

Gilbert Greub¹, Carole Kebbi-Beghdadi²

Protéomique en microbiologie

L'analyse à haut débit de la composition protéique de divers échantillons, appelée protéomique, s'est considérablement développée ces dernières années et est très utile dans les laboratoires de microbiologie diagnostique. Ci-dessous, nous discutons les principales applications actuelles de la protéomique en microbiologie médicale.

I – Application de la protéomique en bactériologie diagnostique

L'utilisation du MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight) a révolutionné l'identification des bactéries, des levures et des champignons filamenteux dans les laboratoires diagnostiques de microbiologie [1]. Aujourd'hui, plus de 95% des identifications sont faites en quelques minutes lorsqu'une colonie est disponible sur une gélose [2]. De plus, l'identification obtenue est fiable à plus de 99%. Si initialement, les bases de données n'étaient pas assez complètes et parfois imprécises, aujourd'hui les rares erreurs d'identification sont plutôt liées à des inversions lors du dépôt d'une colonie sur la plaque de MALDI-TOF, un événement rare survenant moins de une fois sur 400 dépôts. L'avènement de l'automatisation (automated colony picking) va permettre prochainement d'éviter cet écueil. Une autre erreur classique d'identification s'observe avec des espèces très proches tel que *S. mitis* et *S. pneumoniae* d'une part ainsi que *Shigella* et *Escherichia coli* d'autre part [2]. L'identification par MALDI-TOF a permis de réduire les coûts et les délais de rendus des identifications, notamment pour les espèces qui nécessitaient une identification par PCR et séquençage, en raison de leurs faibles nombres de caractéristiques phénotypiques et/ou de leur croissance fastidieuse [3].

Le MALDI-TOF a également été utilisé pour raccourcir le délai entre la positivité d'une bouteille d'hémoculture et l'identification [4]. Cette approche permet l'identification de près de 80% des culots bactériens et avec une fiabilité

supérieure à 99% [5]. En pratique, cette approche (brevetée et introduite en routine à Lausanne en 2009) nous permet d'ajuster le traitement antibiotique initial dans 35% des bactériémies à bacilles Gram négatifs [6].

Le MALDI-TOF permet également la détection de la résistance phénotypique, en regardant des pics spécifiques correspondant par exemple à une molécule de meronem après avoir incubé avec cet antibiotique un bacille Gram négatif dont la susceptibilité au meronem n'est pas connue [7]. En présence d'une bactérie productrice de carbapénémase (résistante), le meronem sera clivé et dans cette situation, le pic du meronem disparaîtra ou sera à une position différente qu'initialement. Comme démontré par Vogne et collaborateurs, la fiabilité de la détection phénotypique de la résistance aux antibiotiques par des approches de protéomique telles que le MALDI-TOF ou la mesure de la concentration résiduelle en meronem par spectrométrie de masse (MS-MS) après incubation d'une bactérie de susceptibilité inconnue avec 10 microgrammes de meronem est nettement plus fiable pour la détection des carbapénémases que leur détection par une analyse génotypique [7]. En effet, les PCR multiplex et les microarrays détectant la présence d'une séquence d'ADN codant pour des carbapénémases n'a pas une fiabilité suffisante, puisqu'il y a une grande diversité de carbapénémases et que ces tests génotypiques n'incluent pas l'ensemble des séquences de carbapénémases connues à ce jour [7].

Le MALDI-TOF est également considéré par certains comme un outil qui pourrait être utilisé pour le typage microbien [8, 9]. Cependant le MALDI-TOF, tel qu'utilisé en microbiologie clinique, se base principalement sur la présence de pics liés aux protéines ribo-

