



Recherche pour la référence

Une thèse liée à la référence :

L'apport de la spectrométrie de masse pour l'investigation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques

J.A. Hennekinne, Afssa, Maisons-Alfort (France)

Le projet ProteomiqES a pour objectif d'élucider l'origine d'épisodes toxiques à staphylocoques. Pour cela, avons nous développé une nouvelle approche analytique utilisant les outils moléculaires et de physico-chimie séparative des protéines, en complément des méthodes microbiologiques et immunochimiques classiquement utilisées. Les résultats montrent une première application intéressante sur des cas de toxi-infections alimentaires collectives.

Les entérotoxines staphylococciques constituent une famille de 23 exoprotéines de 22 à 30 kDa sécrétées dans les matrices alimentaires contaminées par des souches de *Staphylococcus aureus* entérotoxigènes. L'aliment ne devient toxique que si des conditions favorables à une multiplication bactérienne importante et à la toxinogénèse se trouvent réunies.

Compte tenu des propriétés émissantes de certaines de ces entérotoxines, leur ingestion provoque des symptômes gastro-intestinaux avec nausées et vomissements, parfois suivis de diarrhées. En France, en 2007, ces entérotoxines ont constitué la deuxième cause recensée de toxi-infection alimentaire d'origine bactérienne, avec 16,2 % des foyers et 15,8 % des cas (Jourdan da Silva et Vaillant, 2008).

Le diagnostic d'une toxi-infection alimentaire à staphylocoques ne se trouve confirmé que lorsqu'au moins un des paramètres suivants est vérifié : dénombrement de *S. aureus* dans l'aliment suspecté supérieur à 10^5 unités formant colonie par gramme ; détection des entérotoxines staphylococciques dans la matrice alimentaire.

Deux problèmes majeurs se posent pour confirmer le diagnostic des épisodes toxiques à staphylocoques. D'une part, ces pathogènes sont sensibles aux traitements thermiques appliqués aux aliments alors que les entérotoxines ne le sont pas, et d'autre part les méthodes de détection des entérotoxines staphylococciques actuellement disponibles ne couvrent pas l'ensemble des 23 entérotoxines décrites à ce jour.

Ainsi, et afin de proposer une alternative innovante aux tests immuno-enzymatiques utilisés pour la recherche des entérotoxines staphylococciques dans les matrices alimentaires, le Laboratoire d'étude de la dynamique des protéomes du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) de Grenoble et le Laboratoire d'études et de recherche sur la qualité des aliments et des procédés agro-alimentaires de l'Afssa ont développé une méthode de quantification de ces contaminants par spectrométrie de masse.

Cette méthode utilise comme étalons internes des protéines recombinantes entières (PSAQ: Protein Standard Absolute Quantification) biochimiquement identiques aux protéines

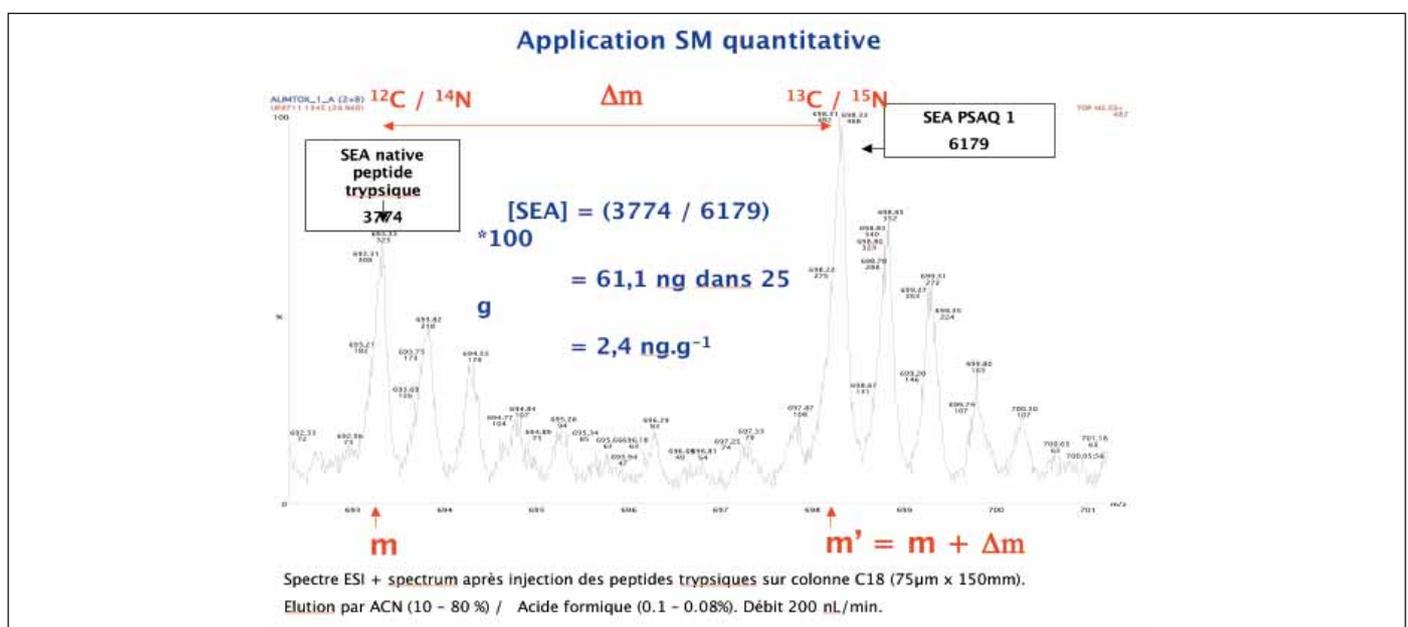


Figure 2. Exemple de spectres obtenus suite au passage par spectrométrie de masse quantitative d'un échantillon de fromage naturellement contaminé en SEA et supplémenté en PSAQ.



