



(86) **Date de dépôt PCT/PCT Filing Date:** 2013/07/30
(87) **Date publication PCT/PCT Publication Date:** 2014/02/06
(85) **Entrée phase nationale/National Entry:** 2015/01/19
(86) **N° demande PCT/PCT Application No.:** FR 2013/051833
(87) **N° publication PCT/PCT Publication No.:** 2014/020276
(30) **Priorité/Priority:** 2012/08/01 (FR1257489)

(51) **Cl.Int./Int.Cl. C12Q 1/04** (2006.01),
G01N 27/62 (2006.01), **G01N 33/68** (2006.01)

(71) **Demandeur/Applicant:**
BIOMERIEUX, FR

(72) **Inventeurs/Inventors:**
CHARRETIER, YANNICK, FR;
CHARRIER, JEAN-PHILIPPE, FR;
FRANCESCHI, CHRISTINE, FR;
ZAMBARDI, GILLES, FR

(74) **Agent:** ROBIC

(54) **Titre : PROCEDE DE DETECTION D'AU MOINS UN MECANISME DE RESISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES PAR
SPECTROMETRIE DE MASSE**

(54) **Title: METHOD FOR DETECTING AT LEAST ONE MECHANISM OF RESISTANCE TO GLYCOPEPTIDES BY MASS
SPECTROMETRY**

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention porte sur un procédé de détection, pour au moins un microorganisme compris dans un échantillon, d'au moins un marqueur de résistance à un glycopeptide, comprenant la détection, par spectrométrie de masse, d'au moins un peptide ou une protéine dudit microorganisme. Préférentiellement, le glycopeptide est la vancomycine. Préférentiellement, ledit peptide est issu d'une protéine de type vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM ou vanN.



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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale

WO 2014/020276 A1

(43) Date de la publication internationale
6 février 2014 (06.02.2014)

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/04 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2013/051833

(22) Date de dépôt international :
30 juillet 2013 (30.07.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1257489 1 août 2012 (01.08.2012) FR

(71) Déposant : BIOMÉRIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy
L'etoile (FR).

(72) Inventeurs : CHARRETIER, Yannick; Le Georges, F-
69690 Courzieu (FR). CHARRIER, Jean-Philippe; 28
rue Barthélémy Thimonnier, F-69160 Tassin La Demi-lune
(FR). FRANCESCHI, Christine; Les Portes de la Dombes
II, 1 rue des Carronnières, F-01800 Meximieux (FR).
ZAMBARDI, Gilles; 10 Impasse Pré Guillaud, F-38300
Chezeneuve (FR).

(74) Mandataire : BLOND, Jean-Luc; BioMérieux, Dpt Pro-
priété Industrielle, 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, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

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

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

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

(54) Title : METHOD FOR DETECTING AT LEAST ONE MECHANISM OF RESISTANCE TO GLYCOPEPTIDES BY MASS SPECTROMETRY

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION D'AU MOINS UN MECANISME DE RESISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

(57) Abstract : The present invention relates to a method for detecting, for at least one microorganism included in a sample, at least one marker for resistance to a glycopeptide, comprising the detection, by mass spectrometry, of at least one peptide or one protein of said microorganism. Preferentially, the glycopeptide is vancomycin. Preferentially, said peptide is derived from a vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM or vanN protein.

(57) Abrégé : La présente invention porte sur un procédé de détection, pour au moins un microorganisme compris dans un échantillon, d'au moins un marqueur de résistance à un glycopeptide, comprenant la détection, par spectrométrie de masse, d'au moins un peptide ou une protéine dudit microorganisme. Préférentiellement, le glycopeptide est la vancomycine. Préférentiellement, ledit peptide est issu d'une protéine de type vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM ou vanN.



WO 2014/020276 A1

Procédé de détection d'au moins un mécanisme de résistance aux glycopeptides par spectrométrie de masse

La présente invention concerne le domaine de la microbiologie. Plus précisément, l'invention concerne la détection, par spectrométrie de masse, d'au moins un mécanisme de résistance aux glycopeptides d'au moins un microorganisme issu d'un échantillon.

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].

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 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 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. Elle se diffuse actuellement dans les laboratoires d'analyses médicales [5]. Son utilisation clinique est cependant limitée à l'identification d'espèces bactériennes et de levures. Elle n'est pas utilisée en routine pour l'identification des résistances aux antimicrobiens.

Or l'identification de résistances aux antimicrobiens tels que les antibiotiques est un élément essentiel pour assurer une prise en charge optimale des patients.

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].

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.

Plus récemment S. Hofstadler et al. [7] ont proposé un procédé associant 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 [8]. Toutefois, il nécessite une amplification par PCR avec les défauts inhérents à la biologie moléculaire, à savoir rendement d'extraction, coût des sondes, etc.

Dans ce contexte, l'objectif de la présente invention est de proposer un procédé de détection de mécanismes de résistance aux glycopeptides, qui permette de palier les inconvénients des procédés de l'art antérieur, à savoir fournir un procédé peu coûteux, sans réactif spécifique 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.

A cette fin, l'invention propose un nouveau procédé de détection, pour au moins un microorganisme compris dans un échantillon, d'au moins un marqueur de résistance à un glycopeptide, comprenant la détection, par spectrométrie de masse, d'au moins un peptide ou une protéine dudit microorganisme.

Avantageusement, des marqueurs de résistance à plusieurs antimicrobiens différents peuvent être détectés simultanément.

De façon surprenante et inattendue, le procédé de la présente invention permet de détecter l'existence de mécanismes de résistance inductibles, en l'absence d'induction.

Comme indiqué dans la demande WO2011045544, des marqueurs de typage et/ou de virulence des microorganismes peuvent être détectés, de la même façon, par spectrométrie de masse, préalablement ou simultanément à la détection des marqueurs de mécanisme de résistance.

Par marqueurs de la résistance à au moins un antimicrobien de la classe des glycopeptides, on entend des molécules d'origine protéique qui sont caractéristiques desdites propriétés de résistance.

Les glycopeptides sont des antibiotiques tels que la vancomycine, la téicoplanine, la telavancine, la bleomycine, la ramoplanine, et la decaplanine. La vancomycine est un glycopeptide proprement dit, la téicoplanine est un lipoglycopeptide. Ces 2 molécules viennent inhiber la synthèse de la paroi bactérienne par inhibition de la synthèse du peptidoglycane. En effet, leur structure tri-dimensionnelle, en forme de poche, recouvre le dipeptide D-Ala D-Ala précurseur de la synthèse du peptidoglycane, empêche l'action des glycosyltransférases et des transpeptidases et bloque l'élongation du peptidoglycane. La résistance aux glycopeptides est due à la présence d'opérons codant des enzymes catalysant la formation de précurseurs de faible affinité et des enzymes éliminant les précurseurs de haute affinité produits par la bactérie hôte. Divers types de résistance sont connus selon les enzymes présentes dans l'opéron. La classification de la résistance aux glycopeptides est basée sur la séquence primaire des gènes de structure des ligases de résistance plutôt que sur les niveaux de résistances aux glycopeptides, dans la mesure où les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des divers types se chevauchent. Neuf types de résistance ont été individualisés. Huit résultent d'une résistance acquise (VanA, B, D, E, G, L, M et N) et un (VanC) est une résistance naturelle présente chez *E. gallinarum* et à *E. casseliflavus*. (pour une revue voir [9], Sujatha, S. & Praharaj, I.

Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis 2012, 781679 (2012))

Le type de résistance VanA est caractérisé par une résistance inductible de haut niveau à la vancomycine et à la téicoplanine. A noter que la transmission du type VanA vers *S. aureus* a été mise en évidence mais est toutefois assez rare.

Le type de résistance VanB est caractérisé par une résistance inductible de niveau modéré à haut à la vancomycine et est sensible à la téicoplanine.

En général, les phénotypes VanA et VanB sont les cas cliniques les plus importants et sont fréquemment retrouvés chez *E.faecalis* et chez *E.faecium*.

Le type de résistance VanD est caractérisé par une résistance constitutive de niveau modéré à la vancomycine et à la téicoplanine.

Les types de résistance VanC, E, G, L et N sont caractérisés par une résistance de bas niveau à la vancomycine et par une sensibilité à la téicoplanine.

La résistance peut s'exprimer en absence d'antibiotique, elle est alors dite constitutive. Elle peut aussi s'exprimer en présence d'une certaine concentration d'antibiotique, elle est alors dite inductible. La culture du microorganisme en présence d'une certaine concentration d'antibiotique est alors appelée culture avec induction.

Par détermination de la résistance à au moins un antimicrobien, on entend l'impossibilité de détruire les bactéries ou d'inhiber leur multiplication à une concentration définie en fonction des paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques propres à chaque antibiotique.

Par détermination d'un mécanisme de résistance à au moins un antibiotique, on entend la mise en évidence d'au moins un composé synthétisé par la bactérie, lui permettant d'échapper au moins partiellement à l'action de l'antibiotique, le plus souvent par modification de la structure de l'antibiotique ou bien de sa cible

métabolique, ou bien encore par sa diminution de pénétration dans la bactérie. Préférentiellement, ledit composé synthétisé par la bactérie est une protéine.

Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre pour détecter des mécanismes de résistance aux glycopeptides chez des bactéries. Ainsi, par exemple, à titre de bactéries chez lesquelles il est possible de rechercher un mécanisme de résistance aux glycopeptides selon le procédé de l'invention, on peut citer, de façon non exhaustive : *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus raffinosus* ou *Staphylococcus aureus*. Les agents, majoritairement, responsables d'infections sont les Entérocoques et plus particulièrement *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

Ainsi, le procédé selon l'invention permet également de détecter un mécanisme de résistance auxdits antibiotiques.

On entend par échantillon une petite partie ou petite quantité isolée d'une entité pour l'analyse. 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 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, c'est-à-dire que les marqueurs des mécanismes de résistance des bactéries aux glycopeptides sont potentiellement détectables directement dans l'échantillon 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.

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 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 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 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 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 des séquences plus

longues. Ces protéases peuvent être des endoprotéases ou des exoprotéases. Parmi les protéases connues on peut citer, comme décrit dans WO2005/098017:

- 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 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 ;
- 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 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.

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 [10], ou sous pression [11], ou bien encore avec un dispositif à ultrasons [12]. Dans ces trois derniers cas, le protocole sera beaucoup plus rapide.

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 l'invention, les marqueurs des mécanismes de résistance des bactéries aux glycopeptides sont des protéines de la bactérie chez laquelle les

mécanismes de résistance aux glycopeptides sont à rechercher. En particulier, lesdites protéines sont digérées en peptides, de préférence par une enzyme, de préférence encore par la trypsine.

De même, l'échantillon contenant des marqueurs protéiques de caractérisation des mécanismes de résistance des bactéries aux glycopeptides peut également être préalablement traité à des fins de purification. Ce traitement préalable de purification peut être mis en œuvre avant ou après l'étape de génération de peptides tels que décrits précédemment.

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 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. [13], ou H. Keshishian et al. [14]. 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 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.

Une alternative aux techniques d'électrophorèse ou de chromatographie, pour le fractionnement des peptides, consiste à purifier spécifiquement les N-glycopeptides ([15] 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, 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, quelle que 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.

Tous les spectromètres de masse comportent :

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

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 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 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 [16]. Ce type de source est particulièrement bien adapté, lorsque les molécules cibles ou peptides protéotypiques obtenus sont 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.

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 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 résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR), l'orbitrappe.

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 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 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 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 :

- une fragmentation des ions moléculaires, alors appelés ions précurseurs, pour donner des ions dit ions fragments de 1^{ère} génération, et
- 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 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 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. [17]. Des logiciels commerciaux, tels que les logiciels MIDAS et MRM Pilote d'Applied Biosystems ou encore MRMAid [18] 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. [19] 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 Cliquad 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 réunions utilisateurs [18]. 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. [18] 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 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 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 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 [20], ou de type trappe ionique [21], ou encore de type temps de vol (TOF) [22], lesquels permettent également la séparation des ions. La ou les fragmentations seront 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 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 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

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 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 résistance potentielle à au moins un antimicrobien, 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 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 ;
- le cas échéant, la détermination des propriétés de typage, et du facteur de virulence est mise en œuvre dans le même appareil de spectrométrie de masse que la détermination des marqueurs de résistance à au moins un antimicrobien, 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 de la résistance à un antibiotique, il convient d'identifier le ou les microorganismes présents dans 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. [10] qui ont capturé différentes espèces bactériennes à l'aide de billes magnétiques avec une surface activée au Fe₃O₄/TiO₂. Une capture par d'autres moyens est également possible, telle qu'une capture par des lectines [23], ou par des anticorps [24], ou encore par de

la Vancomycine [25]. 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 en ce qu'il peut être réalisé en quelques minutes et en ce 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 observée 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, nécessaire pour traiter l'information entre l'acquisition du spectre MS et du spectre MS/MS, ni changement du réglage des paramètres machines, nécessaires 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. [26] ou encore par R. Everley et al. [27] 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 [5]

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. [28] qui ont étudié le peptidome de *Salmonella enterica*, ou les travaux de R. Nandakumar et al. [29] ou de L. Hernychova et al. [30] 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, au moyen 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.

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 mécanismes de résistance des bactéries aux glycopeptides. 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/m³ ou kg/m³, 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.

Une calibration 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 calibrations classiquement utilisées 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. [13]. 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 protéine à doser. Une variante de la technique AQUA a été proposée par J.-M. Pratt et al. [31] 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 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 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 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.

V. Brun et al. [32] 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 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 calibration, utilisée dans des dosages par spectrométrie de masse et en particulier dans les dosages MRM ou MS, pourront être mises en œuvre pour effectuer la calibration, dans le cadre de l'invention.

De façon préférentielle, la spectrométrie de masse utilisée dans le procédé de détection selon l'invention est de type MS/MS. Plus préférentiellement, la spectrométrie de masse est la MRM.

Le procédé de l'invention permet la détection de résistances aux glycopeptides, caractérisée par la détection d'au moins un peptide en tant que marqueur de résistance.

De façon préférentielle, le procédé selon l'invention permet de détecter au moins un marqueur de résistance à la vancomycine.

Selon un premier mode de réalisation, le procédé selon l'invention permet de détecter directement la résistance à un glycopeptide, sans mise en contact du microorganisme potentiellement compris dans l'échantillon avec ledit glycopeptide, c'est-à-dire sans étape d'induction de ladite résistance.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend une étape supplémentaire, préalable à l'étape de détection, et consistant en l'induction du mécanisme de résistance, par mise en contact dudit échantillon avec le(s)dit(s) glycopeptide(s).

De façon préférentielle, ledit marqueur de résistance est un peptide issu des protéines de type Van, telles que les variants respectifs de type Van A, Van B, Van C, Van D, Van E, Van G, Van L, Van M et Van N.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la détection d'un mécanisme de résistance aux glycopeptides, lié à l'expression de la protéine VanA, est caractérisée par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanA et à ses différents variants de séquences **SEQ ID N° 1** à **SEQ ID N° 4**.

