	DDPSQSTNVLGEAK	131-144
5	EQQNAFYEILNMPNLNEEQR	161-180
6	DDPSQSANLLAEAK	189-202
7	DDPSVSK	305-311
8	IAADNK	437-442

2. Pour la résistance potentielle à au moins un antibiotique

- 5 au moins un peptide appartenant à la protéine PBP2a de séquence SEQ ID N° 9 suivante :

MKKIKIVPLILIVVVVGFGIYFYASKDKEINNTIDAIEDKNFKQVYKDSSYIS
 KSDNGEVEMTERPIKIYNSLGVKDINIQDRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTN
 YGNIDRNVQFNFVKEDGMWKLDWDHLSVIIPGMQKDQSIHIENLKSERGKIL
 10 DRNNVELANTGTAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQQMDQNWV
 QDDTFVPLKTVKKMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYV
 GPINSEELKQKEYKGYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNS
 NTIAHTLIEKKKKDGGKDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGS GTAIHPQTGELL
 ALVSTPSYDVYPFMYGMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTSPGSTQKILTA
 15 MIGLNNKTLDDKTSYKIDGKGWQKDKSWGGINVTRYEVVNGNIDLKQAI
 ESSDNIFFARVALELGSKKFEKGMKKLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNE
 ILLADSGYGQGEILINPVQILSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIIS
 KENINLLTDGMQQVVNKTHKEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQI
 20 GWFISYDKDNPNMMMAINVKDVQDKGMASYNKISGKVYDELYENGK
 KYDIDE

lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID N°10 à 17 tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°9
10	IYNSLGVK	69-76

11	DINIQR	77-83
12	ELSISEDYIK	189-198
13	FQITTSPGSTQK	395-406
14	ILTAMIGLNNK	407-417
15	YEVVNGNIDLK	446-456
16	VALELGSK	470-477
17	SYANLIGK	590-597

3. Pour la virulence :

au moins un peptide appartenant à la protéine PVL, sous-unités LukS et LukF, de séquences SEQ ID N° 18 et 22 suivantes, respectivement :

5 SEQ ID N° 18 :

MIFMVKKRLLAATLSLGIITPIATSFHESKADNNIENIGDGAEVVKRTEDTSS
 DKWGVQTNIQVDFVKDKKYNKDALILKMQGFINSKTTYNYKNTDHIKA
 MRWPFQYNIGLKTNDPNVDLINYLPKNKIDSVNVSQTLGYNIGGNFNNSGPS
 TGGNGSFNYSKTISYNQQNYISEVERQNSKSVQWGIKANSFITS LGKMSGH
 10 DPNLFVGYKPYSQNPRDYFVPDNELPPLVHSGFNPSFIATVSHEKGSGDTSE
 FEITYGRNMDVTHATRRTTHYGNSYLEGSRIHNAFVNRNYTVKYEVDWKT
 HEIKVKGHN

SEQ ID N° 22 :

15 MKKIVKSSVVTSIALLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTATSDSD
 KLIKISQILTFNFIKDKSYDKDTLILKAAGNIYSGYTKPNPKDTISSQFYWGSK
 YNISINSDSNDSVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTVGYSGGDINISNGLSGGG
 NGSKSFSETINYKQESYRTSLDKRTNFKKIGWDVEAHKIMNNGWGPYGRD
 SYHSTYGNEMFLGSRQSNLNAGQNFLEYHKMPVLSRGNFNPEFIGVLSRKQ
 20 NAAKSKITVTYQREMDRYTNFWNQLHWIGNNYKDENRATHTSIYEVDW
 ENHTVKLIDTQSKEKNPMS

lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 19, 20, 21, 23 et 24 tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°18
19	TNDPNVDLINYLPK	115-128
20	SVQWGIK	184-190
21	ANSFITSLGK	191-200
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°22
23	MPVLSR	237-242
24	GNFNPEFIGVLSR	243-255

4. Pour l'identification :

- au moins un peptide appartenant à la protéine 50S ribosomal protein L30 (RL30), 50S ribosomal protein L331 (RL331), Staphylococcal secretory antigen ssaA2 (SSAA2), UPF0337 protein SA0772 (Y772), Bifunctional autolysin (ATL), Elongation factor Tu (EFTU), Probable transglycolase isaA (ISAA) et UPF0457 protein SA1975.1 (Y197A), de séquences SEQ ID N° 25, 28, 31, 33, 36, 39, 41 et 43 suivantes, respectivement :

SEQ ID N° 25 :

10 MAKLQITLTRSVIGRPETQRKTVEALGLKKTNSSVVVEDNPAIRGQINKVK
HLVTVEEK

SEQ ID N° 28 :

15 MRVNVTLACTECGDRNYITTKNKRNNPERVEMKKFCSRENKQTLHRETK

SEQ ID N° 31 :

20 MKKIATATIATAGFATIAIASGNQAHASEQDNYGYNPNDPTSSYTYTIDA
QGNHYHTWKGNWHPSQLNQDNGYYSYYYNGYNNYNNYNNGYSYNNY
SRYNNYSNNNQSYNNYNNYSYNTNSYRTGGLGASYSTSSNNVQVTTTMA
PSSNGRSISSGYTSGRNLYTSGQCTYYVFDRVGGKIGSTWGNASNWANAA
ARAGYTVNNTPKAGAIMQTTQGAYGHVAYVESVNSNGSVRVSEMNYGY
GPGVVTSRTISASQAAGYNFIH

SEQ ID N° 33 :

MADESKFEQAKGNVKETVGNVTDNKNLENEGKEDKASGKAKEFVENAKE
KATDFIDKVKGNKGE

SEQ ID N° 36 :

5 MAKKFNYKLPSMVALTLVGSAVTAHQVQAAETTQDQTTNKNVLDSNKKVK
ATTEQAKAEVKNPQTQNISGTQVYQDPAIVQPKTANNKTGNAQVSQKVDTA
QVNGDTRANQSATTNNTQPVAKSTSTTAPKTNNTNVTNAGYSLVDEDDNS
EHQINPELIKSAAKPAALETQYKAAAPKAKTEATPKVTTFSASAQPRSVAA
TPKTSLPKYKPQVNSSINDYIRKNNLKAPKIEEDYTSYFPKYAYRNGVGRPE
10 GIVVHDTANDRSTINGEISYMKNNYQNAFVHAFVDGDRIIETAPTDYLSWG
VGAVGNPRFINVEIVHTHDYASFARSMNNYADYAATQLQYYGLKPDSEY
DNGGTWVTHYAVSKYLGGTDHADPHGYLRSHNYSYDQLYDLINKEYLIK
MGKVAPWGTQFTTTPTTPSKPTTPSKPSTGKLTVAANNGVAQIKPTNSGLY
TTVYDKTGKATNEVQKTFVAVSKTATLGNQKFYLVQDYNNGKFGWVKEG
15 DVVYNTAKSPVNVNQSYSIKSGTKLYTVPWGTSKQVAGSVSGSGNQTFKA
SKQQQIDKSIYLYGSVNGKSGWVSKAYLVDATAKPTPTPIPKPSTPTTNNKLT
VSSLNGVAQINAKNNGLFTTVYDKTGKPTKEVQKTFVAVTKEASLGGNKFY
LVKDYNSTLIGWVKQGDVIYNNNAKSPVNMQTYTVKPGTKLYSVPWGT
YKQEAGAVSGTGNQTFKATKQQQIDKSIYLFGTVNGKSGWVSKAYLAVPA
20 APKKAVAQPKTAVKAYTVTKPQTTQTVSKIAQVKPNNTGIRASVYEKTAK
NGAKYADRTFYVTKERAHGNETYVLLNNTSHNIPLGWFNVKDLNVQNLG
KEVKTTQKYTVNKSNNGLSMVPWGTKNQVILTGNNIAQGTFNATKQVSV
GKDVYLYGTINNRTGWVNAKDLTAPTAVKPTTSAKDYNYTYVIKNGNG
YYYVTPNSDTAKYSLKAFNEQPFVAVKEQVINGQTWYYGKLSNGKLAWI
25 KSTDLAKELIKYNQTGMTLNQVAQIQAGLQYKPQVQVRVPGKWTDANFND
VKHAMDTKRLAQDPALKYQFLRLDQPQNISIDKINQFLKGKGVLENQGAA
FNKAAQMYGINEVYLISHALLETGNGTSQLAKGADVNNKVVVTSNTKY
HNVFGIAAYDNDPLREGIKYAKQAGWDTVSKAIVGGAKFIGNSYVKAGQN
TLYKMRWNPAHPGTHQYATDVDWANINAKIIKGYDYDKIGEYVGYFDIPQY
30 K

SEQ ID N° 39 :

27

MAKEKFDRSKEHANIGTIGHVDHGKTTLTAAIATVLAKNGDSVAQSYDMI
 DNAPEEKERGITINTSHIEYQTDKRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMD
 GGILVVSAADGPMPTREHILLSRNVGVPALVVFLNKVDMVDDEELLELV
 EMEVRDLLSEYDFPGDDVPVIAGSALKALEGDAQYEEKILELMEAVDTYIP
 5 TPERDSDKPFMMPVEDVFSITGRGT VATGRVERGQIKVGEEVEIIGLHDTSK
 TTVTGVEMFRKLLDYAEAGDNIGALLRGVAREDVQRGQVLAAPGSITPHT
 EFKAEVYVLSKDEGGRHTPFSSNYRPQFYFRITTDVTGVVHLPEGTEMVMP
 GDNVEMTVELIAPIAIEDGTRFSIREGGRTVGSGVVTEIHK

10 SEQ ID N° 41 :

MKKTIMASSLAVALGVTGYAAGTGHQAHA AEVNVDQAHLVDLAHNHQD
 QLNAAPIKDGAYDIHFVKDGFQYNFTSNGTTWSWSYEAANGQTAGFSNVA
 GADYTTSYNQGSNVQSVSYNAQSSNSNVEAVSAPTYHNYSTSTTSSSVRLS
 NGNTAGATGSSAAQIMAQRTGVSASTWAAIIARESNGQVNAYNPSGASGL
 15 FQTMPGWGPTNTVDQQINAAVKAYKAQGLGAWGF

SEQ ID N° 43 :

MAMTVKKDNNEVRIQWRVADIKIPTSEIKNITQDQDIHAVPKLDSKDVSRI
 GSTFGKTNRVIIDTEDHEYIIYTQNDQKVYNELTK

20

lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID
 N°26, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44 et 45 tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°25
26	LQITLTR	4-10
27	TNSSVVVEDNPAIR	31-34
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°28
29	VNVT LACTECGDR	3-15
30	NYITTK	16-21
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°31
32	AGYTVNNTPK	200-209
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°33

34	EFVENAKEK	42-50
35	ATDFIDKVK	51-59
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°36
37	LYSVPWGTYK	696-705
38	AYLAVPAAPK	747-756
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°39
40	TVGSGVVTEIIK	383-394
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°41
42	LSNGNTAGATGSSAAQ- IMAQR	148-168
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°43
44	NITQDQDIHAVPK	30-42
45	LDSKDVSR	43-50

Il convient de noter, comme indiqué précédemment, que, pour le typage, le procédé de l'invention peut également utiliser au moins un peptide de séquence SEQ ID N° : 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44 et 45, lesquels sont utiles pour la détermination de la résistance potentielle à au moins un antibiotique ou de la virulence, comme indiqué précédemment.

Bien entendu, par au moins un peptide, on entend au moins un, au moins deux, au moins trois, au moins quatre, au moins cinq, au moins 6 ou plus peptides représentatifs du marqueur qu'on veut détecter. De préférence, on utilisera au moins deux, voire au moins trois, voire au moins quatre peptides par caractéristique.

Selon un autre mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention permet la caractérisation d'*Escherichia coli*.

En particulier, la caractérisation d'*Escherichia coli* met en œuvre au moins un peptide comme suit :

1. pour le typage :

au moins un peptide appartenant à la protéine Aspartate ammonia-lyase (ASPA), la sous-unité alpha de l'ATP synthase (ATPA), la chaperonine 10 kDa (CH10), la

chaperonine 60 kDa (CH60), la DNA-binding protein HU-beta (DBHB), la Glutamate decarboxylase (DCEB), Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (DHSA), la DNA protection during starvation protein (DPS), la DNA-binding protein H-NS (HNS), la Malate dehydrogenase (MDH), la Phosphoglycerate kinase (PGK), la Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase (PUR7), la 50S ribosomal protein L4 (RL4), la 30S ribosomal protein S1 (RS1), la UPF0076 protein yjgF (YJGF), de séquences SEQ ID N° 138 à 152 suivantes, respectivement :

10 SEQ ID N° 138

MSNNIRIEEDLLGTREVPADAYYGVHTLRAIENFYISNNKISDIPEFVRGMV
 MVKKAAMANKELQTIPKSVANAIIAACDEVLNNGKCMDQFPVDVYQGG
 AGTSVNMNTNEVLANIGLELMGHQKGEYQYLNPNHDVHNKCQSTNDAYPT
 GFRIAVYSSLIKLVDAINQLREGFERKAVEFQDILKMGR TQLQDAVPMTLG
 15 QEFRAFSILLKEEVKNIQRTAELLLEVNLGATAIGTGLNTPKEYSPLAVKKL
 AEVTGFPCVPAEDLIEATSDCGAYVMVHGALKRLAVKMSKICNDLRLSS
 GPRAGLNEINLPELQAGSSIMPAKVNPVPEVVNQVCFKVIGNDTTVMMAA
 EAGQLQLNVMEPVIGQAMFESVHILTNACYNLLEKCCINGITANKEVCEGYV
 YNSIGIVTYLNPFIGHHNGDIVGKICAETGKSVREVVLERGLL TEAELDDIFS
 20 VQNLMPAYKAKRYTDESEQ

SEQ ID N° 139

MQLNSTEISELIKQRIAQFNVVSEAHNEGTVSVSDGVIRIHGLADCMQGEM
 ISLPGNRYAIALNLERDSVGAVVMGPYADLAEGMKVKCTGRILEVPVGRG
 25 LLGRVVNTLGAPIDGKGPLDHDGFSAVEAIAPGVIERQSVDQPVQTGYKAV
 DSMIPIGRGQRELIIGDRQTGKTALAIINQRDSGIKCIYVAIGQKASTISN
 VVRKLEEHGALANTIVVVATASESAALQYLAPYAGCAMGEYFRDRGEDAL
 IYDDL SKQAVAYRQISLLRRPPGREAFPGDV FYLHSRLLERAARVNAEYV
 EAFTKGEVKGKTGSLTALPIIETQAGDVSAFVPTNVISITDGGQIFLETNLFNA
 30 GIRPAVNPGISVSRVGGAAQTKIMKKLSGGIRTALAQYRELA AFSQFASDLD
 DATRKQLDHGQKVTELLKQKQYAPMSVAQQSLVLF AAERGYLADVLSKI
 GSFEAALLAYVDRDHAPLMQEINQTGGYNDEIEGKLKGILDSFKATQSW

SEQ ID N° 140

MNIRPLHDRVIVKRKEVETKSAGGIVLTGSAAAKSTRGEVLAVGNRILEN
GEVKPLDVKVGDIVIFNDGYGVKSEKIDNEEVLIMSESDILAIVEA

5

SEQ ID N° 141

MAAKDVKFGNDARVKMLRGVNVLADAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGAPTI
TKDGVSVAREIELEDKFENMGAQMVKEVASKANDAAGDGTTTATVLAQA
IITEGLKAVAAGMNPMDLKRIGDKAVTAAVEELKALSVPSCSDSKAIAQVGT
10 ISANSDETVGKLI AEAMDKVGKEGVITVEDGTGLQDEL DVVEGMQFDRGY
LSPYFINKPETGAVELESPFILLADKKISNIREMLPVLEAVAKAGKPLIIAED
VEGEALATLVVNTMRGIVKVA AVKAPGFGDRRKAMLQDIATLTGGT VISE
EIGMELEKATLEDLGQAKRVVINKDTTTIIDGVGEEAAIQGRVAQIRQQIEE
ATSDYDREKLQERVAKLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKKARVEDALHATR
15 AAVEEGVVAGGGVALIRVASKLADLRGQNE DQNVGIKVALRAMEAPLRQI
VLNCGEEPSVVANTVKGGDGNYGYNAAATEEYGNMIDMGILDPTKVTRSAL
QYAASVAGLMITTECMVTDLPKND AADLGAAGGMGGMGGMGGMM

SEQ ID N° 142

20 MNKSQLIDKIAAGADISKAAAGRALDAIIASVTESLKEGDDVALVGFGTFA
VKERAARTGRNPQTGKEITIAAAKVPSFRAGKALKDAVN

SEQ ID N° 143

MDKKQVTDLRSELLDSRFGAKSISTIAESKRFP LHEMRDDVAFQIINDELYL
25 DGNARQN LATFCQ TWDDENVHKLMDLSINKNWIDKEEYPQSAAIDLRCVN
MVADLWHAPAPKNGQAVGTNTIGSSEACMLGGMAMKWRWRKRMEAAG
KPTDKPNLVC GPVQICWHKFARYWDVELREIPMRPGQLFMDPKRMIEACD
ENTIGVVPTFGV TYTGNYEFPQPLHDALDKFQADTGIDIDMHIDAASGGFL
APFVAPDIVWDFRLPRVKSISASGHKFGLAPLGCGWVIWRDEEALPQELVF
30 NVDYLG GQIGTFAINFSRPAGQVIAQYYEFLRLGREGYTKVQNASYQVAA
YLADEIAKLGPYEFICTGRPDEGIPAVCFKLKDGEDPGYTLYDL SERLRLRG
WQVPAFTLGGEATDIVVMRIMCRRGFEMDFAELLLEDYKASLKYLS DHPK

LQGIAQQNSFKHT

SEQ ID N° 144

5 MKLPVREFDAVVIGAGGAGMRAALQISQSGQTCALLSKVFPTRSHTVSAQ
GGITVALGNTHEDNWEWHMYDTVKGSDYIGDQDAIEYMCKTGPEAILELE
HMGLPFSRLDDGRIYQRPFGGQSKNFGGEQAARTAAAADRTGHALLHTLY
QQNLKNHTTIFSEWYALDLVKNQDGAVVGCTALCIETGEVVYFKARATVL
ATGGAGRIYQSTTNAHINTGDGVGMAIRAGVPVQDMEMWQFHPTGIAGA
GVLVTEGCRGEGGYLLNKHGERFMERYAPNAKDLAGRDVVARSIMIEIRE
10 GRGCDGPWGPHAKLKL DHLGKEVLESRLPGILELSRTFAHVDPVKEPIVIP
TCHYMMGGIPTKVTGQALTVNEKGEDVVVPGLFAVGEIACVSVHGANRL
GGNSLLDLVVFGRAGLHLQESIAEQGALRDASESDVEASLDRLNRWNNN
RNGEDPVAIRKALQECMQHNFSVFREGDAMAKGLEQLKVIRERLKNARLD
DTSSEFNTQRVECLELDNLMETAYATAVSANFRTESRGAHSRFDFFDRDDE
15 NWLCHSLYLPESMTRRSVNMEPKLRPAFPPKIRTY

SEQ ID N° 145

MSTAKLVKSKATNLLYTRNDVSDSEKKATVELLNQRQVIQFIDLSLITKAH
WNMRGANFIAVHEMLDGFRTALIDHLDTMAERAVQLGGVALGTTQVINS
20 KTPLKSYPLDIHNVQDHLKELADRYAIVANDVRKAIGEAKDDDDTADILTAA
SRDLDDKFLWFIESNIE

SEQ ID N° 146

MSEALKILNNIRTLRAQARECTLETLEEMLEKLEVNVNERREEESAAAAEV
25 EERTRKLQQYREMLIADGIDPNELLNSLA AVKSGTKAKRAQRPAKYSYVD
ENGETKTWTGQGRTPAVIKKAMDEQGKSLDDFLIKQ

SEQ ID N° 147

30 MKVAVLGAAGGIGQALALLLKTQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAVDLSHIPT
AVKIKGFSGEDATPALEGANVVLISAGVARKPGMDRSDLFNVNAGIVKNL
VQQVAKTCPKACIGIITNPVNTTVAIAAEVLKKAGVYDKNKLFGVTTLDIIR
SNTFVAELKKGKQPGEVEVPVIGGHSGVTILPLLSQVPGVSFTEQEVADLTR

IQNAGTEVVEAKAGGGSATLSMGQAAARFGLSLVRALQGEQGVVECAVYV
EGDGQYARFFSQPLLLGKNGVEERKSIGTLSAFEKNALEGMLDTLKKDIAL
GEEFVNK

5 SEQ ID N° 148

MSVIKMTDLDLAGKRVFIRADLNVPVKDGKVTSDARIRASLPTIELALKQG
AKVMVTSHLGRPTEGEYNEEFSLPVVNYLKDKLSNPVRLVKDYLDGVDV
AEGELVVLENVRFNKGEKKDDETLSSKYYAALCDVFVMDAFGTAHRAQAS
THGIGKFADVACAGPLLAELDALGKALKEPARPMVAIVGGSKVSTKLT
10 LDSLSKIADQLIVGGGIANTFIAAQGHVDVGKSLYEADLVDEAKRLLSTCNIP
VPSDVRVATEFSETAPATLKS VNDVKADEQILDIGDASAQELAEILKNAKTI
LWNGPVG VFEFPNFRKGTEIVANAIADSEAFSIAGGGDTLAAIDLFGIADKIS
YISTGGGAFLEFVEGKVLPAVAMLEERAKK

