



**HAL**  
open science

## Développement de biopuces dédiées à la détection de bactéries pathogènes à faibles taux

Sihem Bouguelia

► **To cite this version:**

Sihem Bouguelia. Développement de biopuces dédiées à la détection de bactéries pathogènes à faibles taux. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENS016 . tel-00872457

**HAL Id: tel-00872457**

**<https://theses.hal.science/tel-00872457>**

Submitted on 13 Oct 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologies pour la santé / Pharmacie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Sihem BOUGUELIA**

Thèse dirigée par **Thierry LIVACHE** et

Codirigée par **Yoann ROUPIOZ** et **Pascal MAILLEY**

Préparée au sein du Laboratoire **CREAB /SPrAM /INAC /CEA  
Grenoble**

Dans l'École Doctorale d'Ingénierie pour la Santé, la Cognition  
et l'Environnement (EDISCE)

# Développement de biopuces dédiées à la détection et quantification de bactéries pathogènes à faibles taux

Thèse soutenue publiquement le **12/10/2012**,

Devant le jury composé de :

**M. Emmanuel DROUET**

Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble, Président

**M. Bruno LE PIOUFLE**

Professeur à SATIE ENS Cachan, Rapporteur

**M. Philippe RENAUD**

Professeur à l'EPFL, Lausanne, Rapporteur

**M. Thierry LIVACHE**

Directeur de thèse, ingénieur CEA Grenoble, Membre

**M. Yoann ROUPIOZ**

Co-directeur, chargé de recherches CNRS, CEA Grenoble, Membre

**M. Abdelkader BOUBETRA**

Responsable du département Biologie, ISHA Paris, Invité





« Pour que la loi du progrès existât, il faudrait que chacun voulût la créer »  
Charles Baudelaire

A ma famille,



## Remerciements

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein du « Groupe de Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude des Assemblages Biologiques » dirigés par monsieur Thierry Livache et monsieur Yoann Roupioz, à l'Institut de Nanosciences et de Cryogénie du CEA Grenoble.

Je souhaite adresser mes remerciements :

Aux membres de jury de cette thèse : M. Emmanuel Drouet et M. Abdelkader Boubetra, qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail ; M. Bruno Le Pioufle et M. Philippe Renaud pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux et d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Au groupe pneumocoque (IBS, Grenoble) : Thierry Vernet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, Claire Durmort pour son implication dans le projet. Les autres scientifiques, doctorants et personnels techniques que j'ai côtoyé durant cette période également.

A Thierry Livache pour la confiance qu'il m'a accordée, pour le grand intérêt qu'il a porté à mes travaux, mais aussi pour son soutien et ses conseils au quotidien. « Thierry, je n'oublierai jamais nos discussions constructives et tardives au laboratoire (oui, plutôt disponible en fin de journée !). Je te remercie du fond du cœur de m'avoir appris comment voir la science avec un œil de chercheuse ».

A Yoann Roupioz pour l'encadrement et le suivi au quotidien pendant le master et la thèse. Je te remercie pour ton efficacité, ton écoute, ton organisation et tes conseils avisés. J'ai appris à mieux maîtriser ma sensibilité grâce à toi.

A toute l'équipe du CREAB : Roberto Calmczuk pour ses conseils et son aide sur le volet modélisation, Loïc Leory pour la partie optique et instrumentale, Sébastien Dumenil pour tous les problèmes techniques rencontrés. Ainsi qu'à toutes les personnes qui ont directement participé à la réussite de ce projet.

A André, Yanxia, Radek, Feriel, Sami, Laure, Camille, Maria, Loïc...et tous les autres membres du CREAB passés et présents, pour leur gentillesse, leur joie de vivre et pour avoir amélioré chaque jour l'ambiance au sein du laboratoire.

A l'équipe de la jeune société PrestoDiag, à laquelle je souhaite une grande réussite.

Enfin, je remercie infiniment ma famille, et plus particulièrement mes parents et mon ami pour leurs encouragements et leur soutien sans faille pendant les moments difficiles...Et bien sûr un grand merci à tous mes amis, les membres de la Dream Team du LTM et d'Aitap.



# Détection et quantification de bactéries à faible taux par SPRi

## Résumé:

Le protocole standard pour le diagnostic des bactéries dans le domaine médical et agro-alimentaire reste la culture microbienne, qui requiert plusieurs jours pour identifier l'agent pathogène. Or, ces temps de latence ne sont pas forcément compatibles avec l'urgence de détecter rapidement la présence de bactéries pathogènes. Il y a un besoin croissant de développer de nouveaux outils pour identifier les bactéries pathogènes en un temps plus court.

Afin d'atteindre cet objectif, la technologie de l'imagerie par Résonance des Plasmons de Surface (SPRi) a été utilisée avec succès pour la détection spécifique de différentes populations bactériennes durant leur croissance, en utilisant des protéines et/ou des anticorps comme molécules de biorecognition des surfaces bactériennes. Ainsi, la détection spécifique de un à plusieurs milliers de pathogènes/ml peut être réalisée en quelques heures seulement.

Dans ce travail, plusieurs souches bactériennes ont été utilisées comme modèles d'étude (*Streptococcus pneumoniae* R6, *Escherichia coli* K1); ainsi qu'un agent pathogène réel (*Salmonella* Enteritidis), apportant la preuve que cette méthode peut être élargie à d'autres souches. D'autre part, les résultats peuvent être quantitatifs par l'établissement d'une courbe d'étalonnage, permettant ainsi de remonter à la concentration initiale d'un échantillon contaminé. La stratégie développée au cours de ce travail se base sur le couplage simultané de la culture bactérienne et de la détection/identification spécifique, en utilisant l'imagerie SPR.

**Mots clés:** Imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi), *Streptococcus pneumoniae*, *E.coli* K12, *Salmonella* Enteritidis, croissance bactérienne, interactions, détection, capture, diagnostic, agro-alimentaire, pathogènes.

## Low Level Bacteria Detection and Quantification using SPRi

### Abstract:

The standard protocol for bacterial diagnosis in the medical and agri-food fields remains microbial culture, which takes several days to identify the pathogen. However, these time lags are not necessarily compatible with the urgency to rapidly detect the presence of pathogenic bacteria. There is a strong need to develop new tools for identifying pathogenic bacteria in a shorter time.

To achieve this goal, Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) technology has been successfully used for the specific detection of bacterial populations during their growth, using proteins and/or antibodies as bio-recognition molecules targeting bacterial surfaces. Thus, the specific detection of one to thousand pathogens/ml could be achieved within few hours.

Several bacterial strains were used as models in this work (*Streptococcus pneumoniae* R6, *Escherichia coli* K12); as well as a real pathogen (*Salmonella* Enteritidis) providing the proof that this method can be enlarged to other strains. The results can be quantitative by establishing a calibration curve, allowing extrapolation of the initial concentration of a contaminated sample. The strategy developed in this work, is based on the simultaneous coupling of the bacterial enrichment with the specific detection and identification, using the SPR imaging technique.

**Keywords :** Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi), *Streptococcus pneumoniae*, *E.coli* K12, *Salmonella* Enteritidis, bacterial growth, interactions, detection, capture, diagnosis, agri-food, pathogens.

# Sommaire

Contexte de réalisation .....	7
Chapitre I.....	9
<b><u>Principes de la détection bactérienne</u></b>	
<b>I.1 Les micro-organismes pathogènes.....</b>	<b>11</b>
<b>I.2 Les micro-organismes pathogènes d'origine alimentaire .....</b>	<b>12</b>
<b>I.3 Détection de micro-organismes pathogènes .....</b>	<b>14</b>
I.3.1 Techniques conventionnelles en diagnostic bactériologique.....	16
<b>I.3.1.1 Méthodes basées sur la culture et le comptage des colonies .....</b>	<b>17</b>
<b>I.3.1.2 Méthodes basées sur la détection de l'ADN .....</b>	<b>18</b>
<b>I.3.1.3 Méthodes basées sur la détection immunologique.....</b>	<b>20</b>
I.3.2 Technologies émergentes (pratiques récentes).....	21
<b>I.3.2.1 Détection bactérienne non spécifique ou tests de stérilité.....</b>	<b>21</b>
<b>I.3.2.2 Détection bactérienne spécifique.....</b>	<b>24</b>
I.3.3 Limitations et défis : la sensibilité, la spécificité et le temps de détection .....	32
<b>Références bibliographiques du Chapitre I.....</b>	<b>35</b>
Chapitre II .....	41
<b><u>Détection des bactéries par SPR: "l'approche statique"</u></b>	
<b>II.1 Stratégie de la détection.....</b>	<b>44</b>
<b>II.2 Fabrication de la puce.....</b>	<b>45</b>
II.2.1 Adressage des ligands sur les surfaces par électro-copolymérisation .....	47
II.2.2 Greffage électrochimique .....	48
<b>II.3 Choix du modèle bactérien.....</b>	<b>50</b>
<b>II.4 Détection des bactéries en point final.....</b>	<b>52</b>
II.4.1 Validation de la capture par microscopie optique .....	53
II.4.2 Validation de la capture par immunofluorescence .....	54
<b>II.5 Détection des bactéries en temps réel sans traceur .....</b>	<b>56</b>
II.5.1 Le phénomène de Résonance Plasmonique de Surface (SPR).....	56
II.5.2 Description du montage expérimental de la SPRi .....	58
II.5.3 La détection des bactéries par SPR.....	60
<b>II.5.3.1 Etat de l'art de la détection bactérienne par SPR.....</b>	<b>61</b>
<b>II.5.3.2 La détection statique par imagerie SPR.....</b>	<b>63</b>
<b>Références bibliographiques du Chapitre II .....</b>	<b>68</b>

Chapitre III .....	73
<b><u>L'approche dynamique pour la détection bactérienne</u></b>	
<b>III.1 Problématique de la détection de la bactérie unique.....</b>	<b>75</b>
<b>III.2 Notions fondamentales sur la croissance bactérienne .....</b>	<b>77</b>
III.2.1 Le cycle de la croissance bactérienne en milieu non renouvelé.....	77
III.2.2 Loi de la croissance bactérienne.....	78
<b>III.3 Suivi de la croissance du pneumocoque par SPRi .....</b>	<b>79</b>
III.3.1 Principe de l'approche dynamique .....	79
III.3.2 Première expérimentation pratique de l'approche CCM.....	80
III.3.3 Optimisation du processus de croissance sur puce.....	83
<b>III.4 Aspect quantitatif de l'approche dynamique.....</b>	<b>89</b>
<b>III.5 Extension à la détection d'une autre bactérie : <i>Escherichia coli</i> K12 .....</b>	<b>92</b>
<b>Références bibliographiques du Chapitre III.....</b>	<b>94</b>
Chapitre IV .....	97
<b><u>Application à la détection de bactéries pathogènes</u></b>	
<b>IV.1 Détection d'un pathogène en agroalimentaire : Exemple de la salmonelle .....</b>	<b>99</b>
IV.1.1 Classification et caractéristiques de Salmonella (antigène O, H et Vi) .....	102
IV.1.2 Les salmonelloses .....	103
<b>IV.1.2.1 Les gastro-entérites .....</b>	<b>104</b>
<b>IV.1.2.2 Fièvres typhoïde et paratyphoïdes.....</b>	<b>106</b>
IV.1.3 Le Diagnostic de la salmonelle .....	108
<b>IV.1.3.1 Diagnostic clinique et microbiologique .....</b>	<b>108</b>
<b>IV.1.3.2 Détection dans les aliments, l'eau ou l'environnement .....</b>	<b>108</b>
IV.1.4 Application de l'approche dynamique à la recherche de Salmonella .....	108
<b>IV.1.4.1 Essais préliminaires dans le milieu de culture artificiellement contaminé</b> .....	107
<b>IV.1.4.2 Détection de Salmonella dans un mélange de populations bactériennes</b>	118
<b>IV.1.4.3 Détection de bactéries dans une matrice alimentaire complexe ....</b>	<b>119</b>
<b>IV.2 Ouverture vers des applications médicales : l'Antibiogramme intégré.....</b>	<b>126</b>
IV.2.1 Introduction .....	126
IV.2.2 Arrêt de la croissance de bactéries par un antibiotique suivi en SPRi.....	129
IV.2.3 Test simultané de deux souches aux profils de résistance aux antibiotiques différents ..	131
IV.2.4 Conclusion et Perspectives d'intégration d'un antibiogramme à la technique de CCM .	132
<b>Références bibliographiques du Chapitre IV .....</b>	<b>135</b>

Chapitre V .....	137
<b><u>Conclusions et Perspectives</u></b>	
Chapitre VI.....	143
<b><u>Section expérimentales</u></b>	
<b>VI. 1 Matériel et réactifs .....</b>	<b>145</b>
VI.1.1 Produits chimiques :.....	145
VI.1.2 Matériel consommable :.....	145
VI.1.3 Matériel non consommable :.....	146
VI.1.4 Anticorps :.....	146
VI.1.5 Protéines :.....	146
VI.1.6 Tampons :.....	146
VI.1.7 Milieux de culture :.....	147
VI.1.8 Bactéries :.....	147
<b>VI. 2 Procédures expérimentales .....</b>	<b>147</b>
VI.2.1 Réaction de couplage des IgG et des protéines au Pyrrole .....	148
VI.2.2 Purification des IgG polyclonaux (anti-CbpE) par colonne d'exclusion .....	149
VI.2.2.1 Production et purification de la protéine recombinante CbpE.....	149
VI.2.2.2 Purification de l'anticorps anti-CbpE .....	149
VI.2.3 Culture bactérienne .....	151
VI.2.4 Les expérimentations Culture-Capture-Mesure des bactéries par SPRi .....	152
<b>Annexes .....</b>	<b>153</b>
<b>Annexe A : Traitements de données SPRi .....</b>	<b>155</b>
<b>Annexe B : Cotes de la cuve en PEEK utilisée pour la CCM.....</b>	<b>155</b>
<b>Annexe C: Méthode de référence pour la détection de la salmonelle dans les aliments</b>	<b>156</b>
<b>Annexe D : Références normatives en microbiologie alimentaire .....</b>	<b>158</b>
<b>Annexe E : Capture et désorption de bactéries sur puce (système de tri cellulaire).....</b>	<b>159</b>
<b>Annexe F : Liste des communications scientifiques .....</b>	<b>163</b>



# *Contexte de réalisation*

L'objectif de ce projet de thèse vise dans un premier temps, l'optimisation du diagnostic bactériologique, en utilisant la technologie SPRi. Le but étant de développer une plate-forme de biopuce adaptable à la détection et à l'identification des microorganismes pathogènes, ainsi qu'à la détection et l'identification des profils de résistance et de sensibilité aux antibiotiques.

En particulier, nous avons étudié l'effet du couplage simultané de la culture, de la capture, ainsi que de la mesure en temps réel de la détection spécifique des bactéries sur la biopuce. Cette approche nous a permis de significativement réduire les délais d'analyse des échantillons, comparativement à des méthodes de détection sans croissance (dans un tampon sans nutriments). Nous regroupons ces dernières sous le terme de « l'approche statique » pour les différencier de la détection dynamique pendant la croissance des microorganismes.

Dans un deuxième temps, nous avons artificiellement contaminé des matrices plus complexes, pour imiter des échantillons réels, tels que le lait demi-écrémé et le lait cru, et vérifié ainsi la versatilité et la robustesse de notre système de détection.



# **Chapitre I**

---

## *Principes de la détection bactérienne*



La contamination bactérienne des ressources alimentaires et de l'eau, ainsi que l'incidence croissante des infections nosocomiales, sont des éléments qui nous poussent aujourd'hui à développer de nouveaux moyens de détection et d'identification rapide et efficace des bactéries pathogènes. En outre, les risques de menaces de la sécurité personnelle et territoriale (secteur militaire) rendent cette tâche encore plus urgente.

Les outils de détection classiques sont souvent encombrants, onéreux à l'achat, mais nécessitent surtout un temps d'analyse de quelques heures à plusieurs jours. L'intérêt de développer de nouveaux outils de diagnostic bactériologiques rapides est par conséquent de plus en plus important pour les scientifiques, les industriels et les organismes de réglementation. Ces dernières années, beaucoup de développements dans le domaine de la détection des agents pathogènes ont été effectués, tentant de fournir des résultats plus précis, rapides, spécifiques de l'analyte et robustes.

Dans ce premier chapitre, après une introduction générale sur les micro-organismes pathogènes, nous faisons un tour d'horizon sur l'état de l'art de la détection bactérienne, allant des méthodes conventionnelles aux pratiques récentes et technologies émergentes.

## **I.1 Les micro-organismes pathogènes**

Un micro-organisme ou microbe, est un organisme vivant microscopique, invisible à l'œil nu, qui ne peut être observé qu'à l'aide d'un microscope. Un micro-organisme *pathogène*, est tout micro-organisme (virus, bactérie, protozoaire, etc.) apte à provoquer une maladie chez d'autres organismes, l'homme ou les animaux. Dans certains cas, l'agent causal d'une maladie est hautement spécifique d'une espèce donnée, ou seulement de certaines souches particulières de cette espèce. C'est l'exemple de « la maladie du charbon » ou « l'anthrax » qui ne peut être provoquée que par certaines souches de *Bacillus anthracis*. Ces souches particulières produisent « la toxine du charbon » et disposent d'une capsule qui les protège.

Parfois, la maladie peut être causée par un micro-organisme, habituellement non pathogène, qui constitue la flore normale de notre organisme, et qui suite à un déséquilibre, devient un pathogène *opportuniste*. L'apparition de la maladie suite à une exposition au

pathogène n'est pas systématique, en effet, celle-ci dépend souvent de divers facteurs, notamment le degré de résistance de l'hôte (immunodépression, facteurs génétiques) et la virulence de l'agent pathogène.

## **I.2 Les micro-organismes pathogènes d'origine alimentaire**

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les toxi-infections alimentaires comme des maladies, généralement de nature infectieuse ou toxique, provoquées par des agents qui pénètrent dans l'organisme par ingestion de nourriture. L'incidence mondiale des maladies d'origine alimentaire est difficile à estimer, il a été rapporté qu'en 2005, 1,8 millions de personnes sont mortes de maladies diarrhéiques et une grande proportion de ces cas est attribuée à la contamination de la nourriture et de l'eau potable (Rapport OMS, 2007) [1].

Bien que déjà connues, certaines maladies transmises par les aliments sont considérées comme émergentes, parce qu'elles sont devenues plus courantes récemment. On a par exemple signalé depuis longtemps des épidémies de salmonellose, mais l'incidence de cette infection s'est accrue au cours des 25 dernières années sur plusieurs continents [2]. En Amérique du nord et en Europe, le sérovar *Salmonella* Enteritidis est devenu la souche prédominante. Bien qu'il existe des pathogènes divers identifiés dans le secteur agroalimentaire, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, et *Escherichia coli* O157: H7 ont été généralement jugées responsables de la majorité des toxi-infections alimentaires [3, 4]. Une liste des micro-organismes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires est présentée dans le tableau 1.1.

Micro-organisme/ Nom de la maladie	Aliments associés	Dose infectieuse (nb. de bactéries ingérées)	Période d'incubation	Symptômes
<i>Salmonella spp.</i> « Salmonellose »	Œufs crus/pas assez cuits, volaille et viande ; lait cru et produits laitiers ; fruits de mer ; chocolat ; salade et épices. 15 - 20	15 - 20	12 à 24 h	Douleurs d'estomac, diarrhée, nausées, frissons, fièvre et maux de tête
<i>Escherichia coli</i> « Colite hémorragique »	Œufs crus/pas assez cuits, volaille et viande ; lait cru et produits laitiers ; fruits de mer et végétaux feuillés	< 10	2 à 4 jours	Douleurs d'estomac, diarrhée, nausées, frissons, fièvre et maux de tête
<i>Listeria monocytogenes</i> « Listériose »	Fromage à pâte molle, lait cru, crème glacée, salades, viande crue et volaille	< 1000	2 jours à 3 semaines	Fièvre, frissons, maux de tête, maux de dos, parfois douleurs abdominales et diarrhée
<i>Campylobacter jejuni</i> « Campylobactériose »	Lait cru, viande crue ou mal cuite, volaille et crustacés	400 - 500	2 à 5 jours	Fièvre, maux de tête, douleurs musculaires suivies de diarrhées, douleurs abdominales et nausées
<i>Bacillus cereus</i> «Toxi-infection à B.cereus»	Viandes, lait, légumes, poisson, riz, pâtes et fromage	> 10 <sup>6</sup> /g	30 min à 15 h	Diarrhée, crampes abdominales, nausée et vomissements
<i>Clostridium perfringens</i> « Toxi infections alim. A Perfringens »	Viandes mal cuites, produits carnés et sauces	> 10 <sup>8</sup>	8 à 22 h	Crampes abdominales et diarrhée
<i>Shigella</i> « Shigelloses »	Salade, légumes crus, produits laitiers et volaille	<10	12 à 50 h	Douleurs abdominales, crampes, fièvre, vomissement et

				diarrhée sanguinolente
<i>Yersinia enterocolitica</i> « Yersinioses »	Viande (principalement le porc), huîtres, poisson, et lait cru	inconnu	1 à 3 jours	Diarrhée et/ou vomissements ; fièvre et douleurs abdominales
<i>Vibrio vulnificus</i> « Syndrome de septicémie primaire »	Huîtres crues ou contaminées, palourdes et crabes.	<100	<16 h	Diarrhée, infections de plaies
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> « Gastroenterites à <i>V.parahaë</i> »	Poissons, huîtres et fruits de mer crus, mal cuits ou recontaminés.	> 1 million	4 h à 4 jours	Diarrhée, crampes abdominales, nausée, vomissements, mal de tête, fièvre et frissons

**Tableau 1.1 :** Liste non exhaustive des microorganismes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires.

Il existe de nombreux programmes méthodiques comme les Bonnes Pratiques de Fabrication [5], les bonnes pratiques agricoles [6] et le système des points de contrôle critiques pour l'analyse des risques (HACCP) [7, 8]; afin de réduire le risque de contamination des aliments par des micro-organismes pathogènes à la source. Cependant, le rôle des technologies de détection de pathogènes est essentiel, car c'est la clé de la prévention et de l'identification des problèmes liés à la santé et la sécurité sanitaire.

### I.3 Détection de micro-organismes pathogènes

La détection d'espèces biologiques telles que les virus ou les bactéries est un enjeu de plus en plus important dans de nombreux domaines (médical, sécurité alimentaire, environnemental, militaire, etc.) [9]. L'identification phénotypique des bactéries est utilisée depuis plus d'une centaine d'années dans les laboratoires de microbiologie pour identifier les agents pathogènes. Comme ces méthodes sont basées sur les propriétés de croissance des micro-organismes, une incubation d'au moins 18 heures est nécessaire à l'identification des bactéries et, en général, un minimum de 36 à 48 heures s'écoulent avant que l'on obtienne les résultats de l'analyse des échantillons. Or les enjeux économiques et sanitaires nécessitent de

réduire ces délais à quelques heures, voir quelques minutes, tout en disposant d'une portabilité et d'un coût réduit des dispositifs.

Dans le domaine médical, par exemple, le clinicien prescrit souvent, en premier lieu, des antibiotiques à large spectre, en attendant le résultat de l'analyse bactériologique. Parfois, il ne vérifiera les résultats d'analyses que s'il y a échec thérapeutique. Si le médecin connaissait l'identité de l'agent infectieux responsable de la maladie de son patient, il serait en mesure de prescrire immédiatement le traitement approprié. En plus de diminuer les coûts liés à la thérapie, cela limiterait les échecs thérapeutiques ainsi que la sélection de mutants résistants aux antibiotiques.

Dans le secteur agro-alimentaire, comme les produits frais se périment rapidement, ils sont mis sur le marché avant que les résultats des tests microbiologiques sur différents lots soient disponibles. Ainsi, l'industriel prend le risque de mettre des aliments potentiellement contaminés à disposition des consommateurs dans les rayons de vente, puis de les retirer en cas de confirmation de cette contamination.

Le test diagnostique idéal est rapide, simple à mettre en œuvre et peu coûteux. Ce test doit être assez rapide (de quelques heures maximum) et nécessiter peu d'étapes pour être fait sur place. Idéalement, le test détecte une multitude de pathogènes et identifie les profils de résistance aux antibiotiques.

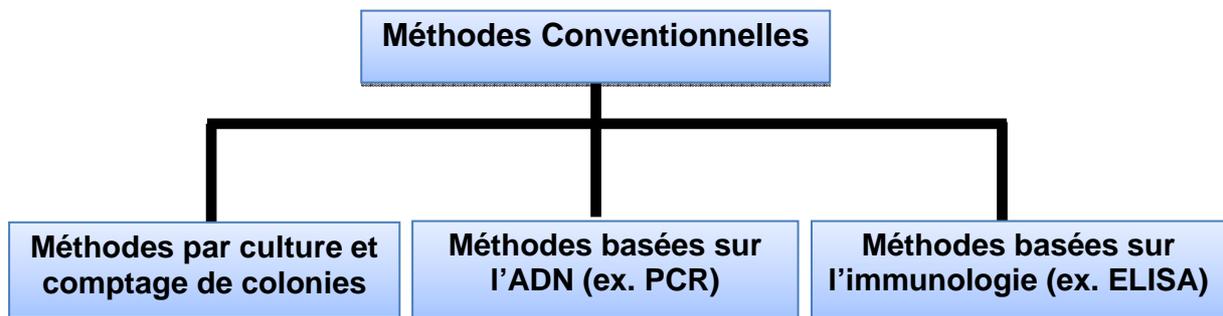
La technologie des biopuces peut répondre à ces exigences, car elle permet d'aligner plusieurs cibles sur une surface de quelques centimètres carrés. Quatre critères permettent l'évaluation des qualités analytiques d'un test diagnostique. Le test doit être rapide, spécifique, sensible et ubiquitaire. La spécificité est définie comme étant la capacité de différencier des espèces différentes, mais apparentées et l'ubiquité est la capacité de détecter toutes les souches d'une même espèce. En ce qui concerne la sensibilité analytique, la limite de détection de la méthode doit permettre de détecter la dose infectieuse, c'est-à-dire la quantité minimale de micro-organismes nécessaires à l'infection. Quelques exemples de doses infectieuses sont présentés dans le tableau 1.1.

Tout d'abord, nous allons faire un rappel sur les méthodes traditionnelles utilisées pour la détection des pathogènes au cours des dernières décennies, en soulignant leurs forces

et leurs faiblesses. Puis nous introduirons les technologies émergentes et nous circonscribons les défis à relever pour améliorer ces systèmes.

### I.3.1 Techniques conventionnelles en diagnostic bactériologique

Les méthodes conventionnelles utilisées pour la détection et l'identification des agents pathogènes, reposent principalement sur l'identification microbiologique et biochimique. Ces méthodes nécessitent un pré-enrichissement préalable des échantillons avant de passer à l'étape de l'analyse. Nous proposons une classification de ces méthodes traditionnelles en trois groupes, comme illustré dans la figure 1.1. Le premier groupe rassemble les méthodes basées sur la culture impliquant le comptage des colonies ; le deuxième groupe concerne les méthodes basées sur l'analyse immunologique impliquant les interactions antigènes-anticorps ; et le troisième implique des réactions d'amplification génique de type PCR, qui consiste à amplifier l'ADN bactérien pour son identification.



**Figure 1.1 :** Différentes méthodes conventionnelles employées pour la détection de pathogènes.

Bien que ces méthodes soient sensibles, peu coûteuses pour certaines et donnent à la fois des informations qualitatives et quantitatives des micro-organismes testés, elles sont grandement limitées par le temps nécessaire pour l'identification de la bactérie, mais aussi par le temps nécessaire à l'enrichissement initial.

