



(51) Classification internationale des brevets :
G01R 33/46 (2006.01) *C12Q 1/10* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2016/051375

(22) Date de dépôt international :
8 juin 2016 (08.06.2016)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1555269 9 juin 2015 (09.06.2015) FR

(71) Déposants : **BIOMÉRIEUX** [FR/FR]; 69280 Marcy l'Etoile (FR). **CNRS** [FR/FR]; 3, Rue Michel Ange, 75794 Paris Cedex 16 (FR). **ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON** [FR/FR]; 15 parvis René Descartes, BP7000, 69342 Lyon Cedex 07 (FR). **UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (UCBL)** [FR/FR]; 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex (FR).

(72) Inventeurs : **CANARD, Isabelle**; 10 rue Emile Guichard, 01360 Loyettes (FR). **ELENA-HERRMANN, Bénédicte**; 6 ter avenue de la Gare, 69250 Albigny sur Saône (FR). **MIRANDE, Caroline**; 38 avenue Roger Salengro, 01500 Ambérieu en Bugey (FR). **PALAMA, Tony**; 23 rue Joseph

Hubert, Appt C17, 31130 Balma (FR). **RAUTUREAU, Gilles**; 1 place Louis Pradel, 69001 Lyon (FR).

(74) Mandataire : **SPRUGNOLI, Claude**; Chemin de l'Orme, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD FOR THE DIFFERENTIATION OF *ESCHERICHIA COLI* AND *SHIGELLA* BACTERIA BY MEANS OF NMR SPECTROMETRY

(54) Titre : PROCÉDÉ DE DISCRIMINATION DES BACTÉRIES *ESCHERICHIA COLI* ET *SHIGELLA* PAR SPECTROMÉTRIE RMN

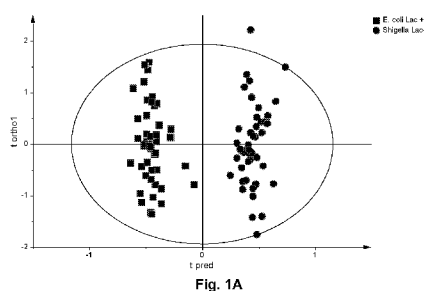


Fig. 1A

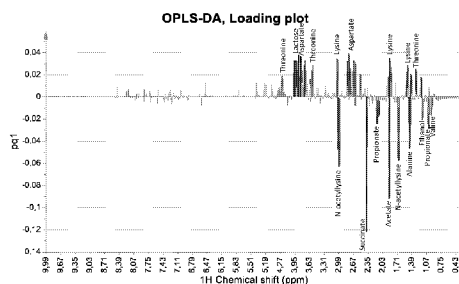


Fig. 1B

(57) Abstract : The invention relates to a method for the proton NMR spectrometry-based differentiation of *Escherichia coli* bacteria and *Shigella* bacteria, said method comprising the steps of: obtaining at least one supernatant of at least one suspension of bacteria that could be *Escherichia coli* or *Shigella*; preparing at least one sample suitable for proton NMR spectrometry analysis, by mixing at least one fraction of at least one supernatant with a deuterated buffer; obtaining at least one NMR spectrum of the at least one sample; analysing the peaks of the at least one spectrum corresponding to the following metabolites: acetate, alanine, aspartate, ethanol, lactose, lysine, Na-acetyllysine, propionate, serine, succinate, threonine and valine; determining if it is *Escherichia coli* or *Shigella* bacteria.

(57) Abrégé : a présente invention concerne un procédé de différenciation par spectrométrie RMN u proton entre une bactérie *Escherichia coli* et une bactérie *Shigella*, ledit procédé omportant les étapes consistant à : - Obtenir au moins un surnageant d'au moins une suspension de bactéries susceptibles d'être *Escherichia coli* ou *Shigella*; - Préparer au moins un échantillon adapté à une analyse en spectrométrie RMN du proton, par mélange d'au moins une fraction du au moins un surnageant avec un tampon deutéré; - Obtenir au moins un spectre RMN du moins un échantillon, - Analyser les pics dudit au moins un spectre correspondant aux métabolites suivant : acétate, alanine, aspartate, éthanol, lactose, lysine, Na-acétyllysine, propionate, sérine, succinate, thréonine et valine; - Déterminer s'il s'agit d'une bactérie *Escherichia coli* ou *Shigella*.



Publiée :

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

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))

Procédé de discrimination des bactéries *Escherichia coli* et *Shigella* par spectrométrie RMN

La présente invention concerne le domaine de la bactériologie. Plus précisément,
5 l'invention concerne la discrimination entre les bactéries de l'espèce *Escherichia coli* et celles du genre *Shigella*.

Depuis la découverte des microbes par Pasteur, les microorganismes sont étudiés par microscopie et analyses biochimiques et quantifiés par cultures quantitatives. Ces
10 méthodes traditionnelles sont souvent longues et fastidieuses et des alternatives analytiques ont très tôt été recherchées.

La détection rapide et l'identification précise des microorganismes et en particulier des bactéries représentent donc un enjeu majeur, tant pour le diagnostic clinique que pour
15 le contrôle microbiologique. Le développement des technologies a permis de disposer de nouveaux outils de diagnostic. Ainsi, l'on a pu voir l'émergence de l'analyse génomique par séquençage, l'identification par spectrométrie de masse, spectrométrie infrarouge ou encore spectrométrie Raman.

La spectrométrie RMN a également fait l'objet de développements dans le domaine de la microbiologie. Ainsi, Delpassand et al. [1] a décrit l'utilisation de la spectrométrie
20 RMN du proton pour identifier différentes espèces bactériennes. En particulier, Delpassand a mis en évidence qu'il était possible d'identifier des bactéries par analyse de molécules intracellulaires, à partir d'une analyse des empreintes spectrales sur quelques suspensions bactériennes.

Plus récemment, Bourne et al. [2] a confirmé qu'il était possible d'identifier des bactéries du genre *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* par analyse
25 multivariée d'empreintes spectrales obtenues sur l'endométabolome bactérien, à partir d'une centaine de suspensions de bactéries Gram positives.