15 SEQ ID N° 149

MQKQAELYRGKAKTVYSTENPDLLVLEFRNDTSAGDGARIEQFDRKGMV
NNKFNYFIMSKLAEAGIPTQMERLLSDTECLVKKLDMVPVECVVRNRAAG
SLVKRLGIEEGIELNPPLFDLFLKNDAMHDPMVNESYCETFGWVSKENLAR
MKELTYKANDVLKKLFDDAGLILVDFKLEFGLYKGEVVLGDEFSPDGSRL
20 WDKETLEKMDKDRFRQSLGGLIEAYEAVARRLGVQLD

SEQ ID N° 150

MELVLKDAQSALTVSETTFGRDFNEALVHQVVVAYAAAGARQGTRAQKTR
AEVTGSGKKPWRQKGTGRARSGSIKSPIWRSGGVTFARPQDHSQKVNKK
25 MYRGALKSILSELVRQDRLIVVEKFSVEAPKTKLLAQKLKDMALEDVLIITG
ELDENLFLAARNLHKVDVRDATGIDPVSLIAFDKVVMTADAVKQVEEMLA

SEQ ID N° 151

MTESFAQLFEESLKEIETRPGSIVRGVVVAIDKD VVLVDAGLKSESAIPAEQF
30 KNAQGELEIQVGDEVDVALDAVEDGFGETLLSREKAKRHEAWITLEKAYE
DAETVTGVINGKVKGGFTVELNGIRAFLPGSLVDVRPVRDTLHLEGKELEF
KVIKLDQKRNNVVVSRRAVIESENSAERDQLLENLQEGMEVKGIVKNLTD

33

YGAFVDLGGVDGLLHITDMAWKRVKHPSEIVNVGDEITVKVLKFDRETR
 VSLGLKQLGEDPWVAIAKRYPEGTKLTGRVTNLTDYGCFVEIEEGVEGLVH
 VSEMDWTNKNIHPSKVNVGDEVVEVMVLDIDEERRRISLGLKQCKANPW
 QQFAETHNKGDRVEGKIKSITDFGIFIGLDGGIDGLVHLSDISWNVAGEEAV
 5 REYKKGDEIAAVVLQVDAERERISLGVKQLAEDPFNNWVALNKKGAIVTG
 KVTAVDAKGATVELADGVEGYLRASEASRDRVEDATLVLSVGDEVEAKF
 TGVDRKNRAISLSVRKDEADEKDAIATVНКQEDANFSNNAMAEAFKAA
 KGE

10 SEQ ID N° 152

MSKTIATENAPAAIGPYVQGVDLGNMIITSGQIPVNPKTGEVPADVAAQAR
 QSLDNVKAIVEAAGLKVGDIVKTTVFVKDLNDFATVNATYEAFFTEHNAT
 FPARSCVEVARLPKDVКIEIEAIAVRR

15 lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID N°67 à 84 tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°138
67	ISDIPEFVR	41-49
68	IEEDLLGTR	7-15
69	LVDAINQLR	163-171
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°139
70	TALAIDAIINQR	176-187
71	VVNTLGAPIDGK	107-118
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°140
72	SAGGIVLTGSAAAK	21-34
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°141
73	AVTAAVEELK	123-132
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°142
74	ALDAIIASVTESLK	24-37
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°143
75	YWDVELR	172-178

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°144
76	LPGILELSR	327-335
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°145
77	SKATNLLYTR	9-18
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°146
78	SEALKILNNIR	2-12
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°147
79	LFGVTTLDIIR	145-155
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°148
80	ASLPTIELALK	39-49
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°149
81	LLSDTECLVK	73-82
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°150
82	SILSELVR	107-114
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°151
83	GGFTVELNGIR	118-128
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°152
84	TGEVPADVAAQAR	39-51

2. Pour la résistance potentielle à au moins un antibiotique

au moins un peptide appartenant à la protéine TEM-2 beta-lactamase (TEM-2) de séquence SEQ ID N° 126 suivante :

5

HPETLVKVKDAEDKLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPMMSTFKVLL
CGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAA
ITMSDNTAANLLTTIGGPKELTAFLHNMGDHVTRLDRWEPELNEAIPNDE
RDTTMPAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSAIPA
10 GWFADKSGVGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAE
IGASLIKHW

lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID N°62 à 66 tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°126
62	LLTGELLTLASR	168-179
63	SALPAGWFIADK	198-209
64	VAGPLLR	191-197
65	VGYIELDLNSGK	19-30
66	VLLCGAVLSR	49-58

3. Pour la virulence :

au moins un peptide appartenant à la protéine Shiga toxine 1 sous-unité A (STX1A), la protéine Shiga toxine 2 sous-unité A (STX2A) ou aux deux, de séquences

5 SEQ ID N° 153 et 154, respectivement :

SEQ ID N° 153

MKIIIFRVLTFFFVIFSVNVVAKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISS
GGTSLLMIDSGTGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR
10 TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT
TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDLSG
RSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSAVALI
LNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVRGITHNKILWDSSTLGAILMRR
TISS

15

SEQ ID N° 154

MKCILFKWVLCLLLGFSSVSHSREFTIDFSTQQSYVSSLNSIRTEISTPLEHIS
QGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLDVYQARFDHLRLIEQNNLYVAGFVNT
ATNTFYRFSDFTTHISVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSLV
20 SSYLALVEFSGNTMTRDASRAVLRFTVTAEALRFRQIQREFRQALSETAP
VYTMTPGDVDLTLNWGRISNVLPDYRGEDGVRVGRISFNNISAILGTAVAIL
NCHHQGARSVRVAVNEDSQPECQITGDRPVIKINNTLWESNTAAFLNRKSQ
FLYTTGK

lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID

25 N°85, 86 et 87 tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°153
85	TYVDSLNVIR	34-43
86	FVTVTAEALR	183-192
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N° 154
86	FVTVTAEALR	183-192
87	ISNVLP EYR	227-235

4. Pour l'identification :

au moins un peptide appartenant à Aconitate hydratase 2 (ACON2) L-asparaginase 2 (ASPG2), 3-oxoacyl-[acyl carrier-protein] synthase 1 (FABB),
 5 Glutamine-binding periplasmic protein (GLNH), Molybdate-binding periplasmic protein (MODA), Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (ODP2), Outer membrane protein C (OMPC), Formate acetyltransferase 1 (PFLB), Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha (SUCD), Transketolase 1 (TKT1), UPF0381 protein yfcZ (YFCZ),
 10 Uncharacterized protein ygaU (YGAU), de séquences SEQ ID N° 127 à 135, 176, 136, 137 suivantes, respectivement :

SEQ ID N° 127

MLEEYRKHVAERAAEGIA PKPLDANQMAALVELLKNPPAGEEEFLDLLT
 15 NRVPPGVDEAAAYVKAGFLAAIAKGEAKSPLLTPKAIELLGTMQGGYNIHP
 LIDALDDAKLAPIAAKALSHTLLMFDNFYDVEEKAKAGNEYAKQVMQSW
 ADAEWFLNRPALAEKLT VTVFKVTGETNTDDLSPAPDAWSRPDIPLHALA
 MLKNAREGIEPDQPGVVGPIKQIEALQQKGFPPLAYYVGDVVGTGSSRKSATN
 SVLWFMGDDIPHPNKRGGGLCLGGKIAPIFFNTMEDAGALPIEVDVSNLN
 20 MGDVIDVYPYKGEVRNHETGELLATFELKTDVLIDEVRAGGRIPLIIGRGLT
 TKAREALGLPHSDVFRQAKDVAESDRGFSLAQKMVGRACGVKGIRPGAYC
 EPKMTSVGSQD TTGPMTRDELKDLACLGFSADLVMQSFCHTAAYPKPVDV
 NTHHTLPDFIMNRGGVSLRPGDGVHSWLNRM LLPDTVGTGGDSHTRFPIG
 ISFPAGSGLVAF AAATGV MPLDMPESVLVRFKGKM QPGITLRDLVHAIPLY
 25 AIKQGLLTVEKKGKKNIFSGRILEIEGLPDLKVEQAFELTDASAERSAAGCTI
 KLNKEPIIEYLNSNIVLLKWMIAEGYGDRRTLERRIQGMEKWLANPELLEA

37

DADA EYAAVIDIDLADIKEPILCAPNDPDDARPLSAVQGEKIDEVFIGSCMT
NIGHFRAAGKLLDAHKGQLPTRLWVAPPTRMDAAQLTEEGYYSVFGKSGA
RIEIPGCSLCMGNQARVADGATVVSTSTRNFPNRLGTGANVFLASAELAAV
AALIGKLPTEEYQTYVAQVDKTAVD TYRYLNFNQLSQYTEKADGVIFQT
5 AV

SEQ ID N° 128

MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGK
VGVENLVNAV PQLKDIANVKGEQV V NIGSQDMNDNVWLT LAKKINTDCD
10 KTDG FVITHGTD TMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFN
LYNAV VTAADKASANRGVLVVMNDTVLDGRDVTKTNTTDVATFKSVNY
GPLGYIHNGKIDYQRT PARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYANASDLP
AKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSSRVPTG
ATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQY
15

SEQ ID N° 129

MKRAVITGLGIVSSIGNNQEV LASLREGRSGITFSQELKDSGMRSHVWGN
VKLDTTGLIDRKVVRFMSDASIY AFLSMEQAIADAGLSPEAYQNNPRVGLI
AGSGGGSPRFQVFGADAMRGPRGLKAVGPYV VTKAMASGVSACLATPFKI
20 HGVNYSISSACATSAHCIGNAVEQIQLGKQDIVFAGGGEELCWEMACEFDA
MGALSTKYNDTPEKASRTYDAHRDGFVIAGGGGMVVVEELEHALARGAH
IYAEIVGYGATSDGADMVAPSGEGAVRCMKMAMHGVDTPIDYLN SHGTS
TPVG DVKELAAIREVFGDKSPAISATKAMTGHSLGAAGVQEAIYSLLMLEH
GFIAPSINIEELDEQAAGLNIVTETTDRELTTVMSNSFGFGGTNATLVMRKL
25 KD

SEQ ID N° 130

MKSVLKVSLAALT LAFAVSSHAADKKLVVATDTAFVPFEFKQGDKYVGFD
VDLWAAIAKELKLDYELKPMDFSGIIPALQTKNVDLALAGITITDERKKAID
30 FSDGY YKSGLLVMVKANNNDVKS VKDL DGKV VAVKSGTGSVDYAKANI
KTKDLRQFPNIDNAYMELGTNRADAVLHDT PNILYFIKTAGNGQFKAVGD
SLEAQQYGIAPFKGSDEL RDKVNGALKTLRENGTYNEIYKKWFGTEPK

SEQ ID N° 131

MARKWLNLFAGAALSFAVAGNALADEGKITVFAAASLTNAMQDIATQFK
KEKGVDDVVSSFASSSTLARQIEAGAPADLFISADQKWMDYAVDKKAIDTA
5 TRQTLLGNSLVVVAPKASVQKDFTIDSKTNWTSLLNGGRLAVGDPEHVPA
GIYAKEALQKLGAWDTLSPKLAPAEDVRGALALVERNEAPLGIVYGSDAV
ASKGVKVVATFPEDSHKKVEYPVAVVEGHNNATVKAFYDYLKGPQAAEIF
KRYGFTIK

10 SEQ ID N° 132

MAIEIKVPDIGADEVEITEILVKVGDKVEAEQSLITVEGDKASMEVPSPQAGI
VKEIKVSVGDKTQTGALIMIFDSADGAADAAPAQAEEKKEAAPAAAPAAA
AAKDVNVPDIGSDEVEVTEILVKVGDKVEAEQSLITVEGDKASMEVPAPFA
GTVKEIKVNVGDKVSTGSLIMVFEVAGEAGAAAPAAKQEAAPAAAPAPAA
15 GVKEVNVPDIGGDEVEVTEVMVKVGDKVAAEQSLITVEGDKASMEVPAPF
AGVVKELKVNVDKVKVTGSLIMIFEVEGAAPAAAPAKQEAAPAPAAKAE
APAAAPAAKAEGKSEFAENDAYVHATPLIRRLAREFGVNLAQVKGTRKGR
RILREDVQAYVKEAIKRAEAAPAATGGGIPGMLPWPKVDFSKFGEIEEVEL
GRIQKISGANLSRNWVMIPHVTHFDKTDITELEAFRQKQNEEAQRKLDVK
20 ITPVVFIMKAVAAALEQMPRFNSSLSGQRLTLKKYINIGVAVDTPNGLV
VPVFKDVNKKGIHLSRELMTISKKARDGKLTAGEMQGGCFTISSIGGLGTT
HFAPIVNAPEVAILGVSKSAMEPVWNGKEFVPRMLPISLSFDHRVIDGADG
ARFITIINNTLSDIRRLVM

25 SEQ ID N° 133

MKVKVLSELLVPALLVAGAANAEEVYNKDGNKLDLYGKVDGLHYFSDDK
SVDGDQTYMRLGFKGETQVTDQLTGYGQWEYQIQGNSAENENNSWTRVA
FAGLKFQDVGSFDYGRNYGVVYDVTSWTDVLPEFGGDTYGSDFNMQQRG
NGFATYRNTDFFGLVDGLNFAVQYQKGKNGSVSGEGMTNNGREALRQNGD
30 GVGGSSITYDYEGFGIGAAVSSSKRTDDQNSPLYIGNGDRAETYTGGLKYDA
NNIYLAAQYTQTYNATRVGSLGWANKAQNFEAVAQYQFDFGLRPSLAYL
QSKGKNLGVINGRNYDDEDILKYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDD

NQFTRDAGINTDNIVALGLVYQF

SEQ ID N° 134

5 MSELNEKLATAWEGFTKGDWQNEVNVVRDFIQKNYTPYEGDESFLAGATE
ATTTLWDKVMIEGVKLENRTHAPVDFDTAVASTITSHDAGYINKQLEKIVG
LQTEAPLKRALIPFGGIKMEIGSCKAYNRELDPMIKKIFTEYRKTHNQGVFD
VYTPDILRCRKSGVLTGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGIDYLMKDKLAQFT
SLQADLENGVNLEQTIRLREEIAEQHRALGQMKEMAAKYGYDISGPATNA
QEAIQWTFYFGYLA AVKSQNGAAMSFGRTSTFLDVYIERDLKAGKITEQEA
10 QEMVDHLVMKLRMVRFLRTPEYDELFSGDPIWATESIGGMGLDGRTLVTK
NSFRFLNTLYTMGPSPEPNMTILWSEKLPLNFKKFAAKVSIDTSSLQYENDD
LMRPDFNNDYAIACCVSPMIVGKQMQFFGARANLAKTMLYAINGGVDE
KLKMQVGPKSEPIKGDVLNYDEVMERMDHFMDWLAKQYITALNIIHYMH
DKYSYEASLMALHDRDVIRTMACGIAGLSVAADSLSAIKYAKVKPIRDEDG
15 LAIDFEIEGEYPQFGNNDPRVDDLAVDLVERFMKKIQKLHTYRDAIPTQSVL
TITSNVVYGKKTGNTPDGRRAGAPFGPGANPMHGRDQKGAVASLTSVAKL
PFAYAKDGISYTF SIVPNALGKDDEVKTNLAGLMDGYFHHEASIEGGQHL
NVNVMNREMLLDAMENPEKYPQLTIRVSGYAVRFNSLTKEQQQDVITRTF
TQSM

20

SEQ ID N° 135

MSILIDKNTKVICQGFTGSQGTFHSEQAIA YGTKMVGGVTPGKGGTTHLGL
PVFNTVREAVAATGATASVIYVPAPFCKDSILEAIDAGIKLIITITEGIPTLDM
LTVKVKLDEAGVRMIGPNCPGVITPGECKIGIQPGHIIHKPGKVGVSRSGTL
25 TYEAVKQTTDYGFGQSTCVGIGGDPIPGSNFIDILEMFEKDPQTEAIVMIGEI
GGSAAAAAYIKEHVTKPVVGYIAGVTAPKGKRMGHAGAIAGGKGTAD
EKFAALEAAGVKTVRSLADIGEALKTVLK

SEQ ID N° 176

30 MSSRKELANAI RALSMDAVQKAKSGHPGAPMGMA DIAEVLWRDFLKHN P
QNPSWADRDRFVLSNGHGSMLIYSLHLTG YDLPMEELKNFRQLH SKTPG
HPEVGYTAGVETTTGPLGQGIANAVGMAIAEKT LAAQFNRP GHDIVDHYT

40

YAFMGDGCMMEGISHEVCSLAGTLKLGKLIIFYDDNGISIDGHVEGWFTD
 DTAMRFEAYGWHVIRDIDGHDAASIKRAVEEARAVTDKPSLLMCKTIIGFG
 SPNKAGTHDSHGAPLGDAEIALTREQLGWKYAPFEIPSEIYAQWDAKEAGQ
 AKESAWNEKFAAYAKAYPQEAAEFTRRMKGEMPSDFDAKAKEFIKLA
 5 NPAKIASRKASQNAIEAFGPLLPEFLGGSADLAPSNLTLWSGSKAINEDAAG
 NYIHYGVREFGMTAANGISLHGGFLPYTSTFLMFVEYARNAVRMAALMK
 QRQVMVYTHDSIGLGEDGPTHQPVEQVASLRVTPNMSTWRPCDQVESAV
 AWKYGVERQDGPTALILSRQNLAQQERTEEQLANIARGGYVLKDCAGQPE
 LIFIATGSEVELAVAAYEKLTAEGVKARVVSMPSTDAFDKQDAAYRESVLP
 10 KAVTARVAVEAGIADYWKYVGLNGAIVGMTTFGESAPAEELLFEEFGFTV
 DNVVAKAKELL

SEQ ID N° 136

MSKCSADETPVCCCMDVGTIMDNSDCTASYSRVFANRAEAEQTLAALTEK
 15 ARSVESEPCKITPTFTEESDGVRLDIDFTFACEAEMLIFQLGLR

SEQ ID N° 137

MGLFNFVKDAGEKLWDAVTGQHDKDDQAKKVQEHLNKTGIPDADKVNI
 QIADGKATVTGDGLSQAQEKILVAVGNISGIASVDDQVKTATPATASQFY
 20 TVKSGDTLSAISKQVYGNANLYNKIFEANKPMLKSPDKIYPGQVLRIPPE

lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID N°46 à 61 tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°127
46	ILEIEGLPDLK	578-588
47	VADGATVVSTSTR	779-791
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°128
48	TNTTDVATFK	185-194
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°129
49	LDTTGLIDR	54-62
50	VGLIAGSGGGSPR	99-111

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°130
51	AIDFSDGYK	100-109
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°131
52	LGAWDTLSPK	160-169
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°132
53	FGEIEEVELGR	397-407
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°133
54	INLLDDNQFTR	339-349
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°134
55	LATAWEGFTK	8-17
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°135
56	DSILEAIDAGIK	80-91
57	FAALEAAGVK	263-272
58	SLADIGEALK	276-285
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°176
59	TEEQLANIAR	529-538
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°136
60	AEAEQTLAALTEK	38-50
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°137
61	SGDTLSAISK	103-112

Il convient de noter, comme indiqué précédemment, que, pour le typage, le procédé de l'invention peut également utiliser au moins un peptide de séquence SEQ ID N° : 46 à 66 et 85 à 87, lesquels sont utiles pour la détermination de la résistance potentielle à au moins un antibiotique, de l'identification ou de la virulence, comme indiqué précédemment.

Selon un autre mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention permet la caractérisation de *Candida albicans*.