L'enrichissement initial dit pré-enrichissement, est une étape indispensable pour détecter les agents pathogènes qui se trouvent généralement en faible nombre dans les aliments. Cette étape est utilisée dans toutes les méthodes conventionnelles et permet aux pathogènes éventuellement présents dans l'échantillon de se multiplier en abondance (facteur allant de  $10^3$  à  $10^9$  selon la rapidité de la croissance) ; ils deviennent ainsi facilement

déTECTABLES par la suite. Le pré-enrichissement est également une étape nécessaire à la croissance des bactéries soumises à un stress, ou endommagées par des facteurs comme l'exposition à la chaleur, la congélation, la déshydratation, les agents de conservation, une forte pression osmotique ou d'importantes fluctuations de température. Souvent, le pré-enrichissement est réalisé en mettant la prise d'essai dans un milieu non sélectif de type eau peptonée tamponnée. La solution homogénéisée obtenue est ensuite placée à l'étuve à 37°C pendant 18 à 20 heures.

### ***1.3.1.1 Méthodes basées sur la culture et le comptage des colonies***

Traditionnellement, la première étape de l'identification bactérienne, consiste à en obtenir une culture pure contenant un seul isolat bactérien. A partir de cette culture, on va confronter un certain nombre de caractères morphologiques, culturels et biochimiques de cet organisme inconnu, avec ceux des nombreuses espèces connues jusqu'à trouver une similitude. L'origine de l'organisme fournit souvent des indications qui, ajoutées à quelques observations et tests simples, peuvent conduire à l'identité possible de l'organisme ou tout au moins, de circonscrire la recherche à l'un des principaux groupes bactériens.

On déterminera souvent en premier lieu une palette de critères typiques, parce qu'elle offre une plus grande valeur distinctive, chacun d'entre eux permettant d'exclure un ou plusieurs des principaux groupes bactériens : (i) la réaction à certains colorants, particulièrement la coloration de Gram ; (ii) la morphologie à l'aide d'un frotti coloré sous microscope (coque, bacille, etc.) ; (iii) la mobilité (à ne pas confondre avec le mouvement brownien<sup>1</sup>) ; (iv) la capacité à croître en aérobie et/ou anaérobie ; (v) la capacité à former des endospores (forme de résistance de la bactérie, au contraire de la forme végétative).

Lorsque le champ d'identification possible a été réduit à une ou quelques familles, les tests métaboliques, dits « biochimiques » sont de rigueur pour l'affiner. Ceux-ci vont distinguer des bactéries d'espèces et de genres différents, en détectant les différences entre leurs métabolismes. Parmi ces méthodes, on retrouve le plus fréquemment, le test de l'oxydase, de la catalase, de la coagulase (pour le staphylocoque), d'oxydation-fermentation, la formation d'acide ou de gaz à partir de sucres, les tests IMViC (indole, rouge de

---

<sup>1</sup> Un mouvement brownien est un mouvement involontaire induit par l'agitation moléculaire d'un liquide.

méthylène, test de Voges-Proskauer et test au citrate), production de sulfure d'hydrogène, réduction de certains composés ainsi que plusieurs tests enzymatiques (uréase, phénylalanine désaminase, décarboxylases, phosphatases, etc.).

Ces quelques tests cités ci-dessus (parmi de nombreux tests existants) sont fréquemment effectués dans les laboratoires, et parfois sous forme de microméthodes (système de tests multiples). Ces microméthodes sont des protocoles miniaturisés, dits kits commerciaux, que l'on utilise fréquemment en bactériologie, pour effectuer simultanément toute une série d'identification de routine, sur une bactérie donnée. Parmi elles, on retrouve le système de *Galeries API*®, *Staph-Ident*®, *Enterotube II*®, *Rapidec Staph*®...etc. Ces systèmes ne sont néanmoins pas robotisés à ce jour et nécessitent l'implication obligatoire du manipulateur.

Les méthodes conventionnelles basées sur la culture sont utilisées comme méthode de référence pour la détection de plusieurs agents de toxi-infections alimentaires, tels que *L. monocytogenes* [10, 11], *S. aureus*, *Salmonella*, *Coliformes*, *E. coli* [12], *Campylobacter jejuni* [13] et *Yersinia enterocolitica* [14] etc. La méthode standard pour la détection de *L. monocytogenes* peut nécessiter jusqu'à 7 jours pour donner des résultats, car elle repose sur la capacité des micro-organismes à se multiplier et à donner des colonies visibles à l'œil nu [10].

### ***1.3.1.2 Méthodes basées sur la détection de l'ADN***

L'utilisation des techniques classiques de culture bactérienne pour la recherche de bactéries pathogènes dans les échantillons pose des problèmes de spécificité, de sensibilité et de délai de réponse. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique alternative, rapide et spécifique, qui permet d'identifier la bactérie par la mise en évidence d'un ou plusieurs fragments de son génome. Dans les cas des bactéries pathogènes pour lesquelles les techniques classiques de détection, lorsqu'elles existent, sont complexes, longues et peu fiables, la PCR constitue une très bonne alternative. Récemment, la PCR a été rapportée comme étant la méthode la plus sensible pour la détection de *Salmonella* dans les fruits de mer (31,6 %), comparée à des méthodes culturales (21,3 %) et à l'ELISA (23,7 %) [15]. La PCR multiplexe est très utile pour la détection simultanée de plusieurs souches bactériennes [16] ; Kim et al ont pu détecter *E. coli O157:H7*, *Salmonella*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* et le *Vibrio parahaemolyticus* simultanément [17].

En contre partie, contrairement aux techniques classiques qui montrent que les bactéries mises en évidence sont des bactéries viables, la PCR détecte aussi bien les bactéries mortes que vivantes sans pouvoir les distinguer, l'ADN de ces dernières étant toujours présent. De plus, le seuil de détection de ces bactéries est parfois trop élevé pour le contrôle réglementaire. En effet, la PCR utilise de très petits volumes d'échantillon (mesurés en microlitres), de sorte que l'échantillon lui-même doit contenir au moins  $10^3$  cellules / ml. En cas de concentration trop faible de l'ADN extrait, il est possible d'améliorer la détection en recourant à une technique comme la séparation immuno-magnétique, qui concentre des fragments d'ADN de séquences spécifiques [18] (ex. *Mycobacterium paratuberculosis* dans le lait).

Dans le but d'améliorer la méthode PCR et de pouvoir différencier les bactéries vivantes et mortes ; des travaux visant à quantifier des bactéries viables par traitement préalable à l'EMA ou PMA (agents intercalants inhibant la détection des bactéries non viables par altération de leur ADN) associé à une PCR quantitative ont été réalisés [19, 20]. Il est à noter que la limite de détection obtenue dans ces travaux est située à environ 500 copie génome, qui est le seuil de quantification qPCR. De plus, une surestimation des bactéries viables apparaît pour un ratio supérieur à une bactérie viable pour 1000 bactéries tuées par la chaleur (1/1000) [20, 21]. Enfin, l'agent intercalant EMA peut pénétrer les cellules vivantes de certaines espèces bactériennes perméables au produit (perte de plus de 60% de l'ADN génomique d'*E.coli O157:H7*, de *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *M.luteus*, *M. avium* et *S. sobrinus*) [19]. Ainsi, l'association d'agent intercalant à la détection par qPCR permet de discriminer des bactéries vivantes de celles tuées par la chaleur, à condition qu'elles soient en nombre suffisant (quelques centaines au minimum) avec un nombre limité de bactéries mortes ; souvent il sera nécessaire de pré-enrichir les solutions bactériennes.

D'autres méthodes telles que le polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) [22], l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) [23, 24], ou le test de compétition par sonde [25] (PACE 2 pour la *Chlamydia*), sont également utilisées pour l'identification et le génotypage de bactéries pathogènes. Néanmoins, leurs inconvénients sont sensiblement les mêmes que pour la PCR, à savoir, des seuils de détection trop élevés pour être conformes à la réglementation, la rapidité qui n'est pas satisfaisante pour l'identification de certaines bactéries (indispensable dans des cas cliniques où le pronostic vital est engagé) et le caractère

viable ou pas de ces bactéries (détecter des bactéries mortes dans des échantillons stérilisés a peu d'intérêt par exemple).

### ***1.3.1.3 Méthodes basées sur la détection immunologique***

Les méthodes basées sur les interactions antigènes-anticorps sont largement utilisées pour la détection de pathogènes d'origine alimentaire. Elles ne sont pas plus spécifiques ou sensibles que les méthodes basées sur les acides nucléiques, mais ont l'avantage d'être plus rapides et robustes. Elles ont notamment la capacité de détecter non seulement les micro-organismes pathogènes, mais aussi les toxines qu'elles produisent et qui peuvent ne pas être exprimées au niveau du génome de l'organisme [26].

Parmi les méthodes immunologiques, nous pouvons citer les tests sérologiques d'agglutination [27, 28], la séparation immuno-magnétique [29-31], les tests d'immuno-précipitation [32], le test bandelette par immuno-chromatographie [33], mais encore les méthodes immuno-enzymatiques (EIA pour *enzyme immuno-assays*) telle que l'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [34-36]. Les automates VIDAS® et Mini-VIDAS® (bioMérieux), Tecra Salmonella ELISA (International Bioproducts), et Salmonella Tek ELISA (Organon Teknika) sont basées sur la technique ELISA. Les temps de détection spécifique de bactéries varient entre 24 et 52 heures. Le plus souvent, un enrichissement est nécessaire, puisque la plupart des tests immunologiques nécessitent  $10^4$  cellules/ml pour assurer la détection [37].

En dépit de leur temps d'analyse inférieur par rapport à des techniques culturales traditionnelles, la détection immunologique n'a pas la capacité de détecter des micro-organismes en "temps réel" ; il est également nécessaire d'utiliser des solutions pré-enrichies pour avoir une sensibilité suffisante. Ces méthodes immunologiques se trouvent aujourd'hui couplées avec d'autres méthodes pour une détection plus efficace des pathogènes, tels que la combinaison de la séparation immuno-magnétique avec la cytométrie en flux pour la détection de *L. monocytogenes* [38].

### **I.3.2 Technologies émergentes (pratiques récentes)**

Cette partie présente une étude bibliographique recensant les principales technologies émergentes, pour la détection de bactéries, et plus particulièrement les enjeux des biopuces et microsystèmes, ainsi que les limites de ses derniers.

Nous pouvons classer ces méthodes alternatives en deux groupes, selon le mode de détection (spécifique et non spécifique) :

#### ***I.3.2.1 Détection bactérienne non spécifique ou tests de stérilité***

Ce sont des techniques de détection généralement basées sur la détection indirecte de la croissance bactérienne et souvent utilisées comme tests de stérilité dans le secteur biomédical et pharmaceutique. Parmi ces techniques, les plus utilisées sont :

##### **a) Bioluminescence de l'Adenosine Tri-Phosphate (ATP)**

L'ATP ou Adénosine Tri-Phosphate est un intermédiaire énergétique majeur et obligatoire de très nombreuses réactions du métabolisme cellulaire. C'est la rupture des liaisons entre les différents groupes phosphate qui est responsable de la libération d'énergie. Toute cellule vivante produit et consomme de l'ATP ; ce coenzyme est donc spécifique des milieux vivants, et toute trace d'ATP est le témoin d'une trace de vie (cellules vivantes ou ayant vécu, car l'ATP n'est pas détruit en totalité à la mort de la cellule). Le dosage de l'ATP est par conséquent utile pour la détection d'une contamination bactérienne [39].

Pour effectuer ce type de dosage, la lumière émise par la réaction enzymatique de bioluminescence utilisant la luciférine et la luciférase de luciole, en présence de l'ATP, est mesurée à l'aide d'un luminomètre. Plus précisément, l'ATP intervient dans l'étape d'activation du complexe luciférase-luciférine, dont l'oxydation est à l'origine d'une émission lumineuse. Comme toute forme de vie contient de l'ATP, les applications en microbiologie sont basées sur le prélèvement des échantillons contenant des micro-organismes, la lyse des cellules et la mesure de la quantité de lumière émise par le milieu contenant à l'origine la luciférine et l'enzyme luciférase. Le dosage d'ATP par la méthode luciférine-luciférase caractérise la présence ou l'absence de micro-organismes et est essentiellement utilisé pour

détecter des contaminations dans l'eau ou des milieux stériles [40]. Les automates PallCheck (Pall Company), Milliflex (Millipore Corporation), Rapiscreen (Celsis), sont tous des luminomètres utilisant cette technique de dosage. Le lecteur PallCheck peut détecter de 10–100 cellules/100 ml dans des échantillons préalablement filtrés [41]. Une variante de cette technique utilise l'Adenylate Kinase (AK) qui est un composant cellulaire libéré par les cellules vivantes dans le milieu ; l'AK réagit avec l'ADP pour produire de l'ATP, ce dernier est ensuite détecté par la méthode de l'ATP bioluminescence [42]. L'utilisation de cette technique améliore sensiblement les seuils de détection du système, jusqu'à 4 cellules par échantillon [43]. L'AKuScreen de Celsis est un automate qui utilise cette technologie.

La technique d'ATP Bioluminescence permet de diminuer le temps de la détection d'un tiers comparée aux méthodes conventionnelles. Malgré son intérêt comme test de stérilité, cette approche ne peut pas être appliquée à la détection de bactéries d'origine alimentaire sur des matrices complexes telle que la viande. En effet, l'ATP est présent aussi bien dans les cellules eucaryotes (animales) que procaryotes (bactériennes). Empêchant ainsi la détection de bactéries dans de la viande ou tout autre échantillon d'origine animale ou végétale.

### **b) La détection CO<sub>2</sub> dans les hémocultures**

Ce système est basé sur la détection indirecte de la croissance des micro-organismes, et font appel au dosage colorimétrique de CO<sub>2</sub> dégagé lors de la prolifération bactérienne. Les automates de suivi de la croissance bactérienne sont des dispositifs commerciaux comme le BACTEC 9000 ® de Becton-Dickinson, le BacT/ALTER ® de BioMérieux, et l'ESP Microbial Detection System ® d'AccuMed International, qui existent sur le marché depuis quelques années. L'utilisation de ces automates a permis d'augmenter la sensibilité des tests en particulier lors d'hémocultures et par conséquent de diminuer les délais de réponse [44]. Ces automates ne permettent toutefois pas d'identifier spécifiquement les genres et espèces de bactéries.

### **c) La calorimétrie**

Cette technologie est basée sur l'activité catabolique des cellules vivantes. Le processus de catabolisme microbien produit de la chaleur qui peut être mesurée par microcalorimétrie. L'échantillon est placé dans une ampoule scellée avec le milieu de culture

dans le calorimètre. Cet instrument peut être utilisé pour établir des courbes de croissance. Cependant, cette technique n'est pas appropriée pour identifier et distinguer la présence d'un seul ou de plusieurs contaminants [45].

#### **d) L'impédancemétrie ou la conductimétrie**

C'est une technique basée sur la détection de la croissance bactérienne, également référencée comme méthode électrochimique. En pratique, les micro-organismes en croissance métabolisent des constituants complexes comme les protéines et les glucides du milieu et les convertissent en sous-produits chargés, tels que les acides aminés, le dioxyde de carbone et des acides. Ces sous-produits ioniques du métabolisme s'accumulent et finissent par modifier les propriétés conductrices du milieu de culture. La résistance au passage d'un courant alternatif à travers un matériau conducteur est définie comme étant de l'impédance [42]. Lorsqu'un courant alternatif est appliqué entre des électrodes à un milieu de culture, une variation d'impédance peut être observée.

Deux types de mesures pour la détection microbienne sont utilisés avec cette technique : l'impédance directe et indirecte. La mesure d'impédance directe permet la détection des changements de la conductivité électrique du milieu de culture lorsqu'un courant alternatif est appliqué entre deux électrodes. Le système d'impédance indirecte détecte le dioxyde de carbone dissous produit par le métabolisme bactérien.

En général, la limite de détection de ces systèmes est autour de  $10^6$  ufc/ml pour de nombreuses espèces bactériennes. Plus la population initiale est faible, plus il faut du temps pour atteindre les seuils de détection. Bactometer<sup>®</sup> (bioMérieux), BacTrac<sup>®</sup> (Sy-Lab), RABIT<sup>®</sup> (Don Whitley Scientific Ltd) et Malthus Microbial Detection System<sup>®</sup> (Malthus Diagnostics) utilisent cette technologie.

Les capteurs impédancemétriques peuvent être couplés à des ondes acoustiques, comme le montre Zhao *et al.* [46] qui utilisent des capteurs impédancemétrique de type BAW (Bulk Acoustic Wave) pour la détection de bactérie. Le principe de détection repose sur une modification de l'impédance dû à la croissance bactérienne sur la surface du capteur. Les bactéries forment ainsi un film en surface qui couvre l'électrode et augmente par conséquent son impédance. Les seuils de détection sont de  $3 \times 10^2$  bactéries/ml, mais dans un temps

relativement long (supérieur à 10 heures). Le temps de détection peut être réduit à quelques heures, mais au détriment du seuil de détection.

Il est important de rappeler que les tests décrits ci-dessus ne sont pas spécifiques et s'appliquent uniquement à des échantillons à priori stériles. Leur application pour la détection de bactéries dans des matrices alimentaires non stériles telles que la viande hachée ou le lait cru, ne peut pas être envisagée.

### ***1.3.2.2 Détection bactérienne spécifique***

Contrairement à la détection non spécifique appelée aussi test de stérilité, la détection spécifique de bactéries se base sur l'utilisation d'interactions spécifiques révélatrices de la présence d'une certaine espèce/genre bactérienne. Cette détection peut se faire soit en solution, soit sur support solide.

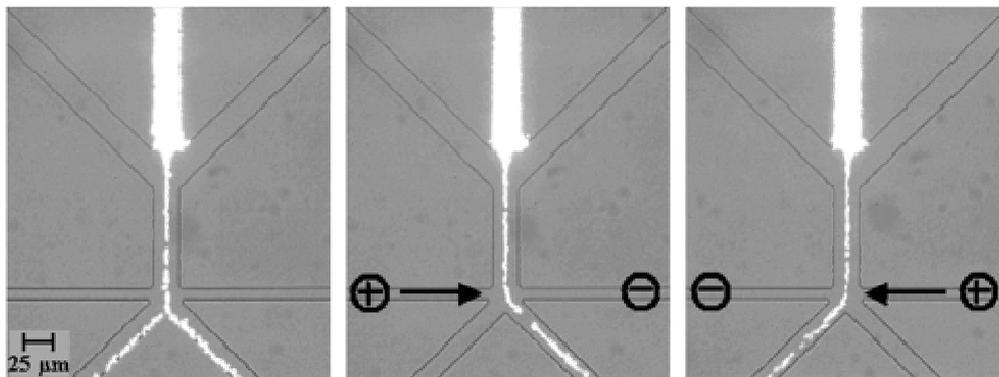
#### **1) Détection spécifique en solution**

C'est l'exemple de la **cytométrie en flux basée sur la viabilité** des bactéries. Dans ce type de cytométrie en flux, les microorganismes sont marqués en solution à l'aide d'un marqueur non fluorescent. Le marqueur est internalisé dans les cellules vivantes et clivé par l'activité enzymatique intracellulaire pour produire un substrat fluorescent. L'échantillon ainsi marqué est automatiquement injecté dans une cuve à flux laminaire, qui fait passer chaque bactérie, une à une à travers un faisceau laser pour sa détection. Les résultats sont obtenus au bout de 1,5-2 heures, avec une limite de détection de 100 ufc/ ml [42]. D-Count® (AES Chemunex) utilise cette technologie.

Un cytomètre de flux microfluidique a été utilisé avec succès pour la détection de *E. coli* [47]. Les cellules bactériennes sont transportées par électro-osmose et concentrées en une veine liquide au centre d'un canal dont le diamètre est équivalent la taille d'une cellule. Une détection unitaire des espèces cellulaires par la source laser est alors possible (comptage) ainsi qu'une détection par fluorescence (tri cellulaire). La détection la fluorescence d'*E. coli* marquées soit à l'aide d'un marqueur d'acides nucléiques perméable à la membrane (Stylo 15), d'un marqueur d'acides nucléiques imperméables à la membrane (iodure de propidium),

ou d'un anticorps marqué à la fluorescéine ont été démontrées avec succès. Le test de viabilité des cellules bactériennes a été réalisé en utilisant des taux de comptage des cellules entre 30-85 cellules par seconde. L'efficacité du marquage observé à l'aide des colorants ou des anticorps était supérieure à 94%.

Un autre système miniaturisé de cytométrie en flux développé par *Dittrich et Schwille*, utilise les forces hydrodynamiques pour la concentration du flux, et les forces électro-osmotiques pour le tri cellulaire (principe figure 1.2) [48].



**Figure 1.2 :** Principe du dispositif de tri, exemplifié par une suspension concentrée de billes fluorescentes. Après une mise au point hydrodynamique, les billes entrent dans les deux canaux de sortie (veines liquides) avec une probabilité égale (**image de gauche**). Par l'activation d'un flux électro-osmotique perpendiculaire, la suspension peut être dirigé dans le canal de sortie souhaitée, en fonction de la polarité des électrodes (**image du milieu et à droite**). Source : *Dittrich and Schwille, 2008* [48].

Les cellules d'*E. coli* dispersées peuvent être triées à l'aide des deux canaux de sortie (figure 1.2). Le procédé de tri est réalisé par un flux de déviation perpendiculaire qui peut être commuté par électro-osmose. Une reconnaissance spécifique des protéines de surface des membranes externes des bactéries à l'aide d'un ligand fluorescent a été démontrée. Ce dispositif peut servir à trier des bactéries soit liées à un ligand ou marquées à la fluorescéine après culture cellulaire. Par conséquent, la quantification des bactéries dans le milieu de culture peut être effectuée à l'aide ce cytomètre microfluidique.

Le processus complexe du prétraitement des échantillons bactériens, y compris les étapes de concentration/purification et marquage fluorescent, n'est pas amélioré par la miniaturisation du système de cytométrie en flux et empêche encore ses applications pratiques dans l'industrie.

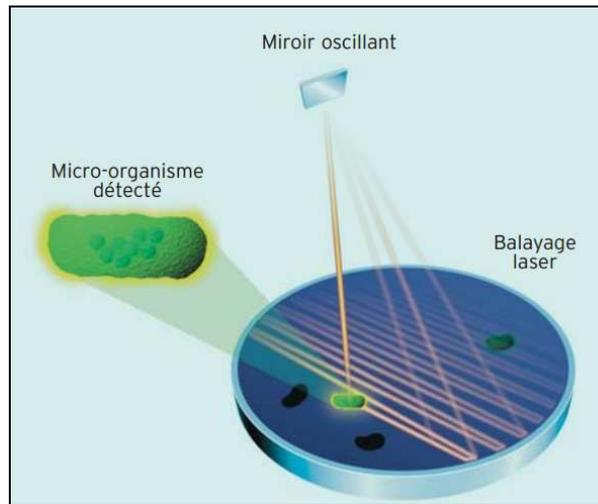
## **2) Détection spécifique sur support solide**

La détection spécifique de bactéries sur support solide nécessite l'utilisation de composants, permettant la reconnaissance spécifique des molécules recherchées (bactéries dans ce cas). Ces composants sont appelés « ligands » ou encore « biorécepteurs ». Ils peuvent être classés dans ces grandes catégories : antigènes/anticorps, enzymes, phages/protéines de phages, aptamères/ADN, oligosaccharides et molécules biomimétiques (en particulier les polymères à empreinte moléculaire). La stratégie du choix des ligands, des supports solides ainsi que de la chimie de surface seront détaillés dans le Chapitre 2.

Nous nous limiterons dans ce paragraphe à l'étude des principales technologies émergentes, jugées les plus pertinents pour la détection spécifique des bactéries :

### **a) Cytométrie en phase solide**

La cytométrie en phase solide est basée sur le même principe que la cytométrie en flux, à la différence qu'elle se fait sur membrane (phase solide) et non en flux. Cette technologie peut être utilisée pour détecter la présence de cellules viables. Dans un premier temps, une membrane de filtration est utilisée pour capturer les potentiels micro-organismes contaminants à partir d'échantillons filtrables. Ensuite les cellules capturées sont marquées à l'aide d'un traceur universel de viabilité. Une fois dans le cytoplasme des microorganismes métaboliquement actifs, le substrat non fluorescent est enzymatiquement clivé à l'aide d'une enzyme hydrolytique et libère un composé fluorescent. Seuls les micro-organismes viables avec des membranes intègres ont la capacité de retenir le marqueur utilisé pour le dosage. Un détecteur laser scanne automatiquement la membrane de filtration, et le nombre de cellules marquées est immédiatement compté (figure 1.3) [42].



**Figure 1.3:** Balayage laser de la membrane filtrante pour le dénombrement de micro-organismes après l'étape de marquage. (Source : Revue « salles propres n°63 », Septembre 2011)

La cytométrie en phase solide élimine la nécessité de pré-enrichir les échantillons par multiplication cellulaire. La sensibilité à l'échelle de la cellule unique est possible indépendamment du volume de l'échantillon, car ce dernier est filtré. Les résultats sont généralement obtenus après les 2 à 5 heures de préparation de l'échantillon [49]. La limite de détection pour ce type de systèmes est de l'ordre de la cellule unique. Notez que la cellule n'est pas une unité formant colonie (ufc), car la croissance n'est pas nécessaire pour la détection [42]. Un exemple commercial de la cytométrie en phase solide est le *ScanRDI* (AES-Chemunex), qui est utilisé par l'industrie pharmaceutique pour le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau.

La microscopie par épifluorescence directe sur filtre, ou Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT) en anglais, est une technique de cytométrie en phase solide basée sur la viabilité. Les échantillons filtrés sont colorés à l'aide d'un indicateur de viabilité fluorescent. L'acridine orange a été historiquement utilisée puis remplacée par le 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). La microscopie par épifluorescence directe détecte la présence de micro-organismes fluorescents sur le filtre. La sensibilité de la technique dépend du volume filtré. La formation de micro-colonies peut améliorer la précision de la technique et la détection de la viabilité cellulaire. Cependant, la difficulté rencontrée dans cette technique est la capacité de différencier les organismes fluorescents des particules autofluorescentes. La robustesse peut être également affectée par la façon dont les micro-organismes sont répartis sur la membrane et par la viscosité des fluides à filtrer [42].

L'équipe d'Aurell *et al.* a décrit l'utilisation du ChemScanRDI pour la quantification spécifique de *L. pneumophila*, à partir d'échantillons environnementaux [49]. Après concentration par filtration des bactéries contenues dans les échantillons à analyser, les bactéries sont marquées par immunofluorescence au moyen d'un anticorps spécifique à *L. pneumophila*. Un balayage laser permet la détection et à la quantification des bactéries de l'espèce *L. pneumophila* marquées. Cette technique est également très sensible puisqu'elle permet de détecter de 10 à 100 bactéries par Litre. Cependant, l'anticorps se fixant indifféremment sur la surface des bactéries mortes et des bactéries vivantes, cette technique ne permet pas, dans ce cas, de renseigner sur la viabilité des légionelles quantifiées.

### **b) Spectroscopies Raman et Infrarouge à transformation de Fourier (FT-IR)**

Les spectroscopies vibrationnelles comme la diffusion Raman et la FT-IR sont les techniques le plus fréquemment rapportées pour l'identification d'empreintes spectrales de micro-organismes entiers, elles sont appelées les « *fingerprinting techniques* ». Elles sont basées sur la reconnaissance des composants cellulaires et sont par conséquent considérées comme étant des méthodes d'identification phénotypiques. En effet, la spectroscopie permet de générer des spectres spécifiques des micro-organismes. Cependant, avant que ces techniques puissent être utilisées pour l'analyse de l'échantillon d'intérêt, les micro-organismes doivent être cultivés dans le but d'isoler l'extrait à analyser à partir d'autres constituants de l'échantillon et/ou de produire une biomasse suffisante pour l'analyse.