Récemment, il a été démontré que les bactéries du genre *Shigella* sont très proches des

bactéries de l'espèce *Escherichia coli* [3]. En effet, *Shigella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et comprend 4 espèces. D'un point de vue génétique, les 4 espèces de *Shigella* (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. sonnei*) et *Escherichia coli* appartiennent au même groupe génomique. Cette similitude est source de

5 problématiques de santé publique et vétérinaire. En effet, les espèces de *Shigella* sont généralement toujours considérées comme des espèces pathogènes alors que *Escherichia coli* peut être pathogène ou commensale selon les souches. Leur différenciation est donc déterminante pour la mise en place d'un traitement. Il existe à ce jour des méthodes biochimiques ou sérologiques pour différencier ces deux bactéries

10 qui sont complémentaires aux techniques de microbiologie traditionnelles. Néanmoins, ces tests complémentaires sont longs, ce qui augmente de manière significative le temps de rendu des résultats et accentue le risque pour le patient ou l'animal.

Le domaine de la microbiologie est donc dans l'attente d'une méthode permettant de

15 différencier de manière sûre et rapide, *Escherichia coli* de *Shigella*.

Les inventeurs proposent de mettre en œuvre une nouvelle méthode de différenciation *Escherichia coli* / *Shigella* basée sur l'analyse de l'exométabolome bactérien par spectrométrie RMN.

20

L'invention concerne de façon particulière, un procédé de différenciation par spectrométrie RMN du proton entre une bactérie de l'espèce *Escherichia coli* et une bactérie du genre *Shigella*, ledit procédé comportant les étapes consistant à :

- a. Obtenir au moins un surnageant d'au moins une suspension de bactéries
- 25 susceptibles d'être *Escherichia coli* ou *Shigella* ;
- b. Préparer au moins un échantillon adapté à une analyse en spectrométrie RMN du proton, par mélange d'au moins une fraction du au moins un surnageant avec un tampon deutéré ;
- c. Obtenir au moins un spectre RMN du au moins un échantillon,
- 30 d. Analyser les pics dudit au moins un spectre correspondant aux métabolites suivant : acétate, alanine, aspartate, éthanol, lactose, lysine, N α -acétyllysine, propionate, sérine, succinate, thréonine et valine ;

e. Déterminer s'il s'agit d'une bactérie *Escherichia coli* ou *Shigella*.

Le procédé selon l'invention consiste à analyser l'exométabolome bactérien. Par exométabolome, on entend l'ensemble des métabolites d'un système biologique tel qu'une cellule, un tissu, un organe ou un organisme, excrétés dans le milieu extracellulaire ou dans le milieu de culture.

Selon un mode particulier du procédé selon l'invention, si la bactérie *Escherichia coli* ne métabolise pas le lactose, les pics analysés à l'étape d), sont préférentiellement ceux correspondant aux métabolites suivant : acétate, aspartate, lysine, N α -acétyllysine, propionate, sérine, succinate, thréonine.

De façon avantageuse, l'étape a) du procédé selon l'invention comporte les sous-étapes suivantes :

a1) Préparer au moins une suspension de bactéries susceptibles d'être *Escherichia coli* ou *Shigella* à partir d'une ou plusieurs colonies de la même bactérie, de façon à obtenir une concentration bactérienne suffisante ;

a2) Incuber la au moins une suspension de bactéries à une température et pendant une durée suffisantes pour obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance.

Par phase exponentielle de croissance, on entend la phase de croissance pendant laquelle les bactéries se multiplient le plus rapidement. De façon avantageuse, les conditions opératoires du procédé selon l'invention sont adaptées pour que lors de l'analyse RMN, les bactéries soient à la moitié de leur phase exponentielle de croissance

La température d'incubation est quant à elle préférentiellement de 37°C.

De façon avantageuse, le temps d'incubation de suspension de bactéries est compris entre 1 et 2 heures, préférentiellement égal à une heure et demie, lorsque la température d'incubation est de 37°C.

La méthode spectrométrique utilisée est la spectrométrie RMN du proton. De manière préférentielle, la fréquence de résonance utilisée est supérieure ou égale 600 mégahertz (MHz). Une fréquence particulièrement avantageuse est de 600,55 MHz.

- 5 Un spectromètre RMN adapté pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention est par exemple celui commercialisé par la société Bruker sous la référence AVANCE III, couplé à une crysonde TCI CryoProbeTM 5 millimètres (mm) et un système de gestion des échantillons haut débit SampleJet.
- 10 D'autres diamètres de tubes RMN peuvent également être utilisés. Ainsi, il est possible d'utiliser des tubes de diamètre 1,7 mm ou 3 mm, en adaptant le volume d'échantillon utilisé.

- Si une sonde cryogénique est préférée dans le procédé selon l'invention, il est toutefois envisageable d'utiliser d'autres types de sonde RMN, telle qu'une sonde chaude. De
15 telles sondes sont bien connues de l'homme du métier, versé dans l'analyse RMN.

- La séquence d'impulsions pour l'acquisition des spectres RMN 1D du proton préférentiellement utilisée est une séquence NOESY (nuclear Overhauser
20 spectroscopy) avec gradients-z. Toutefois, d'autres séquences d'impulsions peuvent également être utilisées: par exemple, l'acquisition directe avec présaturation de l'eau ('zgpr'), NOESY sans gradient-z, séquence CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill)...

- La température pour l'acquisition des spectres RMN est avantageusement supérieure à
25 0 et peut aller jusqu'à 40°C.

Selon un mode préféré de réalisation, le composé de référence utilisé dans la procédé est l'acide 3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteropropionique (TMSP-d4).

- 30 Le procédé selon l'invention peut néanmoins fonctionner sans ajout de composé de référence, en utilisant l'un des signaux des métabolites présents dans le milieu pour calibrer les spectres (doublet du glucose à 5,23 ppm par exemple).

Le traitement du signal peut être fait sans apodisation ou avec une fonction d'apodisation non exponentielle, un élargissement des raies différent, inférieur ou égal à 1Hz.

- 5 La réduction des spectres peut se faire en utilisant des segments dont la largeur peut être inférieure à 0,001 ppm et aller jusqu'à 0,05 ppm. L'intégration peut être faite en considérant la résolution digitale complète des spectres, sans réduction des données.

La région exclue pour le signal de l'eau peut avantageusement aller de 4,3 à 5,1 ppm.