En particulier, la caractérisation de *Candida albicans* met en œuvre au moins un peptide comme suit :

1. pour le typage :

au moins un peptide appartenant à la protéine Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1),

Fructose-biphosphate aldolase (ALF), Lanosterol 14-alpha demethylase (CP51), F-box protein COS111 (CS111), Elongation factor 1-beta (EF1B), Enolase 1 (ENO1), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3P), Heat shock protein SSA1 (HSP71), Heat shock protein SSB1 (HSP75), Pyruvate kinase (KPYK), Lipase 8 (LIP8), Multiprotein-bridging factor 1 (MBF1), Nuclear transport factor 2 (NTF2), Phosphoglycerate kinase (PGK), Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIA), 60S ribosomal protein L13 (RL13), 60S ribosomal protein L28 (RL28), 60S ribosomal protein L36 (RL36), 40S ribosomal protein S22 (RS22), Triosephosphate isomerase (TPIS) de séquences SEQ ID N° 155 à 175 suivantes, respectivement :

10

SEQ ID N° 155

MSEQIPKTQKAVVFDTNGGQLVYKDYPVPTPKPNELLIHVKYSGVCHTDL
HARKGDWPLATKLPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDFAGIKWLNG
SCMSCEFCQQGAEPNCGEADLSGYTHDGSFEQYATADAVQAAKIPAGTDL
15 ANVAPILCAGVTVYKALKTADLAAGQWVAISGAGGGLGSLAVQYARAMG
LRVVAIDGGDEKGEFVKSLGAEAYVDFTKDKDIVEAVKKATDGGPHGAIN
VSVSEKAIDQSVEYVRPLGKVVLVGLPAHAKVTAPVFDVAVKKSIEIKGSYV
GNRKDTAEIDFFSRGLIKCPIKIVGLSDLPEVFKLMEEGKILGRYVLDTSK

20

SEQ ID N° 156

MAPPAVLKSGVIYGKDVKDLFDYAQEKGFAPAINVTSSSTVVAALEAAR
DNKAPIILQTSQGGAAZFAGKGVNDKQDQAASIAGSIAAAHYIRAIAPTYGIP
VVLHTDHC AKKLLPWFDGMLKADEEFFAKTGTPLFSSHMLDLSEETDDENI
ATCAKYFERMAKMGQWLEMEIGITGGEEDGVNNEHVEKDALYTSPETVF
25 AVYESLHKISP NFSIAA AFGNVHGVYKPGNVQLRPEILGDHQVYAKKQIGT
DAKHPLYLVFHGGSGSTQEEFNIAKNGVVKVNLDTDCQYAYLTGIRDYV
TNKIEYLKAPVGNPEGADKPNKKYFDPRVWVREGEKTMSKRIAEALDIFHT
KGQL

30

SEQ ID N° 157

MAIVETVIDGINYFLSLSVTQQISILLGVPFVYNLVWQYLYSLRKDRAPLVF
YWIPWFGSAASYGQQPYEFFESCRQKYGDVFSFMLLGKIMTVYLGPKGHE

43

FVFNAKLSDVSAEDAYKHLTTPVFGKGVYDCPNSRLMEQKKFAKFALTT
DSFKRYVPKIREEILNYFVTDESFKLKEKTHGVANVMKTQPEITIFTASRSLF
GDEMRRIFDRSFAQLYSDLDKGFTPINFVFPNLPLPHYWRRDAAQKKISAT
YMKEIKSRRERGDIDPNRDLIDSLIHSTYKDGVKMTDQEIANLLIGILMGG
5 QHTSASTSAWFLHLGEKPHLQDVIIYQEVVELLKEKGGDLNDLTIEDLQK
LPSVNNTIKETLRMHMPLHSIFRKVTNPLRIPETNYIVPKGHYVLVSPGYAH
TSERYFDNPEDFDPTRWDTAAAKANSVSFNSSDEVYDYGFGKVSKEGVSSPYL
PFGGGRHRCIGEQAAYVQLGTILTTFVYNLRWTIDGYKVPDPDYSSMVVLP
TEPAEIIWEKRETCMF

10

SEQ ID N° 158

MLKTDSLDFHSYLPYRSLINPNARYDYRTHSLIPLTQNDLNLLRIAFQKKK
EAPPSAFKMKYKSLLSDVSRITISMRLSNSNLLSSSSANNNNVLLSPPSSSST
LSTPCGNILNRAGTTSSNISKINNLSONQTQNLPLFPAELHIKNLPVEILDYI
15 FYLVDDNLDYKSCMYTCKLFYFLAKPYYYENLVFTSTYRFAQFVTYLRVN
SEVGQYVQSIDLSGIKPGYDEDEQEEGQEENAENGEENGEGGARDPQYLLG
EIADNPHHERVDQFPRGKILAGWRDWKFKNNPLYTIHPSPSLTKIASNSQFS
NVSSKSSRSTSSKSSSSTTKKFVKPFRYFKSRKRKMSYSGTTKLERKSPRLE
QLQLDQYSSNWNKRVNSHPLINKFLLHYSTSKDLPIGYILHMINLCPNIVSL
20 NLGNLSLSTDYEISRSTIHKYQNFDLINNYPKDLIYKVDNIMRLNDVDDVYS
IDGSILRFGNINSGSSGSNWERNGSSSNRILFKSNQSIASSTASSVYSVTTFSK
PIRKYNSSLPLPQTVADISYLNKGDGKVYLSLNLKEINSAYLKKINEDEIL
SAINVHKGKRLIEYDTSLYQIPKPLNVDIAGTLKYINLSSMIWLNKRLIEKFLT
RLLTKKSPELDMYGICYTDEFFDSDEQESDDDYEDSDDEEQRQCPIIYKQNL
25 VIDFTDSGMYKSLPWAKRIDLNSFEGCQLANKIINNDLMTPEQEQALRRERR
RRGAIAANYLA

SEQ ID N° 159

MSFSDFSKVESIKSLNEFLADKSYIDGTTATQADVTVYKAFQKEFPQFTRWF
30 NHIASFTEEFEDLPAGKAPAASGSAAAAAEEEDDEDVDLFGSDDEVDEEAE
KLKQQRLAEYAAKKAAGPKPAAKSIVTLDVKPWDDDETDLDELLTNVKAI
EMEGLTWGAHQWIPVGFGIKKLQINLVVEDALVSLDDLQAAVEEDEDHVQ

STDIAAMQKL

SEQ ID N° 160

MSYATKIHARYVYDSRGNPTVEVDFTTDKGLFRSIVPSGASTGVHEALELR
5 DGDKSKWLKGVLKAVANVNDIIPALIKAKIDVVDQAKIDEFLLSLDGTP
NKSCLGANAILGVSLAAANAAAAAQGIPLYKHIANISNAKKGKFVLPVPFQ
NVLNNGSHAGGALAFQEFMIAPTGVSTFSEALRIGSEVYHNLKSLTKKKYG
QSAGNVGDEGGVAPDIKTPKEALDLIMDAIDKAGYKGKVGIAMDVASSEF
YKDGKYDLDFKNPESDPSKWLSGPQLADLYEQLISEYPIVSIEDPFAEDDW
10 DAWVHFFERVGDKIQIVGDDLTVTNPTRIKTAIEKKAANALLKVNQIGTL
TESIQAANDSYAAGWGVMSHRSGETEDTFIADLSVGLRSGQIKTGAPARS
ERLAKLNQILRIEEELGSEAIYAGKDFQKASQL

SEQ ID N° 161

15 MAIKIGINGFGRIGRLVLRVALGRKDIEVVAVNDPFIAPDYAAYMFKYDST
HGRYKGEVTASGDDLVIDGHKIKVFQERDPANIPWGKSGVDYVIESTGVFT
KVEGAQKHIDAGAKKVIITAPSADAPMFVVGVNEDKYTPDLKIISNASCTT
NCLAPLAKVVNDTFGIEEGLMTTVHSITATQKTVDGPSHKDWRGGRTASG
NIIPSSTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMSLRLPTTDVSVVDLTVRLKKAASYE
20 EIAPAIAKASEGPKLKGVLGYTEDAVVSTDFLGSSYSSIFDEKAGILLSPTFVK
LISWYDNEYGYSTKVVDLLEHVA

SEQ ID N° 162

MSKAVGIDLGTITYSCVAHFANDRVEIANDQGNRTTPSFVAFTDTERLIGDA
25 AKNQAAMNPANTVFDKRLIGRKFDDEPINDAKHFPFKVIDKAGKPVIQV
EYKGETKTFSPEEISSMVLTKMKEIAEGYLGSTVKDAVVTVPAYFNDSQRQ
ATKDAGTIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDKKGSRGHNVLIFDLGGGTFDV
SLLAIDEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNFFIQEFKRKNKKDISTNQRA
LRLRLTACERAKRTLSSSAQTSIEIDSLYEGIDFYTSITRARFEELCADLFRST
30 LDPVGKVLADAKIDKSQVEEIVLVGGSTRIPKIQKLVSDFFNGKELNKSINP
DEAVAYGAADVQAAILTGDTSSKTQDILLLDVAPLSLGIETAGGIMTKLIPRN
STIPTKKSETFSTYADNQPGVLIQVFEGERAHTKDNNLLGKFELSGIPPAPRG

45

VPQIEVTFDIDANGILNVSALEKGTGKTQKITITNDKGRLSKEEIDKMVSEAE
KFKEEDEKEAARVQAKNQLESYAYSLKNTINDGEMKDKIGADDKEKLTKA
IDETISWLDASQAASTEYEDKRKELESVANPIISGAYGAAGGAPGGAGGFP
GAGGFPGGAPGAGGPGGATGGESSGPTVEEVD

5

SEQ ID N° 163

MADGVFQGAIGIDLGTTYSCVATYDSAVEIIANEQGNRVTPSFVAFTSEERL
IGDAAKNQAALNPKNVFDKRLIGRAFDDSVQKDIKSWPFKVVESNGQ
PLIEVEYLDETKTFSPQEISSMVLTKMKEIAEAKIGKKVEKAVVTVPAYFND
10 AQRQATKDAGAIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLGAGKSEKERHVLIFDLGG
GTFDVSLNITGGVFTVKATAGDTHLGGQDFDTNLEHFKKEFQKKTGNDI
SSDARALRRLRTACERAKRSLSSGTQTTVEIDSLFDGEDFSANITRARFEDIN
SALFKSTLEPVEQVLEDAKISKSQVDEVVLVGGSTRIPKVQKLLSDFFDGKQ
LEKSINPDEAVAYGAAVQGAILTGQSTNDDTKDLLLLDVIPLSLGVAMQGN
15 VLAPVVPRNTTVPTIKRRTFTTVADHQTTPVQFPVYQGERVNCSSENTLLGEF
DLKNIPPMQAGEPVLEAIFEVDANGILKVTAVEKSTGRSANITISNSIGRLST
EEIEKMISDAEKFKSSDDAFKRHEQKQKLEAYVASVESTVTDPVLSAKLK
KSAKDKIEAALSDALQTLIEIESSADDYRKAELALKRAVTKGMATR

20

SEQ ID N° 164

FTIPPNHMIFTTDDAYKTKCDDKVMIIDYKNITKVIAPGKIIYVDDGVLSFE
VISVDDQQTLKVRSLNAGMISSHKTANDVLELRVLSTSG

SEQ ID N° 165

25

30

MLFLLFLLITPIYAGLIFPTKPSSDPFYNPPKGFKAAGVDILQSRETPKSITG
RFAPLKIQNSWQLLVRSSEDSFGNPNAIVTTVIEPVNADPSKIASYQVFEDAA
KADCAPSYALQFGSDLTTFVTQAEMYLMAPLLDQGYVVSVDYEGPKSTF
TIGKQSGQAVLNSIRATLKSSKITNIKEDAKVVMWGYSGGSLASGWAAAL
QPSYAPELSSSLLGAALGGFVTNITATAQAADGTVFAGIVANALGGVANAY
PEFKSILQSDTDKKS VFDEFDSHCLADGVIDYINTSFLTGDNKFKTGWDILK
SPTIAKIVEDNGLVYQKQLVPKIPIFVYHGSIDQIVPIVNVKKTYQNWCEGGI
SSLEFAEDGTNGHLTETVVGAPAALTWIIDRFNGKQTVSGCQHDKRLSNFQ

YPNISSSILKYFKVALDTMMSNGLGSDIQKDKITPDDLRLKFLGGW

SEQ ID N° 166

5 MSSDWDSVTIIGQKARVGGGGPRENVAKTSSQLNAARRAGLVVGTEKKY
GTANTKSNPEGQRLTKLDATDDVVAVKKVDVSVGKAIQQARQEKKLTQK
ELATKVNEKPNVINDYEAGRAIPNQQLLAKLERALGVKLRGKNIGEPLFAK
KK

SEQ ID N° 167

10 MSVDFNAVATEFCNFYYNQFSDRSQLGNYRNEMLTFETSQQLQGARDI
VEKLASLPFQKVAHRISTLDAQPASANGDILVMVTGELLIDEEQNAQRYSQ
VFHLIPDNGSYYVFENDIFRLNYS

SEQ ID N° 168

15 MSLSNKLSVKDLDVAGKRVFIRVDFNVPLDGKTITNNQRIVAALPTIKYVE
EHKPKYIVLASHLGRPNGERNDKYSLAPVATELEKLLGQKVTFNLDCVGPE
VTKAVENAKDGEIFLLENLRYHIEEEGSSKDKDGKKVKADPEAVKKFRQEL
TSLADVYINDAFGTAHRAHSSMVGLEVPQRAAGFLMSKELEYFAKALENP
ERPFLAILGGAKVSDKIQLIDNLLDKVDMLIVGGGMAFTFKKILNKMPIGDS
20 LFDEAGAKNVEHLVEKAKKNNVELILPVDFVTADKFDKDAKTSSATDAEG
IPDNWMGLDCGPKSVELFQQAVAKATIVWNGPPGVFEFEKFKANGTKSLL
DAAVKSANGNIVIIGGGDTATVAKKYGVVEKLSHVSTGGGASLELLEGK
DLPGVVALSNKN

25 SEQ ID N° 169

MSTVYFDVSADGQKLGKITFKLYDDVVPKTAENFRALCTGEKGFGYKGSIF
HRVIPQFMLQGGDFTNFNGTGGKSIYGTKFADENFVKRHDRPGLLSMANA
GPNTNGSQFFITTVPCPWLDGKHVVFGVETDGLDIVKKIESFGSGSGATSKK
IVIEESGQL

30

SEQ ID N° 170

MAISKNLPLLNNHFRKHWQERVRVHFDQAGKKASRRQSRLRKA AKIAPRP

47

IDALRPVVRAPTVKYNRKVRAGRGFTLAELKAVGIAPKYARTIGISVDHRR
QNKSQETFDANVARLQEYKSKLVIFDKKTKASEVASFEQVDVSATFPVEQP
APESGLRAVEVPEQTAYRTLRLARNEKKYKGIREKRAKEKAEAEAEKAKK

5 SEQ ID N° 171

EKKDEYLSKSSASAAPVIDTLAHGYGKVLGKGRLPEVPVIVKARFVSKLAE
EKSESLVVLSN

SEQ ID N° 172

10 MAKSGIAAGVNBKGRKTTAKEVAPKISYRKGASSQRTVFVRSIVKEVAGLAP
YERRLIELIRNAGEKRAKKLAKKRLGTHKRALRKVEEMTQVIAESRRH

SEQ ID N° 173

15 MKYLAAYLLLQGGNTSPSASDITALLESVGVEAEESRLQALLKDLEGKDL
QELIAEGNTKLASVPSGGAAAGGASASTGAAAGGAAEAEKEEKEEAKES
DDDMGFGLFD

SEQ ID N° 174

20 MTRTSVLADALNAINNAEKTGKRQVLIRPSSKVIKFLTVMQKHGYIGEFY
IDDHRSGKIVVQLNGRLNKCQVQPRFNVKINDIERWTDNLLPARQFGYVIL
TTSAGIMDHEEARRKHVSGKILGFVY

SEQ ID N° 175

25 MARQFFVGGNFKANGTKQQITSIIDNLNKADLPKDVEVVICPPALYLGLAV
EQNKQPTVAIGAQNVDKSCGAFTGETCASQILDVGASWTLTGHSERRTIK
ESDEFIAEKTKFALDTGVKVILCIGETLEERKGGVTLDVCARQLDAVSKIYS
DWSNIVVAYEPVWAIGTGLAATPEDAEETHKGIRAHAKSIGAEQAEKTRI
LYGGSVNGKNAKDFKDKANVDGFLVGGASLKPEFVDIIKSRL30 lesdits peptides étant choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N°88 à 125
tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°156
88	ADEEFFAK	125-132
97	IAEALDIFHTK	346-356
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°163
89	AFDDESQK	79-87
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°160
90	AKIDVVDQAK	81-90
98	IDVVDQAK	83-90
99	IEEELGSEAIYAGKDFQK	419-436
112	VGDKIQIVGDDLTVTNPTR	315-333
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°170
91	AVEVPEQTAYR	160-170
107	SQETFDANVAR	105-115
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°174
92	CGVIQPR	72-78
114	WTDNLLPAR	89-97
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°173
93	DLQELIAEGNTK	50-61
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°169
94	FADENFVKR	81-89
100	IESFGSGSGATSK	140-152
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°175
95	FALDTGVK	115-122
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°171
96	GRLPEVPVIVK	32-42
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°167
101	LASLPFQK	54-61
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°166
102	LDATDDVVAVK	66-76
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°168
103	NVEHLVEK	264-271
110	SVELFQQAVAK	319-329
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°172

104	SGIAAGVNK	4-12
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°161
105	SGVDYVIESTGVFTK	89-103
115	YKGEVTASGDDLVIDGHK	55-72
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°158
108	SSSSTTKK	326-333
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°159
106	SLNEFLADK	14-22
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°162
109	STLDPVGK	311-318
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°164
111	TANDVLELR	78-86
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°155
113	VVAIDGGDEK	200-209
116	YVLDTSK	344-350
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°157
117	AVIYDCPNSR	399-414
177	GHYVLVFPGYAHTSER	399-414
118	GHYVLVSPGYAHTSER	399-414
119	GVIYDCPNSR	129-138
120	GVSSPYLPFGGGR	455-467
121	GVSSPYLPFSGGK	455-467
122	GVSSPYLPFSGGR	455-467
Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Localisation dans SEQ ID N°165
123	AAVGDIQSR	37-46
124	ITPDDLRL	447-453
125	TGWDILK	304-310

2. Pour la résistance potentielle à au moins un antibiotique

au moins un peptide appartenant à la protéine Lanosterol 14-alpha demethylase (CP51), de séquence SEQ ID N° 157, lesdits peptides étant choisis, de préférence,

5 parmi les peptides de séquence SEQ ID N°117 à 122 et 177, tel que défini ci-dessus.

3. Pour la virulence :

au moins un peptide appartenant à la protéine Lipase 8 (LIP8) de séquence SEQ ID N° 163, lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 123 à 125, tel que défini ci-dessus.

5

4. Pour l'identification :

au moins un peptide appartenant à la protéine Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1), Fructose-biphosphate aldolase (ALF), F-box protein COS111 (CS111), Elongation factor 1-beta (EF1B), Enolase 1 (ENO1), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3P), Heat shock protein SSA1 (HSP71), Heat shock protein SSB1 (HSP75), Pyruvate kinase (KPYK), Multiprotein-bridging factor 1 (MBF1), Nuclear transport factor 2 (NTF2), Phosphoglycerate kinase (PGK), Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIA), 60S ribosomal protein L13 (RL13), 60S ribosomal protein L28 (RL28), 60S ribosomal protein L36 (RL36), 40S ribosomal protein S22 (RS22), Triosephosphate isomerase (TPIS) de séquences SEQ ID N° 155, 156, 158 à 164, 166 à 175, lesdits peptides étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 88 à 116, tel que défini ci-dessus

Les peptides utiles aux fins de l'invention, de séquence SEQ ID N° 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44 à 125, 177 sont nouveaux et constituent un autre objet de l'invention.

Le procédé de l'invention et ses avantages ressortiront de la suite de la présente description relatant divers exemples non limitatifs de mise en œuvre du procédé de l'invention.

Exemple 1 : Identification de microorganismes à partir d'un échantillon par profil biochimique

1. Mise-en en culture de l'échantillon sur milieu de culture

Les milieux de culture optimaux et les conditions de culture optimales sont différents selon les espèces de microorganisme. Par défaut l'échantillon estensemencé sur différents milieux :

- gélose Columbia au sang de mouton (réf bioMérieux 43041) pendant 18 à 24 h à 35°C, avec ou sans anaérobie ;
- gélose TSA (référence bioMérieux 43011) pendant 18 à 24 h à 37°C.

5 2. Identification des microorganismes

L'identification est mise en œuvre comme suit :

1. Sélection de colonies isolées
2. En respectant les conditions d'asepsie, transfert de 3,0 mL de solution saline stérile aqueuse (à 0,45-0,50 % de NaCl, de pH 4,5 à 7,0) dans un tube à essai en
10 plastique transparent (polystyrène)
3. A l'aide d'un bâtonnet ou d'un écouvillon stérile, transfert d'un nombre suffisant de colonies identiques dans le tube de solution saline préparé à l'étape 2 et ajustement de la suspension bactérienne entre 0,50 et 0,63 McFarland avec un DENSICHEK étalonné du VITEK2
- 15 4. Positionnement du tube de suspension bactérienne et d'une carte d'identification VITEK2 sur une cassette VITEK2
5. Chargement de la cassette dans l'instrument VITEK2
6. Les opérations de remplissage, scellage, incubation et lecture sont automatiques
7. Acquisition d'un profil biochimique
- 20 8. Identification avec le système VITEK2 réalisée par comparaison à des profils biochimiques de souches connues

Exemple 2 : Identification de microorganismes à partir d'un échantillon par MALDI-TOF

25 L'identification est mise en œuvre comme suit :

1. Transfert à l'aide d'une pipette 1 µl d'une portion de colonie de microorganisme obtenue selon l'exemple 1, et dépôt uniforme sur une plaque pour spectrométrie de masse par MALDI-TOF
2. Recouvrement du dépôt avec 1 µl de matrice. La matrice utilisée est une
30 solution saturée d'HCCA (acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique) en solvant organique (50% d'acétonitrile et 2,5% d'acide trifluoroacétique)
3. Séchage à température ambiante

4. Introduction de la plaque dans le spectromètre de masse
5. Acquisition d'un spectre de masse
6. Comparaison du spectre obtenu avec les spectres contenus dans une base de connaissance
- 5 7. Identification du microorganisme par comparaison des pics obtenus à ceux de la base de connaissance

Exemple 3 : Identification de microorganismes à partir d'un échantillon par ESI-MS

- 10 L'identification est mise en œuvre comme suit :
1. Prélèvement d'une colonie de microorganisme, obtenue selon l'exemple 1, et mise en suspension dans 100µl d'eau déminéralisée.
 2. Centrifugation à 3000g pendant 5 minutes.
 - 15 3. Elimination du surnageant.
 4. Remise en suspension dans 100µl d'eau déminéralisée.
 5. Centrifugation à 3000g pendant 5 minutes.
 6. Elimination du surnageant.
 7. Remise en suspension dans 100µl d'un mélange Acétonitrile, eau déminéralisée, acide formique (50/50/0.1%).
 - 20 8. Filtration avec un filtre de porosité 0.45 µm.
 9. Injection dans un spectromètre de masse en mode MS simple.
 10. Acquisition d'un spectre de masse.
 11. Comparaison du spectre obtenu avec les spectres contenus dans une base de connaissance.
 - 25 12. Identification du microorganisme par référence à des spectres de référence.