Il a été démontré que les empreintes générées étaient stables dans tous les groupes taxonomiques. Ces empreintes sont comparées à des bases de données de spectres de micro-organismes connus afin d'identifier le micro-organisme. Il faut cependant standardiser des conditions de croissance pour avoir des résultats reproductibles [42].

La spectroscopie Raman, une technique optique basée sur la diffusion de lumière, a été étudiée par de nombreux chercheurs comme moyen de détection rapide de pathogènes bactériens. Schmilovitch *et al.* a utilisé un spectrophotomètre Raman, avec une diode laser à 785 nm pour détecter la présence de bactéries Gram-positives et Gram-négatives [50]. Durant ces dernières années, la spectroscopie Raman exaltée en surface (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy ou SERS en anglais) a été mise au point pour s'affranchir du besoin de préculture des bactéries par l'emploi d'un phénomène qui amplifie le signal normal de

plusieurs ordres de magnitude. Dans cette approche, les agents pathogènes d'intérêt sont sélectivement isolés de l'échantillon en utilisant des biomolécules de capture, ce qui ajoute un niveau supplémentaire de spécificité à l'identification spectrale du micro-organisme entier. Par conséquent, ce système procure une analyse très précise, permettant de différencier les espèces et les souches en fonction de leur réaction avec la biomolécule de capture. L'équipe de Grow et *al.* a développé une méthode de détection utilisant la microscopie de diffusion Raman exaltée en surface [51]; leurs résultats avaient démontré que les *Listeria*, les *Legionella* ainsi que les spores de *Bacillus* et de *Cryptosporidium oocysts* pouvaient être identifiées au niveau de l'espèce et de la souche en analysant les spectres SERS collectés sur l'analyse mono-cellulaire de ces micro-organismes. Un autre rapport a démontré que la spectroscopie Raman et la SERS ont tout les deux un potentiel pour être utilisés comme plateforme de surveillance des agents pathogènes [52]. La spectroscopie Raman peut également être combinée à d'autres méthodes optiques pour la détection des pathogènes. Récemment, Kalasinsky et *al.* ont utilisé une technique appelée la « *Raman chemical imaging spectroscopy* » (ERIC), qui combine la spectroscopie Raman, la spectroscopie de fluorescence, et l'imagerie numérique [53]. En utilisant cette méthode, des traces d'agents pathogènes ont été détectés, sans aucun besoin d'amplification.

La spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FT-IR) est une technique analytique non destructive qui a un potentiel considérable pour des applications de détection de pathogènes d'origine alimentaire. Cette approche a été développée par Yu et *al.* pour la différenciation et la quantification de huit micro-organismes différents, y compris *Salmonella* [54]. Les résultats obtenus montrent que la technique est en mesure de différencier les micro-organismes étudiés à une concentration de  $10^3$  ufc/ml dans du jus de pomme. Un autre rapport a démontré l'utilisation de la spectroscopie FT-IR pour différencier *E. coli O157: H7* à partir d'un mélange avec d'autres bactéries inoculées dans du jus de pomme ( $10^9$  ufc / ml) [55].

L'avantage de cette technique reste l'identification non destructive des cultures. Les bactéries peuvent ainsi être incubées par la suite pour l'identification plus poussée (génotypique). Néanmoins, cette technique reste peu quantitative à cause de l'absorption de la bande OH de l'eau vers 300 nm qui provoque un effet dissipatif et un masquage du signal spécifique.

### **c) Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse à temps de vol de type désorption-ionisation laser assistée par matrice ou MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption-Time of Flight) est une technique également basée sur la composition cellulaire. Lorsque des bactéries sont chauffées sous vide, les produits de dégradation gazeux peuvent être analysés en utilisant la spectrométrie de masse. Un spectre est alors généré, puis comparé à une base de données d'organismes connus pour son identification. Les bactéries sont soumises à une ionisation intense et libèrent des particules chargées produisant des motifs distincts pour chaque souche bactérienne. Ces motifs sont comparés à une base de données de micro-organismes connus pour compléter l'identification. Les appareils MALDI-TOF de Waters MicrobeLynx, Kratos Analytical Systems et Perspective Biosystem Voyager sont utilisés pour ce genre d'analyses.

Il existe une variante à cette méthode, c'est la SELDI-TOF-MS (pour surface enhanced laser desorption ionisation time of flight mass spectroscopy), qui augmente la sensibilité par augmentation de l'ionisation. Dans cette technologie, une combinaison des méthodes de tests et de miniaturisation est utilisée dans une seule plateforme pour capturer les protéines d'intérêt (biopuce à protéine associée à la spectroscopie de masse dite ProteinChip system). Ainsi, les données du profilage des protéines sont incorporées dans le schéma de la caractérisation, en minimisant d'autres sources de variabilité [56-59].

### **d) Biocapteurs et biopuces**

La détection de bactéries sur support solide se fait de plus en plus à l'aide de biopuces, ce qui nous amène à introduire les notions de biopuce et de biocapteur. Les Biopuces sont nées de la rencontre de la microélectronique, des microsystèmes et de la biologie. Elles sont dédiées à l'analyse biologique, et répondent à des enjeux de miniaturisation, de haut débit et de sensibilité de la nouvelle biologie. De quelques cm<sup>2</sup> seulement, elles sont conçues pour analyser des milliers de cibles, pour paralléliser, automatiser et miniaturiser l'analyse des événements de reconnaissance moléculaire et/ou cellulaire. Un biocapteur est un dispositif analytique global, conçu pour transformer un phénomène reconnaissance moléculaire en un signal mesurable. Il combine le composant biologique appelé « biorécepteur » ou « ligand » permettant la reconnaissance de la molécule recherchée (analyte), et un « transducteur »

permettant de transformer l'événement de reconnaissance en un signal physique représentant le mode de détection. La figure 1.4 présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur.

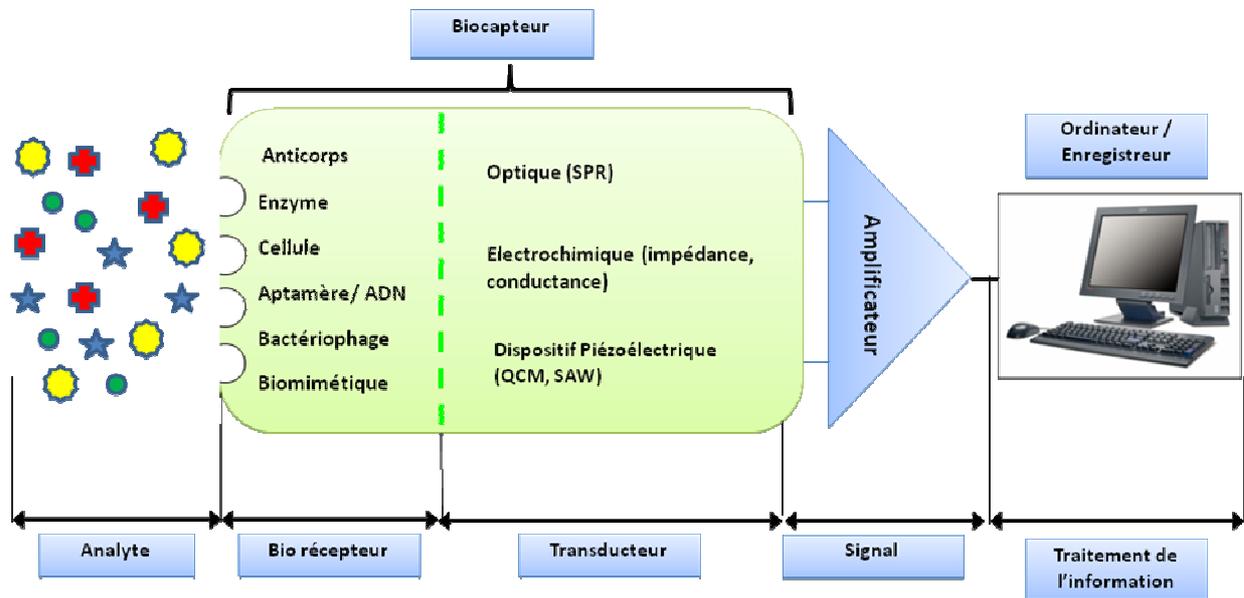


Figure 1.4 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Un biorécepteur interagit avec des structures complémentaires en solution, dits analytes (antigène, anticorps, cellule...) conduisant à des changements de propriétés physiques, chimiques ou optiques des substrats. Souvent, le biorécepteur se trouvera greffé sur une puce, constituant la biopuce. Quant au transducteur, il convertit ce changement en signaux mesurables.

Parmi les biocapteurs prometteurs permettant une détection rapide, directe et sans marquage de pathogènes, nous pouvons citer **la résonance plasmonique de surface (SPR)** et **la microbalance à cristal de quartz (QCM)**. Ces deux biocapteurs sont comparables en termes de méthodologie de détection, car l'analyte se liant au ligand immobilisé donne un signal directement mesurable, ce qui est une caractéristique souhaitable dans des applications de diagnostic rapide. Dans toutes les études SPR dites en « détection directe » de cellules bactériennes, les résultats ont montré qu'il faut une concentration cellulaire très élevée pour obtenir des signaux spécifiques. Citons à titre d'exemple, l'immuno-détection de *Listeria monocytogenes* par SPR est limitée à  $10^7$  ufc/ml [60] ; cette limite de détection a également été rapportée pour la capture directe de *Streptococcus mutans* par agglutinine [61]. Les études menées à l'aide de microbalance à quartz pour la détection directe de bactéries ne sont pas nombreuses ; il a été démontré que *Salmonella Typhimurium* pouvait être détectée à partir de

$3,2 \times 10^6$  ufc/ml [62]. Il faut cependant souligner qu'il est important de faire les mesures de détection de pathogènes dans un milieu liquide, afin de maintenir l'intégrité des épitopes des différents ligands, le plus souvent de nature protéique ; or la plupart des mesures par QCM utilisent la technique dite « *dip-and-dry* », ce qui signifie que l'interaction ligand/pathogène s'effectue dans un milieu liquide, mais que les mesures sont effectuées après que les surfaces des capteurs soient séchées à l'aide d'un flux d'Azote ou autre. Cela complique l'analyse et ne convient pas à des applications où il serait souhaitable de maintenir la bactérie vivante pour d'éventuels tests complémentaires. A cet égard, la technologie SPR a un grand avantage, car toutes les mesures se font en milieu liquide.

### I.3.3 Limitations et défis : la sensibilité, la spécificité et le temps de détection

L'examen des études menées sur la détection de pathogènes au cours d'une période de 20 ans a montré que 38% étaient liées à l'industrie alimentaire, 18% à l'analyse clinique, 16% à l'eau et à l'environnement et 27% à d'autres secteurs [63]. L'analyse d'échantillons alimentaires pour la détection d'agents pathogènes responsables d'infections est un procédé fastidieux, chronophage et très dépendant de l'opérateur. Rappelons qu'aujourd'hui, ces tests prennent de 1 à 7 jours pour l'identification de pathogènes par la méthode conventionnelle, car ils nécessitent une longue phase de pré-enrichissement et de culture, en plus d'un appareillage encombrant et coûteux. Dans l'idéal, il faudrait trouver des systèmes analytiques qui soient faciles d'utilisation, sélectifs et qui fournissent rapidement des résultats quantitatifs si possible.

Les nouvelles technologies émergentes, tentent de répondre à cette demande à travers l'amélioration des méthodes conventionnelles, par combinaison de plusieurs techniques (ex : PCR-ELISA), mais aussi, à travers les biocapteurs et les systèmes miniaturisés (Tab. 3.1).

Techniques de détection	Echantillon bactérien	Seuil de détection (ufc/ml)	Temps d'analyse	Référence
Test d'hybridation en sandwich (SHA)	<i>L. pneumophila</i>	$1,8 \times 10^3$	1-2 heures	[64]
Polymyxin-ELISA	<i>E.coli</i>	$10^3 - 10^4$	2 jours	[65]
PCR-ELISA	<i>Salmonellae</i>	$10^3$	lendemain	[66]

<b>Potentiométrique</b>	<i>E.coli</i>	$10^6$	Quelques minutes	[67]
<b>Ellipsométrique</b>	<i>L. pneumophila</i>	$10^3$	Non cité	[68]
<b>SPR</b>	<i>E. coli</i> directe	$10^6$	1 heure	[69]
	<i>E.coli</i> sandwich	$10^3$		
	<i>E. coli</i> vivantes	$10^6$	Non cité	[70]
	<i>E. coli</i> mortes	$10^4$		
	<i>S. typhimurium</i>	$10^2$	Non cité	[71]
<b>QCM</b>	<i>Salmonella</i>	$3,2 \times 10^6$	Non cité	[62]
<b>Quantum dots</b>	<i>E. coli</i>	$10^6$	Non cité	[72]
<b>Imagerie Ellipsométrique (IE)</b>	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Y.enterocolitica</i> et <i>L. pneumophila</i>	$10^3$ à $10^7$	Non cité	[73]
<b>Microscopie à fluorescence</b>	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Y.enterocolitica</i> et <i>L. pneumophila</i>	$10^2$	Non cité	[73]
<b>Immunoanalyse par Chimiluminescence</b>	<i>E. coli</i> , <i>Y.enterocolitica</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i>	$10^4$ à $10^5$	Non cité	[74]
<b>Microarray microfluidique + chimiluminescence</b>	<i>E. coli</i>	$1.8 \times 10^4$	18 minutes	[75]
	<i>S. typhimurium</i>	$2 \times 10^7$		
	<i>L. pneumophila</i>	$7.9 \times 10^4$		
<b>Séparation immunomagnétique et immuno-test enzymatique</b>	<i>Salmonellae</i>	$10^4$ à $10^6$	48 heures	[76]
<b>Microleviers</b>	<i>S. Enteritidis</i>	$10^5$	40 minutes	[77]

**Tableau 1.2 :** Différentes techniques combinées et émergentes pour la détection de bactéries pathogènes (liste non exhaustive).

Les limites de détection (tableau 1.2) sont situées entre  $10^2$  et  $10^7$  ufc/ml en fonction de l'espèce bactérienne, de l'échantillon et de la technique d'identification utilisée. La rapidité d'analyse ainsi que le suivi en temps réel sans marquage, sont des critères importants qui ont permis d'axer les recherches sur les biocapteurs au cours de ces dernières années. Ce type de systèmes peuvent par conséquent devenir des méthodes pertinentes pour la détection d'une variété d'analytes, allant de petites molécules à des cellules intactes ; il est en effet possible de cibler des antigènes de surface des agents pathogènes et de contourner ainsi l'extraction de l'échantillon, qui est une étape nécessaire dans la détection des acides nucléiques (ADN) pour une amplification PCR par exemple ; car cette dernière n'est pas souhaitable et a l'inconvénient d'être indirecte et par conséquent chronophage.

En conclusion, l'étude bibliographique présentée dans ce chapitre nous a permis de faire un tour d'horizon sur les méthodes conventionnelles, les technologies émergentes et les méthodes combinées pour la détection de bactéries pathogènes, avec une attention particulière sur les pathogènes d'origine alimentaire. L'inconvénient commun des techniques citées dans ce chapitre, reste la sensibilité insuffisante dans le cas d'une détection spécifique où le principe de la « tolérance zéro » est appliqué. Ce principe de tolérance zéro signifie que la présence d'une seule bactérie, détectable dans une quantité alimentaire bien définie, comporte un risque pour le consommateur. Les temps nécessaires pour la détection, les étapes de manipulation et de préparation de l'échantillon, la consommation de matériel biologique (réactifs) sont d'autres éléments à prendre en considération dans le développement de nouvelles techniques de diagnostic microbiologique.

Les biocapteurs développés au cours de ces dernières années ont un potentiel intéressant qui pourrait répondre aux problématiques posées ci dessus. En particulier, nous avons utilisé au cours de ce travail, un capteur optique de type résonance plasmonique de surface qui apparait parmi les capteurs offrant de meilleures performances, grâce à l'approche développée. Nous en proposons donc une étude plus détaillée dans le prochain chapitre.

## Références bibliographiques du Chapitre I:

- [1] WHO, Global public health security in the 21st century, Geneva: World Health Organization (2007).
- [2] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, C. Adley, An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors, *Biotechnol Adv* 28 (2009) 232-254.
- [3] E.C. Alocilja, S.M. Radke, Market analysis of biosensors for food safety, *Biosensors & bioelectronics* 18 (2003) 841-846.
- [4] S. Chemburu, E. Wilkins, I. Abdel-Hamid, Detection of pathogenic bacteria in food samples using highly-dispersed carbon particles, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 491-499.
- [5] G. Mucchetti, B. Bonvini, S. Francolino, E. Neviani, D. Carminati, Effect of washing with a high pressure water spray on removal of *Listeria innocua* from Gorgonzola cheese rind, *Food Control* 19 (2008) 521-525.
- [6] D. Kay, J. Crowther, L. Fewtrell, C.A. Francis, M. Hopkins, C. Kay, A.T. McDonald, C.M. Stapleton, J. Watkins, J. Wilkinson, M.D. Wyer, Quantification and control of microbial pollution from agriculture: a new policy challenge?, *Environmental Science & Policy* 11 (2008) 171-184.
- [7] E. Taylor, A new method of HACCP for the catering and food service industry, *Food Control* 19 (2008) 126-134.
- [8] S. Jin, J. Zhou, J. Ye, Adoption of HACCP system in the Chinese food industry: A comparative analysis, *Food Control* 19 (2008) 823-828.
- [9] O. Lazcka, F.J. Del Campo, F.X. Munoz, Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors, *Biosensors & bioelectronics* 22 (2007) 1205-1217.
- [10] E. de Boer, R. Beumer, Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms, *International journal of food microbiology* 50 (1999) 119-130.
- [11] R. Stephan, S. Schumacher, M.A. Zychowska, The VIT technology for rapid detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp, *International journal of food microbiology* 89 (2003) 287-290.
- [12] H. Ayçiçek, H. Aydoğan, A. Küçükaraaslan, M. Baysallar, A.C. Başustaoğlu, Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers, *Food Control* 15 (2004) 253-259.
- [13] S.Q. Sanders, D.H. Boothe, J.F. Frank, J.W. Arnold, Culture and detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel, *Journal of food protection* 70 (2007) 1379-1385.
- [14] S.D. Weagant, A new chromogenic agar medium for detection of potentially virulent *Yersinia enterocolitica*, *Journal of microbiological methods* 72 (2008) 185-190.
- [15] R. Kumar, P.K. Surendran, N. Thampuran, Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood, *Lett Appl Microbiol* 46 (2008) 221-226.
- [16] A. Touron, T. Berthe, B. Pawlak, F. Petit, Detection of *Salmonella* in environmental water and sediment by a nested-multiplex polymerase chain reaction assay, *Res Microbiol* 156 (2005) 541-553.
- [17] J.S. Kim, G.G. Lee, J.S. Park, Y.H. Jung, H.S. Kwak, S.B. Kim, Y.S. Nam, S.T. Kwon, A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*

monocytogenes, and *Vibrio parahaemolyticus*, *Journal of food protection* 70 (2007) 1656-1662.

[18] G. Mangiapan, M. Vokurka, L. Schouls, J. Cadranell, D. Lecossier, J. van Embden, A.J. Hance, Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens, *Journal of clinical microbiology* 34 (1996) 1209-1215.

[19] Y. Pan, F. Breidt, Jr., Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells, *Applied and environmental microbiology* 73 (2007) 8028-8031.

[20] S. Slimani, A. Robyns, S. Jarraud, M.I. Molmeret, E. Dusserre, C.I. Mazure, J.P. Facon, G.r. Lina, J. Etienne, C. Ginevra, Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR, *Journal of microbiological methods* 88 (2011) 319-321.

[21] M.A. Yanez, A. Nocker, E. Soria-Soria, R. Murtula, L. Martinez, V. Catalan, Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR, *Journal of microbiological methods* 85 (2011) 124-130.

[22] K. Schwaiger, M. Wimmer, R. Huber-Schlenstedt, K. Fehlings, C.S. Holzel, J. Bauer, Hot topic: Bovine milk samples yielding negative or nonspecific results in bacterial culturing--the possible role of PCR-single strand conformation polymorphism in mastitis diagnosis, *J Dairy Sci* 95 (2012) 98-101.

[23] M.A. Davis, D.D. Hancock, T.E. Besser, D.R. Call, Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7, *Journal of clinical microbiology* 41 (2003) 1843-1849.

[24] D.M. Olive, P. Bean, Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms, *Journal of clinical microbiology* 37 (1999) 1661-1669.

[25] I. Robuffo, P. Fazii, A. Rulli, M. Di Nicola, E. Toniato, M. Di Rienzo, L. Cosentino, A. Gambi, M.L. Castellani, S. Martinotti, Upgraded diagnostic value of Gen-Probe PACE 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* infection, *J Biol Regul Homeost Agents* 22 (2008) 253-261.

[26] S.S. Iqbal, M.W. Mayo, J.G. Bruno, B.V. Bronk, C.A. Batt, J.P. Chambers, A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents, *Biosensors & bioelectronics* 15 (2000) 549-578.

[27] Matar, M. G, Hayes, S. P, Bibb, F. W, Swaminathan, B, Listeriolysin O-based latex agglutination test for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, International Association for Food Protection, Des Moines, IA, ETATS-UNIS, 1997.

[28] M.B. Medina, W.L. Shelver, P.M. Fratamico, L. Fortis, G. Tillman, N. Narang, W.C. Cray, Jr., E. Esteban, A. Debroy, Latex agglutination assays for detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145, *Journal of food protection* 75 (2012) 819-826.

[29] J.A. Hudson, R.J. Lake, M.G. Savill, P. Scholes, R.E. McCormick, Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction, *Journal of applied microbiology* 90 (2001) 614-621.

[30] Q. Li, P. Chen, C. Ren, Comparison of different magnetic beads for adsorption of pathogenic bacteria, *Wei Sheng Yan Jiu* 41 (2012) 293-297.

[31] H. Wang, Y. Li, A. Wang, M. Slavik, Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three foodborne pathogens using magnetic nanobead-based immunoseparation and quantum dot-based multiplex immunoassay, *Journal of food protection* 74 (2011) 2039-2047.

[32] P.T. Feldsine, A.H. Lienau, R.L. Forgey, R.D. Calhoon, Visual immunoprecipitate assay (VIP) for *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* species detection in selected foods: collaborative study, *Journal of AOAC International* 80 (1997) 791-805.

- [33] W.B. Shim, J.G. Choi, J.Y. Kim, Z.Y. Yang, K.H. Lee, M.G. Kim, S.D. Ha, K.S. Kim, K.Y. Kim, C.H. Kim, K.S. Ha, S.A. Eremin, D.H. Chung, Production of monoclonal antibody against *Listeria monocytogenes* and its application to immunochromatography strip test, *J Microbiol Biotechnol* 17 (2007) 1152-1161.
- [34] J.D. Palumbo, M.K. Borucki, R.E. Mandrell, L. Gorski, Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting, *Journal of clinical microbiology* 41 (2003) 564-571.
- [35] E. Galikowska, D. Kunikowska, E. Tokarska-Pietrzak, H. Dziadziuszko, J.M. Los, P. Golec, G. Wegrzyn, M. Los, Specific detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30 (2011) 1067–1073.
- [36] S. Park, S. Shukla, Y. Kim, S. Oh, S. Hun Kim, M. Kim, Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* (formerly called *Enterobacter sakazakii*), *Microbiol Immunol* 56 (2012) 472-479.
- [37] Newby PJ and Johnson B (2003) Overview of alternative rapid microbiological technologies. In: Easter MC (ed) *Interpharm/CRC*, Washington, D.C., pp. 41–60.
- [38] K. Hibi, A. Abe, E. Ohashi, K. Mitsubayashi, H. Ushio, T. Hayashi, H. Ren, H. Endo, Combination of immunomagnetic separation with flow cytometry for detection of *Listeria monocytogenes*, *Analytica chimica acta* 573-574 (2006) 158-163.
- [39] L. Jimenez, Rapid methods for the microbiological surveillance of pharmaceuticals, *PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA* 55 (2001) 278-285.
- [40] D.M. Hunter, D.V. Lim, Rapid detection and identification of bacterial pathogens by using an ATP bioluminescence immunoassay, *Journal of food protection* 73 (2010) 739-746.
- [41] K. Wills, ATP bioluminescence and its use in pharmaceutical microbiology. In: Easter MC (ed) *Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry*, Interpharm/CRC, 2003.
- [42] J. Moldenhauer, Overview of Rapid Microbiological Methods, in: S.E. Mohammed Zourob, Anthony Turner (Ed.), *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition, Receptors and Microsystems*, Springer, 2008.
- [43] L.J. Kricka, New technologies for microbiological assays. In: Easter MC (ed) *Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry.*, Interpharm/CRC Washington, D.C 2003.
- [44] B. Lamy, Automates pour hémoculture an 2005, *Bio Tribune Magazine* 16 (2005) 35-40.
- [45] PHARMEUROPA (October 2004) 5.1.6.: Alternative methods for control of microbiological quality. *PHARMEUROPA* 16(4) pp. 555–565 (Note: Subsequently finalized July 2006).
- [46] J. Zhao, W. ZHU, F. HE, Rapidly determining *E. coli* and *P. aeruginosa* by an eight channels bulk acoustic wave impedance physical biosensor, Elsevier, Kidlington, ROYAUME-UNI, 2005.
- [47] M.A. McClain, C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, Flow cytometry of *Escherichia coli* on microfluidic devices, *Analytical chemistry* 73 (2001) 5334-5338.
- [48] P.S. Dittrich, P. Schwiller, An integrated microfluidic system for reaction, high-sensitivity detection, and sorting of fluorescent cells and particles, *Analytical chemistry* 75 (2003) 5767-5774.
- [49] H. Aurell, P. Catala, P. Farge, F. Wallet, M. Le Brun, J.H. Helbig, S. Jarraud, P. Lebaron, Rapid detection and enumeration of *Legionella pneumophila* in hot water systems by solid-phase cytometry, *Applied and environmental microbiology* 70 (2004) 1651-1657.

- [50] Schmilovitch, Z, Mizrach, A, Alchanatis, V, Kritzman, G, Korotic, R, Irudayaraj, J, Debroy, C, Detection of bacteria with low-resolution Raman spectroscopy, American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph, MI, ETATS-UNIS, 2005.
- [51] A.E. Grow, L.L. Wood, J.L. Claycomb, P.A. Thompson, New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins, *Journal of microbiological methods* 53 (2003) 221-233.
- [52] L.J. Goeller, M.R. Riley, Discrimination of bacteria and bacteriophages by Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy, *Appl Spectrosc* 61 (2007) 679-685.
- [53] K.S. Kalasinsky, T. Hadfield, A.A. Shea, V.F. Kalasinsky, M.P. Nelson, J. Neiss, A.J. Drauch, G.S. Vanni, P.J. Treado, Raman chemical imaging spectroscopy reagentless detection and identification of pathogens: signature development and evaluation, *Analytical chemistry* 79 (2007) 2658-2673.
- [54] C. Yu, J. Irudayaraj, C. Debroy, Z.E. Schmilovitch, A. Mizrach, Spectroscopic differentiation and quantification of microorganisms in apple juice, Wiley, Hoboken, NJ, ETATS-UNIS, 2004.
- [55] M.A. Al-Holy, M. Lin, A.G. Cavinato, B.A. Rasco, The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate *Escherichia coli* O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice, *Food Microbiol* 23 (2006) 162-168.
- [56] H.N. Shah, C.J. Keys, O. Schmid, S.E. Gharbia, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology, *Clin Infect Dis* 35 (2002) S58-64.
- [57] D. Dare, Y.-W. Tang, C.W. Stratton, Rapid Bacterial Characterization and Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, Springer US, 2006, pp. 117-133.
- [58] L. Lancashire, O. Schmid, H. Shah, G. Ball, Classification of bacterial species from proteomic data using combinatorial approaches incorporating artificial neural networks, cluster analysis and principal components analysis, *Bioinformatics* 21 (2005) 2191-2199.
- [59] O. Schmid, G. Ball, L. Lancashire, R. Culak, H. Shah, New approaches to identification of bacterial pathogens by surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in concert with artificial neural networks, with special reference to *Neisseria gonorrhoeae*, *J Med Microbiol* 54 (2005) 1205-1211.
- [60] S. Hearty, P. Leonard, J. Quinn, R. O'Kennedy, Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*, *Journal of microbiological methods* 66 (2006) 294-312.
- [61] M.W. Oli, W.P. McArthur, L.J. Brady, A whole cell BIAcore assay to evaluate P1-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to human salivary agglutinin and inhibition by specific antibodies, *Journal of microbiological methods* 65 (2006) 503-511.
- [62] I.-S. Park, W.-Y. Kim, N. Kim, Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting *Salmonella* spp, *Biosensors and Bioelectronics* 15 (2000) 167-172.
- [63] O. Lazcka, F.J. Del Campo, F.X. Munoz, Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors, *Biosensors & bioelectronics* 22 (2007) 1205-1217.
- [64] T. Leskela, A. Tilsala-Timisjarvi, J. Kusnetsov, P. Neubauer, A. Breitenstein, Sensitive genus-specific detection of *Legionella* by a 16S rRNA based sandwich hybridization assay, *Journal of microbiological methods* 62 (2005) 167-179.
- [65] B.W. Blais, J. Leggate, J. Bosley, A. Martinez-Perez, Comparison of fluorogenic and chromogenic assay systems in the detection of *Escherichia coli* O157 by a novel polymyxin-based ELISA, *Lett Appl Microbiol* 39 (2004) 516-522.