10

Les expériences peuvent être réalisées dans des conditions de pH différentes dans une gamme allant de 6,0 à 8,0. La valeur de pH préférentiellement utilisée est 7,4.

- 15 Selon l'invention, le tampon deutéré utilisé est avantageusement un tampon à base de KH_2PO_4 . Toutefois, cette solution tampon peut être remplacée par une solution pure de D_2O (dans cette condition, l'utilisation d'une méthode de réalignement des signaux RMN pourra être nécessaire). De même, si selon le mode réalisation préféré, la solution tampon contient du NaN_3 , ce composé peut, selon une alternative technique, être absent du tampon deutéré.

- 20 La concentration de la solution tampon peut être modifiée, pour une molarité du mélange final pouvant aller jusqu'à 250 mM.

- La quantité de surnageant utilisée est comprise entre 200 et 550 μL , pour un volume total après dilution en solution tampon conservé, et à molarité finale du mélange
- 25 équivalente. Avantageusement, le volume de surnageant utilisé est égal à 540 μL .

- Les données de spectrométrie RMN obtenues sont analysées en analyse multivariée supervisée. Une méthode d'analyse supervisée particulièrement adaptée est la méthode OPLS-DA (Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis) décrite
- 30 par Trygg et Wold [4]. Toutefois, il est possible d'utiliser d'autres méthodes d'analyse supervisée, telles que la méthode PLS-DA.

La méthode OPLS-DA est utilisée pour produire un modèle robuste de classification

des échantillons, qui s'associe à une signature métabolique spécifique pour chaque classe d'échantillons considérée. L'analyse OPLS-DA exploite une matrice X des données RMN réduites (N échantillons x M variables RMN considérées) ainsi qu'une matrice supplémentaire Y contenant l'information de classe des échantillons
5 (*Escherichia coli* Lactose + ; *Escherichia coli* Lactose - ; *Shigella*) sur laquelle est effectuée la régression.

Les données sont visualisées sous forme de « score plots », dans lesquels chaque point représente la projection d'un unique échantillon sur les deux premières composantes du
10 modèle (composante prédictive horizontale associée à la classification, et première composante orthogonale). Les « loadings plots » représentent la contribution des variables RMN (correspondant aux métabolites) sur la composante prédictive.

La qualité du modèle OPLS-DA obtenu est évaluée à l'aide des paramètres R^2 et Q^2 qui
15 sont respectivement reliés à la proportion de variance expliquée et prédite par le modèle, calculée par validation croisée des données (par « 7-fold cross-validation » : 6/7 de l'échantillon de taille N est utilisé comme échantillon d'apprentissage et 1/7 de l'échantillon est utilisé comme échantillon test; d'autres valeurs k pour une validation croisée de type k-fold peuvent être utilisées pour valider le modèle ; d'autres méthodes
20 classiques de validation croisée connues de l'homme du métier peuvent être utilisées). Une validation supplémentaire des modèles est effectuée en ré-échantillonnant le modèle 1000 fois, sous hypothèse nulle, par permutations aléatoires de la matrice Y.

Les analyses multivariées ont été conduites en utilisant le logiciel SIMCA-P 13
25 (Umetrics). D'autres plateformes de traitements statistiques équivalentes peuvent toutefois être utilisées.

L'invention sera mieux comprise à la lumière de l'exemple qui suit en lien avec les figures. Cet exemple a pour but d'illustrer l'invention mais n'a aucun caractère
30 limitatif.

La figure 1A est un graphique permettant de comparer les données présentées sous

forme de « score plots », obtenues à partir de suspensions d' *Escherichia coli* Lactose + et de suspensions de *Shigella*.

La figure 1B est un graphique permettant de comparer les données liées aux
5 métabolites d'intérêt, présentées sous forme de « loading plots », obtenues à partir des mêmes suspensions d' *Escherichia coli* Lactose + et de suspensions de *Shigella* que pour la figure 1A.

La figure 2A est un graphique permettant de comparer les données sous forme de
10 « score plots », obtenues à partir de suspensions d' *Escherichia coli* Lactose - et de suspensions de *Shigella*.

La figure 2B est un graphique permettant de comparer les données liées aux
métabolites d'intérêt, présentées sous forme de « loading plots », obtenues à partir des
15 mêmes suspensions d' *Escherichia coli* Lactose - et de suspensions de *Shigella* que pour la figure 2A.

Exemple :

1. Sélection des souches :

20 Dans cette exemple, les inventeurs ont cherché à discriminer par analyse en spectrométrie RMN du proton deux familles d'*Escherichia coli*, une famille d'*Escherichia coli* fermentant le lactose (dite « *Escherichia coli* Lactose + ») et une famille d'*Escherichia coli* ne fermentant pas le lactose (dite « *Escherichia coli* Lactose - »), de *Shigella*.

25

Ainsi 48 souches provenant de la souchothèque bioMérieux, (site de La Balme les Grottes, France) ont été sélectionnées :

- 16 souches d'*Escherichia coli* Lactose +
- 16 souches d'*Escherichia coli* Lactose -
- 30 • 16 souches de *Shigella*

Le tableau 1 ci-après reprend pour chaque type bactérien, le numéro et la référence bioMérieux (N° API) des souches testées :

N° de la souche	Espèce	N°API
1	<i>Shigella boydii</i>	9511152
2	<i>Shigella boydii</i>	9211058
3	<i>Shigella boydii</i>	9103021
4	<i>Shigella boydii</i>	8518292
5	<i>Shigella boydii</i>	8401004
6	<i>Shigella flexneri</i>	9811048
7	<i>Shigella flexneri</i>	9511143
8	<i>Shigella flexneri</i>	9211059
9	<i>Shigella flexneri</i>	8804032
10	<i>Shigella sonnei</i>	9304068
11	<i>Shigella sonnei</i>	9211060
12	<i>Shigella sonnei</i>	9103146
13	<i>Shigella sonnei</i>	9007037
14	<i>Shigella sonnei</i>	8604102
15	<i>Shigella flexneri</i>	8518293
16	<i>Shigella sonnei</i>	8807097
17	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	0208040
18	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	7308009
19	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	8145303
20	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	8147304
21	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	8610007
22	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	9009100
23	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	9012042
24	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	9030345
25	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	9203096
26	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	9204120
27	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	9207041
28	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	9306055