Exemple 4 : Obtention de protéines digérées à partir de microorganismes

Classiquement le protocole suivant est mis en œuvre en 11 étapes :

- 30 1. Prélèvement d'une colonie de microorganisme, obtenue selon l'exemple 1, et mise en suspension dans 10 à 100µl d'une solution d'hydrochlorure de guanidine 6M, 50 mM Tris-HCl, pH=8,0.

2. Ajout de dithiothréitol (DTT) pour obtenir une concentration finale de 5mM.
3. Réduction pendant 20 minutes à 95°C dans un bain-marie.
4. Refroidissement des tubes à température ambiante.
5. Ajout d'iodoacétamide pour obtenir une concentration finale de 12.5 mM.
- 5 6. Alkylation pendant 40 minutes à température ambiante et à l'obscurité.
7. Dilution d'un facteur 6 avec une solution de NH_4HCO_3 50 mM, pH=8.0 pour obtenir une concentration finale en hydrochlorure de guanidine de 1M.
8. Ajout de 1 µg de trypsine.
9. Digestion à 37°C pendant 6 heures jusqu'à une nuit.
- 10 10. Ajout d'acide formique jusqu'à un pH inférieur à 4 pour stopper la réaction.
11. Ultracentrifugation à 100 000g pendant 30 minutes.

Exemple 5 : Caractérisation d'échantillons de *S. aureus*:

- Après avoir établi la ou les espèces des échantillons selon l'une quelconque des
- 15 méthodes décrites dans les exemples 1 à 3, les espèces listées ci-dessous sont analysées. Treize souches de *S. aureus* sont analysées pour confirmer leur identification et établir leurs caractéristiques :

	ID2	ID3
	ID4	ID2bis
20	ID3bis	ID4bis
	AST7	AST8
	AST13	AST14
	VIR5	VIR6
	VIR7	

- 25 La même méthode d'analyse est appliquée à des espèces n'appartenant pas à l'espèce *S. aureus* pour servir de témoin négatif :

- *E. coli*
- ID7
- AST2
- *S. pneumoniae*
- 30 VIR21
- *C. difficile*

VIR26

Chaque échantillon est traité selon l'exemple 4, puis un volume de 5µl de protéines digérées est injecté et analysé selon les conditions suivantes :

- 5 • Chaîne chromatographique Agilent 1100 series de la société Agilent Technologies (Massy, France).
- Colonne Waters Symmetry C18, 2,1mm de diamètre interne, 100mm de long, taille de particule de 3,5µm.
- Solvant A : H₂O + 0,1% acide formique.
- 10 • Solvant B : ACN + 0,1% acide formique.
- Gradient HPLC défini au **TABLEAU 1** ci-après :

TABLEAU 1

Temps	Débit (µl)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	300	95	5
25	300	60	40
27	300	0	100
35	300	0	100
35.1	300	95	5
45	300	95	5

- 15 • L'éluât en sortie de colonne chromatographique est directement injecté dans la source d'ionisation du spectromètre de masse de type QTRAP® 5500 de la société Applied Biosystems (Foster City, Etats Unis d'Amérique).
- Les peptides, issues de la digestion des protéines du microorganisme, sont analysés par le spectromètre de masse en mode MRM. Seuls les peptides
- 20 indiqués dans le **TABLEAU 2** sont détectés. Pour cela, le ou les fragments de première génération indiqués dans le **TABLEAU 2** sont détectés. L'application, à laquelle permet de répondre chaque transition, c'est à dire chaque peptide associé à son fragment de première génération, est précisée dans la colonne intérêt clinique du **TABLEAU 2** avec les lettres I, T, R et V. I désigne la

confirmation de l'identification du microorganisme, T le typage, R la résistance à au moins un antibiotique et V la détection de facteurs de virulence.

TABLEAU 2 :

Transition Numéro	Protéine	Peptide	Ion fragment de première génération	Intérêt clinique
1	protéine A	DDPSQSANVLGEAQK	y9 monochargé	T
2	protéine A	DDPSQSANVLGEAQK	y13 monochargé	T
3	protéine A	DQQSAFYEILNMPNLNEEQR	y8 monochargé	T
4	protéine A	DQQSAFYEILNMPNLNEEQR	y8 dichargé	T
5	protéine A	DDPSQSTNVLGEAK	y9 monochargé	T
6	protéine A	DDPSQSTNVLGEAK	y12 monochargé	T
7	protéine A	EQQNAFYEILNMPNLNEEQR	y8 monochargé	T
8	protéine A	EQQNAFYEILNMPNLNEEQR	y8 dichargé	T
9	protéine A	DDPSQSANLLAEAK	y9 monochargé	T
10	protéine A	DDPSQSANLLAEAK	y12 monochargé	T
11	protéine A	DDPSVSK	y5 monochargé	T
12	protéine A	DDPSVSK	y4 monochargé	T
13	protéine A	IAADNK	y4 monochargé	T
14	protéine A	IAADNK	y5 monochargé	T
15	PBP2a	IYNSLGVK	y6 monochargé	R + T
16	PBP2a	IYNSLGVK	y7 monochargé	R + T
17	PBP2a	DINIQR	y5 monochargé	R + T
18	PBP2a	DINIQR	y4 monochargé	R + T
19	PBP2a	ELSISEDYIK	y6 monochargé	R + T
20	PBP2a	ELSISEDYIK	y8 monochargé	R + T
21	PBP2a	FQITTSPGSTQK	y9 monochargé	R + T
22	PBP2a	FQITTSPGSTQK	y6 monochargé	R + T
23	PBP2a	ILTAMIGLNNK	y8 monochargé	R + T
24	PBP2a	ILTAMIGLNNK	y9 monochargé	R + T
25	PBP2a	YEVVNGNIDLK	y8 monochargé	R + T
26	PBP2a	YEVVNGNIDLK	y9 monochargé	R + T
27	PBP2a	VALELGSK	y6 monochargé	R + T
28	PBP2a	VALELGSK	y7 monochargé	R + T
29	PBP2a	SYANLIGK	y6 monochargé	R + T
30	LukS	TNDPNVDLINYLK	y8 monochargé	V + T
31	LukS	TNDPNVDLINYLK	y11 monochargé	V + T
32	LukS	SVQWGIK	y5 monochargé	V + T
33	LukS	SVQWGIK	y4 monochargé	V + T
34	LukS	ANSFITS LGK	y8 monochargé	V + T
35	LukS	ANSFITS LGK	y6 monochargé	V + T
36	LukF	MPVLSR	y5 monochargé	V + T
37	LukF	MPVLSR	y3 monochargé	V + T
38	LukF	GNFNPEFIGVLSR	y8 monochargé	V + T
39	LukF	GNFNPEFIGVLSR	y9 monochargé	V + T
40	RL30	LQITLTR	y5 monochargé	I + T

41	RL30	LQITLTR	y6 monochargé	I + T
42	RL30	TNSSVVVEDNPAIR	y8 monochargé	I + T
43	RL30	TNSSVVVEDNPAIR	y8 monochargé	I + T
44	RL331	VNVTLAC[CAM]TEC[CAM]GDR	y8 monochargé	I + T
45	RL331	NYITTK	y5 monochargé	I + T
46	RL331	NYITTK	y4 monochargé	I + T
47	SSAA2	AGYTVNNTPK	y6 monochargé	I + T
48	SSAA2	AGYTVNNTPK	y7 monochargé	I + T
49	SSAA2	AGYTVNNTPK	y8 monochargé	I + T
50	SSAA2	AGYTVNNTPK	y9 monochargé	I + T
51	Y772	ATDFIDKVK	y6 monochargé	I + T
52	Y772	ATDFIDKVK	y8 monochargé	I + T
53	ATL	AYLAVPAAPK	y7 monochargé	I + T
54	ATL	AYLAVPAAPK	y8 monochargé	I + T
55	EFTU	TVGSGVVTEIHK	y7 monochargé	I + T
56	EFTU	TVGSGVVTEIHK	y8 monochargé	I + T
57	EFTU	TVGSGVVTEIHK	y9 monochargé	I + T
58	Y772	EFVENAKEK	y6 monochargé	I + T
59	Y772	EFVENAKEK	y7 monochargé	I + T
60	Y772	EFVENAKEK	y8 monochargé	I + T
61	ISAA	LSNGNTAGATGSSAAQIMAQR	y7 monochargé	I + T
62	ISAA	LSNGNTAGATGSSAAQIMAQR	y8 monochargé	I + T
63	ATL	LYSVPWGTYK	y6 monochargé	I + T
64	ATL	LYSVPWGTYK	y7 monochargé	I + T
65	ATL	LYSVPWGTYK	y8 monochargé	I + T
66	Y197A	NITQDQDIHAVPK	y8 monochargé	I + T
67	Y197A	NITQDQDIHAVPK	y7 monochargé	I + T
68	Y197A	NITQDQDIHAVPK	y6 monochargé	I + T
69	Y197A	LDSKDVSRR	y6 monochargé	I + T
70	Y197A	LDSKDVSRR	y7 monochargé	I + T

L'état de charge du peptide précurseur, son temps de rétention et les transitions, c'est-à-dire les rapports $(m/z)_1$ en Q1 et $(m/z)_2$ en Q3, sont indiqués dans le **TABEAU 3**.

L'énergie de collision utilisée pour fragmenter l'ion précurseur est également indiquée dans le **TABEAU 3**.

5

TABEAU 3 :

Transition Numéro	Etat de charge du précurseur	Temps de rétention	(m/z) filtré en Q1	(m/z) filtré en Q3	Energie de collision
1	2	8.2	779.87	929.51	39
2	2	8.2	779.87	664.84	39
3	3	17.9	813.71	999.49	45
4	3	17.9	813.71	500.24	45
5	2	7.9	730.85	918.49	37
6	2	7.9	730.85	615.82	37
7	3	16.5	827.39	999.49	45

8	3	16.5	827.39	500.25	34
9	2	10	729.86	916.51	37
10	2	10	729.86	614.83	37
11	2	11	374.18	517.3	21
12	2	11	374.18	420.25	21
13	2	8.9	316.17	447.22	19
14	2	8.9	316.17	518.26	19
15	2	6.7	447.26	617.36	25
16	2	6.7	447.26	780.43	25
17	2	6.2	437.22	645.33	24
18	2	6.2	437.22	531.3	24
19	2	11.1	598.81	754.36	31
20	2	11.1	598.81	954.48	31
21	2	7.4	647.84	906.45	34
22	2	7.4	647.84	617.3	26
23	2	11.8	594.34	860.47	31
24	2	11.8	594.34	961.51	31
25	2	10.1	632.33	872.48	33
26	2	10.1	632.33	971.55	33
27	2	7.4	408.74	646.38	23
28	2	7.4	408.74	717.41	23
29	2	8.2	433.24	615.38	24
30	2	14.9	808.42	975.55	41
31	2	14.9	808.42	643.4	41
32	2	8.2	409.23	631.36	23
33	2	8.2	409.23	503.3	23
34	2	10.3	519.28	852.48	28
35	2	10.3	519.28	618.4	28
36	2	6.4	351.7	571.36	20
37	2	6.4	351.7	375.24	20
38	2	14.3	725.38	920.52	37
39	2	14.3	725.38	509.29	37
40	2	9.2	422.77	603.38	24
41	2	9.2	422.77	731.44	24
42	2	8	750.89	913.47	38
43	3	8	500.93	913.47	29
44	2	7.9	747.84	968.36	38
45	2	2.8	370.2	625.36	21
46	2	2.8	370.2	462.29	21
47	2	3.9	532.77	672.37	28
48	2	3.9	532.77	773.42	28.442
49	2	3.9	532.77	936.48	28.442
50	2	3.9	532.77	993.5	28.442
51	2	7.2	518.79	749.46	28
52	2	7.2	518.79	965.53	27.827
53	2	9	500.79	653.4	27
54	2	9	500.79	766.48	27.035
55	2	11.2	601.85	801.51	31

58

56	2	11.2	601.85	858.53	31.482
57	2	11.2	601.85	945.56	31.482
58	2	2.3	547.28	718.37	29
59	2	2.3	547.28	817.44	29.08
60	2	2.3	547.28	964.51	29.08
61	3	8.7	669.33	817.43	37
62	3	8.7	669.33	888.47	37.466
63	2	12.2	607.32	751.38	32
64	2	12.2	607.32	850.45	31.722
65	2	12.2	607.32	937.48	31.722
66	2	6.3	739.88	907.5	38
67	2	6.3	739.88	779.44	37.555
68	2	6.3	739.88	664.41	37.555
69	2	2	460.25	691.37	25.251
70	2	2	460.25	806.4	25.251

- Les autres paramètres machine utilisés sont les suivants :

	Type de balayage:	MRM
	Polarité:	Positive
5	Source d'ionisation:	Turbo V™ (Applied BioSystems)
	Réglage Q1:	Filtrage avec résolution unitaire
	Réglage Q3:	Filtrage avec résolution unitaire
	Pause inter-scan:	5.00 msec
	Vitesse de balayage:	10 Da/s
10	Gaz rideau:	50,00 psi
	Tension de cône:	5500,00 V
	Température de source:	500,00 °C
	Gaz de nébulisation:	50,00 psi
	Gaz chauffant:	40,00 psi
15	Remplissage dynamique:	activé
	Potentiel d'orifice :	100, 00 V
	(en anglais declustering potential (DP))	
	Potentiel d'entrée avant Q0 (EP):	6,00 V
	Potentiel en sortie de cellule de collision :	11 V
20	(en anglais cell exit potential (CXP))	
	Temps de cycle total:	1.6 sec

Les aires obtenues pour chacune des transitions et pour chacun des microorganismes étudiés ont été mesurées. Toutes les transitions dont l'aire est supérieure ou égale à 1000 (unité arbitraire) sont considérées comme positives et ont été notées « 1 » dans les **tableaux 4A et 4B**. Toutes les transitions dont l'aire est inférieure à 1000, sont considérées comme négatives et ont été notées 0 dans les tableaux 4A et 4B. Lorsqu'on n'a observé aucun pic de signal, on a noté la transition comme négative.

Le nombre de transition positive est ensuite sommé pour les applications I, R et V et reporté dans le **TABLEAU 5** :

10

TABLEAU 4A :

	ID2	ID3	ID4	ID2bis	ID3bis	ID4bis	AST7	AST8
Transition	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>S. Aureus</i>
1	0	1	1	0	1	1	0	0
2	0	1	1	0	1	1	0	0
3	0	1	1	0	1	1	0	0
4	0	1	1	0	1	1	0	0
5	1	1	1	1	1	1	0	0
6	1	1	1	1	1	1	0	1
7	1	1	1	1	1	1	0	0
8	1	1	1	1	1	1	0	0
9	1	1	1	1	1	1	0	0
10	1	1	1	1	1	1	0	0
11	0	0	0	0	0	0	1	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1	1	1	0	1	1	0	0
14	1	1	1	1	1	1	1	0
15	1	0	1	1	0	1	0	0
16	0	0	1	0	0	1	0	0
17	1	0	1	1	0	1	0	0
18	1	0	1	1	0	1	0	0
19	1	0	1	1	0	1	0	0
20	1	0	1	1	0	1	0	0
21	1	0	1	1	0	1	0	0
22	1	0	1	1	0	1	0	0
23	1	0	1	1	0	1	0	0
24	1	0	1	1	0	1	0	0
25	1	0	1	1	0	1	0	0
26	1	0	1	1	0	1	0	0
27	1	1	1	1	1	1	0	0

60

28	1	0	1	1	0	1	0	0
29	1	0	1	1	0	1	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	1	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	1
36	0	0	0	0	0	0	1	1
37	0	0	0	0	0	1	0	0
38	0	0	0	0	0	1	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0
40	1	1	1	1	1	1	1	1
41	1	1	1	1	1	1	1	1
42	1	1	1	1	1	1	1	1
43	1	1	1	1	1	1	1	1
44	1	1	1	1	1	1	1	1
45	1	1	1	1	1	1	1	1
46	1	1	1	1	1	1	1	1
47	1	1	1	1	1	1	1	1
48	1	1	1	1	1	1	1	1
49	1	1	1	1	1	1	1	1
50	1	1	1	1	1	1	1	1
51	1	1	1	1	1	1	1	1
52	1	1	1	1	1	1	1	1
53	1	1	1	1	1	1	1	1
54	1	1	1	1	1	1	1	1
55	1	1	1	1	1	1	1	1
56	1	1	1	1	1	1	1	1
57	1	1	1	1	1	1	1	1
58	1	1	1	1	1	1	1	1
59	1	1	1	1	1	1	1	1
60	1	1	1	1	1	1	1	1
61	1	1	1	1	1	1	1	1
62	1	1	1	1	1	1	1	1
63	1	1	1	1	1	1	1	1
64	1	1	1	1	1	1	0	0
65	1	1	1	1	1	1	1	1
66	1	1	1	1	1	1	1	1
67	1	1	1	1	1	1	1	1
68	1	1	1	1	1	1	1	1
69	1	1	1	1	1	1	1	1
70	1	1	1	1	1	1	1	1

TABLEAU 4B :

Transition	AST13	AST14	VIR5	VIR6	VIR7	ID7	AST2	VIR21	VIR26
	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>C. difficile</i>
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	1	0	0	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	0	0	0	1	0	0	0	0	0
11	0	1	1	1	0	0	0	0	0
12	0	1	1	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	0	0	1	0	0	0	0	0
15	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	1	0	0	0	0	0	0	0
18	1	0	0	0	0	0	1	0	0
19	1	1	0	0	0	0	0	0	0
20	1	1	0	0	0	0	0	0	0
21	1	1	0	0	0	0	0	0	0
22	1	0	0	0	0	0	0	0	0
23	1	0	0	0	0	0	1	0	0
24	1	1	0	1	0	0	0	0	0
25	1	1	0	0	0	0	0	0	0
26	1	0	0	0	0	0	0	0	0
27	1	1	0	0	0	0	0	0	1
28	1	1	0	0	0	0	0	0	0
29	1	1	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	1	0	1	0	0	0	0
31	0	0	1	0	1	0	0	0	0
32	0	0	1	0	1	0	0	0	0
33	0	0	1	0	1	0	0	0	0
34	0	0	1	0	1	0	0	0	0
35	0	0	1	0	1	0	0	0	0
36	1	1	1	1	1	0	0	0	0
37	0	0	1	0	1	0	0	0	0
38	0	0	1	0	1	0	0	0	0
39	0	0	1	0	1	0	0	0	0
40	1	1	1	1	1	0	0	0	0
41	1	1	1	1	1	0	0	1	0

62

42	1	1	1	1	1	0	0	0	0
43	0	1	0	1	0	0	0	0	0
44	1	1	1	1	1	0	0	0	0
45	1	1	0	1	1	0	0	0	0
46	1	1	1	1	1	0	0	0	0
47	1	1	1	1	1	0	0	0	0
48	1	1	0	1	1	0	0	0	0
49	1	1	0	1	0	0	0	0	0
50	1	0	0	1	0	0	0	0	0
51	1	1	0	1	1	0	0	0	0
52	1	1	0	1	1	1	0	0	0
53	1	1	1	1	1	0	0	0	0
54	1	1	1	1	1	0	0	0	0
55	1	1	1	1	1	0	0	0	0
56	1	1	1	1	1	0	0	0	0
57	1	1	1	1	1	0	0	0	0
58	1	1	0	1	1	0	0	0	0
59	1	1	0	1	1	0	0	0	0
60	1	1	0	1	1	0	0	0	0
61	1	1	0	1	1	0	0	0	0
62	1	1	0	1	1	0	0	0	0
63	1	1	1	1	1	0	0	0	0
64	1	0	0	0	0	0	0	0	0
65	1	1	1	1	1	0	0	0	0
66	1	1	0	1	1	0	0	0	0
67	0	1	0	1	0	0	0	0	0
68	1	1	0	1	0	0	0	0	0
69	1	1	1	1	1	0	0	0	0
70	1	1	0	1	1	0	0	0	0

TABLEAU 5 :

		I	R	V
ID2	<i>S. aureus</i>	30	14	0
ID3	<i>S. aureus</i>	30	1	0
ID4	<i>S. aureus</i>	30	15	1
ID2bis	<i>S. aureus</i>	30	14	0
ID3bis	<i>S. aureus</i>	30	1	0
ID4bis	<i>S. aureus</i>	30	15	2
AST7	<i>S. aureus</i>	29	0	1
AST8	<i>S. aureus</i>	29	0	2
AST13	<i>S. aureus</i>	28	15	1
AST14	<i>S. aureus</i>	28	9	1
VIR5	<i>S. aureus</i>	13	0	10
VIR6	<i>S. aureus</i>	29	1	1

63

VIR7	<i>S. aureus</i>	24	0	10
ID7	<i>E. coli</i>	1	0	0
AST2	<i>E. coli</i>	0	2	0
VIR21	<i>S. pneumoniae</i>	1	0	0
VIR26	<i>C. difficile</i>	0	1	0

Tous les échantillons de *S. aureus* présentent plus de 12 transitions positives dans la catégorie I. Tous ces échantillons sont donc confirmés comme appartenant bien à l'espèce *S. aureus*.