Proteomik in der Mikrobiologie

Die Proteomik hat mit der Verringerung des zur Identifizierung von Bakterien erforderlichen Zeitbedarfs die mikrobiologische Diagnostik revolutioniert. Die anderen Anwendungen in den diagnostischen Labors konzentrieren sich hauptsächlich auf die phänotypische Resistenzerkennung und auf die Identifizierung antigenischer Proteine, die die Entwicklung leistungsfähigerer serologischer Tests ermöglichen. In der Mikrobiologie findet die Proteomik selbstverständlich auch in der Forschung verbreitete Anwendung; hier brachte sie zahlreiche neue, grundlegende Erkenntnisse über die Biologie der Bakterien und ergänzte damit die durch Genomik und Transkriptomik gewonnenen Informationen. Die Anwendungsmöglichkeiten in der Forschung sind so zahlreich, dass sie hier nicht alle aufgezählt werden können. Beispielhaft sei an dieser Stelle lediglich die Identifizierung von Adhäsinen und Virulenzfaktoren (insbesondere die Effektoren des Typ-III-Sekretionssystems) genannt, die von gewissen Bakterien zur Manipulation der Wirtszelle sezerniert werden.

somales [2], qui sont des protéines très conservées ne permettant pas une discrimination suffisante pour permettre le typage et dans ces situations, une approche de multi-locus sequence typing (MLST) ou de séquençage d'un génome bactérien complet avec analyse des SNP s'avère plus performant [10].

De même, même si certains auteurs considèrent que le MALDI-TOF pourrait permettre la détection de facteurs de virulence [11], d'autres approches modernes (dont la génomique et/ou l'analyse du protéome par MS/MS) devraient lui être préférées pour analyser de manière fiable le virulome d'une bactérie.

II – Application de la protéomique en sérologie microbienne

La protéomique a également son utilité pour les laboratoires qui souhaitent mettre au point de nouveaux tests sérologiques. Il est en effet possible d'identifier par spectrométrie de masse les protéines antigéniques et non cross-réactives avec d'autres espèces proches [12, 13]. En pratique, le choix des protéines antigéniques qui pourront être utilisées dans le développement de tests ELISA peut être effectué en testant par western blot et/ou par gel deux dimensions des séras de patients souffrant de l'agent en question et des séras de patients souffrant d'une infection par une autre espèce proche et possiblement cross-réactive. Ensuite, tous les antigènes paraissant spécifiques d'un pathogène donné pourront

¹ 1,2) Institut de microbiologie, Université de Lausanne, Centre Hospitalier Vaudois (CHUV), Bugnon 48, Lausanne

être identifiés par MS-MS, puis clonés et exprimés chez *Escherichia coli* pour produire suffisamment de protéines utilisées alors comme antigènes dans un test de type ELISA. Cette démarche a été appliquée à Lausanne pour deux pathogènes émergents: *Parachlamydia* et *Waddlia* [12, 13].

Il est également possible d'utiliser comme antigène l'ensemble des protéines présentes à la surface d'une bactérie, en faisant une extraction des protéines exprimées à la surface et en testant globalement leur antigénicité à l'aide d'un ELISA [14]. Ensuite, si cet ELISA de 1^{ère} génération fonctionne avec ce mélange protéique, il est possible d'évaluer plus finement quel est le composant conférant cette spécificité antigénique et ensuite d'exprimer cette protéine dans *Escherichia coli* pour l'obtenir idéalement pur et non dénaturé et l'utiliser comme antigène dans un test ELISA diagnostique.

III – Conclusion

En conclusion, les quelques exemples mentionnés ci-dessus démontrent que la protéomique a permis une révolution majeure dans le diagnostic microbiologique avec une réduction du temps nécessaire à l'identification bactérienne. Les autres applications dans les laboratoires diagnostiques se concentrent principalement sur la détection phénotypique de la résistance et sur l'identification de protéines antigéniques permettant le développement de tests sérologiques plus performants.

En microbiologie, la protéomique est bien entendu aussi largement utilisée en recherche, où elle a apporté de nombreuses nouvelles connaissances fondamentales sur la biologie

des bactéries, complétant les informations obtenues par génomique et transcriptomique. Dans le domaine de la recherche, les applications sont si nombreuses qu'on ne pourra toutes les évoquer ici. Mentionnons simplement à titre d'exemple l'identification d'adhé-

sines [15] et de facteurs de virulence (notamment les effecteurs du système de sécrétion de type III) sécrétés par certaines bactéries dans le but de manipuler la cellule hôte [16].