- [66] S. Perelle, F.o. Dilasser, B. Malorny, J.I. Grout, J. Hoorfar, P. Fach, Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples, *Molecular and Cellular Probes* 18 (2004) 409-420.
- [67] L. Yang, Y. Li, G.F. Erf, Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Analytical chemistry* 76 (2004) 1107-1113.
- [68] Y.M. Bae, B.-K. Oh, W. Lee, W.H. Lee, J.-W. Choi, Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* based on imaging ellipsometry, *Materials Science and Engineering: C* 24 (2004) 61-64.
- [69] A. Subramanian, J. Irudayaraj, T. Ryan, A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of *E. coli* O157:H7, *Biosensors & bioelectronics* 21 (2006) 998-1006.
- [70] A.D. Taylor, Q. Yu, S. Chen, J.Á. Homola, S. Jiang, Comparison of *E. coli* O157:H7 preparation methods used for detection with surface plasmon resonance sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical* 107 (2005) 202-208.
- [71] B.-K. Oh, Y.-K. Kim, K.W. Park, W.H. Lee, J.-W. Choi, Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*, *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004) 1497-1504.
- [72] M.A. Hahn, P.C. Keng, T.D. Krauss, Flow cytometric analysis to detect pathogens in bacterial cell mixtures using semiconductor quantum dots, *Analytical chemistry* 80 (2008) 864-872.
- [73] J.-W. Choi, Y.-K. Kim, B.-K. Oh, The development of protein chip using protein G for the simultaneous detection of various pathogens, *Ultramicroscopy* 108 (2008) 1396-1400.
- [74] M. Magliulo, P. Simoni, M. Guardigli, E. Michelini, M. Luciani, R. Lelli, A. Roda, A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* pathogen bacteria, *J Agric Food Chem* 55 (2007) 4933-4939.
- [75] X.Y. Karsunke, R. Niessner, M. Seidel, Development of a multichannel flow-through chemiluminescence microarray chip for parallel calibration and detection of pathogenic bacteria, *Analytical and bioanalytical chemistry* 395 (2009) 1623-1630.
- [76] C.G. Leon-Velarde, L. Zosherafatein, J.A. Odumeru, Application of an automated immunomagnetic separation enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* from poultry environmental swabs, *Journal of microbiological methods* 79 (2009) 13-17.
- [77] C. Ricciardi, G. Canavese, R. Castagna, G. Digregorio, I. Ferrante, S. Marasso, A. Ricci, V. Alessandria, K. Rantsiou, L. Cocolin, Online Portable Microcantilever Biosensors for *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Detection, *Food and Bioprocess Technology* 3 (2010) 956-960.



# Chapitre II

---

*Détection des bactéries par SPR*

« *L'approche statique* »



Dans le chapitre précédent, nous avons vu que malgré que les méthodes conventionnelles de détection de pathogènes soient sensibles, elles sont le plus souvent pas suffisamment rapides et restent moins performantes que les méthodes instrumentales. Par ailleurs, les techniques émergentes décrites précédemment, présentent certains inconvénients également, qui sont liés à leur sensibilité (limite de détection insuffisante), à leur spécificité (innexistante dans les tests de stérilité), et à leur coût. Par conséquent, le développement de nouvelles méthodes rapides procurant de meilleures performances sont jugées nécessaires.

Dans le secteur alimentaire en particulier, bien que de nombreuses recherches aient été réalisées au cours des dernières décennies pour la détection des pathogènes d'origine alimentaire, les méthodes utilisées ne répondent pas à toutes les problématiques et doivent encore être améliorées. Puisque les agents pathogènes alimentaires sont souvent présents en très faibles nombres (inférieur à 1 ufc / g) au milieu de millions d'autres bactéries, il est très difficile de les détecter. Ces micro-organismes pathogènes peuvent être masqués par la flore contaminante lors de la détection. Par conséquent, une technique de détection qui soit fiable, rapide, précise, simple, sensible et sélective doit être développée. En outre, elle doit être en mesure de détecter les agents pathogènes en très faibles concentrations dans des échantillons complexes et doit être adaptée à leur suivi *in situ* en temps réel.

Une telle technique de détection des agents pathogènes offrirait un grand avantage commercial pour les secteurs de fabrication et de transformation des aliments. Car, en utilisant un biocapteur qui est rapide dans la détection des agents pathogènes microbiens, les denrées alimentaires non contaminées peuvent être libérés rapidement dans les heures qui suivent le test, plutôt que de les libérer avant validation, ce qui permet entre autre d'éviter la nécessité du stockage réfrigéré de longue durée, ainsi que le rappel des lots après leur distribution dans les rayons de consommation.

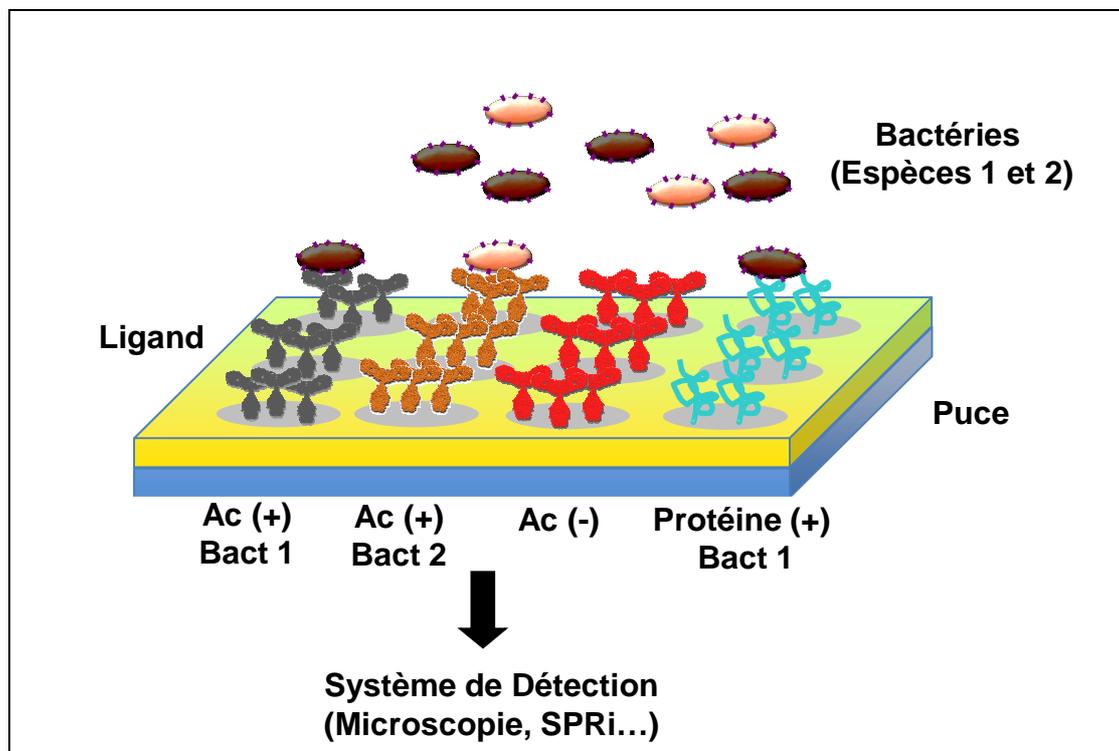
## II.1 Stratégie de la détection

Afin de détecter et d'identifier les bactéries sur biopuce, une reconnaissance « spécifique » est de rigueur ; notre stratégie de détection repose sur la reconnaissance des bactéries par des ligands immobilisés sur un support miniaturisé. Les ligands, appelés également molécules sondes, sont des biomolécules de reconnaissance qui lient des récepteurs (cibles), avec une certaine affinité et de manière spécifique. L'utilisation de différents ligands peut être envisagée, parmi eux, des molécules interagissant de façon spécifique avec la surface bactérienne (exemple des phages, protéines de l'hôte, aptamères...), mais encore, des anticorps dirigés contre des motifs externes de la bactérie, pouvant ainsi se lier aux bactéries si elles sont présentes dans le milieu. Pour plus de détails, nous pouvons nous référer à une récente revue qui étaye les différents outils utilisés dans le domaine de l'immobilisation via un large spectre de récepteurs [1]. La grande variété des antigènes de surfaces bactériennes et des anticorps correspondants, offrent une large gamme de choix pour l'immuno-immobilisation, qui peut être hautement spécifique pour une espèce donnée. Cette approche a été utilisée pour la détection de *Salmonella* [2, 3] ainsi que d'autres bactéries pathogènes [1, 4, 5]. Ces anticorps ont l'avantage d'être relativement stables, reconnaissant spécifiquement les molécules antigéniques ciblées avec une grande affinité. Par ailleurs, ils sont aussi faciles à produire et disponibles dans le commerce le plus souvent.

Le suivi de l'interaction entre le ligand et la bactérie, requiert un support et fait appel à une chimie de surface adéquate pour immobiliser les sondes, dont le choix dépend de la méthode de détection. La question qui se pose alors, est la suivante : « Quelle méthode faudrait-il utiliser pour détecter différentes populations bactériennes de façon spécifique et simultanée? ». Le premier aspect de cette question concerne la reconnaissance des bactéries de façon spécifique (notion de ligand) ; le deuxième aspect, se rapporte à la distinction des différentes espèces entre elles dans un même test (notion de détection multiparamétrique). Enfin, le dernier aspect s'intéresse à la méthode de révélation de cette interaction, ou encore le système de suivi de la détection.

Notre stratégie de détection a par conséquent été orientée vers la conception d'une puce à protéines/anticorps, qui sert de support miniaturisé pour la détection multiparamétrique

et spécifique des bactéries, comme décrite sur la figure 2.1. Nous développerons les approches de détection ci après.



**Figure 2.1** : Stratégie de détection des bactéries sur un support miniaturisé (puce), avec des ligands immobilisés, spécifique ou non pour une population bactérienne donnée.

La figure 2.1 est un schéma simplifié de la stratégie adoptée pour la détection spécifique des bactéries. La biopuce est un support solide sur lequel, sont greffées des molécules de reconnaissance des bactéries (ligands), le plus souvent ce sont des anticorps ou des protéines. En fonction des affinités des ligands pour les bactéries recherchées, le système permet de distinguer de façon simultanée un mélange de plusieurs espèces bactériennes. Afin d'effectuer un contrôle négatif pour valider le système de détection, la présence de ligands non spécifiques est également nécessaire.

## II.2 Fabrication de la puce

L'adressage et l'immobilisation des ligands sur une surface, ne signifie pas seulement de faire en sorte qu'ils soient fixés correctement, mais aussi et surtout qu'ils restent fonctionnels. Ainsi, suite à une adsorption, la grande majorité des ligands perdent leur conformation, et donc leur fonction biologique. Afin de mieux conserver ces propriétés de

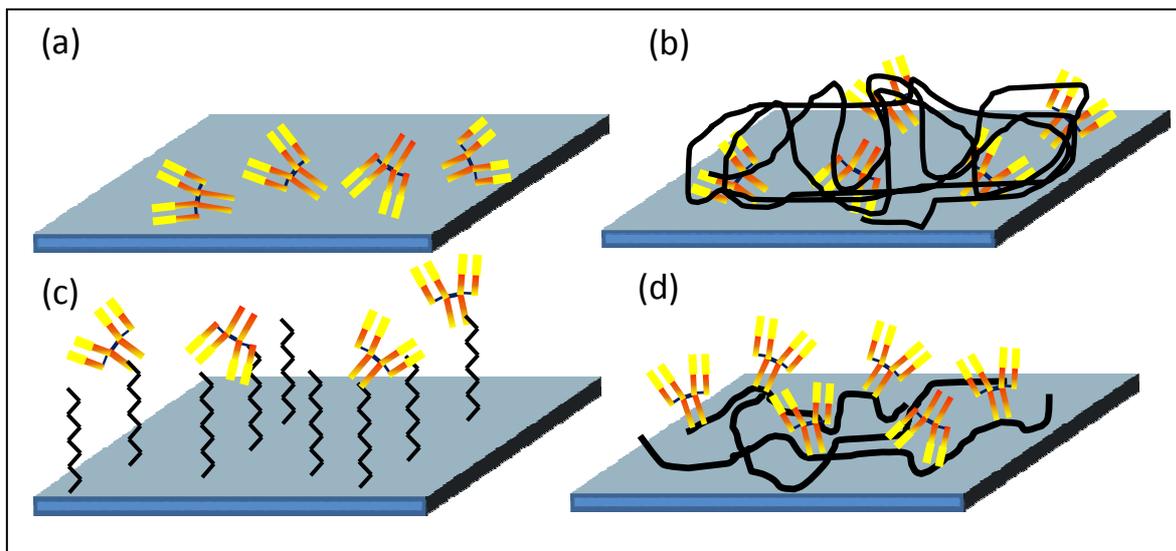
reconnaissance biologique, différentes tentatives d'immobilisation de protéines sur support ont été réalisées. Les premières tentatives cherchaient le plus souvent à extrapoler les méthodes employées pour la conception de puces à ADN en utilisant les mêmes démarches expérimentales [6]. Or il s'est avéré qu'une adaptation ne permettait pas dans la plupart des cas, de réaliser des puces à protéines fiables. En effet, cette approche se heurte à des difficultés inhérentes à la complexité structurale des protéines [7]. Ainsi, contrairement à la stabilité, l'uniformité et la structure bien définie de l'ADN, molécule hydrophile et chargée négativement ; les protéines sont beaucoup plus fragiles et hétérogènes [7]. Elles ont des structures tridimensionnelles très variées ; elles peuvent être hydrophiles et/ou hydrophobes, acides et/ou basiques et par conséquent interagir avec leur environnement par force de Van der Waals, force électrostatique, liaison hydrogène ou liaison hydrophobe. Cependant, il existe des protéines de reconnaissance assez stables, dits anticorps, dont l'immobilisation sur des supports miniaturisés, semble être moins compliquée que celle des autres protéines. Ces anticorps sont disponibles sous différents formats (chaines lourdes et conventionnelles, anticorps monoclonaux, polyclonaux ou encore recombinants), et sont largement employés en immuno-détection [1].

Différentes méthodes d'adressage de biomolécules sur supports solides, allant du simple dépôt par contact en une seule étape, aux techniques lithographiques les plus développées ont été décrites. Dans la littérature, nous pouvons trouver de nombreux exemples de substrats solides, utilisés dans la fabrication de biopuces [8, 9] : verre, silicium, oxyde d'indium-étain (ITO), carbone cristalin (type diamant), or...etc. La chimie de surface est choisie en fonction de la nature du support solide et des propriétés d'adressage souhaités via des liaisons covalentes ou des interactions physicochimiques. Les supports peuvent ainsi rester non activés, ou modifiés par une protéine (streptavidine, protéine G, protéine A...) ou encore modifiés par du polyéthylène glycol (PEG) activé par des groupements époxy. Ces derniers sont bien adaptés à la conception de puces à haute densité et permettent une bonne reproductibilité des tests réalisés ainsi qu'un faible bruit de fond et une bonne sensibilité [10]. De plus ces supports sont compatibles avec la plupart des méthodes de détection : fluorescence, radioactivité, spectrométrie de masse et résonance plasmonique de surface (SPR) [11].

L'immobilisation de protéines peut se faire par adsorption directe [8, 9] ou par des réactions physico-chimiques de greffage covalent ou pas (Figure 2.2). Ces dernières

dépendent du matériau utilisé et du mode de greffage considéré. Dans l'idéal, il faut choisir une chimie de surface qui maintient une bonne activité des ligands après adressage et qui minimise les adhésions non spécifiques à la surface. Parmi les techniques de fonctionnalisation utilisés, nous pouvons citer le piégeage ou l'inclusion [12], l'électro-copolymérisation [13], et l'auto-assemblage de monocouches (SAMs pour Self Assembled Monolayer) [14]. Le piégeage des ligands est une méthode controversée et non adaptée à l'adressage des anticorps, car ces derniers se retrouvent piégés de manière aléatoire au milieu de la couche greffée avec un masquage des sites de reconnaissance [12]. Le dépôt de ligands modifiés par des polymères conducteurs (électro-copolymérisation) est un exemple de méthode stable et robuste qui lie les ligands au film de polymères sans les masquer. L'adressage des molécules par auto-assemblage de monocouches (SAMs), sur des surfaces thiolées par exemple, forme des liaisons covalentes fortes qui assurent une meilleure fixation et une bonne orientation des ligands sur le support. C'est une technique qui peut également être envisagée.

Dans les travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons choisi une stratégie de dépôt sur le support solide, par électro-copolymérisation ; un savoir faire bien maîtrisé par le laboratoire d'accueil (CREAB). Le greffage sur support se fait par l'électro-copolymérisation de microgouttes contenant des monomères de pyrrole, en présence du matériel à immobiliser (anticorps ou protéine) préalablement conjugué à un monomère de pyrrole. Ainsi, cette stratégie permet le greffage covalent de la molécule sur une couche de polypyrrole. Il est à noter que cette couche de polypyrrole, n'est cependant pas covalentement liée au support solide ; elle adhère au support par un réseau de recouvrement des orbitales électroniques  $\pi$  moléculaires du polypyrrole avec le nuage électronique de la surface en or. Il en résulte une force attractive et stable entre les deux matrices.



**Figure 2.2** : Différents exemples de stratégies d'immobilisation de biomolécules. (a) Adsorption non spécifique, (b) Piégeage, (c) Monocouche auto assemblée (SAM), et (d) Electro-copolymérisation.

Il est à noter que dans le cas de l'électro-copolymérisation telle qu'utilisée dans ces travaux (conditions expérimentales décrites ci-dessous), il se forme des films pseudo-organisés de polypyrrole très fins ( $\sim 3$  nm) qui s'enchevêtrent tel un plat de spaghetti. Ils expriment ainsi les molécules covalentement couplées au polypyrrole de taille supérieure ( $\sim 10$  nm) dans différentes configurations (alignement aléatoire). La taille des ligands étant largement supérieure ( $> 3$  fois) à la taille du film formé, ces ligands se retrouvent saillants à la surface et non emprisonnés dans la couche insoluble (cas du piégeage moléculaire fig.2.2.b).

Se pose ici la question de l'influence de cette orientation aléatoire des anticorps en surface sur l'efficacité de la capture, et l'intérêt d'intercaler une protéine A par exemple pour l'orientation des anticorps. La maîtrise de l'orientation sur la surface, d'une protéine intermédiaire (ex : protéine A ou G) par électro-copolymérisation ne pouvant être réalisable, cela ne fera que déplacer le problème et ne le résoudra pas. En effet, si cette protéine se fixe de façon aléatoire sur la surface, les anticorps ne seront pas mieux orientés. En plus l'épaisseur des zones fonctionnalisées risque d'être augmentée, impactant ainsi sur la sensibilité de la biopuce.

### II.2.1 Adressage des ligands sur les surfaces par électro-copolymérisation

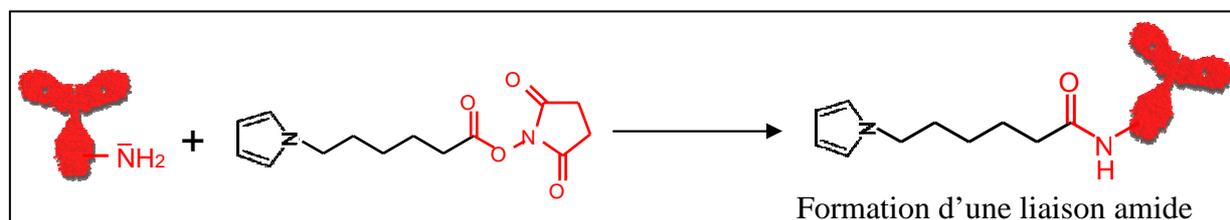
Lorsqu'un cône de pipette contenant un liquide est mis au contact d'une surface, une goutte est déposée. La taille de la goutte dépend des énergies de surface, de la tension

superficielle du fluide, du taux d'humidité, de la force d'appui, du temps de contact et de la géométrie de la pipette.

Nous avons exploité cette propriété pour effectuer nos dépôts de plots (zones fonctionnalisées) contenant des solutions de ligands. Afin d'obtenir plusieurs plots sur une seule surface, les dépôts effectués sont de très petits volumes. En pratique 15  $\mu\text{l}$  sont utilisés dans un cône de pipette contenant un fil de platine (chambre électrochimique), afin d'assurer une mouillabilité et un contact suffisant avec l'électrode (fil de platine) ; mais seulement quelques nanolitres sont déposés en surface. Un tampon d'électro-copolymérisation contenant du glycérol, permet de maintenir les protéines dans un état d'hydratation suffisant, pour minimiser l'évaporation et ainsi éviter leur dénaturation.

## II.2.2 Greffage électrochimique

Parmi les méthodes de greffage électrochimique de biomolécules, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'électrogreffage par oxydation du pyrrole ou l'électro-copolymérisation [15]. C'est un processus, grâce auquel, des micro-dépôts matérialisés par des plots sont réalisés. Le greffage électrochimique consiste à utiliser des ligands préalablement mis en réaction avec une espèce électro-active, le n-hydroxysuccinimide-Pyrrole (Py-NHS) (figure 2. 3). L'application d'une différence de potentiel (pulses de 2,4 V pendant 100 ms) dans la solution contenant les ligands couplés avec un monomère de pyrrole, initie une réaction électrochimique. Elle permet le dépôt d'un film insoluble de polypyrrole sur lequel sont greffés les ligands. Il se forme ainsi, un film insoluble de polypyrrole qui se dépose sur la surface en or (électrode de travail), fixant ainsi la biomolécule conjuguée dans chaque plot déposé.

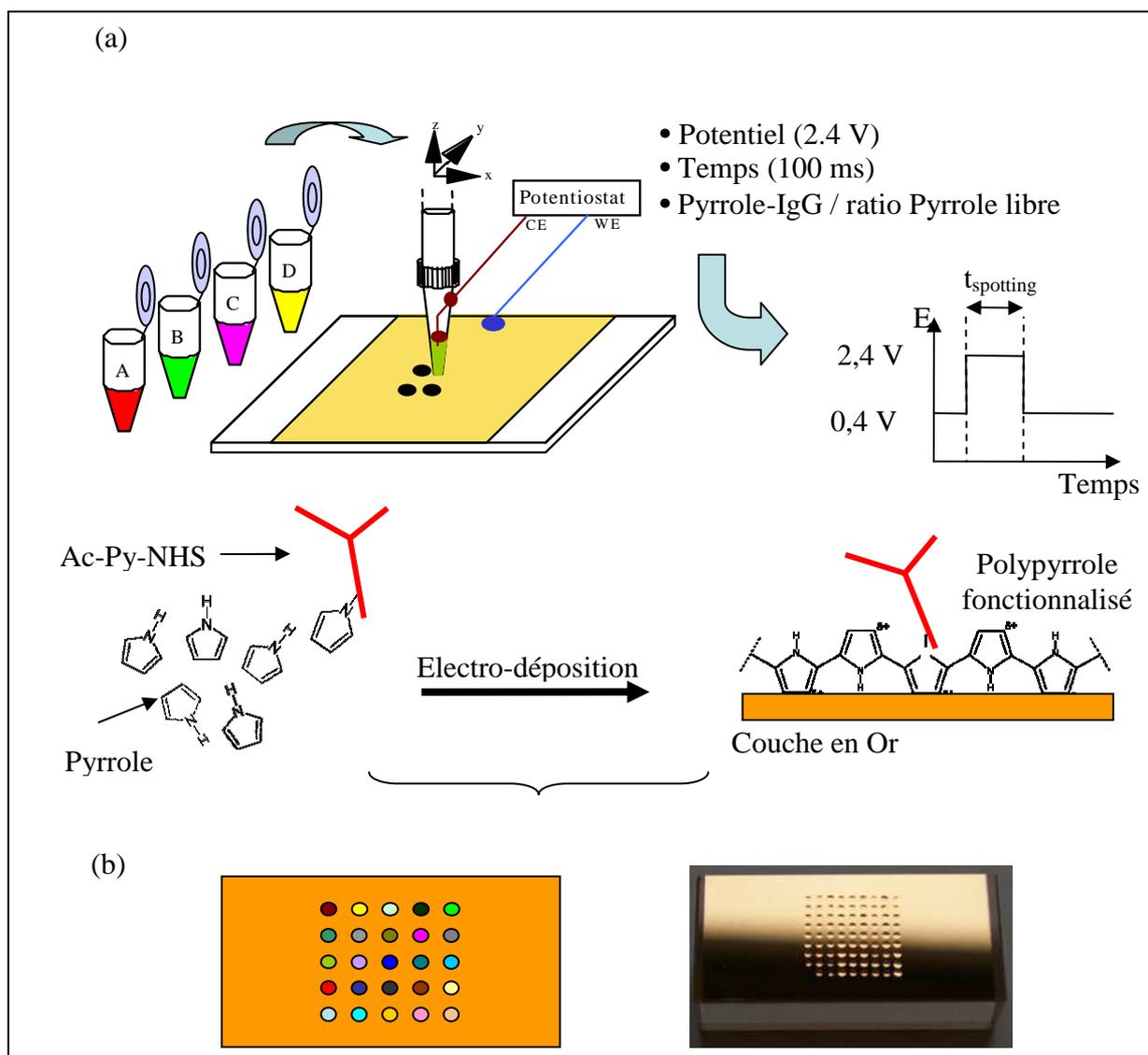


**Figure 2.3 :** Réaction de couplage d'un anticorps avec un monomère de Pyrrole-NHS.

Dans le présent travail, des biopuces à protéines/anticorps ont été préparées en utilisant la méthode d'électro-polymérisation des protéines sur supports recouverts d'une fine couche d'or, comme décrit par *Grosjean et al.* [13], à partir d'un conjugué protéine-pyrrole en

présence de pyrrole libre. En effet, il faut au préalable coupler les protéines/anticorps de façon covalente au Py-NHS (protocole de couplage détaillé en annexe). Ce procédé s'applique à toutes les protéines, à condition que des groupes amines primaires soient présents et accessibles sur la molécule pour réagir avec le groupe NHS du pyrrole. Les conjugués de protéine-pyrrole résultants sont alors électro-copolymérisés en présence de pyrrole libre comme décrit sur la figure 2.4.a. Les monomères de pyrrole libre permettent de former une matrice insoluble après polymérisation, fixant ainsi, de manière covalente, la protéine couplée à un monomère de pyrrole au polymère nouvellement formé.