29	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	9702027
30	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	1301204
31	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	1301205
32	<i>Escherichia coli</i> Lactose +	1301206
33	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	1006021
34	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	1109131
35	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	9304017
36	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	1307049
37	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	0007027
38	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8211054
39	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8306016
40	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8312075
41	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8402177
42	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8406013
43	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8408062
44	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8410015
45	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8410016
46	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8410045
47	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8410048
48	<i>Escherichia coli</i> Lactose -	8410062

Tableau 1

2. Culture des bactéries et préparation de l'échantillon :

- 5 La préparation des échantillons est faite de manière à étudier l'exométabolome bactérien et donc le profil métabolique des bactéries décrites ci-dessus. Ainsi, les étapes de préparation des échantillons sont les suivantes :

- Préculture des bactéries sur gélose Columbia (Ref bioMérieux 43041) supplémentée à 5% en sang de mouton. Cette étape est réalisée à deux reprises par repiquage de colonies ;

- Ensemencement d'un milieu Mueller-Hilton liquide (Muller Hinton II Broth Cation Adjusted, Ref. Becton Dickinson 212322) à partir d'une ou plusieurs colonies obtenues à partir des précultures sur gélose Columbia, de manière à obtenir une concentration bactérienne finale des suspensions correspondant à une turbidité de 2 unités McFarland ;
- Incubation des suspensions à 37°C pendant 1h30 ;
- Centrifugation des suspensions bactériennes pendant 10 min à 4000g ;
- Collecte des surnageants dans des tubes Eppendorf et stockage à -80°C.

Les 48 souches bactériennes préparées sont analysées en triplicata. Par ailleurs, un échantillon de milieu de culture Mueller Hinton sans inoculation bactérienne est également analysé en triplicata, après un temps d'incubation identique au temps d'incubation des suspensions bactériennes.

Ce qui fait un total de 147 surnageants à analyser en spectrométrie RMN.

3. Analyse RMN :

a. Préparation des échantillons pour la RMN :

Un tampon est utilisé pour réduire la dispersion de déplacement chimique des signaux RMN qui peuvent se produire du fait des variations de pH ou de force ionique entre les échantillons.

La préparation optimisée est la suivante : 60µL d'un mélange contenant 1,25M de tampon phosphate KH_2PO_4 (pH 7,4) dans le D_2O avec 2mM de NaN_3 et 0,1% de trimethylsilyl propionate (TMSP) est ajouté à 540 µL de surnageant.

Le mélange est agité vigoureusement et 550 µL du mélange est transféré dans un tube RMN 5mm. Chaque tube est placé dans un rack 96 tubes.

L'ensemble des étapes de pipetage, de mélange et de transfert sont réalisées à l'aide d'une plateforme automatisée de gestion de liquide Freedom EVO 75, commercialisée par TECAN.

5 Les racks sont stockés à +4°C jusqu'aux mesures en RMN.

b. Mesures RMN :

Toutes les mesures sont réalisées sur un spectromètre Bruker AVANCE III fonctionnant à une fréquence de résonance protonique de 600,55 MHz, couplé à une
10 cryosonde TCI CryoProbe™ 5 millimètres (mm) et un système de gestion des échantillons haut débit SampleJet, qui permet de maintenir la température des échantillons à +4°C jusqu'à mesure RMN proprement dite.

La température est alors régulée à 300 Kelvins (K) tout au long des mesures
15 RMN. Une séquence d'impulsions standard de RMN 1D ^1H du proton, la séquence NOESY (nuclear Overhauser spectroscopy) avec gradients-z, a été appliquée sur chaque échantillon afin de recueillir le profil métabolique correspondant. 128 acquisitions du signal de précession libre (FID : Free Induction Decays) ont été collectées pour chaque expérience sur une largeur spectrale de 20 ppm. Un délai de
20 récupération de 4 secondes (s), un temps de mélange NOESY de 10 millisecondes (ms), ainsi qu'un gain du récepteur de 40,3 ont été utilisés. La durée de l'impulsion 90° , proche d'une valeur de 14,5 microsecondes (μs) a été calibrée automatiquement sur chaque échantillon. Une série d'expériences de RMN bidimensionnelle (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^1H TOCSY et ^1H J-Résolue) a été enregistrée pour un sous-ensemble d'échantillons
25 afin de permettre l'annotation des signaux des différents métabolites.

c. Analyse des données de spectres RMN ^1H

Une fonction d'apodisation exponentielle, correspondant à un élargissement des raies de 0,3 Hz a été utilisée pour le traitement des signaux de précession libre,
30 avant transformation de Fourier. Une correction de phase manuelle a été appliquée sur les spectres RMN ^1H obtenus, qui ont été référencés par rapport au signal du TMSP

calibré à $\delta = -0,016$ ppm à pH 7,4, sous Topspin 3,1 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Allemagne).

Les spectres ont été réduits pour intégration en segments de largeur constante (0,01 ppm) sur la gamme de déplacement chimique [0,30 ; 10ppm]. La région [4,50 ; 5,01 pm] correspondant au signal résiduel de l'eau a été exclue de l'analyse. Cette réduction des données a été réalisée sous le logiciel AMIX (Bruker), sans normalisation.

Les données sont ensuite exportées dans SIMCA-P 13 (Umetrics, Umea, Suède), pour analyse statistique. L'analyse par OPLS-DA est effectuée avec une répartition selon la méthode Pareto.

4. Analyse des résultats : discrimination *Escherichia coli* / *Shigella*

16 souches différentes ont été analysées par type bactérien (*Escherichia coli* Lactose +, *Escherichia coli* Lactose -, *Shigella*). Les variations entre les souches d'un même type pouvant être importantes, une analyse multivariée supervisée par OPLS-DA a été mise en œuvre afin de ne se focaliser que sur les différences primaires.

- Discrimination *Escherichia coli* Lactose + / *Shigella* :

Comme explicité supra, la qualité du modèle OPLS-DA choisi pour l'analyse des données de RMN est évaluée et validée à l'aide des paramètres R^2 , Q^2 , mais également la valeur p du test CV-ANOVA. Les valeurs correspondantes ainsi que le nombre de composantes prises en compte pour l'évaluation de la qualité du modèle OPLS-SA choisi, sont regroupés dans le tableau 2 ci-dessous :

Nombre de composantes dans le modèle	R^2	Q^2	Valeur p du test CV-ANOVA
1 composant prédictive + 6 composantes orthogonales	0.904	0.906	1.23 e-33

Tableau 2

Comme on peut le voir sur la figure 1A, l'analyse par modèle OPLS-DA permet d'obtenir une bonne séparation entre les souches d'*Escherichia coli* Lactose + et les souches de *Shigella*.