Recherche pour la référence

naturelles à doser. Ces étalons PSAQ sont alourdis par incorporation de [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$] L-lysine et de [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$] L-arginine lors de leur biosynthèse en système acellulaire (ProteoMaster, Roche).

Les étalons internes PSAQ se comportent comme les protéines cibles naturelles (figure 2) et peuvent être ajoutés préalablement à tout traitement de l'échantillon, permettant ainsi d'éviter tout biais dû au processus analytique (figure 3). Ainsi, la technique PSAQ est la seule à prendre en compte les rendements des étapes de pré-fractionnement, de purification et de digestion trypsique.

Cette méthodologie a été appliquée avec succès pour quantifier l'entérotoxine staphylococcique de type SEA dans différentes matrices alimentaires complexes (Dupuis *et al.*, 2008; Hennekinne *et al.*, 2008). Ces premiers résultats suggèrent que cette méthode pourrait être étendue aux autres entérotoxines staphylococciques et être utilisée à terme dans le processus analytique de caractérisation étiologique des toxi-infections alimentaires, dans le cadre de nos missions de référence au niveau national et communautaire. Un projet de recherche NRBC (ayant trait à la gestion des risques nucléaires, radiologiques, biologiques et chimiques) entre les laboratoires du CEA et de l'Afssa et visant à poursuivre la mise au point de la spectrométrie de masse quantitative pour l'analyse des entérotoxines staphylococciques dans les aliments a débuté début 2009.

Références

- Dupuis A, Hennekinne JA, Garin J, Brun V. 2008. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics*. 8(22): 4633-36. doi: 10.1002/pmic.200800326. <http://www3.interscience.wiley.com/journal/121448051/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>.
- Hennekinne JA, Brun V, De Buyser ML, Dupuis A, Ostyn A, Dragacci S. 2009. Innovative contribution of mass spectrometry to characterise staphylococcal enterotoxins involved in food outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(3): 882-884. doi:10.1128/AEM.01924-08. <http://aem.asm.org/cgi/content/full/75/3/882?view=long&pmid=19074605>.
- Jourdan-Da Silva N, Vaillant V. 2008 Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives en France. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 23(1): 7-14.

Application SM quantitative

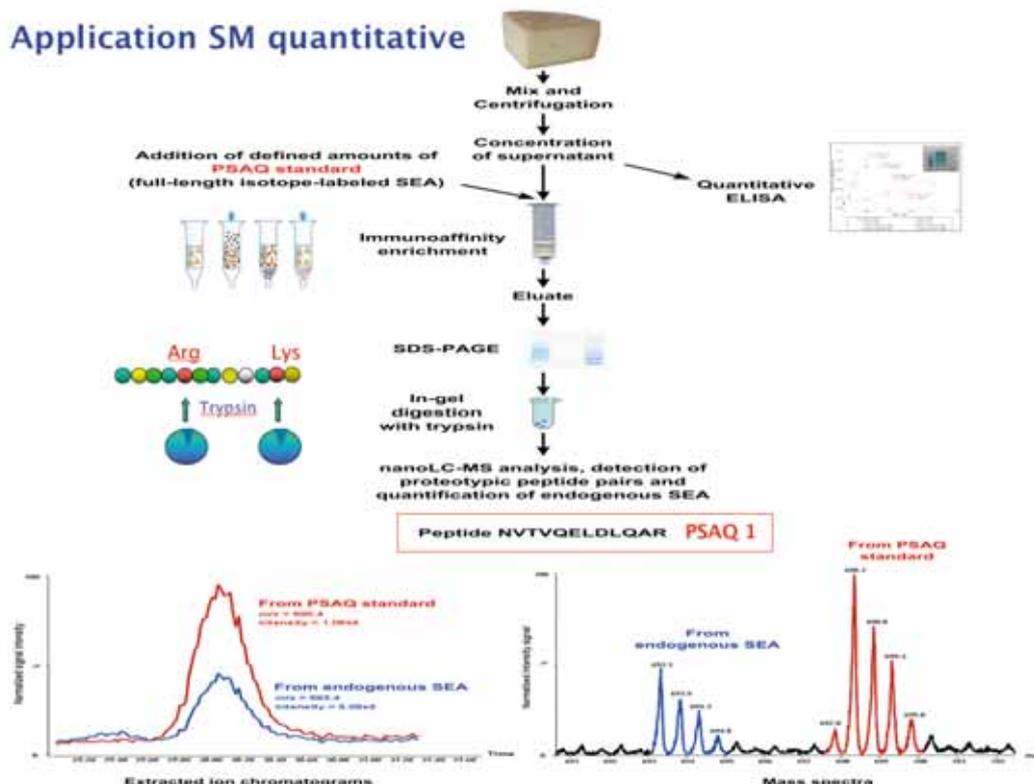


Figure 3: Processus analytique utilisant la spectrométrie de masse quantitative pour le dosage de la SEA sur matrice fromagère contaminée.