- 5 En revanche, les échantillons ID7, AST2, VIR21 et VIR26 présentent moins de 2 transitions positives dans la catégorie I, ces échantillons sont donc confirmés comme n'appartenant pas à l'espèce *S. aureus*.

- 10 Les souches ID2, ID4, ID2bis, ID4bis, AST13 et AST14 de *S. aureus* présentent plus de 8 transitions positives pour la catégorie R, elles expriment donc la Protéine Liant la Pénicilline (PLP2a), ce qui est synonyme d'un mécanisme de résistance aux Pénicillines du groupe M (e.g. Mécicilline).

- 15 En revanche, les souches ID3, ID3bis, AST7, AST8, VIR5, VIR6 et VIR7 de *S. aureus* présentent moins de 3 transitions positives pour la catégorie V, elles n'expriment donc pas PLP2a. Ces souches sont donc sensibles à un antibiotique tel qu'une pénicilline du groupe M.

- Les souches ID7, AST2, VIR21 et VIR26 qui n'appartiennent pas à l'espèce *S. aureus* présentent également moins de 3 transitions pour la catégorie R, elles n'expriment donc pas PLP2a, ce qui confirme la spécificité de la méthode.

20

Les échantillons VIR5 et VIR7 de *S. aureus* présentent plus de 9 transitions positives dans la catégorie V, elles expriment donc la protéine Pantone-Valentine Leucocidine (PVL).

- 25 En revanche, les souches ID2, ID3, ID4, ID2bis, ID3bis, ID4bis, AST7, AST8, AST13, AST14 et VIR6 de *S. aureus* présentent moins de 3 transitions positives, elles n'expriment donc pas PVL. Ces souches n'ont donc pas les propriétés de virulence en lien avec PVL.

Les souches ID7, AST2, VIR21 et VIR26 qui n'appartiennent pas à l'espèce *S. aureus* présentent également moins de 3 transitions pour la catégorie V, elles n'expriment donc pas PVL, ce qui confirme la spécificité de la méthode.

- 5 Pour le typage, les transitions de la catégorie T de chaque souche sont comparées aux transitions des autres souches considérées comme des souches de référence. En pratique une valeur 0 est attribuée lorsque les transitions entre les deux souches se classent dans la même catégorie (positive ou négative) et une valeur de 1 est attribuée lorsque les transitions entre les 2 souches se classent dans des catégories
- 10 différentes (une transition positive et une transition négative). Les valeurs sont sommées pour toutes les transitions de la catégorie T de chaque couple de souche afin d'établir un score. Les scores figurent dans le **TABLEAU 6** :

TABLEAU 6 :

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

15

Les souches qui ont un score inférieur ou égal à 4 sont de même type, les souches qui ont un score strictement supérieur à 4 sont de type différent.

Ainsi, les souches ID2 et ID2bis, ID3 et ID3bis, ID4 et ID4bis, AST7 et AST8 sont de même type. Toutes les autres souches prises deux à deux sont de type différent. Il faut

noter les sommes élevées obtenues entre les souches ID7, AST2, VIR21 et VIR26, qui ne sont pas des *S. aureus*, et toutes les autres souches qui sont des *S. aureus*. Ces résultats confirment la spécificité de la méthode.

Les souches ID7, AST2, VIR21 et VIR26 ne sont bien entendu pas de même type, ce serait absurde, elles sont d'espèces différentes. Ces souches ne peuvent donc pas être comparées entre elles et aucune valeur n'est reportée dans le TABLEAU 6.

De façon extrêmement intéressante, des scores supérieurs à 25, comme par exemple entre ID2 et VR7, traduisent une grande divergence entre souches. Des scores entre 15 et 25, comme entre ID2 et AST14, traduisent une divergence modérée et des scores entre 5 et 15, comme entre ID2 et ID4bis, une divergence faible.

La méthode ainsi mise en œuvre permet donc non seulement d'établir si 2 souches sont de même type, ce qui est important pour identifier un foyer infectieux commun, mais également d'estimer la proximité de 2 souches, ce qui est extrêmement important pour les études épidémiologiques.

Cet exemple montre que, de façon très avantageuse, la présente invention permet en un temps inférieur à une heure, ce qui est très court, de confirmer l'identité d'une espèce telle que *S. aureus* et de déterminer, simultanément au sein de la même analyse, les propriétés de typage, de résistance potentielle à au moins un antibiotique et d'établir l'existence de facteur de virulence. Ces propriétés ont été établies avec le même instrument, ce qui facilite grandement l'analyse et le rendu des résultats. Enfin, les caractéristiques des bactéries sont établies à l'aide de protéines bactériennes, ce qui traduit l'existence de microorganismes vivants et viables, contrairement aux caractérisations à partir d'ADN bactérien qui peuvent être faussées par l'existence de bactéries mortes.

Exemple 6 : Protocole de digestion de microorganismes avec une étape de dessalage

Classiquement le protocole suivant est mis en œuvre en 17 étapes :

Etapes 1 à 10 : idem exemple 4.

11. Le volume d'échantillon est complété à 1mL avec eau/acide formique 0,1% (v/v)

12. Equilibrage des colonnes HLB Oasis Waters avec 1ml de méthanol puis 1 ml H₂O/acide formique 0,1% (v/v)
13. Dépôt de l'échantillon qui s'écoule par gravité
14. Lavage avec 1 ml H₂O/acide formique 0,1% (v/v)
- 5 15. Elution avec 1ml d'un mélange 80% de méthanol et 20% d'eau/acide formique 0,1% (v/v)
16. L'éluât est évaporé avec un évaporateur de type SpeedVac® SPD2010 (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique), durant 2 heures, afin d'obtenir un volume d'environ 100µl.
- 10 17. L'éluât est ensuite repris dans une solution eau/acide formique 0,5% (v/v) quantité suffisante pour (QSP) 250µl

Exemple 7 : Caractérisation d'échantillons de *E coli*:

- Après avoir établi la ou les espèces des échantillons selon l'une quelconque des méthodes décrites dans les exemples 1 à 3, les espèces listées ci-dessous sont analysées. Quinze souches de *E coli* sont analysées pour confirmer leur identification et établir leurs caractéristiques :

	AST1	AST2
	AST3	AST4
20	AST5	VIR41
	VIR42	VIR43
	VIR44	VIR45
	ID6	ID7
	ID8	ID9
25	ID10	

La même méthode d'analyse est appliquée à des espèces n'appartenant pas à l'espèce *E. coli* pour servir de témoin négatif :

- *S. aureus*
- VIR10
- 30 • *S. pneumoniae*

VIR19

- *C. difficile*

VIR28

5 Chaque échantillon est traité selon l'exemple 6, puis un volume de 5µl de protéines digérées est injecté et analysé selon les conditions suivantes :

- Chaîne chromatographique Agilent 1100 series de la société Agilent Technologies (Massy, France).
- Colonne Waters Symmetry C18, 2,1mm de diamètre interne, 100mm de long,
10 taille de particule de 3,5µm.
- Solvant A : H₂O + 0,1% acide formique.
- Solvant B : ACN + 0,1% acide formique.
- Gradient HPLC défini dans le **TABLEAU 7** ci-après :

15 **TABLEAU 7**

Temps (min)	Débit (µl)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	300	95	5
3	300	95	5
28	300	60	40
30	300	0	100
38	300	0	100
38.1	300	95	5
45	300	95	5

- L'éluât en sortie de colonne chromatographique est directement injecté dans la source d'ionisation du spectromètre de masse de type QTRAP® 5500 de la société Applied Biosystems (Foster City, Etats Unis d'Amérique).
- 20 • Les peptides, issues de la digestion des protéines du microorganisme, sont analysés par le spectromètre de masse en mode MRM. Seuls les peptides indiqués dans le **TABLEAU 8** sont détectés. Pour cela, le ou les fragments de première génération indiqués dans le **TABLEAU 8** sont détectés. L'application,

à laquelle permet de répondre chaque transition, c'est à dire chaque peptide associé à son fragment de première génération, est précisée dans la colonne intérêt clinique du **TABLEAU 8** avec les lettres I, T, R et V. I désigne la confirmation de l'identification du microorganisme, T le typage, R la résistance à au moins un antibiotique et V la détection de facteurs de virulence.

5

TABLEAU 8 :

Transition numéro	Protéine	Peptide	ion fragment de première génération	Intérêt clinique
1	ACON2	ILEIEGLPDLK	y7 monochargé	I + T
2	ACON2	ILEIEGLPDLK	y8 monochargé	I + T
3	ACON2	ILEIEGLPDLK	y9 monochargé	I + T
4	ACON2	VADGATVVSTSTR	y7 monochargé	I + T
5	ACON2	VADGATVVSTSTR	y8 monochargé	I + T
6	ACON2	VADGATVVSTSTR	y9 monochargé	I + T
7	ASPG2	TNTTDVATFK	y6 monochargé	I + T
8	ASPG2	TNTTDVATFK	y7 monochargé	I + T
9	ASPG2	TNTTDVATFK	y8 monochargé	I + T
10	FABB	LDTTGLIDR	y6 monochargé	I + T
11	FABB	LDTTGLIDR	y7 monochargé	I + T
12	FABB	LDTTGLIDR	y8 monochargé	I + T
13	FABB	VGLIAGSGGGSPR	y8 monochargé	I + T
14	FABB	VGLIAGSGGGSPR	y9 monochargé	I + T
15	FABB	VGLIAGSGGGSPR	y10 monochargé	I + T
16	GLNH	AIDFSDGYK	y6 monochargé	I + T
17	GLNH	AIDFSDGYK	y7 monochargé	I + T
18	GLNH	AIDFSDGYK	y8 monochargé	I + T
19	MODA	LGAWDTLSPK	y7 monochargé	I + T
20	MODA	LGAWDTLSPK	y8 monochargé	I + T
21	MODA	LGAWDTLSPK	y9 monochargé	I + T
22	ODP2	FGEIEEVELGR	y7 monochargé	I + T
23	ODP2	FGEIEEVELGR	y8 monochargé	I + T
24	ODP2	FGEIEEVELGR	y9 monochargé	I + T
25	OMPC	INLLDDNQFTR	y7 monochargé	I + T
26	OMPC	INLLDDNQFTR	y8 monochargé	I + T
27	OMPC	INLLDDNQFTR	y9 monochargé	I + T
28	PFLB	LATAWEGFTK	y6 monochargé	I + T
29	PFLB	LATAWEGFTK	y7 monochargé	I + T
30	PFLB	LATAWEGFTK	y8 monochargé	I + T
31	SUCD	DSILEAIDAGIK	y8 monochargé	I + T
32	SUCD	DSILEAIDAGIK	y9 monochargé	I + T
33	SUCD	DSILEAIDAGIK	y10 monochargé	I + T
34	SUCD	FAALEAAGVK	y7 monochargé	I + T
35	SUCD	FAALEAAGVK	y8 monochargé	I + T

36	SUCD	FAALEAAGVK	y9 monochargé	I + T
37	SUCD	SLADIGEALK	y6 monochargé	I + T
38	SUCD	SLADIGEALK	y7 monochargé	I + T
39	SUCD	SLADIGEALK	y8 monochargé	I + T
40	TKT1	TEEQLANIAR	y7 monochargé	I + T
41	TKT1	TEEQLANIAR	y8 monochargé	I + T
42	TKT1	TEEQLANIAR	y9 monochargé	I + T
43	YFCZ	AEAEQTLAALTEK	y8 monochargé	I + T
44	YFCZ	AEAEQTLAALTEK	y9 monochargé	I + T
45	YFCZ	AEAEQTLAALTEK	y10 monochargé	I + T
46	YGAU	SGDTLSAISK	y6 monochargé	I + T
47	YGAU	SGDTLSAISK	y7 monochargé	I + T
48	YGAU	SGDTLSAISK	y8 monochargé	I + T
49	TEM-2	LLTGELLTLASR	y7 monochargé	R + T
50	TEM-2	LLTGELLTLASR	y8 monochargé	R + T
51	TEM-2	LLTGELLTLASR	y9 monochargé	R + T
52	TEM-2	SALPAGWFIADK	y7 monochargé	R + T
53	TEM-2	SALPAGWFIADK	y8 monochargé	R + T
54	TEM-2	SALPAGWFIADK	y9 monochargé	R + T
55	TEM-2	VAGPLLR	y4 monochargé	R + T
56	TEM-2	VAGPLLR	y5 monochargé	R + T
57	TEM-2	VAGPLLR	y6 monochargé	R + T
58	TEM-2	VGYIELDLNSGK	y8 monochargé	R + T
59	TEM-2	VGYIELDLNSGK	y9 monochargé	R + T
60	TEM-2	VGYIELDLNSGK	y10 monochargé	R + T
61	TEM-2	VLLCGAVLSR	y7 monochargé	R + T
62	TEM-2	VLLCGAVLSR	y8 monochargé	R + T
63	TEM-2	VLLCGAVLSR	y9 monochargé	R + T
64	ASPA	ISDIPEFVR	y5 monochargé	T
65	ASPA	ISDIPEFVR	y6 monochargé	T
66	ASPA	ISDIPEFVR	y7 monochargé	T
67	ASPA	IEEDLLGTR	y6 monochargé	T
68	ASPA	IEEDLLGTR	y7 monochargé	T
69	ASPA	IEEDLLGTR	y8 monochargé	T
70	ASPA	LVDAINQLR	y6 monochargé	T
71	ASPA	LVDAINQLR	y7 monochargé	T
72	ASPA	LVDAINQLR	y8 monochargé	T
73	ATPA	TALAIDAIINQR	y7 monochargé	T
74	ATPA	TALAIDAIINQR	y8 monochargé	T
75	ATPA	TALAIDAIINQR	y9 monochargé	T
76	ATPA	VVNTLGAPIDGK	y7 monochargé	T
77	ATPA	VVNTLGAPIDGK	y8 monochargé	T
78	ATPA	VVNTLGAPIDGK	y9 monochargé	T
79	CH10	SAGGIVLTGSAAAK	y9 monochargé	T
80	CH10	SAGGIVLTGSAAAK	y10 monochargé	T
81	CH10	SAGGIVLTGSAAAK	y11 monochargé	T
82	CH60	AVTAAVEELK	y6 monochargé	T
83	CH60	AVTAAVEELK	y7 monochargé	T

84	CH60	AVTAAVEELK	y8 monochargé	T
85	DBHB	ALDAIIASVTESLK	y8 monochargé	T
86	DBHB	ALDAIIASVTESLK	y9 monochargé	T
87	DBHB	ALDAIIASVTESLK	y10 monochargé	T
88	DCEB	YWDVELR	y5 monochargé	T
89	DCEB	YWDVELR	y6 monochargé	T
90	DCEB	YWDVELR	y4 monochargé	T
91	DHSA	LPGILELSR	y6 monochargé	T
92	DHSA	LPGILELSR	y7 monochargé	T
93	DHSA	LPGILELSR	y8 monochargé	T
94	DPS	SKATNLLYTR	y6 monochargé	T
95	DPS	SKATNLLYTR	y7 monochargé	T
96	DPS	SKATNLLYTR	y8 monochargé	T
97	HNS	SEALKILNNIR	y7 monochargé	T
98	HNS	SEALKILNNIR	y8 monochargé	T
99	HNS	SEALKILNNIR	y9 monochargé	T
100	MDH	LFGVTTLDIIR	y6 monochargé	T
101	MDH	LFGVTTLDIIR	y7 monochargé	T
102	MDH	LFGVTTLDIIR	y8 monochargé	T
103	PGK	ASLPTIELALK	y7 monochargé	T
104	PGK	ASLPTIELALK	y8 monochargé	T
105	PGK	ASLPTIELALK	y9 monochargé	T
106	PUR7	LLSDTECLVK	y6 monochargé	T
107	PUR7	LLSDTECLVK	y7 monochargé	T
108	PUR7	LLSDTECLVK	y8 monochargé	T
109	RL4	SILSELVR	y5 monochargé	T
110	RL4	SILSELVR	y6 monochargé	T
111	RL4	SILSELVR	y7 monochargé	T
112	RS1	GGFTVELNGIR	y7 monochargé	T
113	RS1	GGFTVELNGIR	y8 monochargé	T
114	RS1	GGFTVELNGIR	y9 monochargé	T
115	YJGF	TGEVPADVAAQAR	y8 monochargé	T
116	YJGF	TGEVPADVAAQAR	y9 monochargé	T
117	YJGF	TGEVPADVAAQAR	y10 monochargé	T
118	stx1A	TYVDSLNVIR	y6 monochargé	V + T
119	stx1A	TYVDSLNVIR	y7 monochargé	V + T
120	stx1A	TYVDSLNVIR	y8 monochargé	V + T
121	stx1A-2A	FVTVTAEALR	y7 monochargé	V + T
122	stx1A-2A	FVTVTAEALR	y8 monochargé	V + T
123	stx2A	ISNVLPEYR	y6 monochargé	V + T
124	stx2A	ISNVLPEYR	y7 monochargé	V + T
125	stx2A	ISNVLPEYR	y8 monochargé	V + T

L'état de charge du peptide précurseur, son temps de rétention et les transitions, c'est-à-dire les rapports $(m/z)_1$ en Q1 et $(m/z)_2$ en Q3, sont indiqués dans le **TABLEAU 9**.

L'énergie de collision utilisée pour fragmenter l'ion précurseur est également indiquée dans le **TABEAU 9**.