- 5 Lorsqu'on se reporte à la figure 1B, l'analyse « loading plot » nous permet de mettre en évidence les métabolites présents dans les surnageants de culture, et donc faisant partie de l'exométabolome bactérien, qui permettent la discrimination entre les types bactériens, car présents en quantité bien supérieure dans un type bactérien par rapport à l'autre.

10

L'analyse de variables (pics repérés par le déplacement chimique proton en ppm) correspondant aux métabolites discriminants pour la différenciation *Escherichia coli* Lactose + / *Shigella* est reprise dans le tableau 3 ci-dessous :

Déplacement chimique (ppm)	Métabolites	Dominant chez
1,9	Acetate	<i>Escherichia coli</i> Lac+
1,46	Alanine	<i>Escherichia coli</i> Lac+
2.66; 2.67; 2.69; 2.78; 2.81; 3.88; 3.89; 3.90	Aspartate	<i>Shigella</i> sp.
1,17	Ethanol	<i>Escherichia coli</i> Lac+
3.81; 3.82; 3.87; 3.92; 3.93; 3.94; 3.95; 3.96	Lactose	<i>Shigella</i> sp.
1.41; 1.42; 1.49; 1.50; 1.51; 1.86; 1.87; 1.88; 1.89; 1.91; 3.03; 3.73; 3.74; 3.75	Lysine	<i>Shigella</i> sp.
1.44; 1.45; 1.68; 1.69; 1.70; 1.71; 2.99; 3.00; 3.01; 3.02	N α -Acetyllysine	<i>Escherichia coli</i> Lac+
1.04; 1.05; 2.16; 2.17	Propionate	<i>Escherichia coli</i> Lac+
2.38; 2.39	Succinate	<i>Escherichia coli</i> Lac+
1.31; 1.32; 3.57; 3.58; 4.23; 4.24	Threonine	<i>Shigella</i> sp.
0.98; 1.03	Valine	<i>Escherichia coli</i> Lac+

15

Tableau 3

Cette analyse montre que 11 métabolites sont discriminants dans la différenciation *Escherichia coli* Lactose + / *Shigella*. Ces métabolites sont : l'acétate, l'alanine, l'aspartate, l'éthanol, le lactose, la lysine, la N α -acétyllysine, le propionate, le succinate, la thréonine et la valine.

20

- Discrimination *Escherichia coli* Lactose - / *Shigella* :

Comme explicité supra, les valeurs des paramètres R^2 , Q^2 , mais également la valeur p du test CV-ANOVA, ainsi que le nombre de composantes prises en compte pour l'évaluation de la qualité du modèle OPLS-SA choisi pour la discrimination

5 *Escherichia coli* Lactose - / *Shigella* , sont regroupés dans le tableau 4 ci-dessous :

Nombre de composantes dans le modèle	R^2	Q^2	Valeur p du test CV-ANOVA
1 composant prédictive + 7 composantes orthogonales	0.927	0.838	2.7 e-23

Tableau 4

10 Comme on peut le voir sur la figure 2A, l'analyse par modèle OPLS-DA permet d'obtenir une bonne séparation entre les souches d'*Escherichia coli* Lactose - et les souches de *Shigella*.

15 Lorsqu'on se reporte à la figure 2B, l'analyse « loading plot » nous permet de mettre en évidence les métabolites présents dans les surnageants de culture, et donc faisant partie de l'exométabolome bactérien, qui permettent la discrimination entre les types bactériens, car présents en quantité bien supérieure dans un type par rapport à l'autre.

20 L'analyse de variables (pics repérés par le déplacement chimique proton en ppm) correspondant aux métabolites discriminants pour la différenciation *Escherichia coli* Lactose - / *Shigella* est reprise dans le tableau 5 ci-dessous :

Déplacement chimique (ppm)	Métabolites	Dominant chez
1,9	Acetate	<i>Escherichia coli</i>
2.66; 2.67; 2.69; 2.78; 2.81; 3.88; 3.89; 3.90	Aspartate	<i>Shigella sp.</i>
1.41; 1.42; 1.49; 1.50; 1.51; 1.52; 1.86; 1.87; 1.88; 1.89; 1.91; 1.92; 3.03; 3.73; 3.74; 3.75	Lysine	<i>Shigella sp.</i>
1.44; 1.45; 1.68; 1.69; 1.70; 2.99; 3.00; 3.02	N α -Acetyllysine	<i>Escherichia coli</i>
1.04; 1.05; 2.15; 2.16; 2.17; 2.18	Propionate	<i>Escherichia coli</i>
3.82; 3.83; 3.84; 3.91; 3.92; 3.94; 3.95; 3.96; 3.97; 3.99	Serine	<i>Shigella sp.</i>
2.38; 2.39	Succinate	<i>Escherichia coli</i>
1.30; 1.31; 1.32; 3.57; 3.58; 4.23; 4.24; 4.25	Threonine	<i>Shigella sp.</i>

Tableau 5

- 5 Cette analyse montre que 8 métabolites sont discriminants dans la différenciation *Escherichia coli* Lactose - / *Shigella*. Ces métabolites sont : l'acétate, l'aspartate, la lysine, la N α -acétyllysine, le propionate, la sérine, le succinate et la thréonine.

10 Cet exemple permet donc de montrer qu'en analysant par spectrométrie RMN du proton, l'exométabolome bactérien, et en particulier en mesurant la quantité d'un nombre réduit de métabolites issus de cet exométabolome, il est possible de différencier aisément *Escherichia coli* de *Shigella*

15 Le procédé selon l'invention apporte donc un réel intérêt clinique, en diminuant sensiblement le temps nécessaire habituellement pour réaliser une telle différenciation et ainsi permettre la mise en place d'un traitement antibiotique, lorsqu'il se justifie.