Le potentiostat utilisé pour effectuer les pulses est relié à un moteur (spotteur), à l'aide d'une première connexion avec l'électrode de travail ou anode (couche dorée) et d'une deuxième connexion avec la contre électrode ou cathode (fil en platine dans la chambre électrochimique). L'expérience se fait à température ambiante, sans besoin de contrôler le taux d'humidité, car la chambre électrochimique est très petite, confinée et contient un volume de solution à électro-copolymériser en excès (15  $\mu$ l), assurant l'équilibre entre la phase gazeuse et la phase liquide.



**Figure 2.4 :** Schema de l'électro-polymérisation d'un mélange de monomères de pyrrole et de biomolécules activées à l'aide de Py-NHS. **(a)** Principe de l'électro-copolymérisation. **(b)** Obtention de  $n$  plots sur la Biopuce (Vue d'en haut).

Le robot Polypotter permet l'électro-polymérisation à température ambiante des protéines couplées au Py-NHS et du pyrrole libre, à l'aide un cône de pipette contenant une tige en platine servant de contre électrode (cellule électrochimique, figure 2.4.a). La polymérisation est effectuée par des pulses électriques rapides de 100 ms avec une différence de potentiel appliquée de 2.4 V, entre la surface en or (anode) et le fil de platine (cathode), comme décrit par *Guédon et al* [16]. Dans ce cas là, il n'y a pas d'électrode de référence, car l'excès de pyrrole libre à oxyder, est considéré comme inépuisable. Ce robot permet d'effectuer des réactions successives de rinçage et de remplissage de la pipette-cellule, ainsi que l'électro-polymérisation par un processus automatisé. Il permet par conséquent, l'obtention de plots identiques sur la surface. Afin d'estimer la reproductibilité de ce

processus, chaque espèce a été déposée sous forme de trois plots (triplicat) sur la surface dorée.

Enfin, ce procédé permet l'obtention d'un support recouvert de sa fine couche homogène d'or, sur laquelle apparaissent des plots luisants visibles à l'œil nu (figure 2.4.b) qui correspondent aux matrices de polypyrrole portant les protéines sur lesquelles les interactions vont pouvoir s'effectuer. Les plots de polypyrrole obtenus avec le robot Polypotter ont un diamètre moyen de 350  $\mu\text{m}$  et une épaisseur de quelques nanomètres. Le support ainsi préparé est laissé à température ambiante pendant 5 minutes afin de stabiliser les plots, puis plongé dans du tampon PBS pour éviter de sécher/dénaturer les protéines.

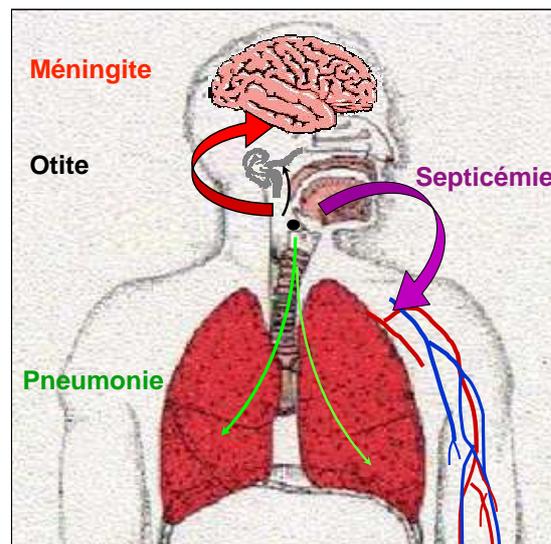
En pratique, pour un électro-dépôt, 15  $\mu\text{l}$  de chaque solution d'anticorps ou de protéines conjugués sont préparés avec : V (volume nécessaire pour avoir la protéine à la concentration finale voulue  $\times \mu\text{M}$ ) + 3  $\mu\text{l}$  de pyrrole libre à 100 mM (large excès) + qsp tampon d'électro-copolymérisation. Il est à noter que les concentrations protéiques utilisées sont exprimées en concentration dans la solution en général de 0,5 à 2  $\mu\text{M}$  et non pas en concentration surfacique de la protéine greffée. Nous estimons que le processus de greffage est reproductible en termes de concentration surfacique pour une concentration en solution à électro-polymériser donnée.

### **II.3 Choix du modèle bactérien**

La disponibilité, l'environnement et la classe de sécurité bactérienne ont guidé notre choix du modèle bactérien utilisé pour initier ce travail. Le modèle choisi est une souche de *Streptococcus pneumoniae* R6 (origine : Institut Rockefeller, New York, USA), qui est une souche atténuée, non capsulée et non virulente classée au niveau de confinement L1 (concerne les bactéries n'ayant aucun pouvoir pathogène pour l'homme et ne constituant pas de menace pour l'environnement). Ceci a facilité son utilisation au sein de notre laboratoire, non équipé au démarrage de ce projet, pour la manipulation de souches microbiologiques virulentes de niveau de confinement supérieur à L1. Cette souche de *Streptococcus pneumoniae* R6, communément appelée pneumocoque, a été utilisée grâce à la collaboration avec l'équipe de Thierry Vernet (Groupe Pneumocoque, Institut de Biologie Structurale, Grenoble), au sein de

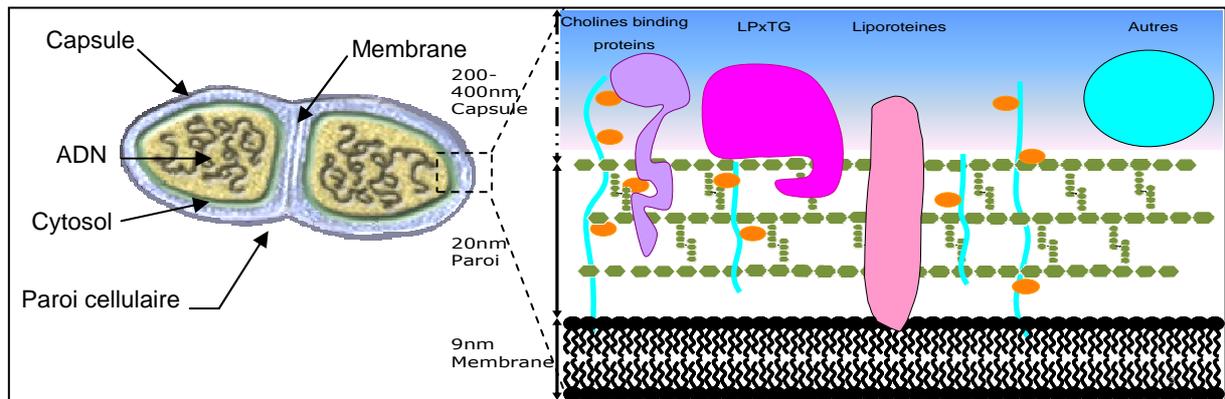
laquelle j'avais initié des travaux d'identification et de caractérisation d'interactions entre différents ligands et protéines bactériennes, lors de mon stage de master.

Le pneumocoque est une bactérie Gram positif, souvent retrouvée sous forme de diplocoque, causant des infections invasives de type pneumonie, méningite et septicémie (Figure 2.5). La couverture vaccinale non optimale et l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques, soulève des problèmes de santé publique [17].



**Figure 2.5 :** Exemples d'infections invasives causées par le *Streptococcus pneumoniae*. La **pneumonie** à pneumocoque est la plus courante des pneumonies bactériennes ; la **septicémie** ou bactériémie à pneumocoque est une complication des **infections ORL** non invasives, de la pneumonie ou de la **méningite**.

Le pneumocoque adhère aux cellules de l'hôte grâce à l'interaction entre ses propres protéines de surface et les protéines de l'hôte [18], ce qui représente une étape importante du processus infectieux. Le séquençage complet du génome de la souche *R6* [19] et *TIGR4* (virulente) de *S.pneumoniae* a rendu possible l'identification d'une grande partie des protéines de surface de ce pathogène (Figure 2.6), mais seules quelques unes sont connues pour leur implication dans la virulence du pneumocoque. Parmi elles, on peut citer la famille des *Choline Binding Proteins*, en particulier la CbpE qui est connue pour faciliter la colonisation et l'adhérence aux cellules épithéliales de l'hôte, à travers le recrutement des protéases (système plasminogène/plasmine) pour cliver la matrice extracellulaire, permettant ainsi de frayer un chemin pour la dissémination de la bactérie [20]. Une autre protéine de la même famille, la CbpA, est une adhésine majeure qui inhibe le système du complément, se protégeant ainsi de la phagocytose par recrutement du facteur H circulant [21].



**Figure 2.6 :** Structure et composition du pneumocoque avec l'organisation de ses protéines de surface (Cbps, LpxTG, lipoprotéines...).

Suite à ces travaux préliminaires, basés sur une stratégie de criblage moléculaire entre les protéines de la bactérie et celles de l'hôte, nous avons pu identifier quelques ligands externes. La caractérisation de ces interactions a été effectuée par test ELISA [20, 22] puis confirmée par notre système SPR. Nous avons retenu par ces deux méthodes combinées, que la protéine recombinante CbpE, interagissait de façon spécifique avec un facteur sanguin appelé plasminogène (protéine de l'hôte) ; ainsi qu'un anticorps anti-CbpE qui a également été utilisé comme contrôle positif pour la détection de la protéine CbpE. La production et la purification de la protéine recombinante CbpE, ainsi que la purification de l'anticorps polyclonal anti-CbpE sera détaillée dans la section expérimentale.

La caractérisation de ces interactions à l'échelle moléculaire a été nécessaire pour passer à l'étape suivante, qui est la détection de la bactérie en tant que cellule entière. Nous avons pu vérifier que le pneumocoque entier interagissait avec le plasminogène ainsi que l'anti-CbpE, par ELISA et par SPR également.

## II.4 Détection des bactéries en point final

Comparée aux autres méthodes conventionnelles, l'immunocapture est l'une des méthodes les plus rapides et les plus utilisées pour le diagnostic bactérien. Nous pouvons citer, les tests sérologiques d'agglutination [23], la séparation immuno-magnétiques à l'aide de billes fonctionnalisées avec des anticorps [24], ou encore les tests radio-immunologiques

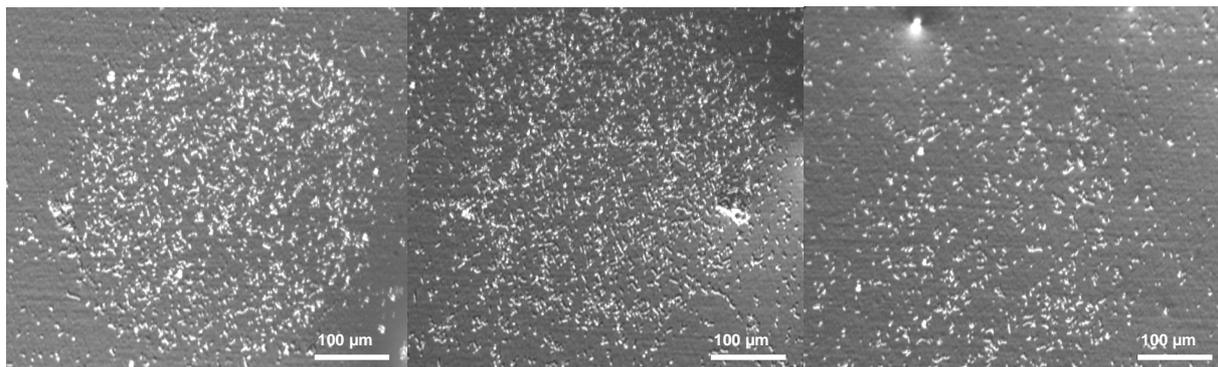
(RIA), substituées pour des raisons de sécurité radiologique par des tests immuno-enzymatiques variés (EIA) avec une détection colorimétrique ou fluorimétrique [25]. La plupart du temps, l'immuncapture est suivie d'un immunomarquage pour la révélation de la détection spécifique et se fait en point final.

Récemment, un grand nombre de tests basés sur les interactions antigènes-anticorps sur support solide (biopuces et microsystèmes) se sont développés. Les immuno-capteurs SPR en font partie.

#### II.4.1 Validation de la capture par microscopie optique

L'immobilisation par électro-polymérisation de l'anticorps anti-CbpE, ainsi que du plasminogène sur une lame recouverte d'or, a permis d'immobiliser des bactéries en suspension. Après blocage de la surface avec de la BSA 1% pendant 15 minutes, une incubation de deux heures de la lame dans un tampon PBS contenant  $5 \times 10^7$  ufc/ml de pneumocoques a été réalisée, puis après un rinçage doux à l'aide de PBS stérile, une observation au microscope optique par réflexion a été réalisée.

Les images ci-après (Figure 2.7), montrent une capture spécifique des pneumocoques R6 sur les plots de l'anti-CbpE ( $1 \mu\text{M}$ ) ainsi que celui du plasminogène ( $2 \mu\text{M}$ ), contrairement au plot contrôle (IgG de lapin  $1 \mu\text{M}$ , non spécifique) où il y a quelques bactéries sur la surface.



(a) Plot d'anti-CbpE

(b) Plot de plasminogène

(c) Plot d'IgG contrôle

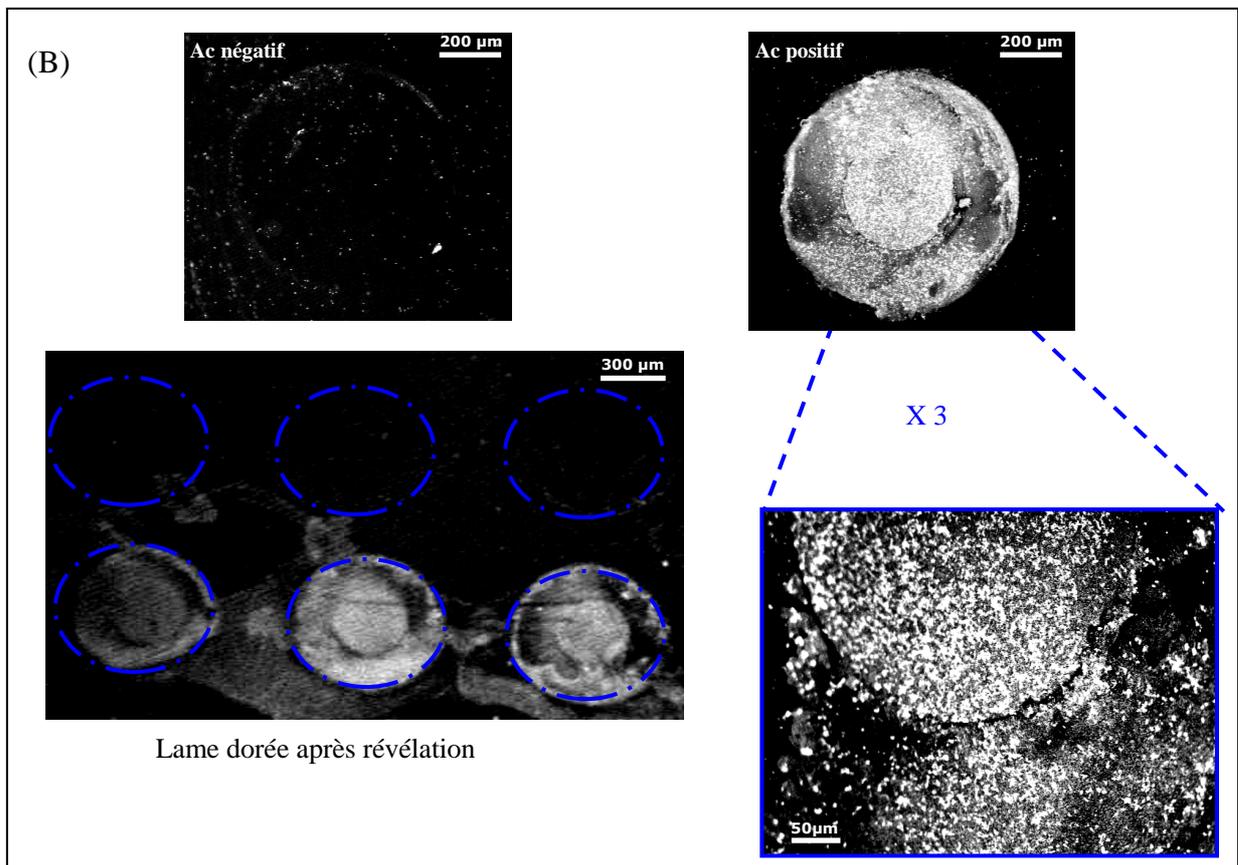
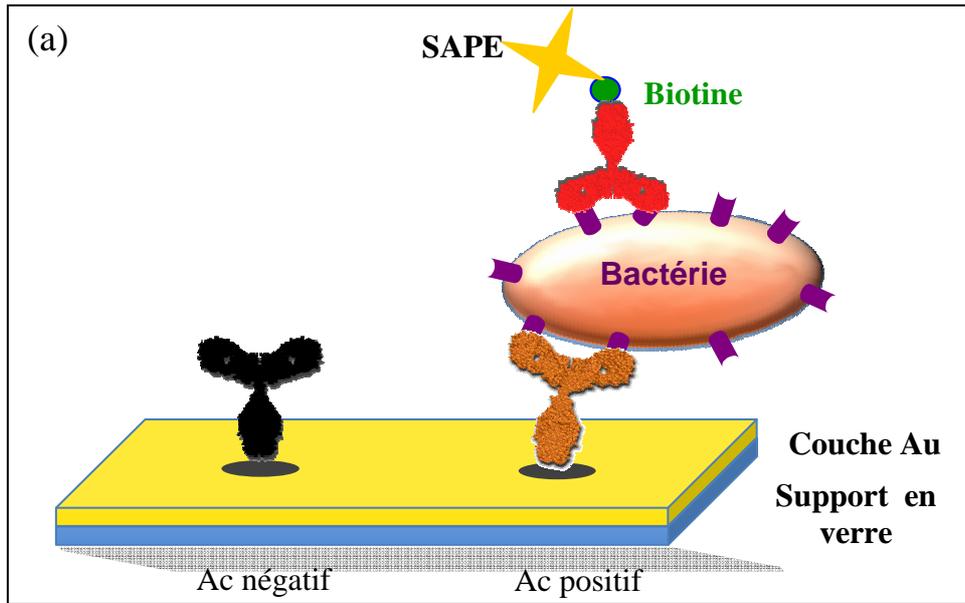
**Figure 2.7 :** Observation au microscope optique par réflexion (x 10), des différents plots d'anticorps sur lame dorée, après une incubation de deux heures au contact de  $5 \times 10^7$  ufc/ml de *S.pneumoniae* R6.

Cette observation directe des bactéries sur support, montre une plus forte densité sur les plots de l'anti CbpE et du Plasminogène, comparé au plot de l'IgG contrôle. Une confirmation de la spécificité de la capture de ces bactéries sur les différents plots peut être réalisée par immunofluorescence. En effet, la technique d'immunofluorescence, se base sur le principe de capture en sandwich puis révélation, offrant une double spécificité de détection et éliminant la révélation de l'adsorption non spécifique des bactéries.

#### **II.4.2 Validation de la capture par immunofluorescence**

Sur une lame dorée de microscope, des plots d'anti-CbpE et des anticorps de référence non spécifique de la bactérie (IgG monoclonal de contrôle), ont été électro-polymérisés en triplicat. Une préculture durant la nuit (environ 15h) a été mise en incubation au contact de la lame, à température ambiante et a permis de capturer des bactéries sur les plots où a été greffé l'anticorps spécifique. La lame est ensuite délicatement rincée puis mise en incubation, pendant une demi-heure avec des anticorps anti CbpE biotinylés. Enfin la révélation se fait à l'aide d'un marqueur fluorescent qui est la StreptAvidine PhycoErythrine (SAPE 5%).

La figure 2.8.a détaille le principe de la révélation par immunofluorescence. La bactérie capturée est prise en sandwich entre deux anticorps dont l'un est fixé sur le support solide et l'autre libre couplé à de la biotine. La streptavidine de l'agent révélateur SAPE se lie à la biotine et produit de la fluorescence. La figure 2.8.b représente des images prises à l'aide d'un microscope à fluorescence ; la révélation de la fluorescence à l'aide de la SAPE a permis de dévoiler les bactéries accrochées sur les plots immuno-fonctionnalisés avec l'anti-CbpE et le plasminogène. Les plots non spécifiques de l'IgG contrôle accrochent très peu les bactéries.



**Figure 2.8. :** Validation de la capture spécifique des bactéries par immunofluorescence. (a) Schéma de la révélation de bactéries capturées sur les plots spécifiques par immunofluorescence. (b) Observation au microscope de la fluorescence des plots d'anticorps spécifiques, après les étapes d'incubation avec les bactéries puis l'anticorps biotinylé, révélation à la SAPE et rinçage.

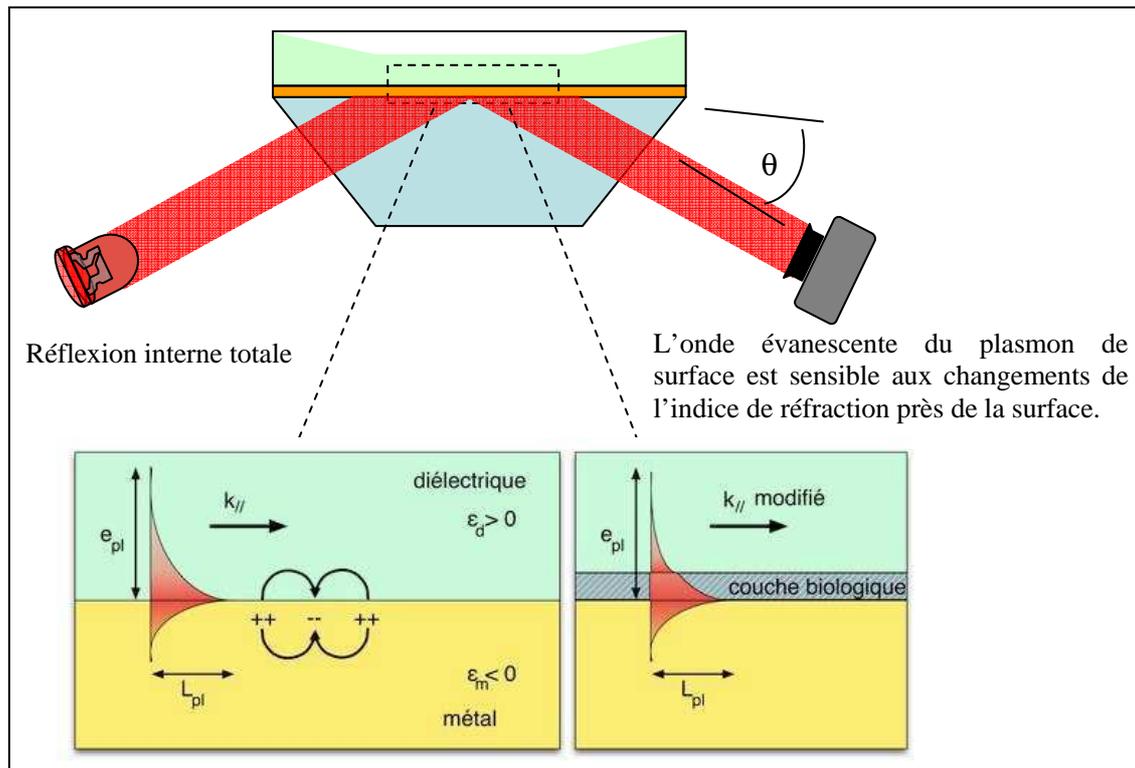
Cette technique d'immunofluorescence a permis de confirmer la capture spécifique des bactéries, avec moins de bruit de fond. En effet, la bactérie se trouve capturée en mode « *sandwich* » entre le ligand immobilisé et l'anticorps secondaire marqué à la biotine ; il y a plusieurs sites de fixation disponibles sur la bactérie, ce qui permet d'avoir plus d'anticorps secondaires armés, procurant ainsi une « double spécificité » pour la bactérie immobilisée. Les inconvénients de cette technique, malgré sa spécificité, sont nombreux. Parmi eux on peut citer la consommation de plus de matériel biologique (anticorps) et de réactifs (Biotine, SAPE), en plus des différentes étapes d'incubation, de rinçage et de révélation, consommatrices de temps, ainsi que le phénomène de photo-blanchiment. S'ajoute à cela, une détection en point final, dissociant la capture et la révélation de la détection bactérienne. Afin de palier ces inconvénients, nous avons donc préféré nous orienter vers un système de détection direct, en temps réel et sans marquage.

## **II.5 Détection des bactéries en temps réel sans traceur**

L'objectif de cette partie est de décrire un procédé permettant la détection des bactéries en temps réel (par opposition à la détection en point final), et ce, sans l'utilisation de traceurs (ex. marqueur fluorescent dans le paragraphe précédent). Grâce aux avantages qu'ils présentent, les biocapteurs optiques à ondes évanescentes type SPR sont les plus développés dans les catégories de biocapteurs à détection sans marquage [26]. La résonance plasmonique de surface semble donc être un bon candidat adapté à une détection directe sans traceur.

### **II.5.1 Le phénomène de Résonance Plasmonique de Surface (SPR)**

Le plasmon de surface est une onde à décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface séparant un métal d'un milieu diélectrique (milieu biologique par exemple), parallèlement à laquelle elle se propage. Les métaux appropriés, peuvent être, l'argent, l'or, le cuivre et l'aluminium, mais les métaux les plus communément utilisés sont l'or (Au) pour sa grande stabilité et l'argent (Ag) pour son pic de résonance étroit.



**Figure 2.9 :** Résonance plasmonique de surface selon la configuration établie par *Kretschmann*. La lumière est réfléchi à l'interface verre/or. «  $e_{pl}$  » et «  $L_{pl}$  » sont des grandeurs caractéristiques de la profondeur de pénétration de l'onde plasmon de surface, dans le milieu diélectrique (espace des interactions biologiques) et le métal respectivement. Les changements de l'indice de réfraction dans le milieu diélectrique sont détectés jusqu'à 100-200nm à partir de l'interface en fonction de la qualité du revêtement d'or et la longueur d'onde de la lumière.

Dans ce qui suit, nous allons nous concentrer sur le couplage SPR via un prisme de verre. Deux configurations différentes ont été proposées par *Otto* [27] et *Kretschmann* [28]. Dans la configuration d'*Otto*, le diélectrique est placé entre le prisme de verre et le métal, laissant une très fine épaisseur du milieu diélectrique entre les deux, pour permettre à l'onde évanescente d'exciter le plasmon de surface. *Kretschmann* a choisi une couche d'or très mince directement placée sur le prisme de verre, offrant ainsi la possibilité d'avoir un plus grand volume du milieu diélectrique. C'est cette dernière configuration qui a été adoptée dans le présent travail, permettant ainsi une fonctionnalisation de la surface de l'or, qui est ensuite mise au contact de la solution biologique. La figure 2.9 représente le principe de fonctionnement du biocapteur SPR selon la configuration de *Kretschmann*. Celui-ci consiste à générer une onde, de polarisation transverse magnétique (TM), qui traverse d'abord un prisme de verre d'indice de réfraction élevé et se réfléchit sur l'interface recouverte d'un métal sous un angle d'incidence supérieur à l'angle critique (condition de réflexion totale). Aux alentours de l'angle de résonance, sont créées des oscillations résonantes dans le plasma ou nuage

électronique constitué par les électrons libres de la bande de conduction du métal. La résonance des plasmons de surface fait chuter le coefficient de réflexion du métal, dû au pic d'absorption d'énergie du faisceau incident près de l'angle de résonance. Le champ électromagnétique dans le milieu présentant un caractère d'onde évanescente ; l'amplitude décroissant exponentiellement avec la distance à l'interface, va être modifiée lors de la fixation de molécules sur la surface. La mesure de l'angle d'incidence permettant cette résonance va déterminer la présence des molécules fixées en surface [29-31]. En d'autres termes, cette méthode optique exploite les « ondes électromagnétiques de surface » pour sonder les variations de masse, d'indice optique et d'épaisseur de la couche formée survenant à l'interface entre le métal et le diélectrique.