TABEAU 9 :

Transition Numéro	Etat de charge du précurseur	Temps de rétention	(m/z) filtré en Q1	(m/z) filtré en Q3	Energie de collision
1	2	19.04	620.36	771.42	36
2	2	19.04	620.36	884.51	36
3	2	19.04	620.36	1013.55	36
4	2	8.93	632.33	749.42	37
5	2	8.93	632.33	850.46	37
6	2	8.93	632.33	921.5	37
7	2	9.99	549.28	680.36	32
8	2	9.99	549.28	781.41	32
9	2	9.99	549.28	882.46	32
10	2	12.89	502.27	674.38	30
11	2	12.89	502.27	775.43	30
12	2	12.89	502.27	890.46	30
13	2	10.63	564.31	674.32	33
14	2	10.63	564.31	745.36	33
15	2	10.63	564.31	858.44	33
16	2	14.12	589.77	732.32	34
17	2	14.12	589.77	879.39	34
18	2	14.12	589.77	994.42	34
19	2	15.09	544.29	846.44	32
20	2	15.09	544.29	917.47	32
21	2	15.09	544.29	974.49	32
22	2	15.61	639.32	831.42	37
23	2	15.61	639.32	944.5	37
24	2	15.61	639.32	1073.55	37
25	2	16.42	674.85	895.39	39
26	2	16.42	674.85	1008.47	39
27	2	16.42	674.85	1121.56	39
28	2	15.49	562.29	767.37	33
29	2	15.49	562.29	838.41	33
30	2	15.49	562.29	939.46	33
31	2	19.84	622.84	816.45	36
32	2	19.84	622.84	929.53	36
33	2	19.84	622.84	1042.61	36
34	2	13.35	488.78	687.4	29
35	2	13.35	488.78	758.44	29
36	2	13.35	488.78	829.48	29
37	2	15.56	508.78	630.38	30
38	2	15.56	508.78	745.41	30
39	2	15.56	508.78	816.45	30

40	2	11.4	572.8	785.46	34
41	2	11.4	572.8	914.51	34
42	2	11.4	572.8	1043.55	34
43	2	14.85	687.86	846.49	39
44	2	14.85	687.86	974.55	39
45	2	14.85	687.86	1103.59	39
46	2	9.8	489.76	618.38	29
47	2	9.8	489.76	719.43	29
48	2	9.8	489.76	834.46	29
49	2	19.38	643.89	773.49	33
50	2	19.38	643.89	902.53	33
51	2	19.38	643.89	959.55	33
52	2	18.43	638.34	836.43	33
53	2	18.43	638.34	907.47	33
54	2	18.43	638.34	1004.52	33
55	2	10.79	363.24	498.34	21
56	2	10.79	363.24	555.36	21
57	2	10.79	363.24	626.4	21
58	2	15.94	654.35	875.45	34
59	2	15.94	654.35	988.53	34
60	2	15.94	654.35	1151.59	34
61	2	14.8	544.32	762.39	29
62	2	14.8	544.32	875.48	29
63	2	14.8	544.32	988.56	29
64	2	12.8	538.29	647.35	29
65	2	12.8	538.29	760.44	29
66	2	12.8	538.29	875.46	29
67	2	12.9	523.28	674.38	28
68	2	12.9	523.28	803.43	28
69	2	12.9	523.28	932.47	28
70	2	15.31	521.31	714.43	28
71	2	15.31	521.31	829.45	28
72	2	15.31	521.31	928.52	28
73	2	17.37	649.87	829.45	34
74	2	17.37	649.87	942.54	34
75	2	17.37	649.87	1013.57	34
76	2	11.94	592.34	657.36	31
77	2	11.94	592.34	770.44	31
78	2	11.94	592.34	871.49	31
79	2	11.08	601.84	817.48	31
80	2	11.08	601.84	930.56	31
81	2	11.08	601.84	987.58	31
82	2	11.86	515.79	688.39	28
83	2	11.86	515.79	759.42	28
84	2	11.86	515.79	860.47	28
85	2	22.24	715.91	834.46	36
86	2	22.24	715.91	947.54	36
87	2	22.24	715.91	1060.62	36

73

88	2	15.35	490.75	631.34	27
89	2	15.35	490.75	817.42	27
90	2	15.35	490.75	516.31	27
91	2	17.1	499.31	730.45	27
92	2	17.1	499.31	787.47	27
93	2	17.1	499.31	884.52	27
94	2	10.02	583.83	779.44	31
95	2	10.02	583.83	880.49	31
96	2	10.02	583.83	951.53	31
97	2	14.94	635.88	870.55	33
98	2	14.94	635.88	983.64	33
99	2	14.94	635.88	1054.67	33
100	2	20.34	624.37	730.45	32
101	2	20.34	624.37	831.49	32
102	2	20.34	624.37	930.56	32
103	2	18.16	578.35	787.49	30
104	2	18.16	578.35	884.55	30
105	2	18.16	578.35	997.63	30
106	2	13.11	589.31	749.39	31
107	2	13.11	589.31	864.41	31
108	2	13.11	589.31	951.45	31
109	2	17.68	458.78	603.35	25
110	2	17.68	458.78	716.43	25
111	2	17.68	458.78	829.51	25
112	2	15.99	581.81	800.46	31
113	2	15.99	581.81	901.51	31
114	2	15.99	581.81	1048.58	31
115	2	10.34	642.83	801.42	33
116	2	10.34	642.83	898.47	33
117	2	10.34	642.83	997.54	33
118	2	14.85	590.32	701.43	31
119	2	14.85	590.32	816.46	31
120	2	14.85	590.32	915.53	31
121	2	14.15	553.81	759.44	29
122	2	14.15	553.81	860.48	29
123	2	12.9	545.8	776.43	29
124	2	12.9	545.8	890.47	29
125	2	12.9	545.8	977.51	29

- Les autres paramètres machine utilisés sont les suivants :

Type de balayage:

MRM

MRM planifié :

oui

Polarité:

Positive

Source d'ionisation:

Turbo V™ (Applied BioSystems)

Réglage Q1:

Filtrage avec résolution unitaire

	Réglage Q3:	Filtrage avec résolution unitaire
	Pause inter-scan:	5.00 msec
	Vitesse de balayage:	10 Da/s
	Gaz rideau:	50,00 psi
5	Tension de cône:	5500,00 V
	Température de source:	550,00 °C
	Gaz de nébulisation:	50,00 psi
	Gaz chauffant:	40,00 psi
	Remplissage dynamique:	activé
10	Potentiel d'orifice :	100, 00 V
	(en anglais declustering potential (DP))	
	Potentiel d'entrée avant Q0 (EP):	9,00 V
	Potentiel en sortie de cellule de collision :	35 V
	(en anglais cell exit potential (CXP))	
15	Temps de cycle total:	1.2 sec
	Fenêtre de détection	80 sec

Les aires obtenues pour chacune des transitions et pour chacun des
20 microorganismes étudiés ont été mesurées. Toutes les transitions dont l'aire est
supérieure ou égale à 2500 (unité arbitraire) sont considérées comme positives et ont
été notées « 1 » dans les **tableaux 10A et 10B**. Toutes les transitions dont l'aire est
inférieure à 2500, sont considérées comme négatives et ont été notées 0 dans les
tableaux 10A et 10B. Lorsqu'on n'a observé aucun pic de signal, on a noté la transition
25 comme négative.

Le nombre de transition positive est ensuite sommé pour les applications I, R et V et reporté dans le **TABLEAU 11** :

TABLEAU 10A :[illegible]

2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	0	0	0	0
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	1	1	1	1	1	1	1	1	1
42	1	1	0	0	0	1	1	1	1
43	1	1	1	1	1	1	1	1	1
44	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45	1	1	1	1	1	1	1	1	1
46	1	1	1	1	1	1	1	1	1
47	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	1	1	1	1	1	1	1	1	1
49	0	1	1	1	1	1	1	1	1

50	0	1	1	1	1	0	0	0	0
51	0	1	1	1	1	1	1	1	1
52	0	1	1	1	1	0	0	1	1
53	0	1	1	1	1	0	0	0	0
54	0	1	1	1	1	0	0	0	0
55	0	1	1	1	1	1	1	1	1
56	1	1	1	1	1	0	0	0	1
57	0	1	1	1	1	0	0	0	0
58	0	1	1	1	1	0	0	0	0
59	0	1	1	1	1	0	0	0	0
60	0	1	1	1	1	0	0	0	0
61	0	1	1	1	1	0	0	0	0
62	0	1	1	1	1	0	1	1	1
63	0	1	1	1	1	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	1
65	0	0	0	0	0	0	0	0	1
66	0	0	0	0	0	1	1	1	1
67	1	1	1	1	1	1	1	1	1
68	1	1	1	1	1	1	1	1	1
69	1	1	1	1	1	1	1	1	1
70	1	1	1	1	1	1	1	1	1
71	1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	1	1	1	1	1	1	1	1	1
73	1	1	1	1	1	1	1	1	1
74	1	1	1	1	1	1	1	1	1
75	1	1	1	1	1	1	1	1	1
76	1	1	1	1	1	1	1	1	1
77	1	1	1	1	1	1	1	1	1
78	1	1	1	1	1	1	1	1	1
79	1	1	1	1	1	1	1	1	1
80	1	1	1	1	1	1	1	1	1
81	1	1	1	1	1	1	1	1	1
82	1	1	1	1	1	1	1	1	1
83	1	1	1	1	1	1	1	1	1
84	1	1	1	1	1	1	1	1	1
85	1	1	1	1	1	1	1	1	1
86	1	1	1	1	1	1	1	1	1
87	1	1	1	1	1	1	1	1	1
88	1	1	1	1	1	1	1	1	1
89	0	1	1	1	1	1	1	1	1
90	1	1	1	1	1	1	1	1	1
91	1	1	1	1	1	1	1	1	1
92	1	1	1	1	1	1	1	1	1
93	1	1	1	1	1	1	1	1	1
94	1	1	1	1	1	1	1	1	0
95	1	1	1	1	1	1	1	1	0
96	1	1	1	1	1	1	1	1	1
97	0	0	0	0	0	1	1	1	1

[illegible]

15	1	1	1	1	1	1	0	0	0
16	1	1	1	1	1	1	0	0	0
17	1	1	1	1	1	1	0	0	0
18	1	1	1	1	1	1	0	0	0
19	1	1	1	1	1	1	0	0	0
20	1	1	1	1	1	1	0	0	0
21	1	1	1	1	1	1	0	0	0
22	1	1	1	1	1	1	0	0	0
23	1	1	1	1	1	1	0	0	0
24	1	1	1	1	1	1	0	0	0
25	1	1	1	1	1	1	0	0	0
26	1	1	1	1	1	1	0	0	0
27	1	1	1	1	1	1	0	0	0
28	1	1	1	1	1	1	0	0	0
29	1	1	1	1	1	1	0	0	0
30	1	1	1	1	1	1	0	0	0
31	1	1	1	1	1	1	0	0	0
32	1	1	1	1	1	1	0	0	0
33	1	1	0	0	0	0	0	0	0
34	1	1	1	1	1	1	1	0	0
35	1	1	1	1	1	1	0	1	0
36	1	1	1	1	1	1	0	0	0
37	1	1	1	1	1	1	0	0	0
38	1	1	1	1	1	1	0	0	0
39	1	1	1	1	1	1	0	0	0
40	1	1	1	1	1	1	0	0	0
41	1	1	1	1	1	1	0	0	0
42	1	1	0	0	0	0	0	0	0
43	1	1	1	1	1	1	0	0	0
44	1	1	1	1	1	1	0	0	0
45	1	1	0	0	0	0	0	0	0
46	1	1	1	1	1	1	0	0	0
47	1	1	1	1	1	1	0	0	0
48	1	1	1	1	1	1	0	0	0
49	1	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	1	0	0	0	0	0	0	0	0
52	1	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	1	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	1	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	1	1	1	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	0	0	1	1	1	0	0	0	0
62	1	0	1	1	1	0	0	0	0

111	1	1	1	1	1	1	0	0	0
112	1	1	1	1	1	1	0	0	0
113	1	1	1	1	1	1	0	0	0
114	1	0	0	0	0	0	0	0	0
115	1	1	1	1	1	1	0	0	0
116	1	1	1	1	1	1	0	0	0
117	1	1	1	1	1	1	0	0	0
118	0	0	0	0	0	0	0	0	0
119	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121	0	0	0	0	0	0	0	0	0
122	0	1	0	1	1	1	0	0	0
123	1	0	0	0	0	0	0	0	0
124	1	0	0	0	0	0	0	0	0
125	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU 11 :

Souches	Espèces	Transitions I	Transitions R	Transitions V
AST1	<i>E. coli</i>	48	1	2
AST2	<i>E. coli</i>	48	15	2
AST3	<i>E. coli</i>	47	15	1
AST4	<i>E. coli</i>	47	15	0
AST5	<i>E. coli</i>	47	15	2
VIR41	<i>E. coli</i>	47	3	8
VIR42	<i>E. coli</i>	47	4	5
VIR43	<i>E. coli</i>	47	5	6
VIR44	<i>E. coli</i>	47	6	5
VIR45	<i>E. coli</i>	48	5	2
ID6	<i>E. coli</i>	48	0	1
ID7	<i>E. coli</i>	45	2	0
ID8	<i>E. coli</i>	45	2	1
ID9	<i>E. coli</i>	45	3	1
ID10	<i>E. coli</i>	45	1	1
VIR10	<i>S. aureus</i>	1	1	0
VIR19	<i>S. pneumoniae</i>	1	1	0
VIR28	<i>C. difficile</i>	2	0	0

Tous les échantillons d'*E. coli* présentent plus de 44 transitions positives dans la
5 catégorie I. Tous ces échantillons sont donc confirmés comme appartenant bien à
l'espèce *E. coli*.

En revanche, les échantillons VIR10, VIR19 et VIR28 présentent moins de 3
transitions positives dans la catégorie I, ces échantillons sont donc confirmés comme
n'appartenant pas à l'espèce *E. coli*.

Les souches AST2, AST3, AST4 et AST5 de *E. coli* présentent plus de 14 transitions positives pour la catégorie R, elles expriment donc la pénicillinase plasmidique TEM-2, ce qui est synonyme d'un mécanisme de résistance aux Pénicillines.

En revanche, les souches AST1, VIR41, VIR42, VIR43, VIR44, VIR45, ID6, ID7, ID8, ID9 et ID10 de *E. coli* présentent moins de 7 transitions positives pour la catégorie R, elles n'expriment donc pas la pénicillinase plasmidique TEM-2. Ces souches sont donc sensibles aux Pénicillines, notamment aminopénicillines ou pénicillines A (ampicilline), carboxypénicillines ou pénicillines C (ticarcilline) et uréidopénicilline ou pénicilline U (pipéracilline).

Les souches VIR10, VIR19 et VIR28 qui n'appartiennent pas à l'espèce *E. coli* présentent moins de 2 transitions pour la catégorie R, elles n'expriment donc pas TEM-2, ce qui confirme la spécificité de la méthode.

Les échantillons VIR41, VIR42, VIR43 et VIR44 de *E. coli* présentent plus de 4 transitions positives dans la catégorie V, elles expriment donc les toxines Shigatoxine 1 ou 2 (STX1 ou STX2). Plus précisément, pour VIR41 les transitions 118 à 125 sont positives, VIR41 exprime donc simultanément Shigatoxine 1 et Shigatoxine 2. VIR42 et VIR44 sont positives pour les transitions 121 à 125, elles expriment donc Shigatoxine 2. Il en est de même pour VIR45 qui présente les transitions 123 et 124. VIR43 qui présente les transitions 118 à 122 exprime Shigatoxine 2. En revanche, les souches AST1, AST2, AST3, AST4, AST5, VIR45, ID6, ID7, ID8, ID9 et ID10 de *E. coli* présentent moins de 3 transitions positives, elles n'expriment donc pas de Shigatoxine. Ces souches n'ont donc pas les propriétés de virulence en lien avec les Shigatoxines.

Les souches VIR10, VIR19 et VIR28 qui n'appartiennent pas à l'espèce *E. coli* présentent également moins de 3 transitions pour la catégorie V, elles n'expriment donc pas stx1 ou stx2, ce qui confirme la spécificité de la méthode.

Pour le typage, les transitions de la catégorie T de chaque souche sont comparées aux transitions des autres souches considérées comme des souches de

référence. En pratique une valeur 0 est attribuée lorsque les transitions entre les 2 souches se classent dans la même catégorie (positive ou négative) et une valeur de 1 est attribuée lorsque les transitions entre les 2 souches se classent dans des catégories différentes (une transition positive et une transition négative). Les valeurs sont

5 sommées pour toutes les transitions de la catégorie T de chaque couple de souche afin d'établir un score. Les scores figurent dans le **TABLEAU 12** :

TABLEAU 12 :

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

10

Les souches qui ont un score inférieur ou égal à 4 sont de même type, les souches qui ont un score strictement supérieur à 4 sont de type différent.

Ainsi, les souches AST2, AST3, AST4, AST5 sont de même type. Il en est de même respectivement pour les souches AST1 et ID6 et pour les souches ID7, ID8, ID9 et

15 ID10. Toutes les autres souches prises deux à deux sont de types différents. Il faut noter les sommes élevées obtenues entre les souches VIR10, VIR19 et VIR28, qui ne sont pas des *S. Aureus*, et toutes les autres souches qui sont des *S. Aureus*. Ces résultats confirment la spécificité de la méthode.

Les souches VIR10, VIR19 et VIR28 sont d'espèces différentes. Ces souches ne peuvent donc pas être comparées entre elles et aucune valeur n'est reportée dans le TABLEAU 12.

De façon extrêmement intéressante, des scores supérieurs à 20, comme par exemple
5 entre AST4 et VIR41, traduisent une grande divergence entre souches. Des scores entre 12 et 20, comme entre ID7 et VIR42, traduisent une divergence modérée et des scores entre 4 et 12, comme entre ID10 et AST1, une divergence faible.

La méthode ainsi mise en œuvre permet donc non seulement d'établir si deux
10 souches sont de même type, ce qui est important pour identifier un foyer infectieux commun, mais également d'estimer la proximité de deux souches, ce qui est extrêmement important pour les études épidémiologiques.

Cet exemple montre que, de façon très avantageuse, la présente invention permet en un temps inférieur à une heure, ce qui est très court, de confirmer l'identité
15 d'une espèce telle que *E. coli* et de déterminer, simultanément au sein de la même analyse, les propriétés de typage, de résistance potentielle à au moins un antibiotique et d'établir l'existence de facteur de virulence. Ces propriétés ont été établies avec le même instrument, ce qui facilite grandement l'analyse et le rendu des résultats. Enfin, les caractéristiques des bactéries sont établies à l'aide de protéines bactériennes, ce qui
20 traduit l'existence de microorganismes vivants et viables, contrairement aux caractérisations à partir d'ADN bactérien qui peuvent être faussées par l'existence de bactéries mortes.

Exemple 8 : Protocole de digestion de microorganismes en présence de méthanol

25 Classiquement le protocole suivant est mis en œuvre en 17 étapes :

1. Prélèvement d'une colonie de microorganisme, obtenue selon l'exemple 1, et mise en suspension dans 400µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH=8,0.

2. Ajout de 600µl de méthanol

30 Etapes 3 à 7 : idem étapes 2 à 6 de l'exemple 4.

Etapes 8 à 17 : idem étapes 8 à 17 de l'exemple 6.

Exemple 9 : Caractérisation d'échantillons de *C. albicans*:

Après avoir établi la ou les espèces des échantillons selon l'une quelconque des méthodes décrites dans les exemples 1 à 3, les espèces listées ci-dessous sont analysées. Dix-sept souches de *C. albicans* sont analysées pour confirmer leur identification et

5 établir leurs caractéristiques :

	ATF1	ATF2
	ATF3	ATF4
	ATF5	ATF6
	ATF7	VIR31
10	VIR32	VIR33
	VIR34	VIR35
	VIR36	VIR37
	VIR38	VIR39
	CA16	

15 La même méthode d'analyse est appliquée à des espèces n'appartenant pas à l'espèce *C. albicans* pour servir de témoin négatif :

- *E. coli*
- VIR43
- *S. aureus*
- 20 VIR5
- *E. faecium*
- AST-VAN8

25 Chaque échantillon est traité selon l'exemple 8, puis un volume de 5µl de protéines digérées est injecté et analysé selon les mêmes conditions que dans l'exemple 7.

- Les peptides, issues de la digestion des protéines du microorganisme, sont analysés par le spectromètre de masse en mode MRM. Seuls les peptides indiqués dans le **TABLEAU 13** sont détectés. Pour cela, le ou les fragments de première génération indiqué dans le **TABLEAU 13** sont détectés. L'application, à laquelle permet de répondre chaque transition, c'est à dire chaque peptide
- 30

associé à son fragment de première génération, est précisée dans la colonne intérêt clinique du **TABLEAU 14** avec les lettres I, T, R et V. I désigne la confirmation de l'identification du microorganisme, T le typage, R la résistance à au moins un antibiotique et V la détection de facteurs de virulence.