Références bibliographiques

- [1] Escherichia S. Delpassand et al., Journal of Clinical Microbiology, May 1995, p. 1258-1262
- 5 [2] R. Bourne et al., Journal of Clinical Microbiology, August 2001, p. 2916-2923
- [3] Di Martino, M.L., et al., Molecular evolution of the nicotinic acid requirement within the Shigella/EIEC pathotype. International Journal of Medical Microbiology, 2013. 303(8): p. 651-661.
- [4] Johan Tryg and Svante Wold, Journal of Chemometrics, Volume 16, Issue 3, pages
10 119–128, March 2002

REVENDICATIONS

1. Procédé de différenciation par spectrométrie RMN du proton entre une bactérie *Escherichia coli* et une bactérie *Shigella*, ledit procédé comportant les étapes consistant à :
 - a) Obtenir au moins un surnageant d'au moins une suspension de bactéries susceptibles d'être *Escherichia coli* ou *Shigella* ;
 - b) Préparer au moins un échantillon adapté à une analyse en spectrométrie RMN du proton, par mélange d'au moins une fraction du au moins un surnageant avec un tampon deutéré ;
 - c) Obtenir au moins un spectre RMN du au moins un échantillon,
 - d) Analyser les pics dudit au moins un spectre correspondant aux métabolites suivant : acétate, alanine, aspartate, éthanol, lactose, lysine, Na-acétyllysine, propionate, sérine, succinate, thréonine et valine ;
 - e) Déterminer s'il s'agit d'une bactérie *Escherichia coli* ou *Shigella*.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel, si la bactérie *Escherichia coli* ne métabolise pas le lactose, les pics analysés à l'étape d), sont ceux correspondant aux métabolites suivant : acétate, aspartate, lysine, Na-acétyllysine, propionate, sérine, succinate, thréonine.
3. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel l'étape a), comporte les sous-étapes suivante :
 - a1) Préparer au moins une suspension de bactéries susceptibles d'être *Escherichia coli* ou *Shigella* à partir d'une ou plusieurs colonies de la même bactérie, de façon à obtenir une concentration bactérienne suffisante ;
 - a2) Incuber la au moins une suspension de bactéries à une température et pendant une durée suffisantes pour obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance.

18

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel le temps d'incubation de la au moins une suspension de bactéries est compris entre 1 et 2 heures, préférentiellement une heure et demie.

5 5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, dans lequel la température d'incubation est de 37°C.

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la fréquence de résonnance utilisée est supérieure ou égale à 600 MHz.

10

7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la fréquence de résonnance utilisée est égale à 600,55 MHz