SEQ ID N°1 :

MKKPLKTVWILKGDRSMNRIKVAILFGGCSEEHDSVKS AIEIAANINKEKYEPLY
IGITKSGVWKMCEKPCA EWENDNCYS AVLSPDKKMHG LLVKKNHEYEINHVDV
AFSALHGKSGEDGSIQGLFELSGIPFVGCDIQSSAICMDKSLTYIVAKNAGIATPA
FWVINKDDRPVAATFTYPVFVKPARSGSSFGVKKVNSADELDYAIESARQYDSK
ILIEQAVSGCEVGCAVLGNSAALVVG EVDQIRLQYGIFRIHQEVEPEKGS ENAVIT

VPADLSAEERGRIQETAKKIYKALGCRGLARVDMFLQDNGRIVLNEVNTLPGFT
SYSRYPRMMAAAGIALPELIDRLIVLALKG

SEQ ID N°2 :

MNRIKVAILFGGCSEEHDVSLKSAIEIAANINKEKEYEPLYIGITKSGVWKMCEKPC
AEWENDNCYSAVLSPDKKMHGLLVKKNHEYEINHVDVAFSALHGKSGEDGSIQ
GLFELSGIPFVGCDIQSSAICMDKSLTYIVAKNAGIATPAFWVINKDDRPVAATFT
YPVFKPARSGSSFGVKKVNSADELDYAIESARQYDSKILIEQAVSGCEVGCAV
LGNSAALVVGEVDQIRLQYGIFRIHQEVEPEKGSENAVITVPADLSAEERGRIQE
TAKKIYKALGCRGLARVDMFLQDNGRIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMMAAAGIA
LPELIDRLIVLALKG

SEQ ID N°3 :

MNRIKVAILFGGCSEEHDVSVKSAIEIAANINKEKEYEPLYIGITKSGVWKMCEKPC
AEWENDNCYSAVLSPDKKMHGLLVKKNHEYEINHVDVAFSALHGKSGEDGSIQ
GLFELSGIPFVGCDIQSSAICMDKSLTYIVAKNAGIATPAFWVINKDDRPVAATFT
YPVFKPARSGSSFGVKKVNSADELDYAIESARQYDSKILIEQAVSGCEVGCAV
LGNSAALAVGEVDQIRLQYGIFRIHQEVEPEKGSENAVITVPADLSAEERGRIQE
TAKKIYKALGCRGLARVDMFLQDNGRIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMMAAAGIA
LPELIDRLIVLALKG

SEQ ID N°4 :

MNRIKVAILFGGCSEEHDVSVKSAIEIAANINKEKEYEPLYIGITKSGVWKMCEKPC
AEWENDNCYSAVLSPDKKMHGLLVKKNHEYEINHVDVAFSALHGKSGEDGSIQ
GLFELSGIPFVGCDIQSSAICMDKSLTYIVAKNAGIATPAFWVINKDDRPVAATFT
YPVFKPARSGSSFGVKKVNSADELDYAIESARQYDSKILIEQAVSGCEVGCAV
LGNSAALVVGEVDQIRLQYGIFRIHQEVEPEKGSENAVITVPADLSAEERGRIQE
TAKKIYKALGCRGLARVDMFLQDNGRIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMMAAAGIA
LPELIDRLIVLALKG

lesdits peptides de type VanA étant choisis, de préférence, parmi les
peptides de séquence **SEQ ID N°5** à **SEQ ID N°16** tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Position du peptide dans la ou les protéines VanA
SEQ ID N°5	IHQEVEPEK	243-251 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 259-267 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°6	LIVLALK	336-342 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 352-358 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°7	LQYGIFR	236-242 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 252-258 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°8	MHGLLVK	75-81 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 91-97 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°9	MMAAAGIALPELIDR	321-335 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 337-351 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°10	NAGIATPAFWVINK	142-155 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 158-171 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°11	SAIEIAANINK	23-33 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 39-49 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°12	SGSSFQVK	175-182 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 191-198 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°13	SLTYIVAK	134-141 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 150-157 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°14	VDMFLQDNGR	291-300 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 307-316 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°15	VNSADELDYAIESAR	184-198 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 200-214 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1
SEQ ID N°16	YEPLYIGITK	36-45 pour les protéines de SEQ N°2, 3, 4; 52-61 pour la protéine de séquence SEQ ID N°1

Avantageusement, les marqueurs de type VanA choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 5 à SEQ ID N° 16 sont détectés après induction du mécanisme de résistance.

Avantageusement, les marqueurs de type VanA choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 15 et SEQ ID N° 16 sont détectés sans étape d'induction.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la détection d'un mécanisme de résistance aux glycopeptides, lié à l'expression de la protéine VanB, est caractérisée par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanB et à ses différents variants de séquences **SEQ ID N° 17 à SEQ ID N° 28**.

SEQ ID N°17 :

MNKIKVAIIFGGCSEEHDSVSVKSAIEIAANINTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPCT
EWEADSLPAIFSPDRKTHGLLVMKEREYETRRIDVAFVPLHGKCGEDGAIQGLF
ELSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIEKGDKPEARTLTYP
VFVKPARSGSSFGVTKVNSTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAVMG
NEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGSSEMIIVPADIPVEERNRVQETAK
KVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMAAAAGITLPA
LIDSLITLAIER

SEQ ID N°18 :

MNRIKVAIIFGGCSEEHDSVSVKSAIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLVMKESEYETRRIDVAFVPLHGKCGEDGAIQGL
FELSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIDKGDPEAGALTY
PVFVKPARSGSSFGVTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAVM
GNEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGSSEMITVPADIPVEERNRVQET
AKKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMMAAAGITL
PALIDSLITLALKR

SEQ ID N°19 :

MNRIKVAIIFGGCSEEHVSVKSAIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
 TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLVMKESEYETRRIDVAFVPLHGKCGEDGAIQGL
 FVLSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQIIDKGDKPEAGALTYP
 VFKPARSGSSFGVTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAVMG
 NEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGSSENAMITVPADIPVEERNRVQETA
 KKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMVAAAGITLP
 ALIDSLITLALKR

SEQ ID N°20 :

MNRIKVAIIFGGCSEEHVSVKSAIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
 TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLVMKESEYETRRIDVAFVPLHGKCGEDGAIQGL
 FVLSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQIIDKGDKPEAGALTYP
 VFKPARSGSSFGVTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAVMG
 NEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGSSENAMITVPADIPVEERNRVQETA
 KKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTMPGFTSYSRYTRMVAAAGITLP
 ALIDSLITLALKR

SEQ ID N°21 :

MNRIKVAIIFGGCSEEHVSVKSAIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
 TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLVMKESEYETRRIDVAFVPLHGKCGEDGAIQGL
 FVLSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIDKGDKPEAGALTY
 PVFKPARSGSSFGLTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAVM
 GNEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGSSENAMITVPADIPVEERNRVQET
 AKKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMMAAAGITL
 PALIDSLITLALKR

SEQ ID N°22 :

MNRIKVAIIFGGCSEEHVSVKSAIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
 TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLVMKESEYETRRIDVAFVPLHGKCGEDGAIQGL
 FVLSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIDKGDKPEAGALTY
 PVFKPARSGSSFGVTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAVM
 GNEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGSSENAMITVPADIPVEERNRVQET
 AKKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMMAAAGITL
 PALIDSLITLALKR

SEQ ID N°23 :

MNRIKVAIIFGGCSEEHDSVKS AIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
 TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLVMKESEYETRRIDVAFVPLHGKCGEDGAIQGL
 FVLSGIPYVGCDIQSSAVCMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIDKGDKPEAGALTY
 PVFVKPARSGSSFGVTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAM
 GNEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGS ENAMITVPADIPVEERNRVQET
 AKKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMVAAAGITL
 PALIDSLITLALKR

SEQ ID N°24 :

MNRIKVAIIFGGCSEEHDSVKS AIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
 TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLVMKESEYETRRIDVAFVPLHGKCGGGEDGAIQ
 GLFVLSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIDKGDKPEAGAL
 TYPVFVKPARSGSSFGVTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAM
 MGNEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGS ENAMITVPADIPVEERNRVQE
 TAKKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMMAAGIT
 LPALIDSLITLALKR

SEQ ID N°25 :

MNRIKVAIIFGGCSEEHDSVKS AIEIAANINTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
 TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLVMKESEYETRRIDVAFVPLHGKCGEDGAIQGL
 FELSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIDKGDKPEAGALTY
 PVFVKPARSGSSFGVTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAM
 GNEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGS ENAMITVPADIPVEERNRVQET
 AKKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMVAAAGITL
 PALIDSLITLALKR

SEQ ID N°26 :

MNRIKVATIFGGCSEEHDSVKS AIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
 TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLVMKESEYETRRIDVAFVPLHGKCGEDGAIQGL
 FVLSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIDKGDKPEAGALTY
 PVFVKPARAGSSFGLTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAM
 GNEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGS ENAMITVPADIPVEERNRVQET

AKKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMMAAAGITL
PALIDSLITLALKR

SEQ ID N°27 :

MNRIKVATIFGGCSEEHDVSVKSAIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLMKESEYETRRIDVAFPVLHGKCGEDGAIQGL
FVLSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIDKGDKPEAGALTY
PVFVKPARSGSSFGLTKVNGTEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAM
GNEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGSNAMITVPADIPVEERNRVQET
AKKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTLPGFTSYSRYPRMMAAAGITL
PAMIDSLITLALKR

SEQ ID N°28 :

MNRIKVATIFGGCSEEHDVSVKSAIEIAANIDTEKFDPHYIGITKNGVWKLCKKPC
TEWEADSLPAILSPDRKTHGLLMKESEYETRRIDVAFPVLHGKCGEDGAIQGL
FVLSGIPYVGCDIQSSAACMDKSLAYILTKNAGIAVPEFQMIDKGDKPEAGALTY
PVFVKPARSGSSFGVTKVNGPEELNAAIEAAGQYDGKILIEQAISGCEVGCAM
GNEDDLIVGEVDQIRLSHGIFRIHQENEPEKGSNAMITVPADIPVEERNRVQET
AKKVYRVLGCRGLARVDLFLQEDGGIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMVAAAGITL
PALIDSLITLALKR

lesdits marqueurs de type VanB étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence **SEQ ID N°29** à **SEQ ID N°35** tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Position du peptide dans la ou les protéines VanB
SEQ ID N°29	FDPHYIGITK	36-45 pour les protéines de SEQ N°17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
SEQ ID N°30	IDVAFPVLHGK	90-100 pour les protéines de SEQ N°17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
SEQ ID N°31	IHQENEPEK	242-250 pour les protéines de SEQ N°17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28; 244- 252 pour la protéine de séquence SEQ ID

		N°24
SEQ ID N°32	LSHGIFR	235-241 pour les protéines de SEQ N°17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28; 237-243 pour la protéine de séquence SEQ ID N°24
SEQ ID N°33	SLAYILTK	133-140 pour les protéines de SEQ N°17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28; 135-142 pour la protéine de séquence SEQ ID N°24
SEQ ID N°34	THGLLVMK	74-81 pour les protéines de SEQ N°17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
SEQ ID N°35	VQETAK	271-276 pour les protéines de SEQ N°17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28; 273-278 pour la protéine de séquence SEQ ID N°24

Avantageusement, les marqueurs de type VanB choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 32 et SEQ ID N° 33 sont détectés après induction du mécanisme de résistance.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la détection d'un mécanisme de résistance aux glycopeptides, lié à l'expression de la protéine VanC, est caractérisée par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanC et à ses différents variants de séquences **SEQ ID N° 36 à SEQ ID N° 58**. Notamment les variants VanC1 sont caractérisés par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanC1 et à ses différents variants de séquences **SEQ ID n°36 à SEQ ID N°43**, les variants VanC2 ou VanC3 sont caractérisés par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanC2 ou Van C3 et à ses différents variants de séquences **SEQ ID N°46 à SEQ ID N°51** et **SEQ ID N°53 à SEQ ID N°57**, les variants VanC4 sont caractérisés par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanC4 et à ses différents variants de séquences **SEQ ID n°44, SEQ ID n°45, SEQ ID n°52 et SEQ ID n°58**

SEQ ID N°36 :

MKKIAVLFGGNSPEYSVSLASAASVIQAIDPLKYEVMTIGIAPTMDWYLYQGNLA
NVRNDTWLEDHKNCHQLTFSSQGFILGEKRIVPDVLPVLHGKYGEDGCIQGLL
ELMNLPYVGCHVAASALCMNKWLLHQLADTMGIASAPTLLLSRYENDPATIDRF
IQDHGFPFIKIPNEAGSSKGITKVTDKTALQSALTAFAYGSTVLIQKAIAGIEIGC
GILGNEQLTIGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISATITVPAPLPLALESQIKEQAQLL
YRNLGLTGLARIDFFVTNQGAIYLNEINTMPGFTGHSRYPAMMAEVGLSYEILVE
QLIALAEEDKR

SEQ ID N°37 :

MKKIAVLFGGNSPEYSVSLASAASVIQAIDPLKYEVMTIGIAPTMDWYWYQGNL
ANVRNDTWLEDHKNCHQLTFSSQGFILGEKRIVPDVLPVLHGKYGEDGCIQGL
LELMNLPYVGCHVAASALCMNKWLLHQLADTMGIASAPTLLLSRYENDPATIDR
FIQDHGFPFIKIPNEAGSSKGITKVTDKTALQSALTAFAYGSTVLIQKAIAGIEIGC
GILGNEQLTIGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISATITVPAPLPLALESQIKEQAQLL
YRNLGLTGLARIDFFVTNQGAIYLNEINTMPGFTGHSRYPAMMAEVGLSYEILVE
QLIALAEEDKR

SEQ ID N°38 :

MKKIAVLFGGNSPEYSVSLASAASVIQAIDPLKYEVMTIGIAPTMDWYWYQGNL
ANVRNDTWLEDHKNCHQLTFSSQGFILGEKRIVPDVLPVLHGKYGEDGCIQGL
LELMNLPYVGCHVAATALCMNKWLLHQLADTMGIASAPTLLLSRYENDPATIDR
FIQDHGFPFIKIPNEAGSSKGITKVTDKTALQSALTAFAYGSTVLIQKAIAGIEIGC
GILGNEQLTIGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISATITVPAPLPLALESQIKEQAQLL
YRNLGLTGLARIDFFVTNQGAIYLNEINTMPGFTGHSRYPAMMAEVGLSYEILVE
QLIALAEEDKR

SEQ ID N°39 :

MKKIAVLFGGNSPEYSVSLTSAASVIQAIDPLKYEVMTIGIAPTMDWYWYQGNLA
NVRNDTWLEDHKNCHQLTFSSQGFILGEKRIVPDVLPVLHGKYGEDGCIQGLL
ELMNLPYVGCHVAASALCMNKWLLHQLADTMGIASAPTLLLSRYENDPATIDRF
IQDHGFPFIKIPNEAGSSKGITKVTDKTALQSALTAFAYGSTVLIQKAIAGIEIGC
GILGNEQLTIGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISATITVPAPLPLALESQIKEQAQLL

YRNLGLTGLARIDFFVTNQGA IYLNEINTMPGFTGHSRY PAMMAEVGLSYEILVE
QLIALAEEDKR

SEQ ID N°40 :

MKKIAVLFGGNSPEYSVSLTSAASVIQAIDPLKYEVM TIGIAPTMDWYWYQGNLA
NVRNDTWLEDHKNCHQLTFSSQGFILGEKRIVPDVLF PVLHGKYGEDGCIQGGL
ELMNLPYVGCHVAASALCMNKWLLHQLADTMGIASAP TLLLSRYENDPATIDRF
IQDHGFPFIKIPNEAGSSKGITKVTDKTALQSALT TAFAYGSTVLIQKAIAGIEIGC
GILGNEQLTIGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISATITV PAPLPLALESQIKEQAQLL
YRNLGLTGLARIDFFVTNQGA IYLNEINTMPGFTGHSRY PAMMAEVGLSYEILVE
KLIALAEEDKR