5

TABLEAU 13 :

Transition numéro	Protéine	Peptide	Ion fragment de première génération	Intérêt clinique
1	ALF	ADEEFFAK	y5 monochargé	I + T
2	ALF	ADEEFFAK	y6 monochargé	I + T
3	ALF	ADEEFFAK	y7 monochargé	I + T
4	HSP75	AFDDESVQK	y6 monochargé	I + T
5	HSP75	AFDDESVQK	y7 monochargé	I + T
6	HSP75	AFDDESVQK	y8 monochargé	I + T
7	ENO1	AKIDVVDQAK	y6 monochargé	I + T
8	ENO1	AKIDVVDQAK	y7 monochargé	I + T
9	ENO1	AKIDVVDQAK	y8 monochargé	I + T
10	RL13	AVEVPEQTAYR	y6 monochargé	I + T
11	RL13	AVEVPEQTAYR	y7 monochargé	I + T
12	RL13	AVEVPEQTAYR	y8 monochargé	I + T
13	RS22	CGVIQPR	y5 monochargé	I + T
14	RS22	CGVIQPR	y6 monochargé	I + T
15	RS22	CGVIQPR	y4 monochargé	I + T
16	RLA4	DLQELIAEGNTK	y8 monochargé	I + T
17	RLA4	DLQELIAEGNTK	y9 monochargé	I + T
18	RLA4	DLQELIAEGNTK	y7 monochargé	I + T
19	PPIA	FADENFVKR	y6 monochargé	I + T
20	PPIA	FADENFVKR	y7 monochargé	I + T
21	PPIA	FADENFVKR	y8 monochargé	I + T
22	TPIS	FALDTGVK	y6 monochargé	I + T
23	TPIS	FALDTGVK	y7 monochargé	I + T
24	TPIS	FALDTGVK	y5 monochargé	I + T
25	RL28	GRLPEVPVIVK	y8 monochargé	I + T
26	RL28	GRLPEVPVIVK	y5 monochargé	I + T
27	ALF	IAEALDIFHTK	y6 monochargé	I + T
28	ALF	IAEALDIFHTK	y7 monochargé	I + T
29	ALF	IAEALDIFHTK	y8 monochargé	I + T
30	ENO1	IDVVDQAK	y5 monochargé	I + T
31	ENO1	IDVVDQAK	y6 monochargé	I + T
32	ENO1	IDVVDQAK	y7 monochargé	I + T
33	ENO1	IEEELGSEAIYAGKDFQK	y8 monochargé	I + T
34	ENO1	IEEELGSEAIYAGKDFQK	y9 monochargé	I + T
35	PPIA	IESFGSGSGATSK	y9 monochargé	I + T
36	PPIA	IESFGSGSGATSK	y10 monochargé	I + T

37	PPIA	IESFGSGSGATSK	y11 monochargé	I + T
38	NTF2	LASLPFQK	y5 monochargé	I + T
39	NTF2	LASLPFQK	y6 monochargé	I + T
40	NTF2	LASLPFQK	y7 monochargé	I + T
41	MBF1	LDATDDVVAVK	y7 monochargé	I + T
42	MBF1	LDATDDVVAVK	y8 monochargé	I + T
43	MBF1	LDATDDVVAVK	y9 monochargé	I + T
44	PGK	NVEHLVEK	y6 monochargé	I + T
45	PGK	NVEHLVEK	y7 monochargé	I + T
46	PGK	NVEHLVEK	y5 monochargé	I + T
47	RL36	SGIAAGVVK	y5 monochargé	I + T
48	RL36	SGIAAGVVK	y6 monochargé	I + T
49	RL36	SGIAAGVVK	y7 monochargé	I + T
50	G3P	SGVDYVIESTGVFTK	y9 monochargé	I + T
51	G3P	SGVDYVIESTGVFTK	y10 monochargé	I + T
52	G3P	SGVDYVIESTGVFTK	y8 monochargé	I + T
53	EF1B	SLNEFLADK	y6 monochargé	I + T
54	EF1B	SLNEFLADK	y7 monochargé	I + T
55	RL13	SQETFDANVAR	y7 monochargé	I + T
56	RL13	SQETFDANVAR	b8 monochargé	I + T
57	RL13	SQETFDANVAR	y9 monochargé	I + T
58	CS111	SSSSTTKK	y6 monochargé	I + T
59	CS111	SSSSTTKK	y7 monochargé	I + T
60	HSP71	STLDPVGK	y6 monochargé	I + T
61	HSP71	STLDPVGK	y7 monochargé	I + T
62	HSP71	STLDPVGK	y5 monochargé	I + T
63	PGK	SVELFQQAVAK	y7 monochargé	I + T
64	PGK	SVELFQQAVAK	y8 monochargé	I + T
65	PGK	SVELFQQAVAK	y6 monochargé	I + T
66	KPYK	TANDVLELR	y5 monochargé	I + T
67	KPYK	TANDVLELR	y6 monochargé	I + T
68	KPYK	TANDVLELR	y7 monochargé	I + T
69	ENO1	VGDKIQIVGDDLTVTNPTR	y7 monochargé	I + T
70	ENO1	VGDKIQIVGDDLTVTNPTR	y8 monochargé	I + T
71	ENO1	VGDKIQIVGDDLTVTNPTR	y9 monochargé	I + T
72	ADH1	VVAIDGGDEK	y7 monochargé	I + T
73	ADH1	VVAIDGGDEK	y8 monochargé	I + T
74	ADH1	VVAIDGGDEK	y9 monochargé	I + T
75	RS22	WTDNLLPAR	y6 monochargé	I + T
76	RS22	WTDNLLPAR	y7 monochargé	I + T
77	RS22	WTDNLLPAR	y8 monochargé	I + T
78	G3P	YKGEVTASGDDLVIDGHK	y10 monochargé	I + T
79	G3P	YKGEVTASGDDLVIDGHK	y11 monochargé	I + T
80	G3P	YKGEVTASGDDLVIDGHK	y9 monochargé	I + T
81	ADH1	YVLDTSK	y5 monochargé	I + T
82	ADH1	YVLDTSK	y6 monochargé	I + T
83	ADH1	YVLDTSK	y4 monochargé	I + T
84	CP51	AVIYDCPNSR	y6 monochargé	R + T

85	CP51	AVIYDCPNSR	y7 monochargé	R + T
86	CP51	GHYVLVFPGYAHTSER	10 monochargé	R + T
87	CP51	GHYVLVFPGYAHTSER	y9 monochargé	R + T
88	CP51	GHYVLVSPGYAHTSER	y9 monochargé	R + T
89	CP51	GHYVLVSPGYAHTSER	10 monochargé	R + T
90	CP51	GVIYDCPNSR	y6 monochargé	R + T
91	CP51	GVIYDCPNSR	y7 monochargé	R + T
92	CP51	GVIYDCPNSR	y8 monochargé	R + T
93	CP51	GVSSPYLPFGGGR	y9 monochargé	R + T
94	CP51	GVSSPYLPFGGGR	y6 monochargé	R + T
95	CP51	GVSSPYLPFSGGK	y9 dichargé	R + T
96	CP51	GVSSPYLPFSGGK	y9 monochargé	R + T
97	CP51	GVSSPYLPFSGGK	y6 monochargé	R + T
98	CP51	GVSSPYLPFSGGR	y9 dichargé	R + T
99	CP51	GVSSPYLPFSGGR	y9 monochargé	R + T
100	CP51	GVSSPYLPFSGGR	y6 monochargé	R + T
101	LIPASE8	AAVGDIQSR	y7 monochargé	V + T
102	LIPASE8	AAVGDIQSR	y8 monochargé	V + T
103	LIPASE8	ITPDDL	y5 monochargé	V + T
104	LIPASE8	ITPDDL	y6 monochargé	V + T
105	LIPASE8	ITPDDL	y4 monochargé	V + T
106	LIPASE8	TGWDILK	y5 monochargé	V + T
107	LIPASE8	TGWDILK	y6 monochargé	V + T
108	LIPASE8	TGWDILK	y4 monochargé	V + T

L'état de charge du peptide précurseur, son temps de rétention et les transitions, c'est-à-dire les rapports $(m/z)_1$ en Q1 et $(m/z)_2$ en Q3, sont indiqués dans le **TABEAU 14**.

L'énergie de collision utilisée pour fragmenter l'ion précurseur est également indiquée dans le **TABEAU 14**.

TABEAU 14 :

Transition numéro	Etat de charge du précurseur	Temps de rétention	(m/z) filtré en Q1	(m/z) filtré en Q3	Energie de collision
1	2	11.9	478.72	641.33	26
2	2	11.9	478.72	770.37	26
3	2	11.9	478.72	885.4	26
4	2	7.8	519.74	705.34	28
5	2	7.8	519.74	820.37	28
6	2	7.8	519.74	967.44	28
7	2	8.5	543.81	659.37	29
8	2	8.5	543.81	774.4	29
9	2	8.5	543.81	887.48	29
10	2	11	631.82	767.37	33

11	2	11	631.82	864.42	33
12	2	11	631.82	963.49	33
13	2	6.4	415.22	612.38	23
14	2	6.4	415.22	669.4	23
15	2	6.4	415.22	513.31	23.3
16	2	15.5	665.85	845.47	34
17	2	15.5	665.85	974.52	34
18	2	15.5	665.85	732.39	34.3
19	2	10.5	563.29	792.44	30
20	2	10.5	563.29	907.46	30
21	2	10.5	563.29	978.5	30
22	2	12.5	425.74	632.36	24
23	2	12.5	425.74	703.4	24
24	2	12.5	425.74	519.28	23.7
25	2	14.8	603.88	880.55	32
26	2	14.8	603.88	555.39	31.6
27	2	17.8	629.35	760.4	33
28	2	17.8	629.35	873.48	33
29	2	17.8	629.35	944.52	33
30	2	9	444.25	560.3	25
31	2	9	444.25	659.37	25
32	2	9	444.25	774.4	25
33	3	18.6	676.34	956.48	38
34	3	18.6	676.34	1069.57	38
35	2	8.4	614.3	751.36	32
36	2	8.4	614.3	898.43	32
37	2	8.4	614.3	985.46	32
38	2	14.1	452.27	632.38	25
39	2	14.1	452.27	719.41	25
40	2	14.1	452.27	790.45	25
41	2	12.1	573.31	745.41	30
42	2	12.1	573.31	846.46	30
43	2	12.1	573.31	917.49	30
44	2	7	484.26	754.41	26
45	2	7	484.26	853.48	26
46	2	7	484.26	625.37	26.3
47	2	4.5	408.73	488.28	23
48	2	4.5	408.73	559.32	23
49	2	4.5	408.73	672.4	23
50	2	18	801.41	981.53	40
51	2	18	801.41	1080.59	40
52	2	18	801.41	868.44	40.3
53	2	14.3	518.77	722.37	28
54	2	14.3	518.77	836.41	28
55	2	10.1	619.29	792.4	32
56	2	10.1	619.29	893.36	32
57	2	10.1	619.29	1022.49	32
58	2	10.6	413.22	651.37	23

59	2	10.6	413.22	738.4	23
60	2	8.7	408.73	628.37	23
61	2	8.7	408.73	729.41	23
62	2	8.7	408.73	515.28	23
63	2	14.6	610.34	791.44	32
64	2	14.6	610.34	904.53	32
65	2	14.6	610.34	644.37	31.9
66	2	12.9	515.78	629.4	28
67	2	12.9	515.78	744.43	28
68	2	12.9	515.78	858.47	28
69	3	15.3	681.04	788.43	38
70	3	15.3	681.04	901.51	38
71	3	15.3	681.04	1016.54	38
72	2	7.7	501.76	733.34	27
73	2	7.7	501.76	804.37	27
74	2	7.7	501.76	903.44	27
75	2	14.9	543.29	683.42	29
76	2	14.9	543.29	798.45	29
77	2	14.9	543.29	899.49	29
78	2	11.4	952.47	1068.53	47
79	2	11.4	952.47	1155.56	47
80	2	11.4	952.47	1011.51	46.9
81	2	8.5	413.22	563.3	23
82	2	8.5	413.22	662.37	23
83	2	8.5	413.22	450.22	23.2
84	2	9.3	597.78	748.3	31
85	2	9.3	597.78	911.37	31
86	2	14.3	916.96	1164.54	45
87	2	14.3	916.96	1017.47	45.3
88	2	11	886.94	1017.47	44
89	2	11	886.94	1104.51	44
90	2	9.4	590.77	748.3	31
91	2	9.4	590.77	911.37	31
92	2	9.4	590.77	1024.45	31
93	2	16.1	647.33	963.5	33
94	2	16.1	647.33	590.3	33.5
95	2	15.8	648.34	483.26	34
96	2	15.8	648.34	965.51	34
97	2	15.8	648.34	592.31	33.5
98	2	16	662.34	497.26	34
99	2	16	662.34	993.52	34
100	2	16	662.34	620.32	34.1
101	2	12.75	515.29	788.43	28
102	2	12.75	515.29	887.49	28
103	2	9.83	415.22	615.31	23
104	2	9.83	415.22	716.36	23
105	2	9.83	415.22	518.26	23.3
106	2	15.81	416.73	674.39	23

107	2	15.81	416.73	731.41	23
108	2	15.81	416.73	488.31	23.3

Les autres paramètres machine utilisés sont les mêmes que dans l'exemple 7. Les aires obtenues pour chacune des transitions et pour chacun des microorganismes étudiés ont été mesurées. Toutes les transitions dont l'aire est supérieure ou égale à 2000 (unité arbitraire) sont considérées comme positives et ont été notées « 1 » dans les **tableaux 15A et 15B**. Toutes les transitions dont l'aire est inférieure à 2000, sont considérées comme négatives et ont été notées 0 dans les tableaux 15A et 15B. Lorsqu'on n'a observé aucun pic de signal, on a noté la transition comme négative.

10

TABLEAU 15A :

Transition Numéro	ATF1	ATF2	ATF3	ATF4	VIR31	ATF5	ATF6	ATF7	VIR32	VIR33
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
11	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
12	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
13	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
20	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
28	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1

[illegible]

92

78	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
79	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
80	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
81	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
82	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
83	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
84	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
85	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
86	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
87	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
90	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
91	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
92	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
93	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
94	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
95	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
96	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
97	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
98	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
99	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
101	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
102	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
103	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
104	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
105	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
106	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
107	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
108	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0

TABLEAU 15B :

Transition Numéro	VIR34	VIR35	VIR36	VIR37	VIR38	VIR39	CA16	VIR43	VIR5	AST- VAN8
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
5	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
6	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
7	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
8	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
9	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
11	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0

13	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
14	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
15	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
16	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
17	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
18	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
19	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
20	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
21	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
22	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
23	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
24	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
25	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
26	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
27	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
28	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
29	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
30	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
31	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
34	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
35	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
36	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
37	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
39	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
41	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
42	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
43	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
44	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
45	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
46	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
47	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
48	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
49	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
50	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
51	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
52	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
53	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
54	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
58	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
59	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
60	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
61	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0

[illegible]

Le nombre de transitions positives est ensuite sommé pour les applications I, R et V et reporté dans le **TABLEAU 16** :

TABLEAU 16 :

Souches	Espèces	Transitions I
ATF1	<i>C. albicans</i>	75
ATF2	<i>C. albicans</i>	75
ATF3	<i>C. albicans</i>	75
ATF4	<i>C. albicans</i>	75
VIR31	<i>C. albicans</i>	61
ATF5	<i>C. albicans</i>	75
ATF6	<i>C. albicans</i>	75
ATF7	<i>C. albicans</i>	75
VIR32	<i>C. albicans</i>	68
VIR33	<i>C. albicans</i>	75
VIR34	<i>C. albicans</i>	72
VIR35	<i>C. albicans</i>	75
VIR36	<i>C. albicans</i>	73
VIR37	<i>C. albicans</i>	74
VIR38	<i>C. albicans</i>	75
VIR39	<i>C. albicans</i>	75
CA16	<i>C. albicans</i>	80
VIR43	<i>E coli</i>	12
VIR5	<i>S. aureus</i>	2
AST-VAN8	<i>E. faecium</i>	1

5

Tous les échantillons de *C. albicans* présentent plus de 60 transitions positives dans la catégorie I. Tous ces échantillons sont donc confirmés comme appartenant bien à l'espèce *C. albicans*.

En revanche, les échantillons VIR43, VIR5 et AST-VAN8 présentent moins de
10 13 transitions positives dans la catégorie I, ces échantillons sont donc confirmés comme
n'appartenant pas à l'espèce *C. albicans*.

L'observation des transitions 84 et 85 indiquent la présence du peptide muté et traduit la résistance des souches ATF6 et ATF7.

15 L'observation des transitions 86 et 87 indiquent la présence du peptide muté et traduit la résistance des souches ATF2 et ATF3.

L'observation de la transition 96 indiquent la présence du peptide muté et traduisent la résistance de la souche ATF5.

L'observation des transitions 99 et 100 indiquent la présence du peptide muté et traduit la résistance de la souche ATF7.

- 5 L'observation des transitions 88 et 89 indiquent la présence du peptide natif et traduit la sensibilité de la souche ATF4.

L'observation des transitions 93 et 94 indiquent la présence du peptide natif et traduit la sensibilité des souches ATF1 et ATF4.

- 10 L'ensemble des aires des transitions I sont sommées pour conduire à la somme SI. L'ensemble des aires des transitions V sont sommées pour conduire à la somme SV. Le rapport SV/SI est ensuite calculé et multiplié par un facteur multiplicatif FM. Les résultats obtenus figurent dans le **TABLEAU 17**.

TABLEAU 17 :

Souches	Somme (SI) des aires des transitions I	Somme (SV) des aires des transitions V	Rapport des sommes SV/SI multiplié par le facteur multiplicatif (FM)	Facteur multiplicatif (FM)
ATF1	1.8E+07	1.6E+03	1.9E+03	2.0E+07
ATF2	1.3E+07	1.6E+03	2.4E+03	
ATF3	2.0E+07	2.3E+03	2.3E+03	
ATF4	2.9E+07	3.3E+03	2.3E+03	
VIR31	1.6E+07	1.4E+06	1.8E+06	
ATF5	1.7E+07	2.3E+03	2.6E+03	
ATF6	2.4E+07	4.8E+03	4.0E+03	
ATF7	2.9E+07	2.4E+03	1.7E+03	
VIR32	2.9E+07	5.3E+05	3.6E+05	
VIR33	1.9E+07	4.2E+04	4.4E+04	
VIR34	4.2E+07	1.8E+03	8.9E+02	
VIR35	1.1E+07	8.8E+03	1.5E+04	
VIR36	8.3E+06	3.5E+04	8.5E+04	
VIR37	2.3E+07	3.9E+03	3.4E+03	
VIR38	2.4E+07	3.4E+03	2.8E+03	
VIR39	1.6E+07	9.2E+03	1.1E+04	
CA16	1.2E+07	5.4E+03	9.1E+03	

15

Les souches VIR31 et VIR32 qui ont un rapport (SV/SI)xFM supérieur à 9.10^4 surexpriment la lipase 8, ces souches sont donc virulentes. Toutes les autres souches ont un rapport inférieur à 9.10^4 , elles ne surexpriment pas la lipase 8 et ne sont donc pas

virulentes. De façon intéressante le rapport (SV/SI)xFM étant plus élevé pour la souche VIR31 que pour la souche VIR32, la souche VIR31 est caractérisée comme plus virulente que la souche VIR32.

- 5 Pour le typage, les transitions de la catégorie T de chaque souche sont comparées aux transitions des autres souches considérées comme des souches de référence. En pratique une valeur 0 est attribuée lorsque les transitions entre les 2 souches se classent dans la même catégorie (positive ou négative) et une valeur de 1 est attribuée lorsque les transitions entre les 2 souches se classent dans des catégories
- 10 différentes (une transition positive et une transition négative). Les valeurs sont sommées pour toutes les transitions de la catégorie T de chaque couple de souche afin d'établir un score. Les scores figurent dans le **TABLEAU 18** :

TABLEAU 18 :

15

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

Les souches qui ont un score inférieur ou égal à 2 sont de même type, les souches qui ont un score strictement supérieur à 2 sont de type différent.

Ainsi, les souches ATF1 et ATF2, VIR35 et VIR36, VIR37 et VIR38 sont respectivement de même type. Toutes les autres souches prises deux à deux sont de types différents. Il faut noter les sommes élevées obtenues entre les souches VIR43, VIR5 et AST-VAN8, qui ne sont pas des *S. Aureus*, et toutes les autres souches qui sont des *S. Aureus*. Ces résultats confirment la spécificité de la méthode.

Les souches VIR43, VIR5 et AST-VAN8 sont d'espèces différentes. Ces souches ne peuvent donc pas être comparées entre elles et aucune valeur n'est reportée dans le **TABLEAU 18**.

De façon extrêmement intéressante, des scores supérieurs à 20, comme par exemple entre ATF1 et VIR39, traduisent une grande divergence entre souches. Des scores entre 14 et 20, comme entre CA16 et ATF1, traduisent une divergence modérée et des scores entre 4 et 14, comme entre ATF1 et ATF7, une divergence faible.

La méthode ainsi mise en œuvre permet donc non seulement d'établir si 2 souches sont de même type, ce qui est important pour identifier un foyer infectieux commun, mais également d'estimer la proximité de 2 souches, ce qui est extrêmement important pour les études épidémiologiques.

Cet exemple montre que, de façon très avantageuse, la présente invention permet en un temps inférieur à une heure, ce qui est très court, de confirmer l'identité d'une espèce telle que *C. albicans* et de déterminer, simultanément au sein de la même analyse, les propriétés de typage, de résistance potentielle à au moins un antibiotique et d'établir l'existence de facteur de virulence. La présente invention permet en outre un dosage quantitatif, ce qui est particulièrement avantageux lorsque les propriétés de résistance à au moins un antibiotique ou de virulence sont liées au taux d'expression d'une protéine ou d'un métabolite. C'est ce que nous illustrons ici avec le dosage quantitatif de la lipase 8. Ces propriétés ont été établies avec le même instrument, ce qui facilite grandement l'analyse et le rendu des résultats. Enfin, les caractéristiques des levures sont établies à l'aide de protéines fongiques, ce qui traduit l'existence de microorganismes vivants et viables, contrairement aux caractérisations à partir d'ADN fongique qui peuvent être faussées par l'existence de levures mortes.

Exemple 10 : Protocole de digestion de microorganismes en présence de méthanol adapté au dosage d'au moins un métabolite

Classiquement le protocole suivant est mis en œuvre en 19 étapes :

- 5 1. Prélèvement de cinq colonies de microorganisme, obtenue selon l'exemple 1, et mise en suspension dans 100µl d'une solution d'hydrochlorure de guanidine 6M, 50 mM Tris-HCl, pH=8,0.
2. Centrifuger à 15000g pendant 5 minutes
3. Le culot est repris dans 400µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium 50
- 10 mM, pH=8,0.
4. Ajout de 600µl de méthanol
- Etapes 5 à 9 : idem étapes 2 à 6 de l'exemple 4.
- Etapes 10 à 19 : idem étapes 8 à 17 de l'exemple 6.

15 **Exemple 11 : Caractérisation d'échantillons de *C. albicans* par analyse simultanée de protéines et de métabolites:**

- Après avoir établi la ou les espèces des échantillons selon l'une quelconque des méthodes décrites dans les exemples 1 à 3, les espèces listées ci-dessous sont analysées. Cinq souches de *C. albicans* sont analysées pour confirmer leur identification et établir
- 20 leurs caractéristiques :

ATF1	ATF2
ATF3	ATF4
ATF6	

- Chaque échantillon est traité selon l'exemple 10, puis un volume de 20µl de protéines
- 25 digérées est injecté et analysé selon les mêmes conditions que dans l'exemple 7.