15

1/2

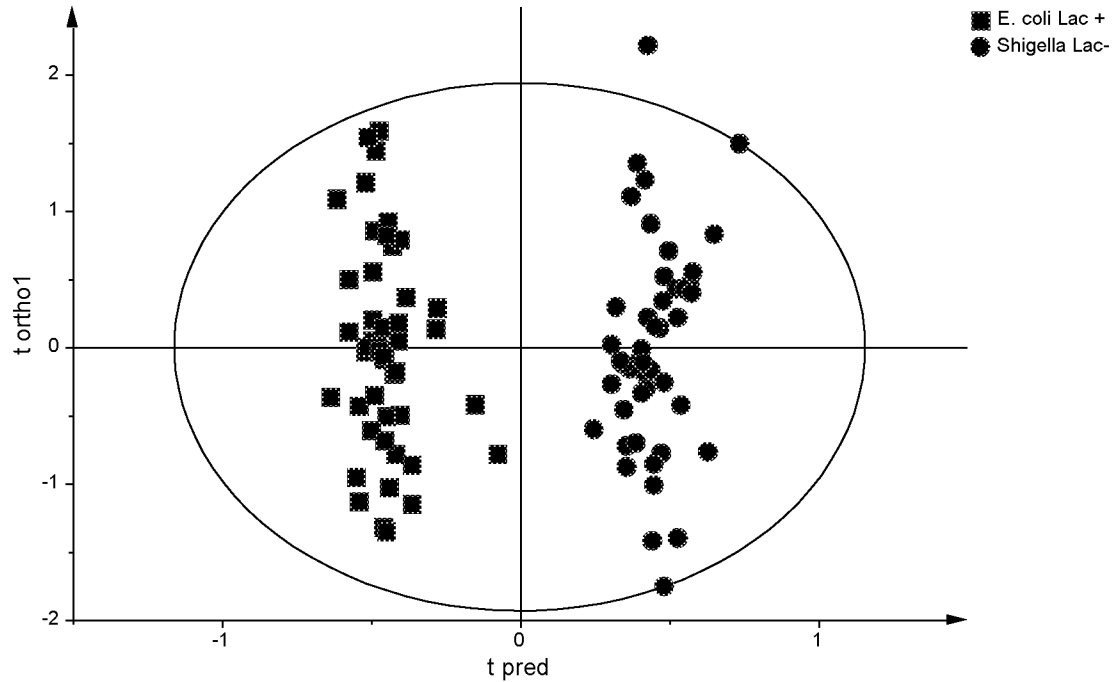


Fig. 1A

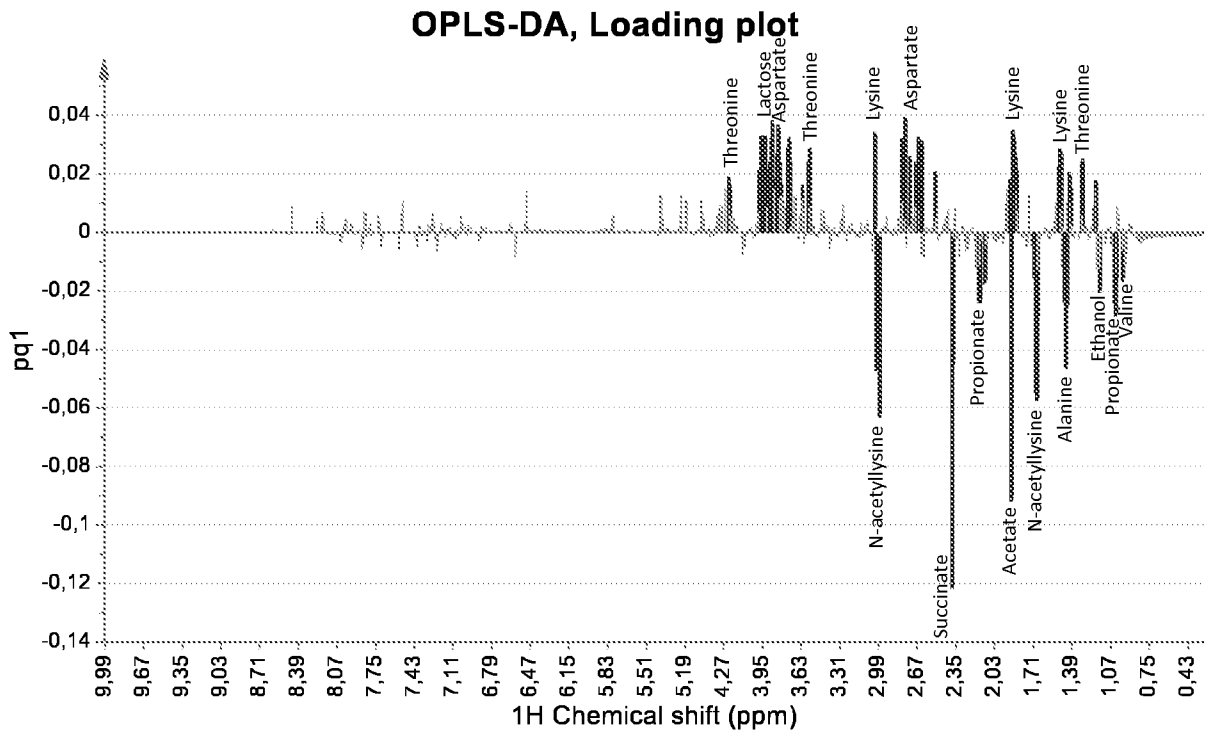


Fig. 1B

2/2

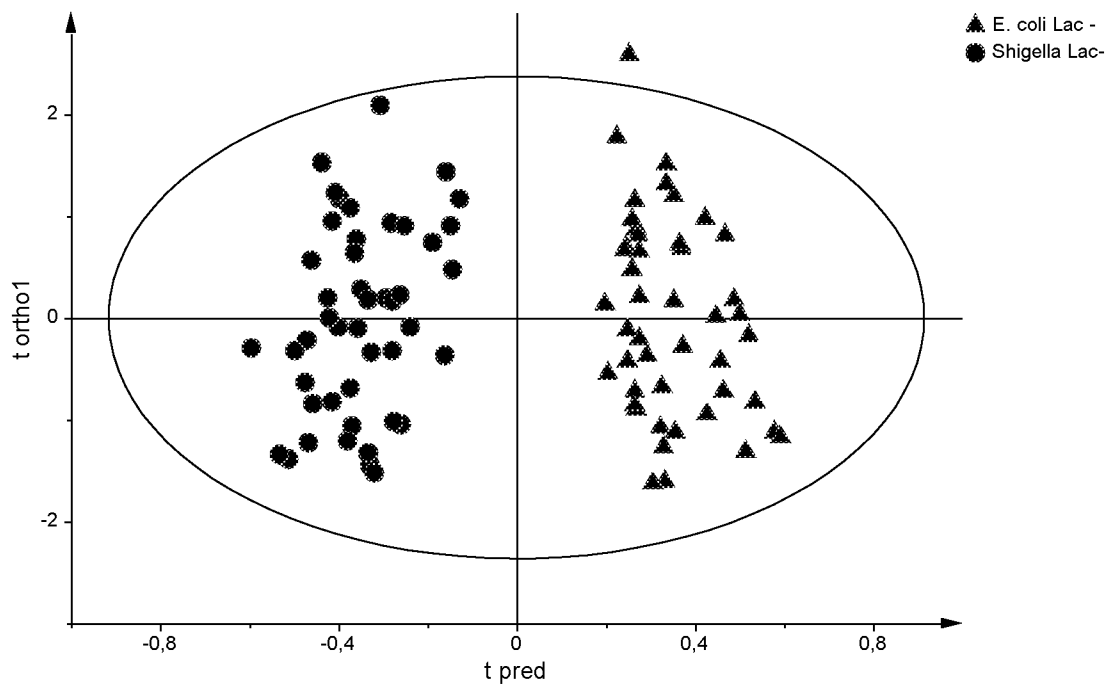


Fig. 2A

OPLS-DA, Loading plot

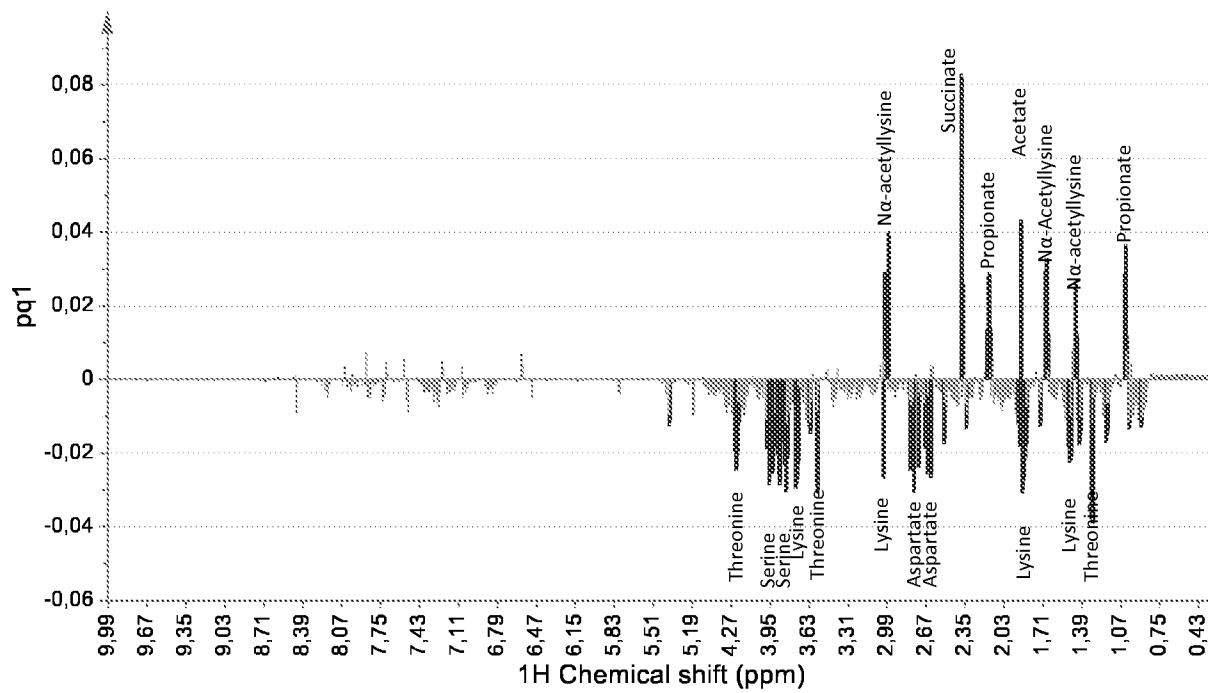


Fig. 2B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2016/051375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. G01R33/46 C12Q1/10
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01R C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DELPASSAND E S ET AL: "RAPID IDENTIFICATION OF COMMON HUMAN PATHOGENS BY HIGH-RESOLUTION PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 33, no. 5, 1 May 1995 (1995-05-01), pages 1258-1262, XP008004477, ISSN: 0095-1137 cited in the application the whole document	1-7
A	US 2002/006611 A1 (PORTUGAL FRANKLIN H [US] ET AL) 17 January 2002 (2002-01-17) the whole document ----- -/-	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 September 2016

Date of mailing of the international search report

04/10/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Raguin, Guy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2016/051375

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIN KINGOMBE CESAR I ET AL: "Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive Escherichia coli and Shigella", JOURNAL OF FOOD PROTECTION, INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR FOOD PROTECTION, US, vol. 68, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 239-245, XP009101856, ISSN: 0362-028X the whole document -----	1-7
A	HSU B M ET AL: "Differentiation and identification of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli in environmental waters by a molecular method and biochemical test", WATER RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 44, no. 3, 29 October 2009 (2009-10-29), pages 949-955, XP026896139, ISSN: 0043-1354, DOI: 10.1016/J.WATRES.2009.10.004 [retrieved on 2009-10-29] the whole document -----	1-7
A	ABU UD-DIN ET AL: "Relationship among Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and their differentiation", BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 45, no. 4, 1 October 2014 (2014-10-01), pages 1131-1138, XP055260603, BR ISSN: 1517-8382, DOI: 10.1590/S1517-83822014000400002 the whole document -----	1-7
A	PRASANNA D. KHOT ET AL: "Novel Approach for Differentiating Shigella Species and Escherichia coli by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 51, no. 11, 28 August 2013 (2013-08-28), pages 3711-3716, XP055260597, US ISSN: 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.01526-13 the whole document ----- -/--	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2016/051375

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	R. BOURNE ET AL: "Identification of Enterococcus, Streptococcus, and Staphylococcus by Multivariate Analysis of Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Data from Plate Cultures", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 8, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 2916-2923, XP055260583, US ISSN: 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.39.8.2916-2923.2001 cited in the application the whole document -----	1-7
A	JOHAN TRYGG ET AL: "Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)", JOURNAL OF CHEMOMETRICS., vol. 16, no. 3, 18 January 2002 (2002-01-18), pages 119-128, XP055260635, GB ISSN: 0886-9383, DOI: 10.1002/cem.695 cited in the application the whole document -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2016/051375