SEQ ID N°41 :

MKKIAVLFGGNSPEYSVSLTSAESVIQAINPLKYEVM TIGIAPTMDWYWYQGNLA
NVRNDTWLEDHKNCHQLTFSSQGFILGEKRIVPDVLF PVLHGKYGEDGCIQGGL
ELMNLPYVGCHVAASALCMNKWLLHQLADTMGIASAP TLLLSRYENDPATIDRF
IQDHGFPFIKIPNEAGSSKGITKVTDKTALQSALT TAFAYGSTVLIQKAIAGIEIGC
GILGNEQLTIGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISATITV PAPLPLALESQIKEQAQLL
YRNLGLTGLARIDFFVTNQGA IYLNEINTMPGFTGHSRY PAMMAEVGLSYEILVE
QLIALAEEDKR

SEQ ID N°42 :

MMKKIAVLFGGNSPEYSVSLASAASVIQAIDPLKYEVM TIGIAPTMDWYWYQGN
LANVRNDTWLEDHKNCHQLTFSSQGFILGEKRIVPDVLF PVLHGKYGEDGCIQGG
LLELMNLPYVGCHVAASALCMNKWLLHQLADTMGIASAP TLLLSRYENDPATID
RFIQDHGFPFIKIPNEAGSSKGITKVTDKTALQSALT TAFAYGSTVLIQKAIAGIEIG
CGILGNEQLTIGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISATITV PAPLPLALESQIKEQAQL
LYRNLGLTGLARIDFFVTNQGA IYLNEINTMPGFTGHSRY PAMMAEVGLSYEILV
EQLIALAEEDKR

SEQ ID N°43 :

MMKKIAVLFGGNSPEYSVSLTSAASVIQAIDPLKYEVM TIGIAPTMDWYWYQGN
LANVRNDTWLEDHKNCHQLTFSSQGFILGEKRIVPDVLF PVLHGKYGEDGCIQGG
LLELMNLPYVGCHVAASALCMNKWLLHQLADTMGIASAP TLLLSRYENDPATID
RFIQDHGFPFIKIPNEAGSSKGITKVTDKTALQSALT TAFAYGSTVLIQKAIAGIEIG

CGILGNEQLTIGACDAISLVDGFFDFEKEYQLISATITVPAPLPLALESQIKEQAQL
LYRNLGLTGLARIDFFVTNQGAIYLNEINTMPGFTGHSRYPAMMAEVGLSYEILV
EQLIALAEEDKR

SEQ ID N°44 :

MKKIAIIFGGNSPEYAVSLASATSAIEALQSSPDDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
LENIRQDTWLLDTKHKQKIQPLFEGNGFWLSEAQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
GSIQGLFELMKLPYVGCGVAASALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ
QDQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQK
NIAGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEKEYQLISAKITVPAPLPETIET
KVKEQAQLLYHSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAA
IGLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°45 :

MKKIAIIFGGNSPEYAVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
LENIRQDTWLLDTKHKQKIQPLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
GSIQGLFELMKLPYVGCGVAASALCMNKWLLHQAAEAIGVQSAPTILLTNQDNQ
QRQIEAFIQTHDFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIPALKEAFAYCSAVLLQK
NIAGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVEGFFDFEKEYQLISAKITVPAPLPETIET
KVKEQAQLLYHSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAA
IGLSYQELLQKLLVLAKEEGK

SEQ ID N°46 :

MKKIAIIFGGNSPEYAVSLASATSALEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
LENIRQDTWLLDTKHKQKIQPLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
GSIQGLFELMKLPYVGCGVAGSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ
QEQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKN
IAGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEKEYQLISAKITVPAPLPETIETK
VKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAV
GLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°47 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
LENIRQDTWLLDTKHKQKIQPLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
GSIQGLFELMKLPYVGCGVAGSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ

QEQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKN
IAGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETK
VKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAV
GLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°48 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
LENIRQDTWLLDTKHKQKIQPLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
GSIQGLFELMKLPYVGCGVAGSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ
QEQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKN
IAGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETK
VKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTERGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAV
GLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°49 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
LENIRQDTWLLDTKHKQKIQPLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
GSIQGLFELMKLPYVGCGVAGSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ
QEQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKN
IVGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETK
VKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAV
GLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°50 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
LENIRQDTWLLDTKHKQKIQPLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
GSIQGLFELMKLPYVGCGVASSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ
QEQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKN
IVGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLEDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETK
VKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAV
GLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°51 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
LENIRQDTWLLDTKHTQKIKPLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGEDG

SIQGLFELMKLPYVGCGVAGSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQQ
 EQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKNI
 AGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETKV
 KEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAVG
 LSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°52 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
 LENIRQDTWLLDTKHTQKIQPLFEGNGFWISEAQQTLPDVLFPIMHGKYGEDG
 SIQGMFELMKLPYVGCGVAASALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ
 QRQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIPALKEAFAYCSAVLLQK
 NIAGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIET
 KVKEQAQLLYHSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAA
 VGLSYQELLQKLLVLAKEEGK

SEQ ID N°53 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
 LENIRQDTWLLDTKQKQKIQPLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
 GSIQGLFELMKLPYVGCGVAGSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNHANQ
 QEIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKN
 IAGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETK
 VKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAV
 GLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°54 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
 LENIRQDTWLLDTKQKQKIQPLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
 GSIQGLFELMKLPYVGCGVASSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ
 QEIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKN
 IVGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLEDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETK
 VKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAV
 GLSYQELLQKLLILAKEEVK

SEQ ID N°55 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
 LENIRQDTWLLDTKQKQKIQLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
 GSIQGMFELMKLPYVGCGVAGSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNHAN
 QQEQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQ
 KNIAGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIE
 TKVKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMA
 AVGLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°56 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGITPDAMDWYLYTGE
 LENIRQDTWLLDTKHKQKIQLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
 GSIQGLFELMKLPYVGCGVAGSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ
 QEQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKN
 IAGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETK
 VKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAV
 GLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°57 :

MKKIAIIFGGNSPEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGITPDAMDWYLYTGE
 LENIRQDTWLLDTKHKQKIQLFEGNGFWLSEEQQTLVPDVLFPIMHGKYGED
 GSIQGLFELMKLPYVGCGVAGSALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQANQ
 QEQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIASALKEAFTYCSAVLLQKN
 IVGVEIGCGILGNDSLTVGACDTISLVDGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETK
 VKEQAQLLYRSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAV
 GLSYQELLQKLLVLAKEEVK

SEQ ID N°58 :

MKKIAIIFGGNSSEYTVSLASATSAIEALQSSPYDYDLSLIGIAPDAMDWYLYTGE
 LENIRQDTWLLDTKHTQKIQLFEENGFWLSEAQQTLVPDVLFPIMHGKYGEDG
 SIQGLFELMKLPYVGCGVAASALCMNKWLLHQAAAAIGVQSAPTILLTNQDNQQ
 QQIEAFIQTHGFPVFFKPNEAGSSKGITKVTCVEEIPALKEAFAYCSAVLLQKNI
 AGVEIGCGILGNDSLTVGACDAISLVEGFFDFEEKYQLISAKITVPAPLPETIETKV
 KEQAQLLYHSLGLKGLARIDFFVTDQGELYLNEINTMPGFTSHSRYPAMMAAIG
 LSYQELLQKLLVLAKEEGK

lesdits marqueurs de type VanC étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence **SEQ ID N°59** à **SEQ ID N°71** tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Position du peptide dans la ou les protéines VanC
SEQ ID N°59	EQAQLLYR	279-286 pour les protéines de SEQ N°46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57; 272-279 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 272-279 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 272-279 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 272-279 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 272-279 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 272-279 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41; 273-280 pour la protéine de séquence SEQ ID N°42; 273-280 pour la protéine de séquence SEQ ID N°43
SEQ ID N°60	FIQDHGFPIFIKPN EAGSSK	164-183 pour les protéines de SEQ N°42, 43; 163-182 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 163-182 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 163-182 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 163-182 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 163-182 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 163-182 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41
SEQ ID N°61	IVPDVLFVPLHG K	87-99 pour les protéines de SEQ N°42, 43; 86-98 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 86-98 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 86-98 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 86-98 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 86-98 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 86-98 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41
SEQ ID N°62	NCHQLTFSSQGFI LGEK	69-85 pour les protéines de SEQ N°42, 43; 68-84 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 68-84 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 68-84 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 68-84 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 68-84 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 68-84 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41

SEQ ID N°63	NDTWLEDHK	60-68 pour les protéines de SEQ N°42, 43; 59-67 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 59-67 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 59-67 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 59-67 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 59-67 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 59-67 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41
SEQ ID N°64	NLGLTGLAR	281-289 pour les protéines de SEQ N°42, 43; 280-288 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 280-288 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 280-288 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 280-288 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 280-288 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 280-288 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41
SEQ ID N°65	TALQSALTTAFA YGSTVLIQK	192-212 pour les protéines de SEQ N°42, 43; 191-211 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 191-211 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 191-211 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 191-211 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 191-211 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 191-211 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41
SEQ ID N°66	WLLHQLADTMG IASAPTLLLSR	132-153 pour les protéines de SEQ N°42, 43; 131-152 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 131-152 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 131-152 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 131-152 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 131-152 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 131-152 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41
SEQ ID N°67	YENDPATIDR	154-163 pour les protéines de SEQ N°42, 43; 153-162 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 153-162 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 153-162 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 153-162 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 153-162 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 153-162 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41

SEQ ID N°68	YQLISATITVPAP LPLALESQIK	250-272 pour les protéines de SEQ N°42, 43; 249-271 pour la protéine de séquence SEQ ID N°36; 249-271 pour la protéine de séquence SEQ ID N°37; 249-271 pour la protéine de séquence SEQ ID N°38; 249-271 pour la protéine de séquence SEQ ID N°39; 249-271 pour la protéine de séquence SEQ ID N°40; 249-271 pour la protéine de séquence SEQ ID N°41
SEQ ID N°69	ITVPAPLPETIET K	263-276 pour les protéines de SEQ N°44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58
SEQ ID N°70	QDTWLLDTK	62-70 pour les protéines de SEQ N°44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58
SEQ ID N°71	YQLISAK	256-262 pour les protéines de SEQ N°44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la détection d'un mécanisme de résistance aux glycopeptides, lié à l'expression de la protéine VanD, est caractérisée par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanD et à ses différents variants de séquences **SEQ ID N° 72** à **SEQ ID N° 79**.

SEQ ID N°72 :

MFKIKVAVLFGGCSEEHNVSIKSAMEIAANIDTKKYQPYYIGITKSGVWKMCEKP
CLEWEQYAGDPVVFSPDRSTHGLLIQKDKGYEIQPVDVVLPMIHGKFGEDGSIQ
GLLELSGIPYVGCDIQSSVTCMDKALAYTVVKNAGIAVPGFRILQEGDRLETEDF
VYPVFKPARSGSSFSGVNVCKAEELQAAIEEARKYDSKILIEEAVTGSEVGCAI
LGNGNDLMAGEVDQIELRHGFFKIHQEAQPEKGSENAVIRVPAALPDEVREIRIQ
KTAMKIYRILGCRGLARIDLFLREDGCIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMMTAAGFT
LTEILDRLELSLRR

SEQ ID N°73 :

MFKIKVAVLFGGCSEEHNVSIKSAMEIAANIDTKKYQPYYIGITKSGVWKMCEKP
CLGWEQYAGDPVVFSPDRSTHGLLIQKDTGYEIQPVDVVFPMIHGKFGEDGSIQ
GLLELSGIPYVGCDIQSSVICMDKALAYTVVKNAGIAVPGFRILQEGDRLETEDLV
YPVFKPARSGSSFSGVNVCKAEELQAAIREARKYDSKILIEEAVTGSEVGCAIL
GNENDLMAGEVDQIELRHGFFKIHQEAQPEKGSENAVIRVPAALPDEVREIRIRK

TAMKIYRILGCRGLARIDLFLREDGCIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMMTAAGFTL
SEILDRLIEFSLRR

SEQ ID N°74 :

MFRIKVAVLFGGCSEEHNVSIKSAMEIAANIDTKKYQPYYIGITKSGVWKMCEKP
CLEWEQYAGDPVVFSPDRSTHGLLIQKDKGYEIQPVDVVFPMIHGKFGEDGSIQ
GELLESGIPYVGCDIQSSVICMDKALAYTVVKNAGITVPGFRILQEGDRLETEDFV
YPVFKPARSGSSFGVNVCKAEELQAAIEEARKYDSKILIEEAVTGSEVGCAIL
GNGNDLMAGEVDQIELRHGFFKIHQEAQPEKGSENAVIRVPAALPDEVREIQE
TAMKIYRILGCRGLARIDLFLREDGCIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMMTAAGFTL
SEILDRLIELSLRR

SEQ ID N°75 :

MFRIKVAVLFGGCSEEHNVSIKSAMEIAANIDTKKYQPYYIGITKSGVWKMCEKP
CLEWEQYAGDPVVFSPDRSTHGLLIQKDTGYEIQPVDVGLPMIHGKFGEDGSIQ
GELLESGIPYVGCDIQSSVTCMDKALAYTVVKNAGIAVPGFRILQEGDRLETEDF
VYPVFKPARSGSSFGVNVCKAEELQAAIEDARKYDSKILIEEAVTGSEVGCAL
LGNGNDLMAGEVDQIELRHGFFKIHQEAQPEKGSENAVIRVPAALPDEVIERIQK
TAMKIYRILGCRGLARIDLFLREDGCIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMMTAAGFTL
TEILDRLIELSLRR

SEQ ID N°76 :

MYKLKIAVLFGGCSEEHVSVKSAMEVAANINKEKYQPFYIGITKSGAWKLCDK
PCRDWENYAGYPAVISPDRIHGLLIQKDGGYESQPVDVVLPMIHGKFGEDGTI
QGELLESGIPYVGCDIQSSVICMDKSLAYMVVKNAGIEVPGFRVLQKGDSLEAE
TLYPVPVFKPARSGSSFGVNVCRAEELQAAVTEAGKYDSKILVEEAVSGSEVG
CAILGNGNDLITGEVDQIELKHGFFKIHQEAQPEKGSENAVIRVPAALPDEVREIQI
QETAKKIYRVLGCRGLARIDLFLREDGSIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMMTAAG
FTLSEILDRLIGLSLRR

SEQ ID N°77 :

MYKLKIAVLFGGCSEEHVSVKSAMEVAANINKEKYQPFYIGITKSGAWKLCDK
PCRDWENYAGYPAVISPDRIHGLLIQKDGGYESQPVDVVLPMIHGKFGEDGTI
QGELLESGIPYVVCIDIQSSVICMDKSLAYMVVKNAGIEVPGFRVLQKGDSLEAET
LSYPVPVFKPARSGSSFGVNVCRAEELQAAVTEAGKYDSKILVEEAVSGSEVG

CAILGNGNDLITGEVDQIELKHGFFKIHQEAQPEKGSENAVIRVPAALPDEVREQI
QETAKKIYRVLGCRGLARIDLFLREDGSIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMMTAAG
FTLSEILDRLIGLSLRR