Les tableaux 13 et 14 sont identiques à une exception près. La transition numéro 109 est ajoutée à la méthode. Elle correspond à la molécule, ergostérol, à l'intérêt clinique I et R.

- L'état de charge du précurseur est de 1, le temps de rétention est de 36.3 minutes, le
- 30 m/z filtré en Q1 est de 379.4, le m/z filtré en Q3 est de 69.2, l'énergie de collision est de 47.

100

Les paramètres de masse sont identiques à ceux de l'exemple 7 à l'exception de ceux-ci :

	Gaz rideau:	25,00 psi
	Température de source:	450,00 °C
5	Gaz chauffant:	50,00 psi
	Potentiel d'entrée avant Q0 (EP):	4,00 V

Pour la transition 109, des paramètres diffèrent :

	Potentiel d'orifice :	200, 00 V
10	(en anglais declustering potential (DP))	
	Potentiel d'entrée avant Q0 (EP):	10,00 V
	Potentiel en sortie de cellule de collision :	8 V
	(en anglais cell exit potential (CXP))	

15 L'ensemble des transitions 1 à 108 sont analysées de façon identique à l'exemple 9. L'ensemble des aires des transitions I sont sommées pour conduire à la somme SI. L'aire de la transition 109 est nommé A109. Le rapport A109/SI est ensuite calculé et multiplié par un facteur multiplicatif FM. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 19.

20

TABLEAU 19 :

Souches	Aire de la transition 109 (A109)	Somme (SI) des aires des transitions I	Rapport A109/SI multiplié par le facteur multiplicatif (FM)	Facteur multiplicatif (FM)
ATF1	1.7E+03	9.3E+07	1.6E+03	9.0E+07
ATF2	7.9E+03	1.1E+08	6.4E+03	
ATF3	3.9E+03	5.7E+07	6.3E+03	
ATF4	5.7E+03	2.9E+08	1.8E+03	
ATF6	6.4E+03	6.8E+07	8.5E+03	

Les souches ATF2, ATF3 et ATF6 qui ont un rapport (A109/SI) x FM supérieur à 2.10^3 surexpriment l'ergostérol, ces souches sont donc résistantes. Toutes les autres souches ont un rapport inférieur à 2.10^3 , elles ne surexpriment pas l'ergostérol et ne sont donc pas résistantes.

25

Cet exemple montre que, de façon très avantageuse, la présente invention permet de doser simultanément au sein de la même analyse, en un temps inférieur à une heure, ce qui est très court, et de façon quantitative, différents composés tels que des protéines, des peptides ou des métabolites. De façon encore plus avantageuse que le dosage d'une protéine, le dosage quantitatif d'un métabolite issu de l'action de cette protéine caractérise la présence d'une protéine fonctionnelle et plus largement d'une voie de synthèse fonctionnelle. Ainsi la quantification de l'ergostérol permet ici d'établir l'existence d'un mécanisme de résistance au fluconazole lié à l'existence de lanostérol déméthylase fonctionnelle et fortement active.

Exemple 12 : Caractérisation de microorganismes présents dans des échantillons urinaires :

Après avoir établi la ou les espèces des échantillons selon l'une quelconque des méthodes décrites dans les exemples 1 à 3, cinq échantillons d'urine contaminée par E. coli (Urine 1 à 5) sont analysés. Une sixième urine non contaminée (Urine 6) est également analysée pour servir de témoin négatif.

Le protocole suivant est mis en œuvre en 29 étapes (les étapes 5 à 12 sont optionnelles et pourraient être omises sans altérer significativement les résultats) :

1. Centrifugation de 5 mL d'urine contaminée à 2000g pendant 30 secondes
2. Récupération du surnageant
3. Centrifugation à 15000g pendant 5 minutes
4. Elimination du surnageant
5. Lavage du culot avec 3 mL d'eau distillée par remise en suspension
6. Centrifugation à 15000g pendant 5 minutes
7. Elimination du surnageant
8. Mettre le culot en présence de solvant en dilution au 1/10
9. Laisser 1 heure à -20°C
10. Centrifugation à 15000g pendant 5 minutes
11. Elimination du surnageant
12. Mettre le culot en présence de solvant en dilution au 1/10
13. Laisser 1 heure à -20°C

14. Centrifugation à 15000g pendant 5 minutes
15. Elimination du surnageant
12. Mise en suspension du culot dans 10 à 100µl d'une solution d'hydrochlorure de guanidine 6M, 50 mM Tris-HCl, pH=8,0.
- 5 13. Etapes 14 à 18 : idem étapes 2 à 6 de l'exemple 4.
19. Etapes 19 à 28 : idem étapes 8 à 17 de l'exemple 6.
29. Injecter 100µL d'éluât acidifié sur la chaîne chromatographique et le spectromètre de masse, selon le protocole décrit dans l'exemple 7.
- 10 Les aires obtenues pour chacune des transitions et pour chacun des microorganismes étudiés ont été mesurées. Les échantillons d'urine ayant une charge bactérienne très différente d'un échantillon à l'autre, le seuil utilisé dans l'exemple 7 pour déclarer une transition positive, ne peut pas être utilisé ici. Il doit être adapté à la quantité de bactéries présentes. Dans les exemples précédents, le prélèvement d'une
- 15 colonie conduisait à une quantité comparable de microorganismes. Ce n'est plus le cas dans cet exemple. Aussi, la quantité de bactéries est estimée en sommant l'aire de l'ensemble des transitions I. La somme des aires des transitions I est reportée dans le
- TABLEAU 20.**

20 **TABLEAU 20 :**

Urine 1	Urine 2	Urine 3	Urine 4	Urine 5	Urine 6
1 509 251,3	828 079,5	5 349 271,0	11 918 946,9	1 054 480,6	0,0

- Ainsi l'échantillon 4 comporte une charge bactérienne plus élevée que l'échantillon 3, lui-même plus chargé que les échantillons 1 et 5, eux-mêmes plus chargés que l'échantillon 2. Les échantillons 1 et 5 ont une charge bactérienne comparable.
- 25 L'échantillon 6 ne comporte pas d'*E. coli* et présente une charge nulle, ce qui démontre la spécificité de la technique.

- L'aire de chaque transition est ensuite normalisée en la divisant par l'aire de l'ensemble des transitions I. Toutes les transitions dont le ratio est supérieur ou égal à 0.00015
- 30 (ratio adimensionnel) sont considérées comme positives et ont été notées « 1 » dans le

TABLEAU 21. Toutes les transitions dont le ratio est inférieur à 0.00015, sont considérées comme négatives et ont été notées 0 dans le **TABLEAU 21**. Lorsqu'on n'a observé aucun pic de signal, on a noté la transition comme négative.

5 **TABLEAU 21 :**

Transition numéro	Urine 1	Urine 2	Urine 3	Urine 4	Urine 5	Urine 6
1	1	1	1	1	1	0
2	1	1	1	1	1	0
3	1	1	1	1	1	0
4	0	0	1	1	1	0
5	0	0	1	1	1	0
6	0	0	0	1	1	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	1	1	1	1	1	0
11	1	1	1	1	1	0
12	1	1	1	1	1	0
13	1	1	1	1	1	0
14	1	1	1	1	1	0
15	1	1	1	1	1	0
16	1	1	1	1	1	0
17	1	1	1	1	1	0
18	1	1	1	1	0	0
19	1	1	1	1	0	0
20	1	0	1	0	0	0
21	1	1	1	1	1	0
22	1	1	1	1	1	0
23	1	1	1	1	1	0
24	1	1	1	1	1	0
25	1	1	0	1	1	0
26	1	1	0	1	1	0
27	1	1	0	1	1	0
28	1	1	1	1	1	0
29	1	1	1	1	1	0
30	1	1	1	1	1	0
31	0	1	1	1	1	0
32	0	0	1	1	1	0
33	0	0	0	1	0	0
34	1	1	1	1	1	0
35	1	1	1	1	1	0
36	1	1	1	1	1	0
37	1	1	1	1	1	0
38	1	1	1	1	1	0
39	1	1	1	1	1	0

104

40	1	1	1	1	1	0
41	1	1	1	1	1	0
42	1	1	1	1	1	0
43	1	1	1	1	1	0
44	1	1	1	1	1	0
45	1	1	1	1	1	0
46	0	0	1	1	1	0
47	0	0	1	1	1	0
48	0	0	1	1	1	0
49	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0
55	1	1	1	0	1	0
56	1	1	1	0	1	0
57	1	1	1	0	1	0
58	1	1	1	0	1	0
59	1	1	1	0	1	0
60	1	1	1	0	0	0
61	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0
66	1	0	0	0	0	0
67	1	1	1	1	1	0
68	1	1	1	1	1	0
69	1	1	1	1	1	0
70	1	0	0	1	1	0
71	1	0	0	1	1	0
72	0	0	0	0	0	0
73	1	0	1	1	1	0
74	1	0	1	1	1	0
75	1	0	1	1	1	0
76	1	1	1	1	1	0
77	1	1	1	1	1	0
78	1	1	1	1	1	0
79	1	1	1	1	1	0
80	1	1	1	1	1	0
81	1	1	1	1	1	0
82	1	1	1	1	1	0
83	1	1	1	1	1	0
84	1	1	1	1	1	0
85	1	1	1	1	1	0
86	1	1	1	1	1	0
87	1	1	1	1	1	0

105

88	1	1	1	1	1	0
89	1	1	1	1	1	0
90	1	1	1	1	1	0
91	1	0	1	1	1	0
92	1	1	1	1	1	0
93	1	0	1	1	1	0
94	0	0	0	0	0	0
95	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0	0
97	0	0	0	0	0	0
98	0	0	0	0	0	0
99	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0
101	0	0	0	0	0	0
102	0	1	0	0	0	0
103	1	1	1	1	1	0
104	1	1	1	1	1	0
105	1	1	1	1	1	0
106	1	1	1	1	1	0
107	1	1	1	1	1	0
108	1	1	1	1	1	0
109	1	1	1	1	1	0
110	1	1	1	1	1	0
111	1	1	1	1	1	0
112	1	1	1	1	1	0
113	1	1	1	1	1	0
114	0	0	0	1	1	0
115	1	1	1	1	1	0
116	1	1	1	1	1	0
117	1	1	1	1	1	0
118	0	0	0	0	0	0
119	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0
121	1	1	1	0	0	0
122	0	0	0	0	0	0
123	0	0	0	0	0	0
124	0	0	0	0	0	0
125	0	0	0	0	0	0

Le nombre de transitions positives est ensuite sommé pour les applications I, R et V et reporté dans le **TABLEAU 22** :

5

TABLEAU 22 :

	Urine 1	Urine 2	Urine 3	Urine 4	Urine 5	Urine 6
I	36	36	40	44	41	0

106

R	6	6	6	0	5	0
V	1	1	1	0	0	0

De même que le seuil de positivité des transitions a du être modifié pour tenir compte de la concentration des échantillons, le nombre de peptides nécessaires pour caractériser une souche doit être adapté à la concentration totale en bactérieq. Certains peptides faiblement détectés dans l'exemple 7 peuvent être sous la limite de détection si la quantité de bactéries est inférieure à une colonie.

Les urines 1 à 5 présentent plus de 30 transitions positives dans la catégorie I. Tous ces échantillons sont donc confirmés comme contaminé par l'espèce *E. coli*.

En revanche, l'urine 6 ne présente aucune transition positive dans la catégorie I. Elle est donc confirmée comme n'étant pas contaminée par l'espèce *E. coli*.

Les urines 1, 2, 3 et 5 présentent au moins 5 transitions positives pour la catégorie R, elles expriment donc la pénicillinase plasmidique TEM-2, ce qui est synonyme d'un mécanisme de résistance aux Pénicillines, notamment aminopénicillines ou pénicillines A (ampicilline), carboxypénicillines ou pénicillines C (ticarcilline) et uréidopénicilline ou pénicilline U (pipéracilline).

En revanche, les urines 4 et 6 ne présentent pas de transitions positives pour la catégorie R, elles n'expriment donc pas la pénicillinase plasmidique TEM-2. Ces souches sont donc sensibles aux Pénicillines.

Ces résultats de résistance à l'ampicilline, la ticarcilline et la pipéracilline ont été confirmés avec l'automate VITEK®2 commercialisé par la demanderesse et les cartes AST-EXN et AST-N103. De façon moins rapide que pour la présente invention, la confirmation a pris un temps de 6 à 8 heures sur l'automate VITEK®2.

Les urines 1 à 6 ne présentent pas plus d'une transition positive pour la catégorie V. Ces urines ne sont donc pas contaminées par des toxines de type Shigatoxines.

Pour le typage, les transitions de la catégorie T de chaque souche sont comparées aux transitions des autres souches considérées comme des souches de référence. En pratique une valeur 0 est attribuée lorsque les transitions entre les 2 souches se classent dans la même catégorie (positive ou négative) et une valeur de 1 est attribuée lorsque les transitions entre les 2 souches se classent dans des catégories différentes (une transition positive et une transition négative). Les valeurs sont sommées pour toutes les transitions de la catégorie T de chaque couple de souche afin d'établir un score. Les scores figurent dans le **TABLEAU 23** :

10 **TABLEAU 23 :**

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

Aucune urine n'a un score inférieur ou égal à 4. Les souches infectant les urines 1 à 5 sont donc de type différents. Ces échantillons urinaires ont été collectés dans un laboratoire d'analyse médicale de ville où les infections surviennent souvent dans des environnements différents. Dans ces conditions, il est peut fréquent d'observer des infections urinaires liées à la même souche.

Cet exemple montre que, de façon très avantageuse, la présente invention permet directement à partir de l'échantillon primaire, ce qui est très avantageux de confirmer l'identité d'une espèce telle que *E. coli* et de déterminer, simultanément au sein de la même analyse, les propriétés de typage, et de résistance potentielle à au moins un antibiotique.

Références bibliographiques

- [1] J. Anhalt & C. Fenselau, 1975, *Anal. Chem.*, 47(2) :219-225.
- [2] A. Fox et al, ed., 1990, *Analytical microbiology methods : chromatography and mass spectrometry*, Plenum Press, New York, N.Y.
- 5 [3] M. Claydon et al, 1996, *Nature Biotech.* 14 :1584-1586.
- [4] T. Krishnamurthy & P. Ross, 1996, *Rapid Com. Mass Spec.*, 10 :1992-1996.
- [5] P. Seng et al. 2009, *Clin. Infect. Dis.*, 49 :543-551.
- [6] C. Fenselau et al., 2008, *Appl. Environ. Microbiol.*, 904-906.
- 10 [7] D. Ding et al. 2009, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50:79-85.
- [8] R. Everley et al., 2009, *J. Microbiol. Methods*, 77:152-158.
- [9] S. Hofstadler et al., 2005, *Int. J Mass Spectrom.*, 242:23-41.
- [10] D. Ecker, 2008, *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(7):553-558.
- [11] W.-J. Chen et al., 2008, *Anal. Chem.*, 80 : 9612-9621
- 15 [12] D. Lopez-Ferrer et al., 2008, *Anal. Chem.*, 80 :8930-8936
- [13] D. Lopez-Ferrer et al., 2005, *J. Proteome res.*, 4(5) : 1569-1574
- [14] T. Fortin et al., 2009, *Mol. Cell Proteomics*, 8(5) : 1006-1015.
- [15] H. Keshishian et al., 2007, *Mol. Cell Proteomics*, 2212-2229.
- [16] J. Stal-Zeng et al., 2007, *Mol. Cell Proteomics*, 1809-1817.
- 20 [17] Gaskell, *Electrospray: principles and practise*, 1997, *J. Mass Spectrom.*, 32, 677-688).
- [18] V. Fusaro et al., 2009, *Nature Biotech.* 27, 190-198.
- [19] J. Mead et al., 15 nov 2008, *Mol. Cell Proteomics*, E-pub.
- [20] F. Desiere et al., 2006, *Nucleic Acids Res.*, 34(database issue) : D655-8).
- 25 [21] L. Anderson & C. Hunter, 2006, *Mol. Cell Proteomics*, 573-588).
- [22] B. Han & R. Higgs, 2008, *Brief Funct Genomic Proteomic.*,7(5):340-54).
- [23] K.-Y. Wang et al., 2008, *Anal Chem*, 80(16) 6159-6167).
- [24] J. Bundy & C. Fenselau, 1999, *Anal. Chem.* 71 : 1460-1463.
- [25] K-C Ho et al., 2004, *Anal. Chem.* 76 : 7162-7268.
- 30 [26] Y.S. Lin et al., 2005, *Anal. Chem.*, 77 : 1753-1760.
- [27] S. Vaidyanathan et al., 2001, *Anal. Chem.*, 73 :4134-4144.
- [28] P. Seng et al., 2009, *Clin. Infect. Dis.*, 49 :543-551.

- [29] Manes N. et al., 2007, Mol. & Cell. Proteomics, 6(4): 717-727.
- [30] R. Nandakumar et al., 2009, Oral Microbiology Immunology, 24 :347-352).
- [31] L. Hernychova et al., 2008, Anal. Chem., 80 :7097-7104.
- [32] J.-M. Pratt et al., 2006, Nat. Protoc., 1:1029-1043.
- 5 [33] V. Brun et al., 2007, Mol. Cell Proteomics, 2139-2149.

REVENDICATIONS

1. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme issu d'un échantillon, comprenant l'identification dudit au moins un microorganisme et la
5 détermination des propriétés de typage, résistance potentielle à au moins un antimicrobien et facteur de virulence, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence pour ledit au moins un microorganisme est mise en œuvre par spectrométrie de masse en utilisant des protéines, peptides et/ou métabolites en tant que marqueurs desdites
10 propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence.

2. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 1, caractérisé en ce que la spectrométrie de masse, mise en œuvre pour les propriétés de typage, de résistance potentielle à au moins un antimicrobien et
15 facteur de virulence, est une spectrométrie de type MS/MS.

3. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 2, caractérisé en ce que la spectrométrie MS/MS est de la MRM.

20 4. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence est mise en œuvre dans le même appareil de spectrométrie de masse.

25 5. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 4, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence est mise en œuvre simultanément.

30 6. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'identification dudit au moins un microorganisme est également mise en œuvre par spectrométrie de masse.

7. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 6, caractérisé en ce que la spectrométrie de masse pour l'identification dudit au moins un microorganisme est une spectrométrie de type MS, MS/MS ou MS
5 suivie d'une spectrométrie de type MS/MS.

8. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire de confirmation de l'identification dudit au moins un microorganisme,
10 laquelle étape de confirmation est mise en œuvre par spectrométrie de masse.

9. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 8, caractérisé en ce que la spectrométrie de masse de l'étape de confirmation est une spectrométrie de masse de type MS/MS.
15

10. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 9, caractérisé en ce que la spectrométrie de masse de l'étape de confirmation est une MRM.

20 11. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les marqueurs desdites propriétés de typage, résistance à au moins un antimicrobien et facteur de virulence sont des protéines dudit au moins un microorganisme.

25 12. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 11, caractérisé en ce que les protéines dudit microorganisme sont digérées en peptides.

30 13. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 12, caractérisé en ce que la digestion est réalisée par une enzyme.

14. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la

revendication 13, caractérisé en ce que l'enzyme est de la trypsine.

15. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon les revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit au moins un microorganisme est
5 une bactérie et l'antimicrobien est un antibiotique.

16. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 15, caractérisé en ce que la bactérie est *Staphylococcus aureus*.

10 17. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 16, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de typage met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44 ou 45.

15 18. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de résistance potentielle à au moins un antibiotique met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°10 à 17.

20 19. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que la détermination de la virulence met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°19, 20, 21, 23 ou 24.

25 20. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que l'identification met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°26, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44 et 45.

30 21. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 15, caractérisé en ce que la bactérie est *Escherichia coli*.

22. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 21, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de typage met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°46 à 87.

5 23. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de résistance potentielle à au moins un antibiotique met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°85, 86 et 87.

10 24. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que la détermination de la virulence met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N° 62 à 66.

15 25. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications 21 à 24, caractérisé en ce que l'identification met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°46 à 61.

20 26. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon les revendications 1 à 14, caractérisé en ce que ledit au moins un microorganisme est une levure et l'antimicrobien est un antifongique.

27. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 26, caractérisé en ce que la levure est *Candida albicans*.

25 28. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 27, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de typage met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°88 à 125 et 177.

30 29. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon la revendication 27 ou 28, caractérisé en ce que la détermination des propriétés de résistance potentielle à au moins un antifongique met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N° 117 à 122 et 177.

30. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications 27 à 29, caractérisé en ce que la détermination de la virulence met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°123 à 125.

5

31. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications 27 à 30, caractérisé en ce que l'identification met en œuvre au moins un peptide de séquence SEQ ID N°88 à 116.

10

32. Procédé de caractérisation d'au moins un microorganisme selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le métabolite est l'ergostérol.

33. Peptide de séquence SEQ ID N°2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,
15 17, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 44 à 125, 177.