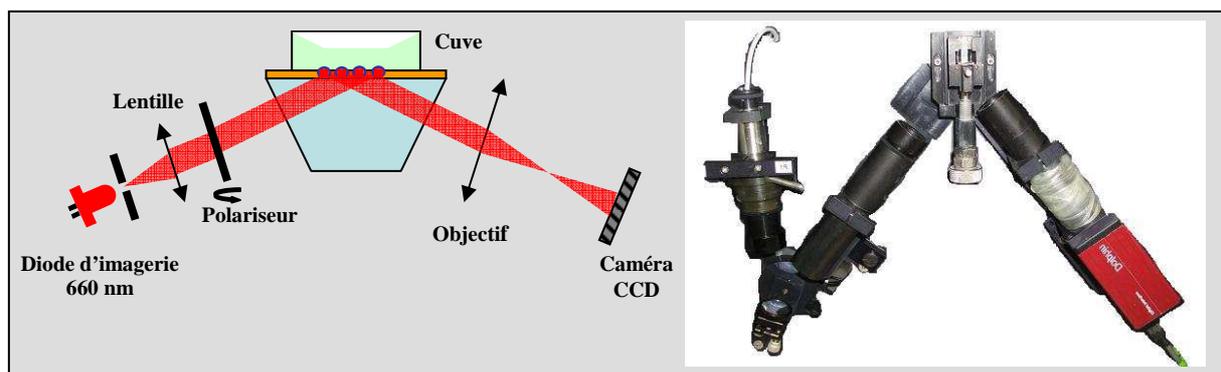
Les biocapteurs SPR permettent une analyse en temps réel des interactions entre les biomolécules ligands et les récepteurs (ou système sonde-cible), tout en évitant l'étape de marquage qui peut affecter l'interaction par la modification apportée à la cible. La détection des interactions est basée sur le changement induit sur la surface par la formation du complexe ligand-récepteur qui va perturber le signal optique initial. La variation de ce signal est mesurée en fonction du temps (notion de suivi en temps réel), qui va permettre d'obtenir une cinétique de l'interaction. Le signal optique dépend aussi d'une caractéristique intrinsèque aux biocapteurs et au milieu baignant au dessus de cette surface (air ou solution aqueuse).

Les puces SPR ont été fonctionnalisées avec une large gamme de biomolécules de reconnaissance, comprenant les oligonucléotides [32], les aptamères [33, 34], les anticorps [35-37], les protéines [38], et même des cellules entières [39]. Les anticorps sont les biomolécules les plus utilisées, grâce à leur grande affinité, spécificité et disponibilité dans le commerce, comme détaillé précédemment [40].

### **II.5.2 Description du montage expérimental de la SPRi**

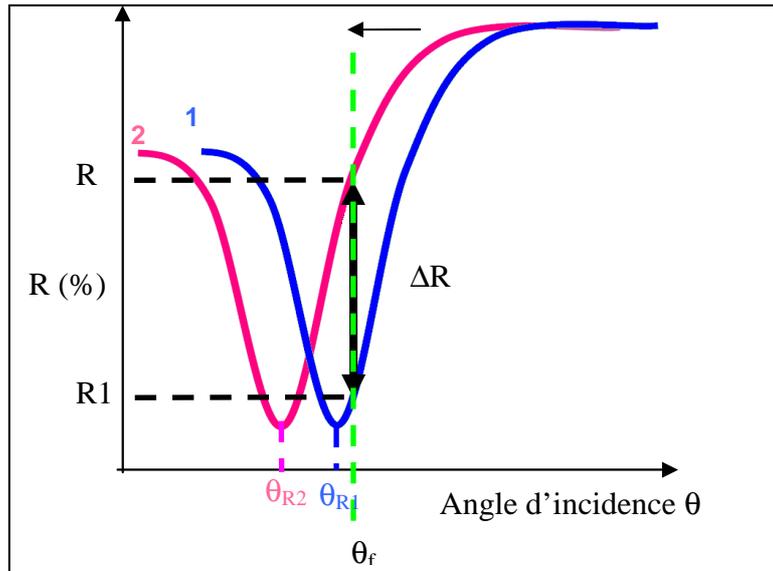
Les expérimentations présentées dans ce travail sont réalisées à l'aide d'un instrument d'imagerie SPR développé par *Horiba Scientific-GenOptics* et sont basées sur la configuration de Kretschmann. C'est un appareil d'imagerie multiparamétrique, ce qui le diffère des monocapteurs (ex. du Biacore) non compatibles avec notre stratégie d'immobilisation et surtout la lecture multiparamétrique. Le cœur du système d'imagerie SPR est composé de

plusieurs éléments de nature optique (figure 2.10). La lumière incidente (660 nm) est générée par une diode électroluminescente (LED), le trajet optique passe ensuite par une lentille biconvexe, puis par un polariseur rotatif qui comporte deux modes de polarisation : Transverse Magnétique (TM) pour la mesure SPR, et Transverse Electric (TE) pour la réflectivité totale de référence. La lumière incidente est réfléchiée sur la surface de la biopuce puis la réflectivité résultante est enregistrée par une camera CCD (12-bit). Il faut noter que l'angle d'incidence ainsi que la longueur d'onde de la lumière incidente sont fixés pendant la mesure. Un logiciel dédié fourni par *Horiba Scientific-GenOptics* est utilisé pour suivre les variations de réflectivité observées sur des zones correspondant aux plots associés aux différentes biomolécules greffées. La réflectivité locale est mesurée (pixélisée) par la caméra CCD puis les données sont traitées par logiciel et représentées sous forme de courbes cinétiques par intégration des variations de réflectance sur la surface de chaque plot.



**Figure 2.10 :** Montage expérimental de l'imageur SPR (Horiba Scientific-GenOptics). Le système SPRi est équipé avec une LED ( $\lambda = 660$  nm) et la réflectivité est enregistrée par une camera CCD connectée à un ordinateur. L'acquisition des données est contrôlée par un logiciel approprié. Le montage est incubé dans une enceinte à 37°C pendant les expériences.

Le principe de mesure par SPR est basé sur l'analyse du déplacement de la courbe plasmon qui représente la variation de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence (figure 2.11).



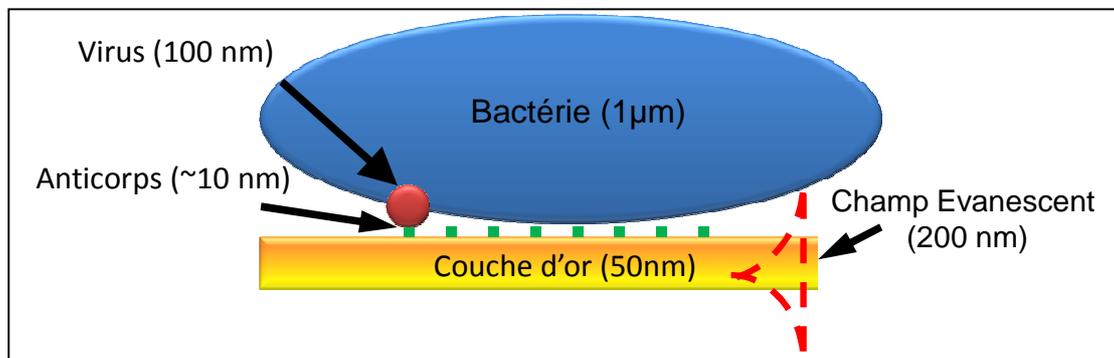
**Figure 2.11** : Courbe plasmon de la variation de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence  $\theta$ . Le décalage de l'angle de résonance de la droite (courbe 1) vers la gauche (courbe 2), donne une variation en réflectivité  $\Delta R$  ( $R_2 - R_1$ ), mesurable sur la zone linéaire de la courbe. Il faut se placer à un angle de travail  $\theta_f$  afin d'être au maximum de la pente de la courbe plasmon (c-à-d au pied de la zone linéaire).

L'optimum de la résonance des plasmons est au voisinage d'un angle d'incidence donnant le minimum de réflectivité. Il est par conséquent nécessaire de bien choisir l'angle de travail afin d'être placé à proximité du maximum de la pente de la courbe plasmon (au pied de la zone linéaire par exemple) où les déplacements angulaires donnent une variation de réflectivité maximale [41, 42].

### II.5.3 La détection des bactéries par SPR

La détection des bactéries par SPR rencontre plusieurs difficultés. D'une part, la grande taille et la morphologie de la bactérie entière se heurtent à la faible pénétration de l'onde électromagnétique du plasmon de surface (figure 2.12), car en fonction de la longueur d'onde et de l'indice de réfraction du milieu, la profondeur de pénétration du plasmon de surface peut varier de 100 à 200 nm [43]. Ce volume sensible de la surface est très petit comparé à la dimension des bactéries (1 à 3  $\mu\text{m}$ ) ; l'exposition de la bactérie entière à l'onde évanescente est donc impossible. D'autre part, le cytoplasme bactérien et le milieu aqueux dans lequel elle est détectée ont un faible contraste de l'indice de réfraction. De ce fait, la SPR détecte le changement de l'indice de réfraction de la masse sèche de la bactérie, excluant ainsi l'eau qu'elle renferme, à la différence de la microbalance à Quartz (QCM) où l'onde

acoustique de surface (SAW) détecte la masse mouillée de la bactérie accrochée [44]. Il est également à noter, que la disponibilité et l'accessibilité des antigènes de la surface bactérienne capables de se lier aux biomolécules de reconnaissance, est également un facteur limitant. De surcroît, la diffusion des bactéries dans le milieu est lente et se fait uniquement via des mouvements browniens et de la sédimentation si la bactérie n'est pas dotée de flagelles pour nager ; ce phénomène limite ainsi les chances de la bactérie d'atteindre les ligands immobilisés sur la surface de la biopuce et ce de manière plus flagrante pour une faible concentration de bactéries. Par conséquent, il faudrait de grandes quantités de bactéries pour pouvoir les immobiliser et les détecter de façon spécifique et efficace ; ce qui nous dirige vers la notion de limite de détection, que nous appelleront LOD pour « *Limit Of Detection* ».



**Figure 2.12 :** Comparaison de la taille des différentes entités biologiques et du champ évanescent.

Dans ce qui suit, nous détaillerons les travaux de différentes équipes, en matière de détection de bactéries par SPR. Puis nous situerons nos travaux de détection de bactéries entières, de façon statique (sans croissance), en termes de spécificité et de LOD, grâce à notre système d'imagerie SPR.

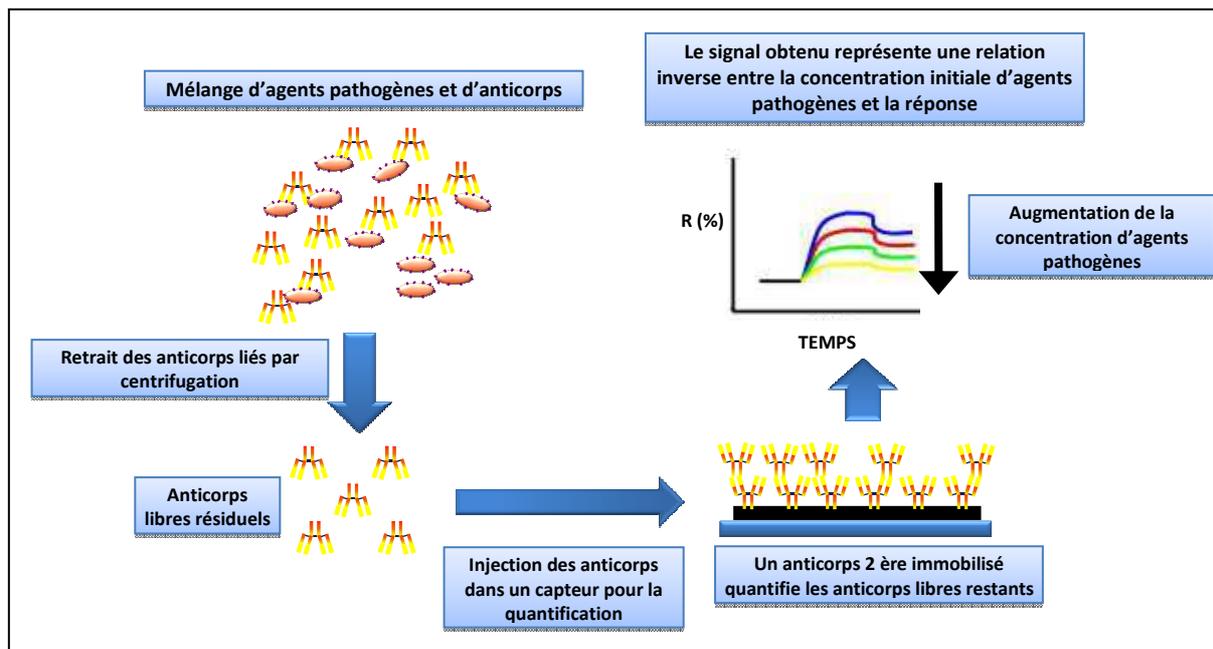
### ***II.5.3.1 Etat de l'art de la détection bactérienne par SPR***

La détection de bactéries, grâce à un système microfluidique a été appliquée par différentes équipes, soit sur des versions commerciales des biocapteurs de type SPR, telles que Biacore © qui est très utilisé pour des travaux de recherche comme ceux décrits par *Homola* [45] ou *Taylor* [46, 47], soit par des systèmes non commerciaux conçus dans les laboratoires. Dans le but de diminuer les limites de détection (LOD), différentes stratégies ont été abordées. La première, fut la destruction de l'intégrité bactérienne, avec ou sans traitements physiques et/ou chimiques. D'autres stratégies étaient basées sur l'amélioration de

la disponibilité et du greffage des ligands sur la surface de la puce, ou de l'amélioration de la chimie de surface. Contrairement aux tests en cuve ouverte que nous utiliserons dans notre protocole, les expérimentations de l'état de l'art sont des tests microfluidiques réalisés dans une cuve comportant au moins une chambre réactionnelle de détection avec une entrée et une sortie de liquide.

Différentes équipes ont travaillé sur l'optimisation de la LOD par traitement préalable des bactéries. L'équipe de *Hearty et al.*[48] détecte la *Listeria monocytogenes* viable à des seuils de  $10^7$  ufc/ml. Celle de Taylor *et al.*[47] a obtenu de bons résultats avec un seuil de détection qui descend à  $10^6$  ufc/ml pour une immobilisation de bactéries entières à la surface du capteur et un seuil de  $10^4$  ufc/ml avec des bactéries lysées ou mortes dans l'éthanol. Effectivement, casser les bactéries en plusieurs fragments, diminue les limitations dues au flux et permet aux composants bactériens de se rapprocher plus près de la région sensible de la surface, par contre cette optimisation n'est pas adaptée à l'identification des bactéries viables, car elle se réalise sur lysat bactérien. L'équipe de *Subramanian* [49] a réussi à détecter *E.coli* O157H7 avec des LOD de  $10^6$  ufc/ml dans un tampon et  $10^8$  ufc/ml dans un jus de pomme, pour une détection directe des bactéries vivantes immobilisées à la surface du capteur, mais réussit à descendre à une LOD de  $10^3$  ufc/ml dans le tampon et  $10^6$  ufc/ml dans le jus de pomme, avec une détection de type sandwich : après immobilisation des bactéries sur le capteur, un deuxième anticorps dirigé contre la bactérie est utilisé. Cet anticorps s'immobilise à la surface du capteur, si la bactérie cible est bien présente, et provoque une variation de la réponse du capteur, amplifiant ainsi le signal. Ce système, bien que permettant de diminuer le seuil de détection du capteur, d'un facteur 100 à chaque fois, demande un temps d'analyse plus long ainsi qu'une augmentation de la quantité du matériel biologique utilisé. De plus, il nécessite soit des échantillons très contaminés, soit une culture préalable pour atteindre ces concentrations.

D'autres équipes ont utilisé une approche indirecte basée sur un test d'inhibition appelé « *Subtractive Inhibition Assay* », suivi par SPR, c'est-à-dire que les bactéries sont incubées avec des anticorps libres spécifiques, et seul le taux d'anticorps libres résiduels est mesuré par SPR grâce à des anticorps secondaires (figure 2.13). Ce taux est par conséquent inversement proportionnel à la quantité de bactéries incubées au départ.



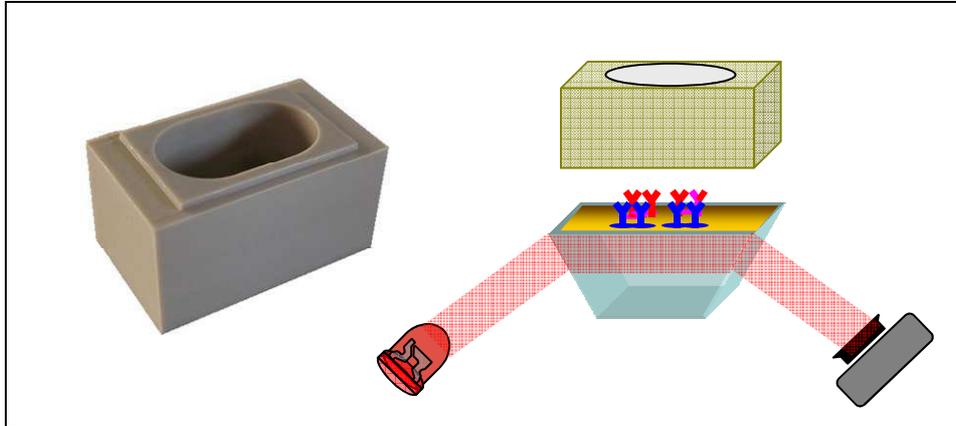
**Figure 2.13** : Schéma du principe de quantification des bactéries par le test d'inhibition « *Substrative Inhibition Assay* ».

L'équipe de Leonad *et al.* [50] a obtenu un seuil de détection de  $10^5$  ufc/ml sur des souches de *Listeria monocytogenes*, mais celles-ci étaient préalablement tuées par la chaleur ; Yixian *et al.* [51] a amélioré la LOD de  $3 \times 10^5$  ufc/ml en détection directe, à  $3 \times 10^4$  ufc/ml, en mesurant le taux d'anticorps libre résiduel. L'équipe de Oh *et al.*, a pu détecter *E. coli* O157:H7, avec une LOD de  $10^4$  ufc/ml [52], la surface était fonctionnalisée à l'aide des anticorps monoclonaux capturés par la protéine G. En optimisant la composition de l'assemblage des biomolécules de reconnaissance liées à la protéine G, ils ont pu améliorer la détection à  $10^2$  ufc/ml [53]. Ces travaux montrent que les limites de détection obtenues, ne descendent jamais au dessous du seuil de  $10^2$  ufc/ml. Cette approche ne permet pas de suffisamment améliorer la LOD pour détecter une à dix bactéries viables par millilitre; un besoin actuel dans les domaines médicaux et agro alimentaires dans le cadre du diagnostic rapide et sans enrichissement préalable de pathogènes.

### II.5.3.2 La détection statique par imagerie SPR

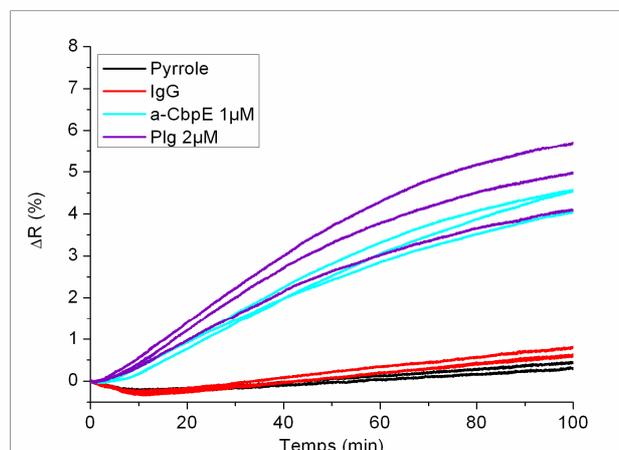
Nous avons voulu tester la limite de détection de bactéries par imagerie SPR hors système fluide. Pour ce faire, nous avons utilisé une cuve ouverte comportant une seule chambre (figure 2. 14). Après une préculture du *S. pneumoniae* R6 durant la nuit, les bactéries sont lavées et suspendues dans le PBS. Différentes dilutions dans le PBS sont réalisées pour

une détection que l'on a appelée « statique », c'est-à-dire sans croissance, car le tampon ne contient pas de nutriments ; la concentration de bactéries entières, reste par conséquent, fixe en fonction du temps.



**Figure 2.14** : Photo et schéma de la cuve à une chambre.

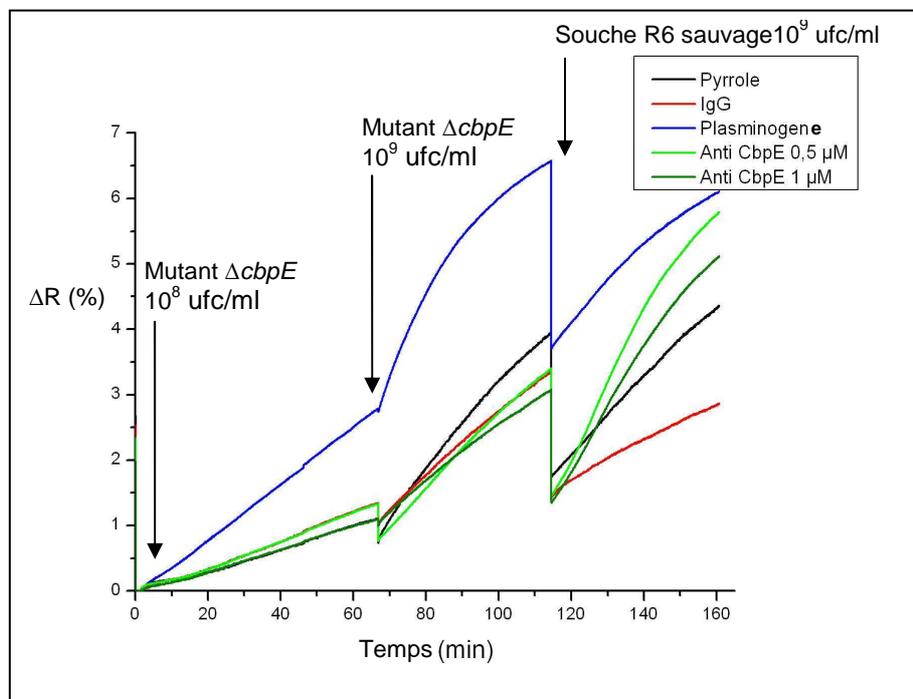
Afin de démontrer la spécificité de la détection du *S.pneumoniae R6* par SPR, nous avons réalisé une biopuce comportant des triplicats d'anti-CbpE et de plasminogène (plots spécifiques) ainsi que des IgG contrôle et du pyrrole (plots non spécifiques servant de contrôle négatif). La figure 2.15 présente le suivi cinétique de la détection de  $10^9$  ufc/ml de *S. pneumoniae R6* dans un tampon PBS. Des tests d'optimisation de la concentration en anticorps et du plasminogène sur les plots ont été réalisés, en établissant des gammes de concentration pour chaque espèce. Les concentrations optimales dans la solution d'électro-polymérisation retenues et utilisés pour cette expérimentation étaient de  $2\mu\text{M}$  pour le plasminogène et de  $1\mu\text{M}$  pour l'anti-CbpE dans la solution d'électro-polymérisation.



**Figure 2.15** : Suivi en temps réel de la détection de  $10^9$  ufc/ml de *S. pneumoniae R6* par imagerie SPR.

Ce graphique montre une nette augmentation des signaux sur les plots d'anti-CbpE et de plasminogène, dès les premières minutes ( $\Delta R = 1\%$  en moins de 20 min). Alors que les signaux des plots contrôles restent constants, avec une légère dérive en fonction du temps. Cette dérive peut être expliquée par une évaporation du milieu (enceinte de travail à 25°C). Cette expérimentation permet de valider la spécificité de la détection de *S.pneumoniae R6*.

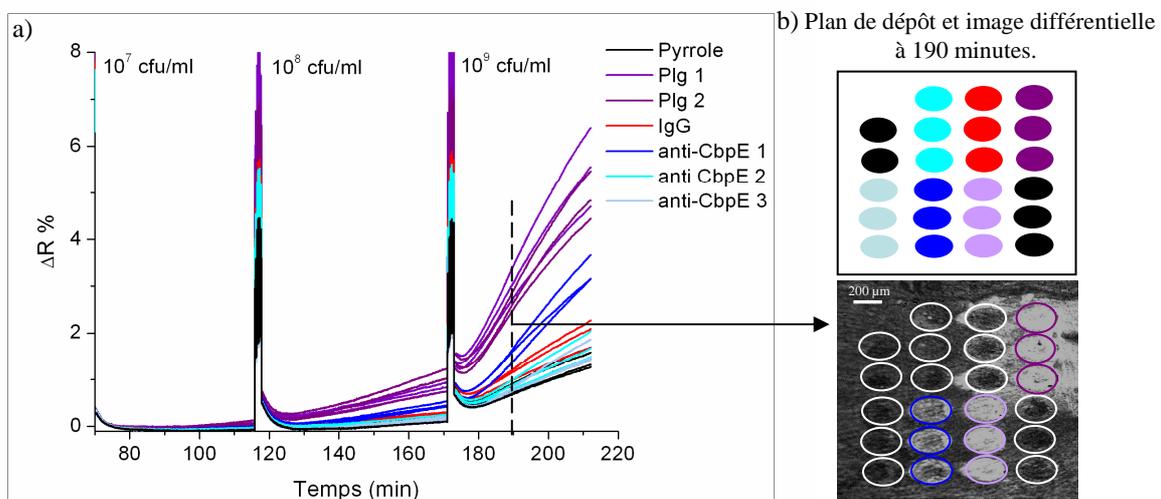
Un autre test de spécificité, consistant à utiliser un mutant de la souche *R6* du pneumocoque, invalidé pour les gènes codants pour la protéine CbpE, a également été réalisé. Cette souche de *S. pneumoniae R6ΔCbpE*, permet de montrer la spécificité de l'anti-CbpE, qui ne peut, en l'occurrence, pas la reconnaître. Des expériences ont démontré que le pneumocoque possédait au moins huit récepteurs pour le plasminogène, dont trois d'entre eux, ont été identifiés : l'alpha-enolase [54-56], la GAPDH [57, 58] et la CbpE [20]. Le recrutement de la plasmine via ces protéines permet au pneumocoque de détourner le système endogène afin de franchir les barrières endothéliales et épithéliales et de se propager de ce fait, dans son hôte. Le plasminogène peut donc reconnaître le mutant *R6ΔCbpE*, sur des récepteurs autres que la CbpE, comme le démontre l'expérimentation SPRi (figure 2.16).



**Figure 2.16 :** Suivi de la détection du *S. pneumoniae R6 ΔcbpE* par SPRi. Après saturation avec 1% BSA, injection de  $10^8$  ufc/ml du mutant  $\Delta cbpE$  incubé pendant 66 min, puis de  $10^9$  ufc/ml pendant 45 min. La souche *S. pneumoniae R6* sauvage a été utilisée comme contrôle positif de la réponse de l'anti-CbpE.