SEQ ID N°78 :

MYKLKIAVLFGGCSEEHDVSVKSAMEVAANINKEKYQPFYIGITKSGAWKLCDK
PCRDWENYAGYPAVISPDRRTHGLLIQKDGGYESQPVDVVLPMIHGKFGEDGT
IQGLLELSGIPYVGCDIQSSVTCMDKSLAYMVVKNAGIEVPGFRVLQKGDSLKA
ETLSYPVFKPARSGSSFGVNVKVCRAEELQAAVTEAGKYDCKILVEEAVSGSEV
GCAILGNENALMAGEVDQIELRHGFFKIHQEAQPEKGSENAVIRVPAVLPDEV
ERIQKTAMKIYRILGCRGLARIDLFLREDGCIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMMTA
AGFTLTEILDRLIELSLRR

SEQ ID N°79 :

MYRINVAVLFGGCSEEHTVSIKSAMELAANIDTEKYQPFYIGITKSGVWKLCEKP
CLDWEQYAKYPVVFSPGRNTHGFLIQKEDRYEIQPVDVVFPIIHGKFGEDGSIQ
GLLELSGIPYVGCDIQSSVICMDKSLAYTTVKNAGIEVPDFQIIQDGDSPKTECF
FPLFVKPARSGSSFGVNVKVDKAEDLCAAINARQYDRKVLIEQAVSGSEVGCAV
LGTGTDLIVGEVDQISLKHGFFKIHQEAQPEKGSENAVIRVPAVLPDEV
TAKKIYQVLGCRGLARIDLFLREDGHIVLNEVNTMPGFTSYSRYPCMMTAAGFT
LSELIDRLIELALRR

lesdits peptides de type VanD étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence **SEQ ID N°80** à **SEQ ID N°83** tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Position du peptide dans la ou les protéines VanD
SEQ ID N°80	GSENAVIR	252-259 pour les protéines de SEQ N°72, 73, 74, 75, 76, 77, 78
SEQ ID N°81	IDLFLR	291-296 pour les protéines de SEQ N°72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79

SEQ ID N°82	IHQEAQPEK	243-251 pour les protéines de SEQ N°72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79
SEQ ID N°83	SGSSFQVVK	175-183 pour les protéines de SEQ N°72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79

Avantageusement, les marqueurs de type VanD choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 80, SEQ ID N° 81 et SEQ ID N° 83 sont détectés après induction du mécanisme de résistance.

Avantageusement, les marqueurs de type VanD choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 80, SEQ ID N° 81 et SEQ ID N° 83 sont détectés sans étape d'induction.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la détection d'un mécanisme de résistance aux glycopeptides, induit par l'expression de la protéine VanE, est caractérisée par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanE de séquence **SEQ ID N° 84**.

SEQ ID N°84 :

MKTVAIIFGGVSSEYEVSLKSAVAIIKNMESIDYNVMKIGITEEGHWYLFEGTTDKI
KKDRWFLDESCEEIVVDFAKKSFVLKNSKKIIPDILFPVLHGGYGENGAMQGVF
ELLDIPYVGCGIGAAAISMNKIMLHQFAEAIGVKSTPSMIIEKGQDLQKVDAFAKI
HGFPLYIKPNEAGSSKGISKVERKSDLYKAIDEASKYDSRILIQKEVKGVEIGCGIL
GNEQLVVGECDAQISLVDGFFDYEEKYNLVTAEILLPAKLSIDKKEDIQMKAKKLY
RLLGCKGLARIDFFLTDDGEILLNEINTMPGFTEHSRFPMMMNEIGMDYKEIENL
LVLAVENHEKKLSTID

lesdits marqueurs de type VanE étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence **SEQ ID N°85** à **SEQ ID N°91** tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d’acides aminés	Position du peptide dans la ou les protéines VanE
SEQ ID N°85	AIDEASK	198-204 pour la protéine de SEQ N°84
SEQ ID N°86	FPMMMNEIGMDYK	318-330 pour la protéine de SEQ N°84
SEQ ID N°87	IMLHQFAEAIGVK	134-146 pour la protéine de SEQ N°84
SEQ ID N°88	NMESIDYNVMK	28-38 pour la protéine de SEQ N°84
SEQ ID N°89	SAVAIIK	21-27 pour la protéine de SEQ N°84
SEQ ID N°90	STPSMIIK	147-155 pour la protéine de SEQ N°84
SEQ ID N°91	YNLVTAEILLPAK	251-263 pour la protéine de SEQ N°84

Avantageusement, le marqueur de type VanE correspondant au peptide de séquence SEQ ID N° 89 est détecté après induction du mécanisme de résistance.

Selon un autre mode de réalisation de l’invention, la détection d’un mécanisme de résistance aux glycopeptides, lié à l’expression de la protéine VanG, est caractérisée par la détection d’au moins un peptide appartenant à la protéine VanG et à ses différents variants de séquences **SEQ ID N° 92** à **SEQ ID N° 94**.

SEQ ID N°92 :

MIKKRIAIIFGGNSTEYEVSLQSASAVFENINTKKFDIVPIGITRNGDWYHYTGKKE
KIANNTWFEDNENLYSVAVSQNRSVKGFIEFKEEKFYIIKVDLIFPVLHGKNGED
GTLQGLFELAGIPVVGCDTLSSALCMDKDKAHKLVSLAGISVPKSVTFKFSGKK
AALKKIEKELSYPLFVKPVRAGSSFGITKVTKQQELENAIQLAFEHDAEVIVEETIN
GFEVGCAVLGIDELIVGRVDEIELSSGFFDYTEKYTLKSSKIYMPARIDAEAEKRI
QETAVTIYKALGCSGFSRVDMFYTPSGEIVFNEVNTIPGFTSHSRYPNMMKGIG
LSFAQMLDKLIGLYVE

SEQ ID N°93 :

MQNKKIAVIFGGNSTEYEVSLQSASAVFENINTNKFDIIPIGITRSGEWYHYTGEK
EKILNNTWFEDSKNLCPVVVSQNRSVKGFLEIASDKYRIIKVDLVFPVLHGKNGE
DGTLQGIFELAGIPVVGCDTLSSALCMDKDRAHKLVS LAGISVPKSVTFKRFNEE
AAMKEIEANLTYPLFIKPVRAGSSFGITKVIEKQELDAAIELAFEHDTEVIVEETIN
GFEVGCAVLGIDELIVGRVDEIELSSGFFDYTEKYTLKSSKIYMPARIDAEAEKRI
QEAAVTIYKALGCSGFSRVDMFYTPSGEIVFNEVNTIPGFTSHSRYPNMMKGIG
LSFSQMLDKLIGLYVE

SEQ ID N°94 :

MQNKKIAVIFGGNSTEYEVSLQSASAVFENINTNKFDIIPIGITRSGEWYHYTGEK
EKILNNTWFEDSKNLCPVVVSQNRSVKGFLEIASDKYRIIKVDLVFPVLHGKNGE
NGTLQGIFELAGIPVVGCDTLSSALCMDKDRAHKLVS LAGISVPKSVTFKRFNEE
AAMKEIEANLTYPLFIKPVRAGSSFGITKVIEKQELDAAIELAFEHDTEVIVEETIN
GFEVGCAVLGIDELIVGRVDEIELSSGFFDYTEKYTLKSSKIYMPARIDAEAEKRI
QEAAVTIYKALGCSGFSRVDMFYTPSGEIVFNEVNTIPGFTSHSRYPNMMKGIG
LSFSQMLDKLIGLYVE

lesdits marqueurs de type VanG étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence **SEQ ID N°95** à **SEQ ID N°102** tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d’acides aminés	Position du peptide dans la ou les protéines VanG
SEQ ID N°95	AGSSFGITK	187-195 pour les protéines de SEQ N°92, 93, 94
SEQ ID N°96	ALGCSGFSR	289-297 pour les protéines de SEQ N°92, 93, 94
SEQ ID N°97	IDAEAEK	271-277 pour les protéines de SEQ N°92, 93, 94

SEQ ID N°98	IYMPAR	265-270 pour les protéines de SEQ N°92, 93, 94
SEQ ID N°99	LIGLYVE	343-349 pour les protéines de SEQ N°92, 93, 94
SEQ ID N°100	LVSLAGISVPK	146-156 pour les protéines de SEQ N°92, 93, 94
SEQ ID N°101	VDEIELSSGFFDYTEK	242-257 pour les protéines de SEQ N°92, 93, 94
SEQ ID N°102	YPNMMK	325-330 pour les protéines de SEQ N°92, 93, 94

Avantageusement, les marqueurs de type VanG choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 95, SEQ ID N° 96, SEQ ID N° 97, SEQ ID N° 98, SEQ ID N° 100 et SEQ ID N° 102 sont détectés après induction du mécanisme de résistance.

Avantageusement, les marqueurs de type VanG choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 97 et SEQ ID N° 100 sont détectés sans étape d'induction.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la détection d'un mécanisme de résistance aux glycopeptides, induit par l'expression de la protéine VanL, est caractérisée par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanL de séquence **SEQ ID N° 103**.

SEQ ID N°103 :

MMKLKKIAIIFGGQSSEYEVSLKSTVSVLETLSNCFEIIKIGIDLGGKWYLTTSNN
KDIEYDVWQTDPSLQEIIPCFNNRGFYNNKTTNKFYRPDVLFPILHGGTGEDGTL

QGVFELMNIPYVGCGVTPSAICMDKYLLHEFAQSVGVKSAPTLLIIRTRNCKDEID
KFIEKNDFPIFVKPNEAGSSKGINKVNEPDKLEDALTEAFKYSKSVIIQKAIIGREI
GCAVLGNEKLLVGECDEVSLNSDFFDYTEKYQMISAKVNIPASISVEFSNEMKK
QAQLLYRLLGCSEGLARIDFFLSDNNEILLNEINTLPGFTEHSRYPKMMMEAVGVTY
KEITKLINLAEEKYYG

lesdits peptides de type VanL étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence **SEQ ID N°104** à **SEQ ID N°120** tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Position du peptide dans la ou les protéines VanL
SEQ ID N°104	DIEYDVWQTDPSLQEIIPCFNNR	59-81 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°105	EIGCAVLGNEK	222-232 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°106	IAIIFGGQSSEYEVSLK	7-23 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°107	IGIDLGGK	42-49 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°108	LEDALTEAFK	198-207 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°109	LINLAEEK	339-346 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°110	LLGCSEGLAR	285-293 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°111	LLVGECDEVSLNSDFFDYTEK	233-253 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°112	MMEAVGVTYK	324-333 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°113	NDFPIFVKPNEAGSSK	172-187 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°114	QAQLLYR	278-284 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°115	SAPTLLIR	150-157 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°116	STVSVLETLSSTCNFEIHK	24-41 pour la protéine de SEQ N°103

SEQ ID N°117	VNIPASISVEFSNEMK	261-276 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°118	WYLTTSNNK	50-58 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°119	YLLHEFAQSVGVK	137-149 pour la protéine de SEQ N°103
SEQ ID N°120	YQMISAK	254-260 pour la protéine de SEQ N°103

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la détection d'un mécanisme de résistance aux glycopeptides, induit par l'expression de la protéine VanM, est caractérisée par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanM de séquence **SEQ ID N° 121**.

SEQ ID N°121 :

MNRLKIAILFGGCSEEHNVSVKSAAEIANIDIGKYEPIYIGITQSGVWKTCEKPCI
DWDNEHCRSAVLSPDKKMHGLLIMQDKGYQIQRIDVVFSLHGKSGEDGAIQG
LFELSGIPYVGCDIQSSAVCMDKSLAYIIAKNAGIATPEFQVIYKDDKPAADSFTY
PVFVKPARSGSSYGVNKNVNSADELDSAIDLARQYDSKILIEQGVLGYEVGCAVL
GNSFDLIVGEVDQIRLQHGIFRIHQEAEPEKGSENATITVPAELSAEERERIKEAA
KNIYKALGCRGLSRVDMFLQDNGRIVLNEVNTMPGFTSYSRYPRMMVSAGITIP
ELIDHLIVLAVKE

lesdits peptides de type VanM étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence **SEQ ID N°122** à **SEQ ID N°139** tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Position du peptide dans la ou les protéines VanM
----------------------------------	---------------------------------	--

SEQ ID N°122	DDKPAADSFTYPVFKPAR	156-174 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°123	GSENATITVPAELSAEER	252-269 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°124	IAILFGGCSEEHNVSVK	6-22 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°125	IDVVFSVLHGK	91-101 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°126	IHQEAEPEK	243-251 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°127	IVLNEVNTMPGFTSYSR	301-317 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°128	LQHGIFR	236-242 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°129	MHGLLIMQDK	75-84 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°130	MMVSAGITIPELIDHLIVLAVK	321-342 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°131	NAGIATPEFQVIYK	142-155 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°132	SAAEIANNIDIGK	23-35 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°133	SAVLSPDK	66-73 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°134	SGSSYGVNK	175-183 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°135	SLAYIIAK	134-141 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°136	TCEKPCIDWDNEHCR	51-65 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°137	VDMFLQDNCR	291-300 pour la protéine de SEQ N°121
SEQ ID N°138	VNSADELDSAIDLAR	184-198 pour la protéine de SEQ N°121

SEQ ID N°139	YEPIYIGITQSGVWK	36-50 pour la protéine de SEQ N°121
-----------------	-----------------	--

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la détection d'un mécanisme de résistance aux glycopeptides, induit par l'expression de la protéine VanN, est caractérisée par la détection d'au moins un peptide appartenant à la protéine VanN de séquence **SEQ ID N° 140**.

SEQ ID N°140 :

MKKIALIFGGTSAEYEVSLKSAASVLSVLENLNVEIYRIGIASNGKWYLTFSNETI
ANDLWLQDKKLNEITPSFDGRGFYDQAEKVYFKPDVLFPM LHGGTGENGTLQG
VFECMQIPYVGCGVASSAICMNKYLLHQFAKSVGVMSTPTQLISSTDEQQVIKN
FTELYGFPIFIKPNEAGSSKGISKVHTEAELTKALTEAFQFSQTVILQKAVSGVEI
GCAILGNDQLLVGECDEVSLATDFFDYTEKYQMTTAKLTVPAKIPVATSREIKRQ
AQLLYQLLGCQGLARIDFFLTEAGEILLNEINTMPGFTNHSRFPAMMAATGITYQ
ELISTLITLAEDK

lesdits peptides de type VanN étant choisis, de préférence, parmi les peptides de séquence **SEQ ID N°141** à **SEQ ID N°154** tels que définis ci-après :

Peptide SEQ ID N°	Séquence d'acides aminés	Position du peptide dans la protéine VanN
SEQ ID N°141	ALTEAFQFSQTVILQK	198-213 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°142	GFYDQAEK	79-86 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°143	IALIFGGTSAEYEVSLK	4-20 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°144	IGIASNGK	39-46 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°145	IPVATSR	264-270 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°146	LNEITPSFDGR	68-78 pour la protéine de SEQ N°140

SEQ ID N°147	NFTELYGFPIFIKPNEAGSSK	164-184 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°148	QAQLLYQLLGCQGLAR	275-290 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°149	SAASVLSVLENLNVEIYR	21-38 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°150	SVGVMSTPTQLISSTDEQQVIK	142-163 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°151	VHTEAELTK	189-197 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°152	WYLTFSDNETIANDLWLQDK	47-66 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°153	YLLHQFAK	134-141 pour la protéine de SEQ N°140
SEQ ID N°154	YQMTTAK	251-257 pour la protéine de SEQ N°140

Le procédé de l'invention et ses avantages ressortiront de la suite de la présente description qui présente plusieurs exemples, non limitatifs, de mise en œuvre dudit procédé.