Correspondance
Gilbert.Greub@chuv.ch

Références

1. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Nov;16(11):1614-9.
2. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):380-407.
3. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'homme G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2011 Feb;49(2):693-6.
4. Croxatto A, Prod'homme G, Durussel C, Greub G. Preparation of a blood culture pellet for rapid bacterial identification and antibiotic susceptibility testing. *J Vis Exp.* 2014 Oct 15;(92):e51985.
5. Prod'homme G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1481-3.
6. Clerc O, Prod'homme G, Senn L, Jaton K, Zanetti G, Calandra T, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Apr;20(4):355-60.
7. Vogne C, Prod'homme G, Jaton K, Decosterd LA, Greub G. A simple, robust and rapid approach to detect carbapenemases in Gram-negative isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: validation with triple quadrupole tandem mass spectrometry, microarray and PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Dec;20(12):O1106-12.
8. Cheng JW, Liu C, Kudinha T, Xiao M, Yu SY, Yang CX, Wei M, Liang GW, Shao DH, Kong F, Tong ZH, Xu YC. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify MLST clade 4 *Clostridium difficile* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018 Sep;92(1):19-24.
9. Lindgren Å, Karami N, Karlsson R, Åhrén C, Welker M, Moore ERB, Stadler LS. Development of a rapid MALDI-TOF MS based epidemiological screening method using MRSA as a model organism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 Jan;37(1):57-68.
10. Schlegelbusch S, Price GR, Gallagher RL, Horton-Szar V, Elbourne LD, Griffin P, Venter DJ, Jensen SO, Van Hal SJ. MALDI-TOF MS meets WGS in a VRE outbreak investigation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Mar;36(3):495-499.
11. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydière AM, Ader F, Bes M, Lina G, Tristan A, Reverdy ME, Marchand A, Geissmann T, Benito Y, Durand G, Charrier JP, Etienne J, Welker M, Van Belkum A, Vandenesch F. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One.* 2012;7(7):e40660.
12. Greub G, Kebbi-Beghdadi C, Bertelli C, Collyn F, Riederer BM, Yersin C, Croxatto A, Raout D. High throughput sequencing and proteomics to identify immunogenic proteins of a new pathogen: the dirty genome approach. *PLoS One.* 2009 Dec 23;4(12):e8423.
13. Kebbi-Beghdadi C, Lienard J, Uytendaele F, Baud D, Riederer BM, Greub G. Identification of immunogenic proteins of *Waddlia chondrophila*. *PLoS One.* 2012;7(1):e28605.
14. Lienard J, Croxatto A, Gervais A, Posfay-Barbe K, Baud D, Kebbi-Beghdadi C, Greub G. Undressing of *Waddlia chondrophila* to enrich its outer membrane proteins to develop a new species-specific ELISA. *New Microbes New Infect.* 2014 Jan;2(1):13-24.
15. Kebbi-Beghdadi C, Domröse A, Becker E, Cisse OH, Hegemann JH, Greub G. OmpA family proteins and Pmp-like autotransporter: new adhesins of *Waddlia chondrophila*. *Pathog Dis.* 2015 Aug;73(6):ftv035.
16. de Bary M, Greub G. Functional genomics of intracellular bacteria. *Brief Funct Genomics.* 2013 Jul;12(4):341-53.

SOCOREX Service Center

«Metrologie für
Pipetten und
Dispenser
aller Marken»

- Breites Reparatur- und Kalibrationsprogramm
- Technische Beratung durch ein qualifiziertes Team
- Effiziente Erledigung, "Express Service" in nur 48 Std.
- SCS akkreditiertes Kontrolllabor
- Kontrollen gemäss Normen ISO 8655 und ISO 17025
- Socorex Service Center im Internet www.socorex.com