L'inoculation de  $10^8$  ufc/ml de *S. pneumoniae* R6  $\Delta$ cbpE montre que la bactérie n'est détectée que sur les plots de plasminogène, alors que le signal sur les plots de l'anti-CbpE reste négatif, au même titre que l'IgG contrôle et le pyrrole. L'inoculation de  $10^9$  ufc/ml du mutant *S. pneumoniae* R6  $\Delta$ cbpE, confirme ce résultat. Enfin, l'inoculation de la souche sauvage *S. pneumoniae* R6 qui exprime des protéines CbpE à sa surface, permet d'obtenir un signal sur les plots d'anti CbpE. Par contre, le signal est plus faible sur les plots de plasminogène. Ceci s'explique par le fait que l'adhésion préalable du mutant sur les plots de plasminogène, aurait saturé ses derniers.

Enfin, nous avons voulu tester la limite de détection (LOD) de cette approche statique en cuve ouverte. La figure 2.17 présente le graphique du suivi en temps réel par SPRi, du signal de variation en réflectivité, obtenu sur les plots d'anti-CbpE et du plasminogène après inoculations successives de  $10^7$  ufc/ml,  $10^8$  ufc/ml et  $10^9$  ufc/ml de *S.pneumoniae* R6. L'image différentielle à 190 minutes, montre l'interaction spécifique aux niveaux des triplicats de plasminogène (Plg1 et Plg2) en violet ainsi que l'anti CbpE en bleu.



**Figure 2.17 :** Suivi en temps réel par SPRi de la détection du *S.pneumoniae* R6. (a) Graphique du suivi en temps réel après injections successives de  $10^7$ ,  $10^8$  et  $10^9$  ufc/ml. (b) Image différentielle à  $t = 190$  minutes avec augmentation de la variation en réflectivité sur les plots spécifiques.

Des concentrations plus faibles que celles illustrées sur les graphiques, ont également été testées, mais aucun signal de variation en réflectivité n'a été obtenu. A partir de  $10^8$  ufc/ml, il y a une séparation plus nette entre les signaux sur les plots d'anticorps et de protéines spécifiques pour le *S.pneumoniae* R6 et les contrôles négatifs, les plots d'anti-CbpE

2 et 3, correspondent à des concentrations en anticorps de 0,1 et 0,02  $\mu\text{M}$  dans les solutions à électro-polymériser sur la puce, ce qui est visiblement trop faible pour la capture des bactéries. L'anti-CbpE 1 (0,5 $\mu\text{M}$ ) ainsi que le Plg 1 (1 $\mu\text{M}$ ) et Plg 2 (0,5 $\mu\text{M}$ ), sont en concentrations suffisantes pour capturer les bactéries de façon spécifique, l'image différentielle montre une augmentation de la réflectivité (plots claires) aux niveaux de ces plots spécifiques. Dans ces conditions la limite de détection se situe entre  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml.

En conclusion, les conditions hydrodynamiques typiques des canaux microfluidiques utilisés par différentes équipes, peuvent ralentir la diffusion des bactéries vers la surface et compliquent la détection, puisque les particules ont tendance à s'aligner au niveau du centre du canal microfluidique, par le phénomène du focus hydrodynamique. En outre, on peut rencontrer des problèmes de colmatage et de forces de cisaillement des bactéries dans les canaux, ainsi que des écoulements à petit nombre de Reynolds, limitant l'homogénéité des cellules en surface. Pour ces raisons, nous nous sommes orientés vers une expérimentation en cuve ouverte, sans système montage fluide, afin de situer les LOD des bactéries à l'aide de notre appareil SPRi.

En résumé, la détection statique en cuve ouverte testée, a permis de valider le choix des sondes et à prouver leur spécificité. En revanche, la LOD telle que présentée dans ces expériences reste élevée. Par la suite, nous avons voulu améliorer cette LOD en détectant les bactéries en cuve ouverte, pendant leur multiplication (phase de pré-enrichissement). Cette nouvelle approche, dite « dynamique », en opposition avec l'approche « statique », permet de détecter des inocula plus faibles, pendant la phase de leur croissance sur puce, ouvrant la possibilité de détecter en théorie, un inoculum d'une seule bactérie, à condition que cette dernière soit viable. Cette approche dynamique sera abordée plus en détail dans le prochain chapitre.

## Références bibliographiques du Chapitre II:

- [1] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, C. Adley, An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors, *Biotechnol Adv* 28 (2009) 232-254.
- [2] A.G. Mantzila, V. Maipa, M.I. Prodromidis, Development of a faradic impedimetric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium* in milk, *Analytical chemistry* 80 (2008) 1169-1175.
- [3] B.-K. Oh, Y.-K. Kim, K.W. Park, W.H. Lee, J.-W. Choi, Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*, *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004) 1497-1504.
- [4] B. Byrne, E. Stack, N. Gilmartin, R. O'Kennedy, Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins, *Sensors (Basel)* 9 (2009) 4407-4445.
- [5] P.D. Skottrup, M. Nicolaisen, A.F. Justesen, Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors, *Biosensors & bioelectronics* 24 (2008) 339-348.
- [6] J.H. Ng, L.L. Ilag, *Biochips beyond DNA: technologies and applications*, *Biotechnology Annual Review*, Elsevier, 2003, pp. 1-149.
- [7] D.S. Wilson, S. Nock, Functional protein microarrays, *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (2002) 81-85.
- [8] B.B. Haab, M.J. Dunham, P.O. Brown, Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions, *Genome biology* 2 (2001) RESEARCH0004.
- [9] T.O. Joos, M. Schrenk, P. Hopfl, K. Kroger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schorner, M. Durr, K. Herick, S. Rupp, K. Sohn, H. Hammerle, A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics, *Electrophoresis* 21 (2000) 2641-2650.
- [10] D.W. Grainger, C.H. Greef, P. Gong, M.J. Lochhead, Current microarray surface chemistries, *Methods Mol Biol* 381 (2007) 37-57.
- [11] S.J. Oh, B.J. Hong, K.Y. Choi, J.W. Park, Surface modification for DNA and protein microarrays, *Omics* 10 (2006) 327-343.
- [12] P.T. Charles, E.R. Goldman, J.G. Rangesammy, C.L. Schauer, M.-S. Chen, C.R. Taitt, Fabrication and characterization of 3D hydrogel microarrays to measure antigenicity and antibody functionality for biosensor applications, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004) 753-764.
- [13] L. Grosjean, B. Cherif, E. Mercey, A. Roget, Y. Levy, P.N. Marche, M.B. Villiers, T. Livache, A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process, *Analytical biochemistry* 347 (2005) 193-200.
- [14] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem Rev* 105 (2005) 1103-1169.
- [15] T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, R. Teoule, Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group, *Nucleic acids research* 22 (1994) 2915-2921.
- [16] P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan, Y. Levy, Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging, *Analytical chemistry* 72 (2000) 6003-6009.
- [17] D.M. Musher, Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment, *Clin Infect Dis* 14 (1992) 801-807.

- [18] S. Hammerschmidt, Adherence molecules of pathogenic pneumococci, *Current opinion in microbiology* 9 (2006) 12-20.
- [19] J. Hoskins, W.E. Alborn, Jr., J. Arnold, L.C. Blaszcak, S. Burgett, B.S. DeHoff, S.T. Estrem, L. Fritz, D.J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J.S. Glass, H. Khoja, A.R. Kraft, R.E. Lagace, D.J. LeBlanc, L.N. Lee, E.J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S.M. McAhren, M. McHenney, K. McLeaster, C.W. Mundy, T.I. Nicas, F.H. Norris, M. O'Gara, R.B. Peery, G.T. Robertson, P. Rockey, P.M. Sun, M.E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C.A. Zook, R.H. Baltz, S.R. Jaskunas, P.R. Rosteck, Jr., P.L. Skatrud, J.I. Glass, Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6, *Journal of bacteriology* 183 (2001) 5709-5717.
- [20] C. Attali, C. Frolet, C. Durmort, J. Offant, T. Vernet, A.M. Di Guilmi, *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix, *Infection and immunity* 76 (2008) 466-476.
- [21] L. Lu, Z. Ma, T.S. Jokiranta, A.R. Whitney, F.R. DeLeo, J.R. Zhang, Species-specific interaction of *Streptococcus pneumoniae* with human complement factor H, *J Immunol* 181 (2008) 7138-7146.
- [22] R.D. Marchese, D. Puchalski, P. Miller, J. Antonello, O. Hammond, T. Green, L.J. Rubinstein, M.J. Caulfield, D. Sikkema, Optimization and validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum, *Clin Vaccine Immunol* 16 (2009) 387-396.
- [23] M.B. Medina, W.L. Shelver, P.M. Fratamico, L. Fortis, G. Tillman, N. Narang, W.C. Cray, Jr., E. Esteban, A. Debroy, Latex agglutination assays for detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145, *Journal of food protection* 75 (2012) 819-826.
- [24] Q. Li, P. Chen, C. Ren, Comparison of different magnetic beads for adsorption of pathogenic bacteria, *Wei Sheng Yan Jiu* 41 (2012) 293-297.
- [25] S. Park, S. Shukla, Y. Kim, S. Oh, S. Hun Kim, M. Kim, Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* (formerly called *Enterobacter sakazakii*), *Microbiol Immunol* 56 (2012) 472-479.
- [26] R.L. Rich, D.G. Myszka, Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis, *Current Opinion in Biotechnology* 11 (2000) 54-61.
- [27] A. Otto, Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 216 (1968) 398-410.
- [28] E. Kretschmann, Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen, *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 241 (1971) 313-324.
- [29] C. Boozer, Q. Yu, S. Chen, C.-Y. Lee, J.Ä.Ì. Homola, S.S. Yee, S. Jiang, Surface functionalization for self-referencing surface plasmon resonance (SPR) biosensors by multi-step self-assembly, *Sensors and Actuators B: Chemical* 90 (2003) 22-30.
- [30] E. Mauriz, A. Calle, J.J. ManclÃ's, A. Montoya, A.M. Escuela, J.R. Sendra, L.M. Lechuga, Single and multi-analyte surface plasmon resonance assays for simultaneous detection of cholinesterase inhibiting pesticides, *Sensors and Actuators B: Chemical* 118 (2006) 399-407.
- [31] J. DostÄ;lek, H. VaisocherovÄ;ĵ, J.Ä. Homola, Multichannel surface plasmon resonance biosensor with wavelength division multiplexing, *Sensors and Actuators B: Chemical* 108 (2005) 758-764.
- [32] B.P. Nelson, M.R. Liles, K.B. Frederick, R.M. Corn, R.M. Goodman, Label-free detection of 16S ribosomal RNA hybridization on reusable DNA arrays using surface plasmon resonance imaging, *Environmental microbiology* 4 (2002) 735-743.

- [33] S. Balamurugan, A. Obubuafo, S.A. Soper, R.L. McCarley, D.A. Spivak, Designing highly specific biosensing surfaces using aptamer monolayers on gold, *Langmuir* 22 (2006) 6446-6453.
- [34] S. Xu, H. Yuan, S. Chen, A. Xu, J. Wang, L. Wu, Selection of DNA aptamers against polychlorinated biphenyls as potential biorecognition elements for environmental analysis, *Analytical biochemistry* 423 (2012) 195-201.
- [35] P.M. Fratamico, T.P. Strobaugh, M.B. Medina, A.G. Gehring, Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor, *Biotechnology Techniques* 12 (1998) 571-576.
- [36] B.-K. Oh, W. Lee, Y. Bae, W. Lee, J.-W. Choi, Surface plasmon resonance immunosensor for detection of *Legionella pneumophila*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8 (2003) 112-116.
- [37] M. Shimomura, Y. Nomura, W. Zhang, M. Sakino, K.-H. Lee, K. Ikebukuro, I. Karube, Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenyls and atrazine, *Analytica chimica acta* 434 (2001) 223-230.
- [38] M. Usami, K. Mitsunaga, Y. Ohno, Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 81 (2002) 47-55.
- [39] J.-W. Choi, K.-W. Park, D.-B. Lee, W. Lee, W.H. Lee, Cell immobilization using self-assembled synthetic oligopeptide and its application to biological toxicity detection using surface plasmon resonance, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 2300-2305.
- [40] W.M. Mullett, E.P. Lai, J.M. Yeung, Surface plasmon resonance-based immunoassays, *Methods (San Diego, Calif)* 22 (2000) 77-91.
- [41] J.M. Brockman, B.P. Nelson, R.M. Corn, Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films, *Annu Rev Phys Chem* 51 (2000) 41-63.
- [42] G. Steiner, Surface plasmon resonance imaging, *Analytical and bioanalytical chemistry* 379 (2004) 328-331.
- [43] R. Slavák, J. Homola, Ultrahigh resolution long range surface plasmon-based sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical* 123 (2007) 10-12.
- [44] J.L. Allen D. Taylor, Jiří Homola and Shaoyi Jiang *Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors for the Detection of Bacterial Pathogens*, Springer Science+ Business Media, LLC, Now York USA, 2008.
- [45] T.M. Squires, R.J. Messinger, S.R. Manalis, Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors, *Nat Biotech* 26 (2008) 417-426.
- [46] J. Homola, Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and bioanalytical chemistry* 377 (2003) 528-539.
- [47] A.D. Taylor, J. Ladd, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, S. Jiang, Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor, *Biosensors & bioelectronics* 22 (2006) 752-758.
- [48] A.D. Taylor, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, S. Jiang, Comparison of *E. coli* O157:H7 preparation methods used for detection with surface plasmon resonance sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical* 107 (2005) 202-208.
- [49] S. Hearty, P. Leonard, J. Quinn, R. O'Kennedy, Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*, *Journal of microbiological methods* 66 (2006) 294-312.
- [50] A. Subramanian, J. Irudayaraj, T. Ryan, A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of *E. coli* O157:H7, *Biosensors & bioelectronics* 21 (2006) 998-1006.

- [51] P. Leonard, S. Hearty, J. Quinn, R. O'Kennedy, A generic approach for the detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface plasmon resonance, *Biosensors & bioelectronics* 19 (2004) 1331-1335.
- [52] Y. Wang, Z. Ye, C. Si, Y. Ying, Subtractive Inhibition Assay for the Detection of *E. coli* O157:H7 Using Surface Plasmon Resonance, *Sensors (Basel)* 11 (2011) 2728-2739.
- [53] Oh, K. Byung, Kim, K. Young, B.A.E. Young Min, L.E.E. Won Hong, Choi, W. Jeong, Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunosensor based on surface plasmon resonance, Korean Society for Applied Microbiology, Seoul, COREE, REPUBLIQUE DE, 2002.
- [54] B.-K. Oh, W. Lee, W. Lee, J.-W. Choi, Nano-scale probe fabrication using self-assembly technique and application to detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8 (2003) 227-232.
- [55] A.J. Cork, S. Jergic, S. Hammerschmidt, B. Kobe, V. Pancholi, J.L. Benesch, C.V. Robinson, N.E. Dixon, J.A. Aquilina, M.J. Walker, Defining the structural basis of human plasminogen binding by streptococcal surface enolase, *The Journal of biological chemistry* 284 (2009) 17129-17137.
- [56] J. Ge, D.M. Catt, R.L. Gregory, *Streptococcus mutans* surface alpha-enolase binds salivary mucin MG2 and human plasminogen, *Infection and immunity* 72 (2004) 6748-6752.
- [57] S. Bergmann, M. Rohde, G.S. Chhatwal, S. Hammerschmidt,  $\alpha$ -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface, *Molecular Microbiology* 40 (2001) 1273-1287.
- [58] S.B. Winram, R. Lottenberg, The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Microbiology (Reading, England)* 142 ( Pt 8) (1996) 2311-2320.
- [59] A. Berge, U. Sjobring, PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, *The Journal of biological chemistry* 268 (1993) 25417-25424.



# Chapitre III

---

*L'Approche dynamique pour la  
détection bactérienne*



Nous avons détaillé dans le chapitre précédent, la notion de détection statique des bactéries, c'est-à-dire, dans un milieu où leur concentration est stable dans le temps, par absence de multiplication. Dans la méthode basée sur la SPR, le seuil de détection élevé ( $10^7$ - $10^8$  ufc/ ml), empêche la détection d'un faible nombre de bactéries ; cette approche ne peut par conséquent pas identifier une seule bactérie entière viable, sans pré-enrichissement préalable. Or, dans certains cas précis, la présence d'*une seule bactérie* peut déjà engager le pronostic vital (cas d'une septicémie en diagnostic clinique). Certaines normes et réglementations dans le secteur agroalimentaire, exigent également l'absence totale de certains pathogènes, comme par exemple l'absence de *Salmonella* dans 25g de viande fraîche de volaille (réglementation UE No 1086/2011), pour que le produit alimentaire soit conforme aux normes de salubrité et de qualité exigées. Il faut par conséquent s'orienter vers une méthode sensible à de très faibles concentrations bactériennes, le tout combiné à un temps d'analyse le plus rapide possible (quelques heures maximum).

### **III.1 Problématique de la détection de la bactérie unique**

La faible concentration en bactéries d'un échantillon est toujours un facteur limitant le diagnostic et seule la mise en culture, permet indirectement de maîtriser la sensibilité. Certaines méthodes s'appuyant sur le suivi continu de la culture et visant à améliorer la sensibilité de la détection d'une faible quantité de bactéries, ont été décrites. Parmi elles, nous pouvons citer les automates pour hémoculture, tels que la série des BACTEC 9000 et Bactec LX (Becton-Dickinson) et de BacT/ALERT (bioMérieux) [1]. Ces derniers peuvent diminuer les délais de positivité des échantillons pour la détection de bactériémies, en se basant sur la détection continue du CO<sub>2</sub> produit par la multiplication bactérienne dans les flacons. Les agents pathogènes sont détectés habituellement en quelques heures, généralement en moins de 48 h; au-delà, il s'agit majoritairement de contaminants [2, 3]. Le point faible de ces automates est la détection indirecte non spécifique, qui ne permet pas d'identifier la bactérie ; c'est par conséquent un simple test de stérilité, suffisant pour des applications de type diagnostic de septicémie.

Une autre technique basée sur la culture appelée « Bioluminescence de l'ATP », mesure la quantité totale des molécules d'ATP présentes dans le milieu et produites par les cellules vivantes, grâce à une réaction enzymatique de bioluminescence [4-6]. Son intensité

est fonction de la teneur en ATP et donc indirectement en nombre de micro-organismes vivants dans le milieu. La présence de cellules animales ou végétales dans les échantillons à analyser peut cependant fausser l'estimation de la concentration bactérienne, car toutes les cellules produisent de l'ATP.

D'autres méthodes comme la mesure de la turbidimétrie, la microcalorimétrie et l'impédancemétrie sont également utilisées [7]. Ces méthodes sont toutes basées sur un suivi de la culture bactérienne, de façon indirecte, et ont l'inconvénient commun de détecter la présence de micro-organismes sans les identifier. Elles ne sont donc pas appropriées pour la distinction entre un seul contaminant ou une mixture de plusieurs souches bactériennes.

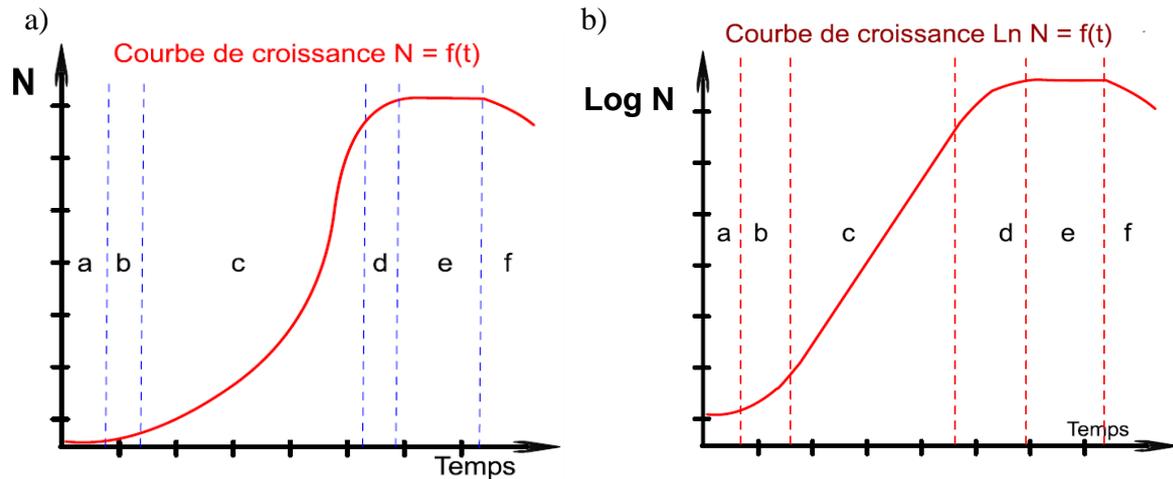
En résumé, toutes les méthodes décrites actuellement sont basées sur un pré-enrichissement de l'échantillon, afin d'obtenir du matériel en quantité suffisante avant de passer à l'étape de l'identification. L'approche que nous proposons dans ce manuscrit, est basée sur la réduction du temps d'identification, par combinaison des étapes de pré-enrichissement de la culture à la capture et l'identification spécifique de la bactérie grâce au ligand, pendant la multiplication.

En les intégrant dans une même étape, on obtient un suivi de la culture bactérienne de façon spécifique en temps réel. Cette notion de « suivre la croissance pendant qu'elle se produit », a donné naissance à l'approche dynamique, simple et innovante, de la détection bactérienne, que l'on nommera : l'approche Culture/Capture/Mesure (CCM).

## III.2 Notions fondamentales sur la croissance bactérienne

### III.2.1 Le cycle de la croissance bactérienne en milieu non renouvelé

Si l'on introduit un certain nombre de bactéries vivantes dans un volume donné de milieu nutritif contenu dans un système fermé (comme un flacon), leur croissance peut être divisée en différentes phases caractéristiques :



**Figure 3.1 :** Courbe de la croissance bactérienne en milieu non renouvelé. (a) Représentation de la courbe de croissance en nombre de bactéries en fonction du temps. (b) Représentation de la courbe de croissance en logarithme de la croissance bactérienne en fonction du temps.

Les lettres a, b, c, d, e, et f sur la courbe représentent les phases suivantes :

- (a) La phase **de latence**, avant le début des divisions cellulaires.
- (b) La phase d'**accélération** (pour certaines espèces cette phase n'est pas décelable).
- (c) La phase **exponentielle**, ou phase de **croissance logarithmique**, durant laquelle les cellules se divisent à vitesse constante et maximale.
- (d) La phase de **décélération**.
- (e) La phase **stationnaire**, lorsque cessent les divisions cellulaires.
- (f) La phase de **déclin** des bactéries (mort des bactéries).

Il est important de noter que la croissance bactérienne est limitée dans le temps quand on ne renouvelle pas le milieu nutritif. Le milieu finit par s'épuiser et les bactéries meurent.

### III.2.2 Loi de la croissance bactérienne

Si on examine une cellule bactérienne, on peut voir son volume augmenter jusqu'à la division en deux cellules filles qui, à leur tour augmentent de volume et se divisent en deux. Le temps entre deux divisions est appelé : *temps de génération*.

Du fait que :

- ✓ le temps de division de chaque bactérie est différent.
- ✓ toutes les bactéries ne se divisent pas au même moment.
- ✓ la culture bactérienne met en jeu beaucoup de cellules.

Le temps de génération qu'on observe représente un temps moyen : c'est le *temps de génération moyen*  $\tau$ .

Si on met  $N_0$  cellules dans milieu nutritif, au bout de 1 temps de génération (1 génération) on aura  $2 N_0$  cellules, au bout de 2 temps de génération (2 générations)  $4N_0$  cellules ( $2^2 N_0$  cellules) et de  $x$  générations  $2^x N_0$  cellules.

Soit  $N$  le nombre de bactéries après  $x$  générations :

$$N = N_0 \cdot 2^x \quad (1) \text{ d'où } \mathbf{\text{Log } N = \text{Log } N_0 + x \text{ Log } 2} \quad (2)$$

$$\mathbf{x = \text{Log } (N) - \text{Ln } (N_0) / \text{Log } 2} \quad (3)$$

Soit «  $\tau$  » le temps de génération moyen et «  $t$  » le temps pour que  $N_0$  bactéries deviennent  $N$  bactéries :

$$\mathbf{t / \tau = x} \quad (4) \text{ (le nombre de générations)}$$

En remplaçant  $x$  par  $t / \tau$  dans l'équation, on obtient :

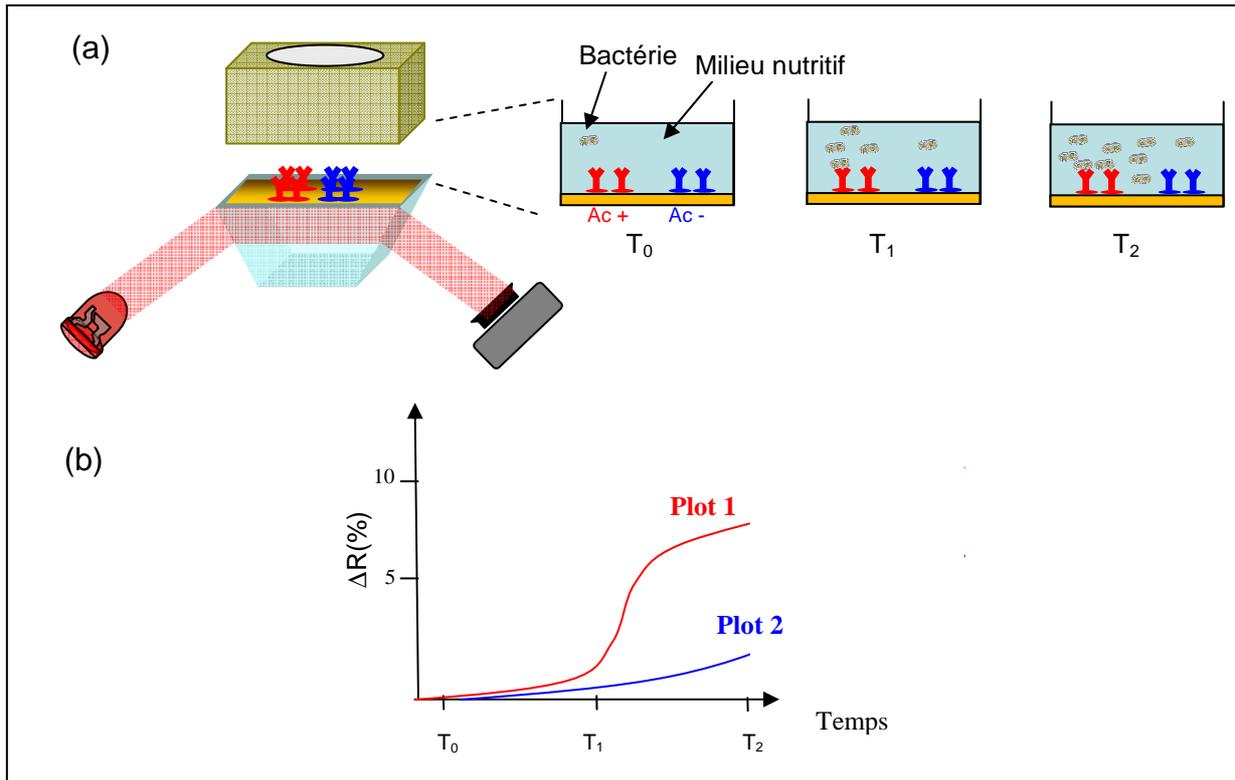
$$\mathbf{t / \tau = x = (\text{Log } N - \text{Log } N_0) / (\text{Ln } 2)} \quad (5)$$

### III.3 Suivi de la croissance du pneumocoque par SPRi

#### III.3.1 Principe de l'approche dynamique

Nous avons voulu expérimenter la faisabilité de cette approche dynamique basée sur la détection de la bactérie pendant sa multiplication, en testant la croissance de *S. pneumoniae* R6 directement sur une biopuce fonctionnalisée. L'idée étant de capturer les bactéries déjà présentes dans le milieu nutritif, pendant leur croissance. Cette approche permet d'augmenter la concentration bactérienne sur le capteur et de détecter les bactéries directement pendant leur phase de multiplication.