Exemple 1 : Préparation d'un échantillon primaire urinaire par enrichissement en microorganismes:

Le protocole suivant est mis en œuvre en 16 étapes (les étapes 5 à 12 sont optionnelles et pourraient être omises si l'échantillon enrichi est ultérieurement traité selon les exemples 6 et suivants) :

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 (8 volumes acétone pour 1 volume de méthanol) 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 (8 volumes acétone pour 1 volume de méthanol) en dilution au 1/10
13. Laisser 1 heure à –20°C
14. Centrifugation à 15000g pendant 5 minutes
15. Elimination du surnageant

Le culot constitue l'échantillon enrichi en microorganisme

Exemple 2 : Mise en culture de l'échantillon sur milieu de culture en absence d'antibiotique :

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 (référence bioMérieux 43041) pendant 18 à 24 h à 35°C, en atmosphère aérobie ou anaérobie ;
- gélose TSA (référence bioMérieux 43011) pendant 18 à 24 h à 37°C.

Exemple 3 : Mise en culture de l'échantillon sur milieu de culture en présence d'antibiotique :

L'échantillon estensemencé sur milieu :

- gélose VRE (référence bioMérieux 43002) pendant 18 à 24 h à 35°C, en atmosphère aérobie ou anaérobie. Ce milieu contient de la vancomycine.

Exemple 4 : Identification de microorganismes par profil biochimique :

L'identification est mise en œuvre comme suit :

1. Sélection de colonies isolées obtenues selon l'exemple 2 ou l'exemple 3, ou par enrichissement de microorganismes présents dans un échantillon primaire selon l'exemple 1.
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 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 VITEK®
4. Positionnement du tube de suspension bactérienne et d'une carte d'identification VITEK® sur une cassette VITEK®
5. Chargement de la cassette dans l'instrument VITEK®
6. Les opérations de remplissage, scellage, incubation et lecture sont automatiques
7. Acquisition d'un profil biochimique

Identification avec le système VITEK® réalisée par comparaison à des profils biochimiques de souches connues

Exemple 5 : Identification de microorganismes à partir d'un échantillon par MALDI-TOF

L'identification est mise en œuvre comme suit :

1. Transfert, à l'aide d'une pipette de 1 µl, d'une portion de colonie de microorganisme obtenue selon l'exemple 2 ou 3, ou d'un échantillon enrichi 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 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
7. Identification du microorganisme par comparaison des pics obtenus à ceux de la base de connaissance

Exemple 6 : Identification de microorganismes à partir d'un échantillon par ESI-MS

L'identification est mise en œuvre comme suit :

1. Prélèvement d'une colonie de microorganisme, obtenue selon l'exemple 2 ou 3, ou d'un échantillon enrichi selon l'exemple 1, et mise en suspension dans 100µl d'eau déminéralisée.
2. Centrifugation à 3000g pendant 5 minutes.
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%).
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.

12. Identification du microorganisme par référence à des spectres de référence.

Exemple 7 : Obtention de protéines digérées à partir de microorganismes

Le protocole suivant est mis en œuvre en 17 étapes :

1. Prélèvement d'une colonie de microorganisme, obtenue selon l'exemple 2 ou 3, ou d'un échantillon enrichi 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.
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. Ajout d'acide formique jusqu'à un pH inférieur à 4 pour stopper la réaction.
11. Le volume d'échantillon est complété à 1mL avec eau/acide formique 0,5% (v/v)
12. Equilibrage des colonnes HLB Oasis Waters avec 1ml de méthanol puis 1 ml H_2O /acide formique 0,1% (v/v)
13. Dépôt de l'échantillon qui s'écoule par gravité
14. Lavage avec 1 ml H_2O /acide formique 0,1% (v/v)
15. Elution avec 1ml d'un mélange 80% de méthanol et 20% d'eau/acide formique 0,1% (v/v)

16. L'éluat 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.

L'éluat est ensuite repris dans une solution eau/acide formique 0,5% (v/v) quantité suffisante pour (QSP) 200µl

Exemple 8 : Identification de résistance aux glycopeptides, sans induction, de type VanA, VanB, VanC1, VanD, VanE et VanG:

Les échantillons Ech1 à Ech13 sont identifiés selon l'une des méthodes décrites dans les exemples 1 à 6. L'identification des espèces est reportée dans le **TABLEAU 1.**

TABLEAU1 :

Nom	Espèces
Ech1	<i>E. faecalis</i>
Ech2	<i>E. gallinarum</i>
Ech3	<i>E. faecalis</i>
Ech4	<i>E. faecalis</i>
Ech5	<i>E. faecalis</i>
Ech6	<i>E. faecalis</i>
Ech7	<i>E. faecalis</i>
Ech8	<i>E. faecium</i>
Ech9	<i>E. faecium</i>
Ech10	<i>E. faecalis</i>
Ech11	<i>E. faecium</i>

Les échantillons Ech1 à Ech11 correspondent à une espèce pouvant comporter un mécanisme de résistance de type Van. La méthode suivante est alors mise en œuvre pour rechercher un tel mécanisme.

La colonie de microorganisme est obtenue selon l'exemple 2, traitée selon l'exemple 7, puis un volume de 50µl de protéines digérées est injecté et analysé selon les conditions suivantes :

- Chaîne chromatographique Dionex Ultimate 3000 de la société Dionex Corporation (Sunnyvale, Etats Unis d'Amerique).
- Colonne Waters BEH130 C18, 2,1mm de diamètre interne, 100mm de long, taille de particule de 3,5µm (Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France).
- Solvant A : H₂O + 0,1% acide formique.
- Solvant B : ACN + 0,1% acide formique.

Gradient HPLC défini dans le **TABLEAU 2** ci-après.

TABLEAU 2 :

Temps (min)	Débit (µl)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	300	98	2
3	300	98	2
28	300	63	37
30	300	0	100
38	300	0	100
38.1	300	98	2
45	300	98	2

- L'éluat 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, issus de la digestion des protéines du microorganisme, sont analysés par le spectromètre de masse en mode MRM. Seuls les peptides indiqués dans le **TABLEAU 3** sont détectés. Pour cela, le ou les fragments indiqués dans le **TABLEAU 3** sont détectés.

TABLEAU 3 :

Transition numéro	Protéine	Peptide	Etat de charge du précurseur	Ion fragment de première génération
1	VanA	IHQEVEPEK	2	y5 monochargé
2	VanA	IHQEVEPEK	2	y6 monochargé
3	VanA	IHQEVEPEK	2	y7 monochargé
4	VanA	LIVLALK	2	y4 monochargé
5	VanA	LIVLALK	2	y5 monochargé
6	VanA	LIVLALK	2	y6 monochargé
7	VanA	LQYGIFR	2	y4 monochargé
8	VanA	LQYGIFR	2	y5 monochargé
9	VanA	LQYGIFR	2	y6 monochargé
10	VanA	MHGLLVK	2	b5 monochargé
11	VanA	MHGLLVK	2	y5 monochargé
12	VanA	MHGLLVK	2	y6 monochargé
13	VanA	MMAAAGIALPELIDR	2	y6 monochargé
14	VanA	MMAAAGIALPELIDR	2	y7 monochargé
15	VanA	MMAAAGIALPELIDR	2	y8 monochargé
16	VanA	NAGIATPAFWVINK	2	y10 monochargé
17	VanA	NAGIATPAFWVINK	2	y8 monochargé
18	VanA	NAGIATPAFWVINK	2	y9 monochargé
19	VanA	SAIEIAANINK	2	y6 monochargé
20	VanA	SAIEIAANINK	2	y7 monochargé
21	VanA	SAIEIAANINK	2	y8 monochargé
22	VanA	SGSSFQVK	2	y5 monochargé
23	VanA	SGSSFQVK	2	y6 monochargé
24	VanA	SGSSFQVK	2	y7 monochargé
25	VanA	SLTYIVAK	2	y4 monochargé
26	VanA	SLTYIVAK	2	y5 monochargé
27	VanA	SLTYIVAK	2	y6 monochargé
28	VanA	VDMFLQDNQR	2	y6 monochargé
29	VanA	VDMFLQDNQR	2	y7 monochargé
30	VanA	VDMFLQDNQR	2	y8 monochargé
31	VanA	VNSADELDYAIESAR	2	y6 monochargé
32	VanA	VNSADELDYAIESAR	2	y7 monochargé
33	VanA	VNSADELDYAIESAR	2	y8 monochargé
34	VanA	YEPLYIGITK	2	y7 monochargé
35	VanA	YEPLYIGITK	2	y8 monochargé
36	VanA	YEPLYIGITK	2	y8 dichargé
37	VanB	FDPHYIGITK	2	y6 monochargé
38	VanB	FDPHYIGITK	2	y7 dichargé
39	VanB	FDPHYIGITK	2	y8 dichargé
40	VanB	IDVAFPVHGGK	2	y6 monochargé
41	VanB	IDVAFPVHGGK	2	y7 monochargé
42	VanB	IDVAFPVHGGK	2	y8 monochargé
43	VanB	IHQENEPEK	2	y5 monochargé
44	VanB	IHQENEPEK	2	y6 monochargé

45	VanB	IHQENEPEK	2	y7 monochargé
46	VanB	LSHGIFR	2	y4 monochargé
47	VanB	LSHGIFR	2	y5 monochargé
48	VanB	LSHGIFR	2	y6 monochargé
49	VanB	SLAYILTK	2	y5 monochargé
50	VanB	SLAYILTK	2	y6 monochargé
51	VanB	SLAYILTK	2	y7 monochargé
52	VanB	THGLLVMK	2	b5 monochargé
53	VanB	THGLLVMK	2	b6 monochargé
54	VanB	THGLLVMK	2	y6 monochargé
55	VanB	VQETAK	2	y3 monochargé
56	VanB	VQETAK	2	y4 monochargé
57	VanB	VQETAK	2	y5 monochargé
58	VanC1	EQAQLLYR	2	y3 monochargé
59	VanC1	EQAQLLYR	2	y4 monochargé
60	VanC1	EQAQLLYR	2	y6 monochargé
61	VanC1	FIQDHGFPIFIKPNEAGSSK	3	b7 monochargé
62	VanC1	FIQDHGFPIFIKPNEAGSSK	3	y8 monochargé
63	VanC1	FIQDHGFPIFIKPNEAGSSK	3	y9 monochargé
64	VanC1	IVPDVLPVLHGK	2	y11 dichargé
65	VanC1	IVPDVLPVLHGK	3	y11 dichargé
66	VanC1	IVPDVLPVLHGK	3	y11 trichargé
67	VanC1	NC[CAM]HQLTFSSQGFILGEK	3	y5 monochargé
68	VanC1	NC[CAM]HQLTFSSQGFILGEK	3	y7 monochargé
69	VanC1	NC[CAM]HQLTFSSQGFILGEK	3	y8 monochargé
70	VanC1	NDTWLEDHK	2	y5 monochargé
71	VanC1	NDTWLEDHK	2	y6 monochargé
72	VanC1	NDTWLEDHK	2	y7 monochargé
73	VanC1	NLGLTGLAR	2	y4 monochargé
74	VanC1	NLGLTGLAR	2	y5 monochargé
75	VanC1	NLGLTGLAR	2	y7 monochargé
76	VanC1	TALQSALTAFAYGSTVLIQK	3	y7 monochargé
77	VanC1	TALQSALTAFAYGSTVLIQK	3	y8 monochargé
78	VanC1	TALQSALTAFAYGSTVLIQK	3	y9 monochargé
79	VanC1	WLLHQLADTMGIASAPTL LLSR	3	y10 monochargé
80	VanC1	WLLHQLADTMGIASAPTL LLSR	3	y7 monochargé
81	VanC1	WLLHQLADTMGIASAPTL LLSR	3	y9 monochargé
82	VanC1	YENDPATIDR	2	b4 monochargé
83	VanC1	YENDPATIDR	2	y6 monochargé
84	VanC1	YENDPATIDR	2	y8 monochargé
85	VanC1	YQLISATITVPAPLPLALESQIK	3	y11 dichargé
86	VanC1	YQLISATITVPAPLPLALESQIK	3	y13 dichargé
87	VanC1	YQLISATITVPAPLPLALESQIK	3	y9 monochargé
88	VanC2	ITVPAPLPETIETK	2	y11 dichargé
89	VanC2	ITVPAPLPETIETK	2	y7 monochargé
90	VanC2	ITVPAPLPETIETK	2	y9 monochargé
91	VanC2	QDTWLLDTK	2	y4 monochargé
92	VanC2	QDTWLLDTK	2	y5 monochargé

93	VanC2	QDTWLLDTK	2	y6 monochargé
94	VanC2	YQLISAK	2	y3 monochargé
95	VanC2	YQLISAK	2	y5 monochargé
96	VanC2	YQLISAK	2	y6 monochargé
97	VanD	GSENAVIR	2	y4 monochargé
98	VanD	GSENAVIR	2	y5 monochargé
99	VanD	GSENAVIR	2	y6 monochargé
100	VanD	IDLFLR	2	y3 monochargé
101	VanD	IDLFLR	2	y4 monochargé
102	VanD	IDLFLR	2	y5 monochargé
103	VanD	IHQEAQPEK	2	y3 monochargé
104	VanD	IHQEAQPEK	2	y7 monochargé
105	VanD	IHQEAQPEK	2	y8 dichargé
106	VanD	SGSSFQVVK	2	y5 monochargé
107	VanD	SGSSFQVVK	2	y6 monochargé
108	VanD	SGSSFQVVK	2	y7 monochargé
109	VanE	AIDEASK	2	y4 monochargé
110	VanE	AIDEASK	2	y5 monochargé
111	VanE	AIDEASK	2	y6 monochargé
112	VanE	FPMMMNEIGMDYK	2	y9 monochargé
113	VanE	FPMMMNEIGMDYK	2	y12 dichargé
114	VanE	FPMMMNEIGMDYK	2	y5 monochargé
115	VanE	IMLHQFAEAIGVK	2	y10 dichargé
116	VanE	IMLHQFAEAIGVK	2	y8 monochargé
117	VanE	IMLHQFAEAIGVK	2	y9 monochargé
118	VanE	NMESIDYNVMK	2	y6 monochargé
119	VanE	NMESIDYNVMK	2	y7 monochargé
120	VanE	NMESIDYNVMK	2	y8 monochargé
121	VanE	SAVAIK	2	y4 monochargé
122	VanE	SAVAIK	2	y5 monochargé
123	VanE	SAVAIK	2	y6 monochargé
124	VanE	STPSMIEK	2	y6 monochargé
125	VanE	STPSMIEK	2	y7 monochargé
126	VanE	STPSMIEK	2	y7 dichargé
127	VanE	YNLVTAEILLPAK	2	y4 monochargé
128	VanE	YNLVTAEILLPAK	2	y8 monochargé
129	VanE	YNLVTAEILLPAK	2	y9 monochargé
130	VanG	AGSSFQITK	2	y5 monochargé
131	VanG	AGSSFQITK	2	y7 monochargé
132	VanG	AGSSFQITK	2	y8 monochargé
133	VanG	ALGC[CAM]SGFSR	2	y5 monochargé
134	VanG	ALGC[CAM]SGFSR	2	y6 monochargé
135	VanG	ALGC[CAM]SGFSR	2	y7 monochargé
136	VanG	IDAEAEK	2	y4 monochargé
137	VanG	IDAEAEK	2	y5 monochargé
138	VanG	IDAEAEK	2	y6 monochargé
139	VanG	IYMPAR	2	y3 monochargé
140	VanG	IYMPAR	2	y4 monochargé

141	VanG	IYMPAR	2	y5 monochargé
142	VanG	LIGLYVE	2	b4 monochargé
143	VanG	LIGLYVE	2	b5 monochargé
144	VanG	LIGLYVE	2	b6 monochargé
145	VanG	LVSLAGISVPK	2	y6 monochargé
146	VanG	LVSLAGISVPK	2	y7 monochargé
147	VanG	LVSLAGISVPK	2	y9 monochargé
148	VanG	VDEIELSSGFFDYTEK	2	y10 monochargé
149	VanG	VDEIELSSGFFDYTEK	2	y4 monochargé
150	VanG	VDEIELSSGFFDYTEK	2	y6 monochargé
151	VanG	YPNMMK	2	y3 monochargé
152	VanG	YPNMMK	2	y4 monochargé
153	VanG	YPNMMK	2	y5 monochargé

Les transitions mentionnées dans le **TABLEAU 3** sont détectées en utilisant les paramètres figurant dans les **TABLEAU 4** et **5**.