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002006611 A1	17-01-2002	US 2002006611 A1	17-01-2002
		US 2003087227 A1	08-05-2003

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. G01R33/46 C12Q1/10
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
G01R C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DELPASSAND E S ET AL: "RAPID IDENTIFICATION OF COMMON HUMAN PATHOGENS BY HIGH-RESOLUTION PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 33, no. 5, 1 mai 1995 (1995-05-01), pages 1258-1262, XP008004477, ISSN: 0095-1137 cité dans la demande le document en entier	1-7
A	US 2002/006611 A1 (PORTUGAL FRANKLIN H [US] ET AL) 17 janvier 2002 (2002-01-17) le document en entier	1-7
	----- -/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 septembre 2016

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/10/2016

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Raguin, Guy

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BIN KINGOMBE CESAR I ET AL: "Molecular strategies for the detection, identification, and differentiation between enteroinvasive Escherichia coli and Shigella", JOURNAL OF FOOD PROTECTION, INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR FOOD PROTECTION, US, vol. 68, no. 2, 1 février 2005 (2005-02-01), pages 239-245, XP009101856, ISSN: 0362-028X le document en entier -----	1-7
A	HSU B M ET AL: "Differentiation and identification of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli in environmental waters by a molecular method and biochemical test", WATER RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 44, no. 3, 29 octobre 2009 (2009-10-29), pages 949-955, XP026896139, ISSN: 0043-1354, DOI: 10.1016/J.WATRES.2009.10.004 [extrait le 2009-10-29] le document en entier -----	1-7
A	ABU UD-DIN ET AL: "Relationship among Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and their differentiation", BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 45, no. 4, 1 octobre 2014 (2014-10-01), pages 1131-1138, XP055260603, BR ISSN: 1517-8382, DOI: 10.1590/S1517-83822014000400002 le document en entier -----	1-7
A	PRASANNA D. KHOT ET AL: "Novel Approach for Differentiating Shigella Species and Escherichia coli by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 51, no. 11, 28 août 2013 (2013-08-28), pages 3711-3716, XP055260597, US ISSN: 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.01526-13 le document en entier ----- -/--	1-7

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	R. BOURNE ET AL: "Identification of Enterococcus, Streptococcus, and Staphylococcus by Multivariate Analysis of Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Data from Plate Cultures", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 8, 1 août 2001 (2001-08-01), pages 2916-2923, XP055260583, US ISSN: 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.39.8.2916-2923.2001 cité dans la demande le document en entier -----	1-7
A	JOHAN TRYGG ET AL: "Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)", JOURNAL OF CHEMOMETRICS., vol. 16, no. 3, 18 janvier 2002 (2002-01-18), pages 119-128, XP055260635, GB ISSN: 0886-9383, DOI: 10.1002/cem.695 cité dans la demande le document en entier -----	1-7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2016/051375

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2002006611 A1	17-01-2002	US 2002006611 A1 US 2003087227 A1	17-01-2002 08-05-2003