TABLEAU 4 :

Transition numéro	Temps de rétention	(m/z) filtré en Q1	(m/z) filtré en Q3	Energie de collision (eV)
1	8,75	554,79	601,32	29
2	8,75	554,79	730,36	29
3	8,75	554,79	858,42	29
4	19,71	385,28	444,32	22
5	19,71	385,28	543,39	22
6	19,71	385,28	656,47	22
7	17,91	448,75	492,29	25
8	17,91	448,75	655,36	25
9	17,91	448,75	783,41	25
10	13,32	399,24	552,3	23
11	13,32	399,24	529,37	23
12	13,32	399,24	666,43	23
13	23,29	786,42	742,41	32
14	23,29	786,42	855,49	31
15	23,29	786,42	926,53	34
16	22,44	751,41	1146,63	38
17	22,44	751,41	974,55	38
18	22,44	751,41	1075,59	38
19	15,89	572,32	630,36	25
20	15,89	572,32	743,44	26
21	15,89	572,32	872,48	25
22	10,67	384,7	537,3	20,5

23	10,67	384,7	624,34	18,5
24	10,67	384,7	681,36	19,5
25	15,29	447,77	430,3	25
26	15,29	447,77	593,37	25
27	15,29	447,77	694,41	25
28	16,64	597,78	702,35	29
29	16,64	597,78	849,42	29
30	16,64	597,78	980,46	27
31	18,52	826,89	646,35	41
32	18,52	826,89	809,42	41
33	18,52	826,89	924,44	41
34	19,2	598,83	807,5	31
35	19,2	598,83	904,55	22
36	19,2	598,83	452,78	25
37	15,89	595,81	694,41	33
38	15,89	595,81	416,24	35
39	15,89	595,81	464,77	28
40	19,1	598,35	650,4	29
41	19,1	598,35	797,47	28
42	19,1	598,35	868,5	28
43	4,97	562,27	616,29	30
44	4,97	562,27	745,34	30
45	4,97	562,27	873,39	30
46	12,85	415,24	492,29	23
47	12,85	415,24	629,35	23
48	12,85	415,24	716,38	23
49	17,9	454,78	637,39	25
50	17,9	454,78	708,43	25
51	17,9	454,78	821,51	25
52	14,32	449,76	522,3	25
53	14,32	449,76	621,37	25
54	14,32	449,76	660,41	25
55	1,53	338,19	319,2	20
56	1,53	338,19	448,24	20
57	1,53	338,19	576,3	20
58	14,16	510,78	451,27	24
59	14,16	510,78	564,35	25
60	14,16	510,78	763,45	27
61	19,45	744,72	845,39	43
62	19,45	744,72	789,37	41
63	19,45	744,72	917,47	40
64	22,56	717,43	611,35	30
65	22,56	478,62	611,35	16
66	22,56	478,62	407,9	19
67	19,53	655,98	559,34	34
68	19,53	655,98	763,43	27
69	19,53	655,98	891,49	25
70	12,98	579,26	641,33	31

71	12,98	579,26	827,4	29
72	12,98	579,26	928,45	27
73	16,92	457,77	416,26	22
74	16,92	457,77	517,31	21
75	16,92	457,77	687,41	22
76	27,6	728,74	788,89	29
77	27,6	728,74	845,51	31
78	27,6	728,74	1008,57	31
79	26,39	803,11	1028,61	35
80	26,39	803,11	799,5	30
81	26,39	803,11	957,57	35
82	11,46	597,28	522,18	26
83	11,46	597,28	672,37	33
84	11,46	597,28	901,44	26
85	26,58	822,81	604,87	30
86	26,58	822,81	688,91	26
87	26,58	822,81	998,59	39
88	19,29	754,93	598,33	30
89	19,29	754,93	817,43	45
90	19,29	754,93	1027,57	38
91	18,18	560,29	476,27	30
92	18,18	560,29	589,36	30
93	18,18	560,29	775,43	30
94	13,88	411,74	305,18	23
95	13,88	411,74	531,35	23
96	13,88	411,74	659,41	23
97	9,97	423,23	458,31	25
98	9,97	423,23	572,35	23
99	9,97	423,23	701,39	21
100	19,92	388,74	435,27	19
101	19,92	388,74	548,36	17
102	19,92	388,74	663,38	19
103	5,57	540,28	373,21	35
104	5,57	540,28	829,41	26
105	5,57	540,28	483,74	29
106	10,45	441,72	564,31	23
107	10,45	441,72	651,35	22
108	10,45	441,72	738,38	21
109	4,52	367,19	434,22	21
110	4,52	367,19	549,25	17
111	4,52	367,19	662,34	18
112	21,88	803,84	1100,48	41
113	21,88	803,84	730,31	38
114	21,88	803,84	613,27	46
115	20,03	728,9	550,3	39
116	20,03	728,9	834,47	41
117	20,03	728,9	962,53	39
118	16,81	672,3	769,35	26

119	16,81	672,3	882,44	26
120	16,81	672,3	969,47	26
121	13,59	351,23	444,32	18
122	13,59	351,23	543,39	16
123	13,59	351,23	614,42	17
124	14,51	503,27	720,4	28
125	14,51	503,27	817,45	19
126	14,51	503,27	409,23	20
127	22,39	722,92	428,29	37
128	22,39	722,92	854,53	37
129	22,39	722,92	955,58	37
130	12,77	434,23	565,33	24
131	12,77	434,23	739,4	21
132	12,77	434,23	796,42	22
133	12,41	477,73	553,27	27
134	12,41	477,73	713,3	26
135	12,41	477,73	770,33	24
136	7,63	388,2	476,24	22
137	7,63	388,2	547,27	19
138	7,63	388,2	662,3	19
139	12,85	375,7	343,21	22
140	12,85	375,7	474,25	22
141	12,85	375,7	637,31	22
142	20,72	403,74	397,28	23
143	20,72	403,74	560,34	23
144	20,72	403,74	659,41	23
145	19,66	542,34	600,37	23
146	19,66	542,34	671,41	25
147	19,66	542,34	871,52	23
148	22,14	939,94	1180,52	46
149	22,14	939,94	540,27	46
150	22,14	939,94	802,36	46
151	12,66	392,18	409,19	22
152	12,66	392,18	523,24	22
153	12,66	392,18	620,29	22

TABLEAU 5 :

Transition numéro	Potentiel d'orifice	potentiel d'entrée avant Q0	Potentiel en sortie de cellule de collision	Seuil de positivité
1	80	10	35	2000
2	80	10	35	2000
3	80	10	35	2000

4	80	10	35	1400
5	80	10	35	2000
6	80	10	35	2000
7	80	10	35	2000
8	80	10	35	2000
9	80	10	35	1500
10	80	10	35	4000
11	80	10	35	4000
12	80	10	35	4000
13	120	10	18	2000
14	120	10	18	2000
15	120	10	18	2000
16	80	10	35	2000
17	80	10	35	2000
18	80	10	35	2000
19	90	10	15	2000
20	90	10	15	2000
21	90	10	15	2000
22	85	10	24	2000
23	85	10	24	2000
24	85	10	24	2000
25	80	10	35	2000
26	80	10	35	1500
27	80	10	35	2000
28	100	10	17	2000
29	100	10	17	2000
30	100	10	17	2000
31	80	10	35	1000
32	80	10	35	2000
33	80	10	35	2000
34	105	10	20	1400
35	105	10	20	2000
36	105	10	20	2000
37	100	10	11	2000
38	100	10	16	2000
39	100	10	11	2000
40	90	10	16	2000
41	90	10	18	2000
42	90	10	22	2000
43	80	10	35	2000
44	80	10	35	2000
45	80	10	35	2000
46	80	10	35	2000
47	80	10	35	2000
48	80	10	35	2000
49	80	10	35	2000
50	80	10	35	2000
51	80	10	35	2000

52	80	10	35	2000
53	80	10	35	2000
54	80	10	35	2000
55	80	10	35	2000
56	80	10	35	2000
57	80	10	35	2000
58	75	12	11	2000
59	75	12	14	2000
60	75	12	18	2000
61	140	10	35	2000
62	140	10	35	2000
63	140	10	35	2000
64	120	10	35	2000
65	70	10	35	2000
66	70	10	35	2000
67	100	10	35	2000
68	100	10	35	2000
69	100	10	35	2000
70	80	12	15	2000
71	80	12	19	2000
72	80	12	22	2000
73	70	12	10	4000
74	70	12	13	4000
75	70	12	16	4000
76	120	10	35	2000
77	120	10	35	2000
78	120	10	35	2000
79	120	10	35	2000
80	120	10	35	2000
81	120	10	35	2000
82	85	12	13	2000
83	85	12	16	2000
84	85	12	21	2000
85	100	10	35	2000
86	100	10	35	2000
87	100	10	35	2000
88	100	10	35	2000
89	100	10	35	2000
90	100	10	35	2000
91	80	10	35	2000
92	80	10	35	2000
93	80	10	35	2000
94	80	10	35	2000
95	80	10	35	2000
96	80	10	35	2000
97	75	10	11	2000
98	75	10	14	2000
99	75	10	16	1800

100	140	6	10	1300
101	140	6	14	2000
102	140	6	16	2000
103	110	12	10	2000
104	110	12	20	2000
105	110	12	6	2000
106	75	12	14	2000
107	75	12	16	2000
108	75	12	18	2000
109	65	12	18	2000
110	65	12	23	2000
111	65	12	15	2000
112	100	10	35	2000
113	100	10	35	2000
114	100	10	35	2000
115	140	9	14	2000
116	140	9	34	2000
117	140	9	24	2000
118	125	9	18	2000
119	125	9	21	2000
120	125	9	41	2000
121	70	12	10	2000
122	70	12	23	2000
123	70	12	14	2000
124	70	12	17	8000
125	70	12	20	2000
126	70	12	10	2000
127	80	10	35	2000
128	80	10	35	2000
129	80	10	35	2000
130	70	12	14	2000
131	70	12	18	2000
132	70	12	19	2000
133	80	12	14	2000
134	80	12	18	2000
135	80	12	18	2000
136	70	12	12	1600
137	70	12	13	2000
138	70	12	16	2000
139	80	10	35	2000
140	80	10	35	2000
141	80	10	35	2000
142	80	10	35	2000
143	80	10	35	2000
144	80	10	35	2000
145	80	12	16	2000
146	80	12	14	2000
147	80	12	21	2000

148	80	10	35	2000
149	80	10	35	2000
150	80	10	35	2000
151	80	10	35	3000
152	80	10	35	2000
153	80	10	35	2000

- 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
Tension de cône:	5500,00 V
Température de source:	550,00 °C
Gaz de nébulisation:	50,00 psi
Gaz chauffant:	40,00 psi
Gaz de collision induisant dissociation :	9,00 psi
Remplissage dynamique:	inactivé
Temps de cycle total:	1.2 sec
Fenêtre de détection :	90 sec

Les aires obtenues pour chacune des transitions et pour chacun des microorganismes étudiés ont été mesurées. Lorsque l'aire d'une transition est supérieure ou égale au seuil de positivité décrit dans le **TABLEAU 5**, la détection de la transition est considérée comme positive et est notée « 1 » dans le **TABLEAU 6**. Lorsque l'aire d'une transition est inférieure au seuil de positivité décrit dans le **TABLEAU 5**, la détection de la transition est considérée comme

négative et est notée « 0 » dans le **TABLEAU 6**. Lorsque les 3 transitions d'un même peptide sont notées « 1 », la détection du peptide est considérée comme positive. Un cas particulier fait exception à cette règle. Le peptide correspondant aux transitions numéros 49, 50 et 51 a une transition de très faible intensité. Dans ce cas précis, lorsque les transitions 49 et 50 sont notées « 1 », la détection de ce peptide sera considérée comme positive.

TABLEAU 6 :

[illegible]

[illegible]

129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
131	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
136	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
137	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
138	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
145	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
146	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
147	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
151	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
152	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
153	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Les échantillons Ech1, Ech2, Ech4, Ech5, Ech7 et Ech9 ne présentent aucun peptide caractéristique de résistance de type Van. Les bactéries présentes dans les échantillons Ech1, Ech2, Ech4, Ech5, Ech7 et Ech9 peuvent être sensibles aux glycopeptides de type Vancomycine ou Teicoplanine.

Les échantillons Ech3, Ech10 et Ech11 comportent au moins un peptide caractéristique de VanA. Les bactéries présentes dans les échantillons Ech3, Ech10 et Ech11 expriment donc la ligase VanA qui leur confère une résistance à la Vancomycine et à la Teicoplanine.

L'échantillon Ech6 comporte au moins un peptide caractéristique de VanG. La bactérie présente dans l'échantillon Ech6 exprime donc la ligase VanG qui lui confère une résistance à la Vancomycine.

L'échantillon Ech8 comporte au moins un peptide caractéristique de VanD. La bactérie présente dans l'échantillon Ech8 exprime donc la ligase VanD qui lui confère une résistance à la Vancomycine et à la Teicoplanine.

Ainsi, de façon avantageuse plusieurs mécanismes de résistance aux glycopeptides sont recherchés simultanément. De façon particulièrement avantageuse, un mécanisme de résistance inductible, tel que le mécanisme de résistance lié à l'expression de VanA, est détecté sans phase d'induction lors de la culture du microorganisme. Ce procédé permet donc de rechercher les mécanismes de résistance aux glycopeptides sans *a priori* sur leur éventuel existence.

Exemple 9 : Identification de résistance aux glycopeptides, avec induction, de type VanA, VanB, VanD, VanE et VanG:

Les échantillons Ech1 à Ech11 sont identifiés selon l'une des méthodes décrites dans les exemples 1 à 6. L'identification des espèces est reportée dans le **TABLEAU 7.**

TABLEAU7 :

Nom	Espèces
Ech12	<i>E. faecalis</i>
Ech13	<i>E. faecalis</i>
Ech14	<i>E. faecalis</i>
Ech15	<i>E. faecalis</i>
Ech16	<i>E. faecalis</i>
Ech17	<i>E. faecium</i>
Ech18	<i>E. faecium</i>
Ech19	<i>E. faecalis</i>
Ech20	<i>E. faecium</i>

Les échantillons Ech12 à Ech20 correspondent à une espèce pouvant comporter un mécanisme de résistance de type Van. La méthode suivante est alors mise en œuvre pour rechercher un tel mécanisme.

La colonie de microorganisme est obtenue selon l'exemple 3 puis traité selon l'exemple 7 et analysé selon l'exemple 8.

Les aires obtenues pour chacune des transitions et pour chacun des microorganismes étudiés ont été mesurées. Lorsque l'aire d'une transition est supérieure ou égale au seuil de positivité décrit dans le **TABLEAU 5**, la détection de la transition est considérée comme positive et est notée « 1 » dans le **TABLEAU 8**. Lorsque l'aire d'une transition est inférieure au seuil de positivité décrit dans le **TABLEAU 5**, la détection de la transition est considérée comme négative et est notée « 0 » dans le **TABLEAU 8**. Lorsque les 3 transitions d'un même peptide sont notées « 1 », la détection du peptide est considérée comme positive. Un cas particulier fait exception à cette règle. Le peptide correspondant aux transitions numéros 49, 50 et 51 a une transition de très faible intensité. Dans ce cas précis, lorsque les transitions 49 et 50 sont notées « 1 », la détection de ce peptide sera considérée comme positive.

TABLEAU 8 :[illegible]

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	1	0	0	0	0
122	0	0	0	0	1	0	0	0	0
123	0	0	0	0	1	0	0	0	0
124	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125	0	0	1	0	1	0	0	0	0
126	0	0	1	0	1	0	0	0	0
127	0	0	0	0	0	1	0	0	0
128	0	0	0	0	0	1	0	0	0
129	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130	0	0	0	1	0	0	0	0	0
131	0	0	0	1	0	0	0	0	0
132	0	0	0	1	0	0	0	0	0
133	0	0	0	1	0	0	0	0	0
134	0	0	0	1	0	0	0	0	0
135	0	0	0	1	0	0	0	0	0
136	0	0	0	1	0	0	0	0	0
137	0	0	0	1	0	0	0	0	0
138	0	0	0	1	0	0	0	0	0
139	0	0	0	1	0	0	0	0	0
140	0	0	0	1	0	0	0	0	0
141	0	0	0	1	0	0	0	0	0
142	0	0	0	0	0	0	0	0	0
143	0	0	0	0	0	0	0	0	0
144	0	0	0	0	0	0	0	0	0
145	0	0	0	1	0	0	0	0	0
146	0	0	0	1	0	0	0	0	0
147	0	0	0	1	0	0	0	0	0
148	0	0	0	0	0	0	0	0	0
149	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0
151	0	0	0	1	0	0	0	0	0
152	0	0	0	1	0	0	0	0	0
153	0	0	0	1	0	0	0	0	0

L'échantillon Ech12 ne présente aucun peptide caractéristique de résistance de type Van. La bactérie présente dans l'échantillon Ech12 peut être sensible aux glycopeptides de type Vancomycine ou Teicoplanine.

Les échantillons Ech19 et Ech20 comportent au moins un peptide caractéristique de VanA. Les bactéries présentes dans les échantillons Ech19 et Ech20

expriment donc la ligase VanA qui leur confère une résistance à la Vancomycine et à la Teicoplanine.

Les échantillons Ech13, Ech14 et Ech18 comportent au moins un peptide caractéristique de VanB. Les bactéries présentes dans les échantillons Ech13, Ech14 et Ech18 expriment donc la ligase VanB qui leur confère une résistance à la Vancomycine.

L'échantillon Ech15 comporte au moins un peptide caractéristique de VanG. La bactérie présente dans l'échantillon Ech15 exprime la ligase VanG qui lui confère une résistance à la Vancomycine.

L'échantillon Ech16 comporte au moins un peptide caractéristique de VanE. La bactérie présente dans l'échantillon Ech16 exprime la ligase VanE qui lui confère une résistance à la Vancomycine.

L'échantillon Ech17 comporte au moins un peptide caractéristique de VanD. La bactérie présente dans l'échantillon Ech17 exprime la ligase VanD qui lui confère une résistance à la Vancomycine et à la Teicoplanine.

Ainsi, de façon avantageuse plusieurs mécanismes de résistance aux glycopeptides peuvent être recherchés simultanément.

Exemple 10 : Obtention de protéines digérées à partir de microorganismes

Le protocole suivant est mis en œuvre en 16 étapes :

1. Prélèvement d'une colonie de microorganisme, obtenue selon l'exemple 8 et mise en suspension dans 100µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium, 50 mM, pH=8,0 dans un tube contenant des billes de verre de 0.05mm à 2mm de diamètre
2. Ajout de dithiothréitol (DTT) pour obtenir une concentration finale de 5mM.
3. Réduction pendant 5 minutes à 95°C sur une sonde Hielscher (réglage instrument : amplitude :100, cycle :1)

4. Refroidissement des tubes à température ambiante.
5. Ajout d'iodoacétamide pour obtenir une concentration finale de 12.5 mM.
6. Alkylation pendant 5 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
7. Ajout de 1 µg de trypsine.
8. Digestion à 50°C pendant 15 minutes
9. Ajout d'acide formique jusqu'à un pH inférieur à 4 pour stopper la réaction.
10. Centrifugation pendant 5 minutes à 15 000g, le surnageant est récupéré et complété à 1mL avec eau/acide formique 0,5% (v/v)
11. Equilibrage des colonnes HLB Oasis Waters avec 1ml de méthanol puis 1 ml H₂O/acide formique 0,1% (v/v)
12. Dépôt de l'échantillon qui s'écoule par gravité
13. Lavage avec 1 ml H₂O/acide formique 0,1% (v/v)
14. Elution avec 1ml d'un mélange 80% de méthanol et 20% d'eau/acide formique 0,1% (v/v)
15. L'éluat 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.
16. L'éluat est ensuite repris dans une solution eau/acide formique 0,5% (v/v) quantité suffisante pour (QSP) 150µl

Exemple 11 : Identification de résistance aux glycopeptides, sans induction, de type VanA:

Les échantillons Ech21 et Ech22 sont identifiés selon l'une des méthodes décrites dans les exemples 1 à 6. L'identification des espèces est reportée dans le **TABLEAU 9**.

TABLEAU 9 :

Nom	Espèces
Ech21	<i>E. faecalis</i>
Ech22	<i>E. faecalis</i>

Les échantillons Ech21 et Ech22 correspondent à l'espèce, *Enterococcus faecalis*, pouvant comporter un mécanisme de résistance de type Van. La méthode suivante est alors mise en œuvre pour rechercher un tel mécanisme.

Chaque échantillon est traité selon l'exemple 10 et analysé selon l'exemple 8 hormis les éléments mentionnés ci-après.

Les transitions mentionnées dans le **TABLEAU 3** sont détectées en utilisant les paramètres figurant dans les **TABLEAUX 10 et 11**.

TABLEAU 10 :

Transition numéro	Temps de rétention	(m/z) filtré en Q1	(m/z) filtré en Q3	Energie de collision (eV)
1	8,75	554,79	601,32	29
2	8,75	554,79	730,36	29
3	8,75	554,79	858,42	29
4	19,71	385,28	444,32	22
5	19,71	385,28	543,39	22
6	19,71	385,28	656,47	22
7	17,91	448,75	492,29	25
8	17,91	448,75	655,36	25
9	17,91	448,75	783,41	25
10	13,32	399,24	552,3	23
11	13,32	399,24	529,37	23
12	13,32	399,24	666,43	23
13	23,29	786,42	742,41	32
14	23,29	786,42	855,49	31
15	23,29	786,42	926,53	34
16	22,44	751,41	1146,63	38
17	22,44	751,41	974,55	38
18	22,44	751,41	1075,59	38
19	15,89	572,32	630,36	25
20	15,89	572,32	743,44	26
21	15,89	572,32	872,48	25
22	10,67	384,7	537,3	20,5

23	10,67	384,7	624,34	18,5
24	10,67	384,7	681,36	19,5
25	15,29	447,77	430,3	25
26	15,29	447,77	593,37	25
27	15,29	447,77	694,41	25
28	16,64	597,78	702,35	29
29	16,64	597,78	849,42	29
30	16,64	597,78	980,46	27
31	18,52	826,89	646,35	41
32	18,52	826,89	809,42	41
33	18,52	826,89	924,44	41
34	19,2	598,83	807,5	31
35	19,2	598,83	904,55	22
36	19,2	598,83	452,78	25
37	15,89	595,81	694,41	33
38	15,89	595,81	416,24	35
39	15,89	595,81	464,77	28
40	19,1	598,35	650,4	29
41	19,1	598,35	797,47	28
42	19,1	598,35	868,5	28
43	4,97	562,27	616,29	30
44	4,97	562,27	745,34	30
45	4,97	562,27	873,39	30
46	12,85	415,24	492,29	23
47	12,85	415,24	629,35	23
48	12,85	415,24	716,38	23
49	17,9	454,78	637,39	25
50	17,9	454,78	708,43	25
51	17,9	454,78	821,51	25
52	14,32	449,76	522,3	25
53	14,32	449,76	621,37	25
54	14,32	449,76	660,41	25
55	1,53	338,19	319,2	20
56	1,53	338,19	448,24	20
57	1,53	338,19	576,3	20
58	14,16	510,78	451,27	24
59	14,16	510,78	564,35	25
60	14,16	510,78	763,45	27
61	19,45	744,72	845,39	43
62	19,45	744,72	789,37	41
63	19,45	744,72	917,47	40
64	22,56	717,43	611,35	30
65	22,56	478,62	611,35	16
66	22,56	478,62	407,9	19
67	19,53	655,98	559,34	34
68	19,53	655,98	763,43	27
69	19,53	655,98	891,49	25
70	12,98	579,26	641,33	31

71	12,98	579,26	827,4	29
72	12,98	579,26	928,45	27
73	16,92	457,77	416,26	22
74	16,92	457,77	517,31	21
75	16,92	457,77	687,41	22
76	27,6	728,74	788,89	29
77	27,6	728,74	845,51	31
78	27,6	728,74	1008,57	31
79	26,39	803,11	1028,61	35
80	26,39	803,11	799,5	30
81	26,39	803,11	957,57	35
82	11,46	597,28	522,18	26
83	11,46	597,28	672,37	33
84	11,46	597,28	901,44	26
85	26,58	822,81	604,87	30
86	26,58	822,81	688,91	26
87	26,58	822,81	998,59	39
88	19,29	754,93	598,33	30
89	19,29	754,93	817,43	45
90	19,29	754,93	1027,57	38
91	18,18	560,29	476,27	30
92	18,18	560,29	589,36	30
93	18,18	560,29	775,43	30
94	13,88	411,74	305,18	23
95	13,88	411,74	531,35	23
96	13,88	411,74	659,41	23
97	9,97	423,23	458,31	25
98	9,97	423,23	572,35	23
99	9,97	423,23	701,39	21
100	19,92	388,74	435,27	19
101	19,92	388,74	548,36	17
102	19,92	388,74	663,38	19
103	5,57	540,28	373,21	35
104	5,57	540,28	829,41	26
105	5,57	540,28	483,74	29
106	10,45	441,72	564,31	23
107	10,45	441,72	651,35	22
108	10,45	441,72	738,38	21
109	4,52	367,19	434,22	21
110	4,52	367,19	549,25	17
111	4,52	367,19	662,34	18
112	21,88	803,84	1100,48	41
113	21,88	803,84	730,31	38
114	21,88	803,84	613,27	46
115	20,03	728,9	550,3	39
116	20,03	728,9	834,47	41
117	20,03	728,9	962,53	39
118	16,81	672,3	769,35	26

119	16,81	672,3	882,44	26
120	16,81	672,3	969,47	26
121	13,59	351,23	444,32	18
122	13,59	351,23	543,39	16
123	13,59	351,23	614,42	17
124	14,51	503,27	720,4	28
125	14,51	503,27	817,45	19
126	14,51	503,27	409,23	20
127	22,39	722,92	428,29	37
128	22,39	722,92	854,53	37
129	22,39	722,92	955,58	37
130	12,77	434,23	565,33	24
131	12,77	434,23	739,4	21
132	12,77	434,23	796,42	22
133	12,41	477,73	553,27	27
134	12,41	477,73	713,3	26
135	12,41	477,73	770,33	24
136	7,63	388,2	476,24	22
137	7,63	388,2	547,27	19
138	7,63	388,2	662,3	19
139	12,85	375,7	343,21	22
140	12,85	375,7	474,25	22
141	12,85	375,7	637,31	22
142	20,72	403,74	397,28	23
143	20,72	403,74	560,34	23
144	20,72	403,74	659,41	23
145	19,66	542,34	600,37	23
146	19,66	542,34	671,41	25
147	19,66	542,34	871,52	23
148	22,14	939,94	1180,52	46
149	22,14	939,94	540,27	46
150	22,14	939,94	802,36	46
151	12,66	392,18	409,19	22
152	12,66	392,18	523,24	22
153	12,66	392,18	620,29	22

TABLEAU 11 :

Transition numéro	Potentiel d'orifice	potentiel d'entrée avant Q0	Potentiel en sortie de cellule de collision	Seuil de positivité
1	80	10	35	2000
2	80	10	35	2000
3	80	10	35	2000
4	80	10	35	600
5	80	10	35	2000
6	80	10	35	1000

7	80	10	35	2000
8	80	10	35	2000
9	80	10	35	2000
10	80	10	35	2000
11	80	10	35	2000
12	80	10	35	2000
13	120	10	18	2000
14	120	10	18	2000
15	120	10	18	2000
16	80	10	35	2000
17	80	10	35	2000
18	80	10	35	2000
19	90	10	15	2000
20	90	10	15	2000
21	90	10	15	2000
22	85	10	24	2000
23	85	10	24	2000
24	85	10	24	2000
25	80	10	35	2000
26	80	10	35	2000
27	80	10	35	2000
28	100	10	17	2000
29	100	10	17	2000
30	100	10	17	2000
31	80	10	35	2000
32	80	10	35	2000
33	80	10	35	2000
34	105	10	20	2000
35	105	10	20	2000
36	105	10	20	2000
37	100	10	11	2000
38	100	10	16	2000
39	100	10	11	2000
40	90	10	16	2000
41	90	10	18	2000
42	90	10	22	2000
43	80	10	35	2000
44	80	10	35	2000
45	80	10	35	2000
46	80	10	35	2000
47	80	10	35	2000
48	80	10	35	2000
49	80	10	35	2000
50	80	10	35	2000
51	80	10	35	2000
52	80	10	35	2000
53	80	10	35	2000
54	80	10	35	2000

55	80	10	35	2000
56	80	10	35	2000
57	80	10	35	2000
58	75	12	11	2000
59	75	12	14	2000
60	75	12	18	2000
61	140	10	35	2000
62	140	10	35	2000
63	140	10	35	2000
64	120	10	35	2000
65	70	10	35	2000
66	70	10	35	2000
67	100	10	35	2000
68	100	10	35	2000
69	100	10	35	2000
70	80	12	15	3500
71	80	12	19	2500
72	80	12	22	4500
73	70	12	10	2000
74	70	12	13	2000
75	70	12	16	2000
76	120	10	35	2000
77	120	10	35	2000
78	120	10	35	2000
79	120	10	35	2000
80	120	10	35	2000
81	120	10	35	2000
82	85	12	13	2000
83	85	12	16	2000
84	85	12	21	2000
85	100	10	35	2000
86	100	10	35	2000
87	100	10	35	2000
88	100	10	35	2000
89	100	10	35	4000
90	100	10	35	2000
91	80	10	35	4000
92	80	10	35	3500
93	80	10	35	6000
94	80	10	35	2000
95	80	10	35	2000
96	80	10	35	2000
97	75	10	11	2000
98	75	10	14	2000
99	75	10	16	2000
100	140	6	10	2000
101	140	6	14	2000
102	140	6	16	2000

103	110	12	10	2000
104	110	12	20	2000
105	110	12	6	2000
106	75	12	14	2000
107	75	12	16	2000
108	75	12	18	2000
109	65	12	18	2000
110	65	12	23	2000
111	65	12	15	2000
112	100	10	35	2000
113	100	10	35	2000
114	100	10	35	2000
115	140	9	14	2000
116	140	9	34	2000
117	140	9	24	2000
118	125	9	18	2000
119	125	9	21	2000
120	125	9	41	2000
121	70	12	10	2000
122	70	12	23	2000
123	70	12	14	2000
124	70	12	17	2500
125	70	12	20	2500
126	70	12	10	2500
127	80	10	35	2000
128	80	10	35	2000
129	80	10	35	2000
130	70	12	14	2000
131	70	12	18	2000
132	70	12	19	2000
133	80	12	14	2000
134	80	12	18	2000
135	80	12	18	2000
136	70	12	12	2000
137	70	12	13	2000
138	70	12	16	2000
139	80	10	35	2000
140	80	10	35	2000
141	80	10	35	2000
142	80	10	35	2000
143	80	10	35	2000
144	80	10	35	2000
145	80	12	16	2000
146	80	12	14	2000
147	80	12	21	2000
148	80	10	35	2000
149	80	10	35	2000
150	80	10	35	2000

151	80	10	35	2800
152	80	10	35	2000
153	80	10	35	2000

- 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
Tension de cône:	5500,00 V
Température de source:	550,00 °C
Gaz de nébulisation:	50,00 psi
Gaz chauffant:	40,00 psi
Gaz de collision induisant dissociation :	9,00 psi
Remplissage dynamique:	inactivé
Temps de cycle total:	1.2 sec
Fenêtre de détection :	90 sec

Les aires obtenues pour chacune des transitions et pour chacun des microorganismes étudiés ont été mesurées. Lorsque l'aire d'une transition est supérieure ou égale au seuil de positivité décrit dans le **TABLEAU 11**, la détection de la transition est considérée comme positive et est notée « 1 » dans le **TABLEAU 12**. Lorsque l'aire d'une transition est inférieure au seuil de positivité décrit dans le **TABLEAU 11**, la détection de la transition est considérée comme négative et est notée « 0 » dans le **TABLEAU 12**. Lorsque les 3 transitions d'un même peptide sont notées « 1 », la détection du peptide est

considérée comme positive. Un cas particulier fait exception à cette règle. Le peptide correspondant aux transitions numéros 49, 50 et 51 a une transition de très faible intensité. Dans ce cas précis, lorsque les transitions 49 et 50 sont notées « 1 », la détection de ce peptide sera considérée comme positive.

TABLEAU 12 :

Transition numéro	Ech21	Ech22
1	0	1
2	0	1
3	0	1
4	1	1
5	1	1
6	1	1
7	1	1
8	1	1
9	1	1
10	1	1
11	1	1
12	1	1
13	0	1
14	0	1
15	0	1
16	0	1
17	0	1
18	0	1
19	1	1
20	1	1
21	1	1
22	1	1
23	1	1
24	1	1
25	0	1
26	0	1
27	0	1
28	0	1
29	0	1
30	0	1
31	0	1
32	0	1
33	0	1
34	1	1
35	1	1
36	1	1
37	0	0
38	0	0
39	0	0

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

88	0	0
89	0	0
90	0	0
91	0	0
92	0	0
93	0	0
94	0	0
95	0	0
96	0	0
97	0	0
98	0	0
99	0	0
100	0	0
101	0	0
102	0	0
103	0	0
104	0	0
105	0	0
106	0	0
107	0	0
108	0	0
109	0	0
110	0	0
111	0	0
112	0	0
113	0	0
114	0	0
115	0	0
116	0	0
117	0	0
118	0	0
119	0	0
120	0	0
121	0	0
122	0	0
123	0	0
124	0	0
125	0	0
126	0	0
127	0	0
128	0	0
129	0	0
130	0	0
131	0	0
132	0	0
133	0	0
134	0	0
135	0	0

136	0	0
137	0	0
138	0	0
139	0	0
140	0	0
141	0	0
142	0	0
143	0	0
144	0	0
145	0	0
146	0	0
147	0	0
148	0	0
149	0	0
150	0	0
151	0	0
152	0	0
153	0	0

Les échantillons Ech21 et Ech22 comportent au moins un peptide caractéristique de VanA. Les bactéries présentes dans les échantillons Ech21 et Ech22 expriment la ligase VanA qui leur confère une résistance à la Vancomycine et à la Teicoplanine.

Ainsi, de façon particulièrement avantageuse, un mécanisme de résistance inductible, tel que le mécanisme de résistance lié à l'expression de VanA, est détecté sans phase d'induction lors de la culture du microorganisme, après une phase de préparation d'échantillon réalisée en moins de 3 heures. Ce procédé permet donc de rechercher rapidement les mécanismes de résistance aux glycopeptides sans *a priori* sur leur éventuel existence.

Exemple 12 : Identification de résistance aux glycopeptides, sans Induction :

Les échantillons Ech23 et Ech24 sont identifiés selon l'une des méthodes décrites dans les exemples 1 à 6. L'identification des espèces est reportée dans le **TABLEAU 13**.

TABLEAU 13 :

Nom	Espèces
Ech23	<i>E. faecium</i>
Ech24	<i>E. faecalis</i>
Ech25	<i>E. faecium</i>

Les échantillons Ech23, Ech24 et Ech25 correspondent à l'espèce, *Enterococcus Faecalis* ou *Enterococcus faecium*, pouvant comporter un mécanisme de résistance de type Van.

La méthode suivante est alors mise en œuvre pour rechercher un tel mécanisme. Chaque échantillon est traité selon l'exemple 10 avec les modifications suivantes :

- Etape 1 : une ligne de colonie de 3 cm est prélevée avec une oese de 10µl (contre une colonie précédemment).
- Etape 7 : ajout de 2 µg de trypsine.

Chaque échantillon est analysé selon l'exemple 8 hormis les éléments mentionnés ci-après.

Les transitions mentionnées dans le **TABLEAU 3** sont détectées en utilisant les paramètres figurant dans les **TABLEAUX 4 et 11**.

Comme dans l'exemple 8 les aires positives sont notées « 1 » dans le **TABLEAU 14**. Les peptides positifs sont détectés selon les règles de l'exemple 8.

TABLEAU 14 :

Transition numéro	Ech23	Ech24	Ech25
1	0	0	1
2	0	0	1
3	0	0	1
4	0	0	1

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

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

83	0	0	0
84	0	0	0
85	0	0	0
86	0	0	0
87	0	0	0
88	0	0	0
89	0	0	0
90	0	0	0
91	1	0	1
92	1	0	1
93	0	0	0
94	0	0	0
95	0	0	0
96	0	0	0
97	0	0	0
98	0	0	0
99	0	0	0
100	0	0	0
101	0	0	0
102	0	0	0
103	0	0	0
104	0	0	0
105	0	0	0
106	0	0	0
107	0	0	0
108	0	0	0
109	0	0	0
110	0	0	0
111	0	0	0
112	0	0	0
113	0	0	0
114	0	0	0
115	0	0	0
116	0	0	0
117	0	0	0
118	0	0	0
119	0	0	0
120	0	0	0
121	0	0	0

122	0	0	0
123	0	0	0
124	0	0	0
125	0	0	0
126	0	0	0
127	0	0	0
128	0	0	0
129	0	0	0
130	0	0	0
131	0	0	0
132	0	0	0
133	0	0	0
134	0	0	0
135	0	0	0
136	0	0	0
137	0	0	0
138	0	0	0
139	0	0	0
140	0	0	0
141	0	0	0
142	0	0	0
143	0	0	0
144	0	0	0
145	0	0	0
146	0	0	0
147	0	0	0
148	0	0	0
149	0	0	0
150	0	0	0
151	0	0	0
152	0	0	0
153	0	0	0

L'échantillon Ech23 comporte au moins un peptide caractéristique de VanB. La bactérie présente dans l'échantillon Ech23 exprime la ligase VanB qui lui confère une résistance à la Vancomycine.

L'échantillon Ech25 comporte au moins un peptide caractéristique de VanA. La bactérie présente dans l'échantillon Ech25 exprime la ligase VanA qui lui confère une résistance à la Vancomycine et à la Teicoplanine.

A l'inverse l'échantillon Ech24 ne présente aucun peptide caractéristique de résistance de type Van. La bactérie présente dans l'échantillon Ech24 peut être sensible aux glycopeptides de type Vancomycine ou Teicoplanine.

Ainsi, de façon particulièrement avantageuse, un mécanisme de résistance inductible, tel que le mécanisme de résistance lié à l'expression de VanB, est détecté sans phase d'induction lors de la culture du microorganisme, après une phase de préparation d'échantillon réalisée en moins de 3 heures. De façon également très avantageuse, tous les mécanismes de résistance aux glycopeptides peuvent être recherchés et détectés simultanément. Ainsi 2 mécanismes de résistance, VanB et VanA sont détectés respectivement dans les échantillons Ech23 et Ech25 en utilisant la même méthode.

Ce procédé permet donc de rechercher rapidement les mécanismes de résistance aux glycopeptides sans *a priori* sur leur éventuel existence.

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.
- [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.
- [7] S. Hofstadler et al., 2005, *Int. J Mass Spectrom.*, 242:23-41.
- [8] D. Ecker, 2008, *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(7):553-558.
- [9] Sujatha,S. & Praharaj,I. Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis* 2012, 781679 (2012
- [10] W.-J. Chen et al., 2008, *Anal. Chem.*, 80 : 9612-9621
- [11] D. Lopez-Ferrer et al., 2008, *Anal. Chem.*, 80 :8930-8936
- [12] D. Lopez-Ferrer et al., 2005, *J. Proteome res.*, 4(5) : 1569-1574
- [13] T. Fortin et al., 2009, *Mol. Cell Proteomics*, 8(5) : 1006-1015.
- [14] H. Keshishian et al., 2007, *Mol. Cell Proteomics*, 2212-2229.
- [15] J. Stal-Zeng et al., 2007, *Mol. Cell Proteomics*, 1809-1817.
- [16] Gaskell, *Electrospray: principles and practise*, 1997, *J. Mass Spectrom.*, 32, 677-688).
- [17] V. Fusaro et al., 2009, *Nature Biotech.* 27, 190-198.
- [18] J. Mead et al., 15 nov 2008, *Mol. Cell Proteomics*, E-pub.
- [19] F. Desiere et al., 2006, *Nucleic Acids Res.*, 34(database issue) : D655-8).
- [20] L. Anderson & C. Hunter, 2006, *Mol. Cell Proteomics*, 573-588).
- [21] B. Han & R. Higgs, 2008, *Brief Funct Genomic Proteomic.*,7(5):340-54).
- [22] K.-Y. Wang et al., 2008, *Anal Chem*, 80(16) 6159-6167).
- [23] J. Bundy & C. Fenselau, 1999, *Anal. Chem.* 71 : 1460-1463.
- [24] K-C Ho et al., 2004, *Anal. Chem.* 76 : 7162-7268.
- [25] Y.S. Lin et al., 2005, *Anal. Chem.*, 77 : 1753-1760.
- [26] S. Vaidyanathan et al., 2001, *Anal. Chem.*, 73 :4134-4144.

- [27] R. Everley et al., 2009, J. Microbiol. Methods, 77:152-158.
- [28] Manes N. et al., 2007, Mol. & Cell. Proteomics, 6(4): 717-727.
- [29] R. Nandakumar et al., 2009, Oral Microbiology Immunology, 24 :347-352).
- [30] L. Hernychova et al., 2008, Anal. Chem., 80 :7097-7104.
- [31] J.-M. Pratt et al., 2006, Nat. Protoc., 1:1029-1043.
- [32] V. Brun et al., 2007, Mol. Cell Proteomics, 2139-2149.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection, pour au moins un microorganisme compris dans un échantillon, d'au moins un marqueur de résistance à un glycopeptide, comprenant la détection, par spectrométrie de masse, d'au moins un peptide ou une protéine dudit microorganisme.
2. Procédé de détection selon la revendication 1, dans lequel la spectrométrie de masse est une spectrométrie de type MS/MS.
3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel la spectrométrie MS/MS est la MRM.
4. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le glycopeptide est la vancomycine.
5. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 4, comprenant une étape préalable à l'étape de détection consistant en l'induction du mécanisme de résistance par mise en contact préalable dudit échantillon avec ledit glycopeptide.
6. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des protéines ou des peptides de type Van choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 5 à 16, 29 à 35, 5 à 71, 80 à 83, 85 à 91, 95 à 102, 104 à 120, 122 à 139 ou 141 à 154.
7. Procédé de détection selon la revendication 6, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des protéines de type VanA choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 5 à SEQ ID N° 16.

8. Procédé de détection selon la revendication 7, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanA choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16.
9. Procédé de détection selon la revendication 5, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des peptides de type VanA choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 5 à SEQ ID N° 16.
10. Procédé de détection selon la revendication 6, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanB choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 29 à SEQ ID N° 35.
11. Procédé de détection selon la revendication 5, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanB choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 32 et SEQ ID N° 33.
12. Procédé de détection selon la revendication 6, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanC choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 59 à SEQ ID N° 71.
13. Procédé de détection selon la revendication 6, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanD choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 80 à SEQ ID N° 83.
14. Procédé de détection selon la revendication 13, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanD choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 80, SEQ ID N° 81 et SEQ ID N° 83.

15. Procédé de détection selon la revendication 5, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanD choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 80, SEQ ID N° 81 et SEQ ID N° 83
16. Procédé de détection selon la revendication 6, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanE choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 85 à SEQ ID N° 91.
17. Procédé de détection selon la revendication 5, dans lequel ledit marqueur de résistance est un marqueur de type VanE correspondant au peptide de séquence SEQ ID N° 89.
18. Procédé de détection selon la revendication 6, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanG choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 95 à SEQ ID N° 102.
19. Procédé de détection selon la revendication 18, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanG choisis parmi les peptides SEQ ID N° 97 et SEQ ID N° 100.
20. Procédé de détection selon la revendication 5, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanG choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 95, SEQ ID N° 96, SEQ ID N° 97, SEQ ID N° 98, SEQ ID N° 100 et SEQ ID N° 102.
21. Procédé de détection selon la revendication 6, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanL choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 104 à SEQ ID N° 120.

22. Procédé de détection selon la revendication 6, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanM choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 122 à SEQ ID N° 139.

23. Procédé de détection selon la revendication 6, dans lequel lesdits marqueurs de résistance sont des marqueurs de type VanN choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 141 à SEQ ID N° 154.