La figure 3.2 décrit le mécanisme proposé de détection spécifique de bactéries. Au temps ( $T_0$ ) une très faible contamination de la solution à analyser est inoculée (une bactérie). Elle n'est pas directement détectée, à cause de la sensibilité insuffisante du système. Mais en présence de nutriments dans le milieu de culture et après un certain temps, la bactérie se multiplie ( $T_1$ ) ; ainsi quelques unes d'entre elles rencontrent le ligand spécifique sur la surface fonctionnalisée et sont immobilisées sur les plots spécifiques. Au temps ( $T_2$ ), la solution bactérienne est enrichie après multiplication, ce qui permet en principe de détecter les bactéries de façon beaucoup plus rapide et efficace.



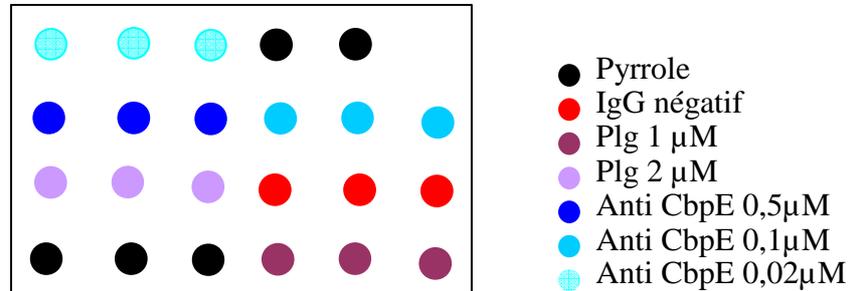
**Figure 3.2 :** Principe de la détection dynamique par SPRi. (a) Mécanisme de détection des bactéries pendant leur multiplication dans un milieu nutritif. (b) Sensorgram du suivi de la détection bactérienne par SPRi ; le plot 1 comporte des ligands spécifiques reconnaissant la bactérie (anticorps spécifiques « Ac +») et donnant un signal de variation de réflectivité positif, qui correspond à la courbe de croissance de la bactérie ; le plot 2 comporte des ligands non spécifiques (anticorps de contrôle « Ac -»).

La variation de réflectivité sur le plot spécifique correspond à une courbe de croissance de la bactérie (forme d'une fonction sigmoïde ou courbe en « S ») ; sur le plot contrôle, la variation de réflectivité est négligeable et ne correspond pas à une capture spécifique, il n'y a donc pas de détection de la croissance bactérienne.

### III.3.2 Première expérimentation pratique de l'approche CCM

Les premières expérimentations de croissance sur biopuce ont été réalisées dans une cuve ouverte à chambre unique d'une contenance d'un millilitre (figure 3.2.a). Le milieu de culture utilisé est un bouillon d'enrichissement Todd Hewitt (TH), le plus souvent utilisé pour la culture de bactéries de la famille des streptocoques et plus particulièrement ceux du groupe B, comme le pneumocoque.

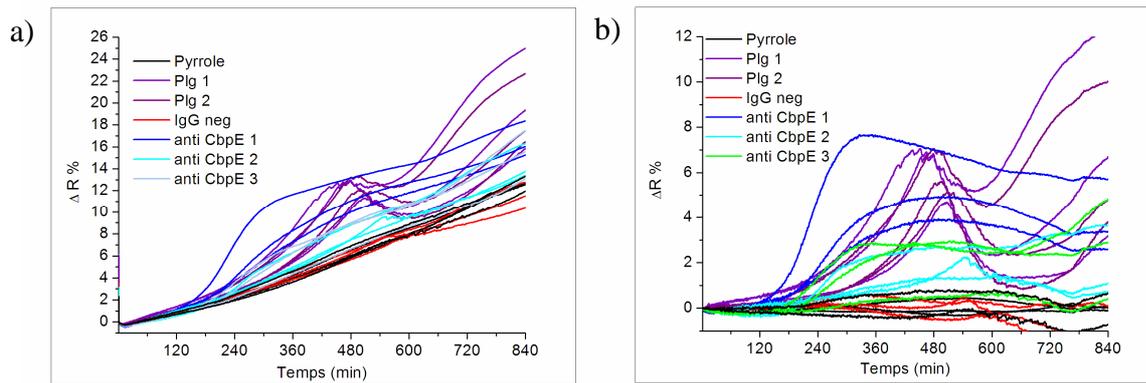
La souche *S. pneumoniae* R6 a été inoculée dans la chambre à une concentration initiale de  $7,5 \times 10^5$  ufc / ml de milieu TH. Le montage a été incubé dans une étuve réglée à 30°C. La cartographie des plots greffés sur le prisme est représentée dans la figure 3.3.



**Figure 3.3 :** Plan de dépôt des ligands spécifiques anti-CbpE et plasminogène (Plg) et des contrôles négatifs IgG et pyrrole sur le prisme.

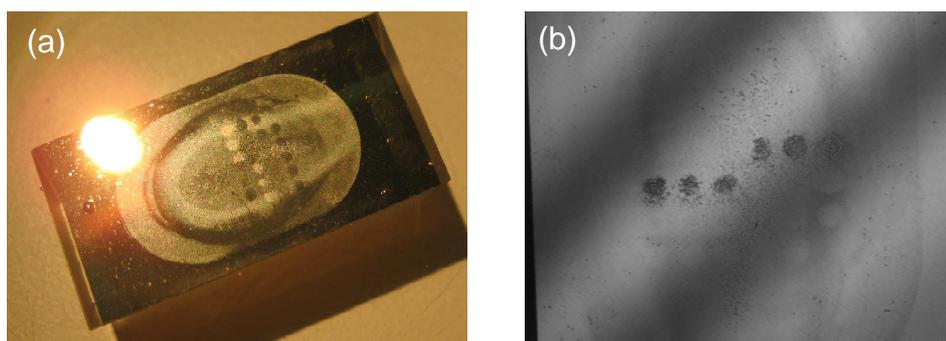
Afin de trouver une concentration surfacique adéquate pour la capture de la bactérie et de palier les problématiques d'encombrement stérique sur plot, différentes concentrations de ligands en solution à électro-polymériser ont été testées.

Le suivi de la croissance par SPRi est représenté dans la figure 3.4. Une dérive linéaire générale sur tous les plots est notée ; elle est probablement due à l'augmentation de l'indice optique due à la croissance des bactéries, mais également à l'évaporation de l'échantillon (étuve réglée à 30°C). Néanmoins, des signaux spécifiques sont enregistrés sur l'anti-CbpE 1 (0,5 µM) suivi des deux concentrations de plasminogène (1 et 2 µM). Les plots d'anti-CbpE 2 et 3 (à des concentrations respectives de 0,1µM et 0,02 µM), ainsi que l'IgG de contrôle (0,5 µM) et le pyrrole, ont tous des signaux de variation de réflectivité moins importants. La soustraction du signal d'un plot de pyrrole (plot contrôle) donne le graphique figure 3.4.b, où l'on voit que les bactéries sont capturées sur les plots spécifiques avec des affinités variables en fonction de la concentration initiale, mais pas sur les plots de contrôle (IgG et Pyrrole).



**Figure 3.4 :** (a) Sensorgram du suivi de la croissance de *S.pneumoniae R6* par SPRi, dans une cuve à chambre unique contenant  $7,5 \times 10^5$  ufc/ml. (b) Le même sensorgram après soustraction d'un plot contrôle de pyrrole.

Par conséquent, grâce à cette approche dynamique, nous avons pu détecter  $7,5 \times 10^5$  ufc/ ml de *S.pneumoniae R6* dans son milieu de croissance (TH), en environ 4 heures ; ce qui était jusque là irréalisable via l'approche statique où la LOD était entre  $10^7$  et  $10^8$  ufc / ml (cf. Chapitre 2). A la fin de l'expérience, le prisme récupéré a été rincé à l'aide de PBS et les images de la figure 3.5 montrent que les plots de plasminogène recouverts de bactéries sont visibles à l'œil nu après capture des bactéries. Les plots de l'anti-CbpE ne sont pas visibles contrairement à ce que l'on pouvait s'attendre. Il semblerait que la concentration d'anticorps n'est pas optimale pour permettre une adhésion assez forte et irréversible après rinçage. Par la suite, la concentration sera adaptée aux futures expériences.



**Figure 3.5 :** Image photographique du prisme après la fin de l'expérimentation. (a) Image photographique du prisme entier. (b) Grossissement sur les plots de plasminogène de densité plus importante.

Il est à noter sur la figure 3.5, que les triplicats du plasminogène à 1 et 2  $\mu$ M sont plus denses à l'œil nu que l'ensemble des autres plots, à cause de l'adhésion d'un nombre plus

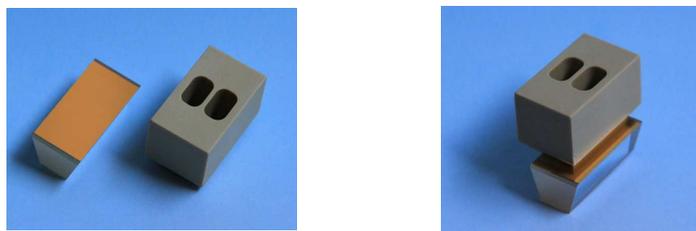
important de bactéries. Cette observation concorde avec la variation de réflectivité observée à la fin de l'expérimentation (840 min), qui est la plus élevée.

Cette première expérimentation de suivi de croissance sur biopuce a permis de valider le principe de l'approche dynamique proposée. Néanmoins, les résultats obtenus ne sont pas suffisants pour une amélioration significative de la LOD. En effet, les concentrations bactériennes détectées ( $7,5 \times 10^5$  ufc / ml) sont encore trop élevées. En plus, les adhésions non spécifiques perturbent le signal et les concentrations des ligands anti-CbpE sur la puce ne sont pas optimales.

### III.3.3 Optimisation du processus de croissance sur puce

Suite à cette la première expérience, une autre gamme de concentrations de ligands a été testée. Les concentrations retenues pour les anticorps étaient de  $1 \mu\text{M}$  et pour le plasminogène de  $2 \mu\text{M}$  (également utilisées dans l'approche statique cf. chapitre 2). Le blocage préalable de la surface de la biopuce à l'aide de BSA 1% n'était visiblement pas suffisant pour limiter les adhésions non spécifiques ; une étape de blocage supplémentaire avec du milieu de culture pendant 15 minutes (riche en protéines) a été rajoutée.

Afin de mieux comprendre les phénomènes observés, l'utilisation d'une cuve ouverte à deux chambres (figure 3.6), a permis de suivre la culture bactérienne dans l'une des chambres et de suivre le signal généré en absence de bactéries dans l'autre chambre. Ces chambres ont une contenance de  $500 \mu\text{l}$  chacune avec des surfaces comparables à celles des puits de microplaques ELISA P-96 standards.



**Figure 3.6 :** Images photographiques de la cuve à deux chambres (en PEEK) et de la biopuce (prisme en verre doré).

La biopuce confectionnée comporte des triplicats de l'antiCbpE ( $1\mu\text{M}$ ), du plasminogène ( $2\mu\text{M}$ ), de l'IgG contrôle ( $1\mu\text{M}$ ) et de pyrrole seul. Ce schéma de greffage est

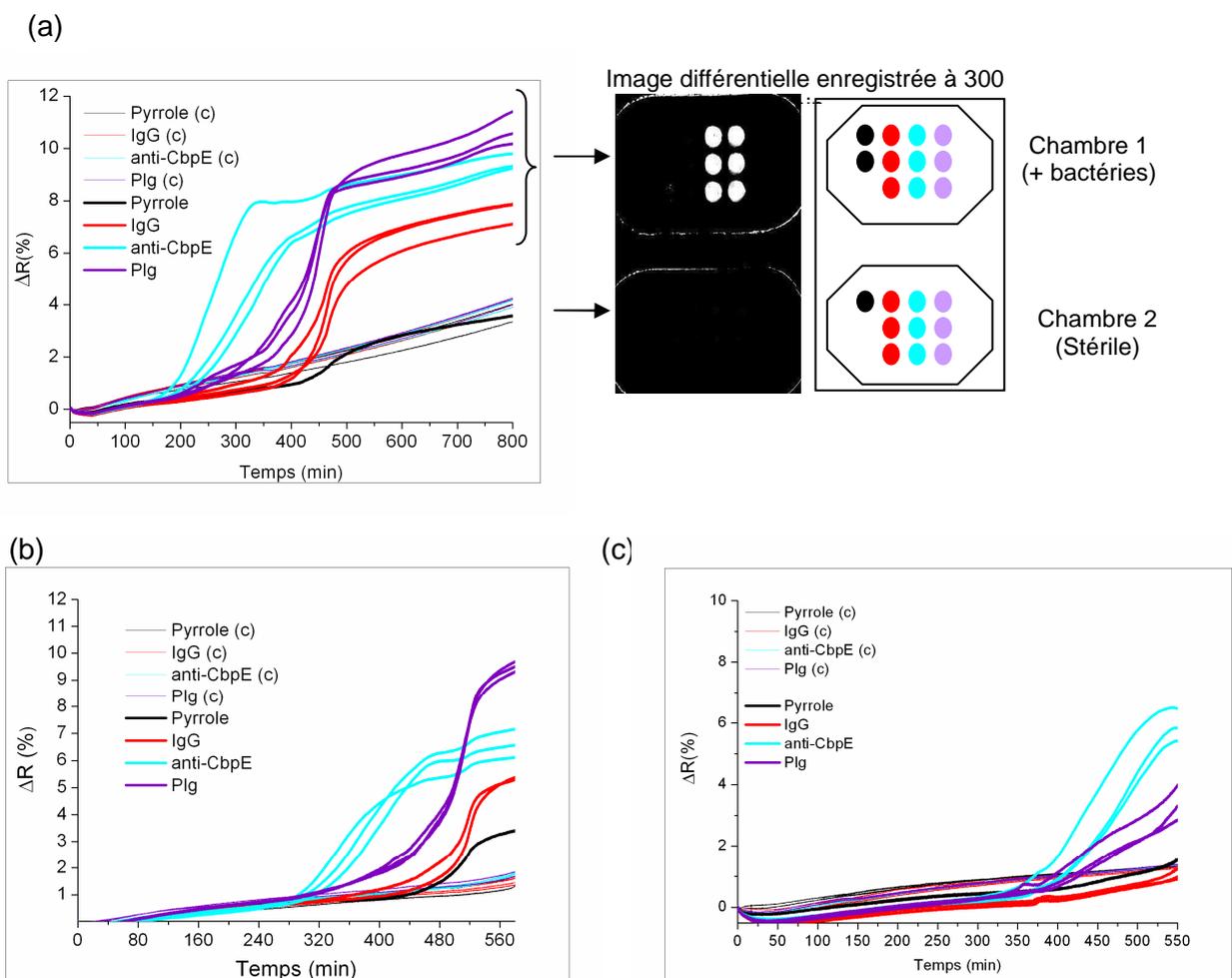
repris une deuxième fois sur la même puce, pour que chaque chambre de la cuve soit en contact avec les mêmes espèces greffées (figure 3.7.a).

Le suivi de la croissance de *S.pneumoniae R6* par SPRi selon l'approche dynamique proposée, dans une cuve à deux chambres, a été réalisé à partir de différentes concentrations :  $50 \pm 14$ ,  $500 \pm 45$  et  $5000 \pm 141$  ufc par 500 $\mu$ l de milieu TH (marges d'erreurs calculées à l'aide de l'approximation de la loi de Poisson). Dans chaque expérimentation, une chambre est inoculée avec une certaine concentration de *S.pneumoniae R6* et l'autre chambre, avec du milieu de culture stérile (0 ufc). Cette démarche permet d'avoir un contrôle supplémentaire, pour identifier les effets liés à la présence de bactéries ; mais aussi sur l'effet d'une éventuelle contamination bactérienne du milieu par exemple, avec des bactéries environnantes, car le suivi ne se fait pas dans un environnement strictement stérile.

Après l'injection de 5000 bactéries (Figure 3.7.a) des signaux positifs de variation de réflectivité ont été mesurés sur les plots correspondants à l'anti-CbpE et le plasminogène ; ceci atteste d'une capture spécifique de la bactérie, détectable après 200 minutes de culture sur la biopuce. Une image différentielle enregistrée à l'aide de l'imageur SPR vers 300 minutes, montre une spécificité de la variation de réflectivité sur les plots de plasminogène et de l'anti-CbpE, dont les signaux sont plus intenses.

Vers ~ 400 minutes, le signal augmente massivement sur tous les plots, y compris ceux utilisés comme contrôles négatifs. Cette augmentation tardive et non spécifique du signal est probablement due à un dépôt sur la surface lié à la surcharge bactérienne et à sa précipitation en fin de culture, voir de la formation éventuelle d'un biofilm ; il a également été rapporté (selon le Groupe Pneumocoque de l'IBS) que l'espèce *S.pneumoniae R6* soit une bactérie fragile connue pour se lyser à la fin de son cycle de multiplication. Des tests complémentaires visant à identifier la cause de cette augmentation générale des signaux en fin de culture, ont été réalisés. L'injection d'un lysat de bactéries préalablement digérées, a donné un signal non spécifique et une augmentation massive sur tous les plots confondus. Nous n'avons pas pu déterminer si ce sont les débris bactériens ou bien les composants intracellulaires libérés dans le milieu qui étaient à l'origine de ce phénomène. Il a également été considéré que le milieu de culture pouvait changer d'indice de réfraction en fin de cycle de culture à cause du métabolisme bactérien, provoquant ainsi cette augmentation des signaux sur tous les plots ; en effet les bactéries transforment la constitution chimique du milieu de

culture via des réactions de biosynthèse et de dégradation qui assurent l'élaboration des constituants bactériens et leur fonctionnement. Nous avons voulu vérifier ce changement d'indice du milieu de culture sur le capteur, en comparant l'injection d'un surnageant d'une culture en début et en fin de cycle (8 heures de croissance). Cette expérience n'a pas montré de différence en terme d'indice de réfraction quand elle est comparée à un surnageant d'une culture en début de croissance. Cette théorie n'a donc pas été retenue. Enfin, l'injection d'une forte concentration bactérienne sur une puce ( $< 10^9$  ufc/ ml), génère une augmentation de signal de moins en moins spécifique, ce qui vient conforter la théorie de dépôt de surcharge bactérienne, émise plus haut.

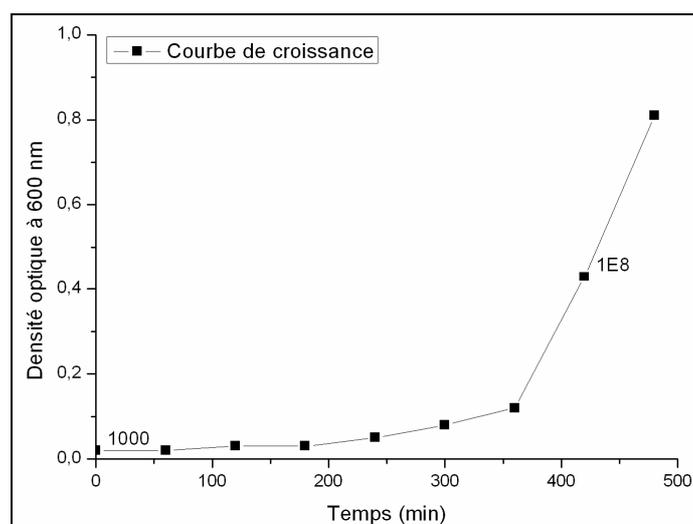


**Figure 3.7 :** Sensorgrams du suivi de la croissance de *S.pneumoniae* par SPRi à différentes concentrations. **(a)** Suivi de la croissance de *S.pneumoniae* R6 inoculé à une concentration initiale de 5000 ufc par 500 $\mu$ l de milieu de culture TH ; l'image différentielle enregistrée à 300 minutes, montre la spécificité et l'intensité des signaux de variation de réflectivité sur les plots de ligands spécifiques (anti-CbpE et Plg) de la chambre inoculée avec les bactéries. **(b)** suivi de la croissance de *S.pneumoniae* R6 à une concentration initiale de 500 ufc par 500 $\mu$ l, le temps nécessaire pour la détection spécifique est plus long car la concentration initiale est dix fois plus faible

comparé à l'expérience (a). (c) Suivi de la culture bactérienne à une concentration initiale de 50 ufc par 500µl, le temps de détection s'allonge et est directement lié à la concentration initiale inoculée.

L'injection de 500 ufc/ 500 µl (figure 3.6.b) et de 50 ufc/ 500 µl (figure 3.6.c), donnent des réponses spécifiques sur les plots de l'anti-CbpE et du plasminogène (comme précédemment observé et décrit avec 5000 ufc/ 500 µl), mais avec un temps de détection de plus en plus long. En effet, plus la quantité de l'inoculum est petite, plus il faudra attendre que les bactéries se multiplient en nombre suffisant pour la détection. Avec un inoculum de 500 ufc/ 500 µl, le temps de détection pris à une réflectivité de 2% (considéré comme un signal spécifique), correspond à 340 minutes ; alors qu'avec 50 bactéries au départ, le temps de détection est à 420 minutes.

Un suivi de la croissance bactérienne par mesure de la densité optique DO (600 nm) de la même concentration bactérienne initiale que dans l'expérimentation figure 3.7 ( $10^4$  ufc/ml), a été réalisé en parallèle à l'aide d'un spectrophotomètre. Le graphique figure 3.8 montre qu'une concentration de  $10^8$  ufc/ml ( $DO_{600\text{ nm}} = 0,4$ ) n'est atteinte qu'au bout de 420 minutes. Cette concentration a été calculée expérimentalement par ensemencement de différentes dilutions de la culture à une  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,4 sur milieu solide Columbia Blood Agar (CBA) puis comptage des colonies de pneumocoque sur boîte de Petri. Par comparaison des deux courbes de croissance, on en déduit que le temps nécessaire pour la détection de  $10^8$  ufc / ml correspond à une phase de saturation sur le prisme. Cette observation permet de conclure que la SPR est sensible à de plus faibles concentrations bactériennes, comparée à la mesure de densité optique.

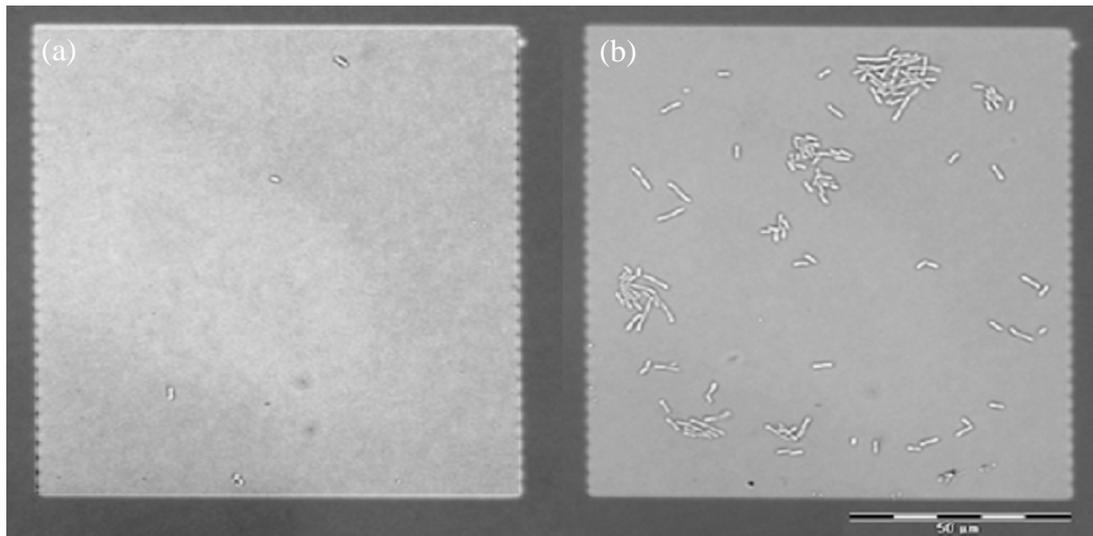


**Figure 3.8 :** Suivi de la culture de  $10^4$  ufc/ ml de *S. pneumoniae* R6, par mesure de la densité optique (turbidité) à 600 nm.

En conclusion, le couplage de la préculture avec la phase de capture/identification de bactéries sur biopuce améliore non seulement le temps d'identification de la bactérie, mais également les limites de détection de l'analyse. Cette amélioration des limites de détection est certainement due à la multiplication des bactéries dans le milieu de culture, qui sont plus facilement capturées par les ligands spécifiques. Nous pouvons néanmoins être amenés à nous poser la question suivante : est ce que les bactéries immobilisées sur plots spécifiques, sont capables de se multiplier dans ce plot « *in spot* » ? Au quel cas, les concentrations bactériennes apparentes sur la surface seraient supérieures, amenant des bactéries près de la surface, directement disponibles pour une détection plus rapide et efficace sur la partie « sensible » de la surface de la biopuce.

La question de savoir si les bactéries immobilisées sur support fonctionnalisé maintiennent leurs activités biologiques, comme la division cellulaire est pertinente. Nous pouvons imaginer qu'un nombre excessif de ligands autour d'une bactérie peut altérer son comportement par immobilisation totale. Il a été prouvé que les bactéries immuno-immobilisées ne subissaient pas d'inhibition avec les techniques d'immobilisation[8]. En effet, toutes les molécules ligands sont liées à la surface, et seules les bactéries qui sont à proximité de la surface fonctionnalisée vont interagir avec les ligands. Selon Sue et *al*, parmi les nombreuses molécules d'anticorps immobilisées (~ des milliers par  $\mu\text{m}^2$ ), seule une poignée (une dizaine par bactérie) interagit avec la bactérie et la maintient liée à la surface. La preuve en est qu'une bactérie immobilisée a toujours un degré de liberté, lui permettant de faire des rotations sur elle-même, en position couchée ou levée [9]. Ceci indique qu'elle n'est maintenue à la surface, que par un petit nombre de paire d'antigène/anticorps.

En conclusion, certaines bactéries immobilisées, semblent garder leur activité biologique habituelle comme la multiplication. La figure 3.9 montre la formation de micro-colonies de façon localisée sur le support à partir de quelques bactéries immobilisées. Les bactéries peuvent néanmoins donner lieu à des activités secondaires, provoquées par le processus d'immobilisation, telles que la production excessive de flagelles par rapport aux bactéries à l'état planctonique (libres) [9].



**Figure 3.8 :** Division des cellules bactériennes immobilisées: **(a)** Quatre cellules sont capturées sur une surface fonctionnalisée avec des anticorps (le carré claire) quand le substrat est incubé avec une culture de *S. Typhimurium* de  $10^4$  UFC/ml. **(b)** Plus de cellules sont observées après incubation de l'échantillon dans un milieu de culture stérile pendant 20 heures à température ambiante. Les amas formés sont localisés aux mêmes endroits que les cellules initialement capturées, laissant supposer la croissance de micro-colonies avec quelques relargages dans le liquide, qui se fixent ailleurs sur la puce.

(Source: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-diversified-superbug> : Chapter 25)

Finalement, en plus de la croissance dans le milieu liquide, si la multiplication sur plots fonctionnalisés a bien lieu, elle permettrait d'augmenter d'autant plus la sensibilité du signal SPR. En effet, cette sensibilité n'étant exploitable que sur quelques nanomètres au dessus de la surface de la biopuce, il y aurait des multiplications dans le volume sensible, puis capture instantanée de la bactérie dédoublée, directement disponible en surface, et par conséquent directement détectable.

Par rapport à une approche de détection statique (sans croissance), si la quantité de bactéries est faible, la lenteur de la diffusion de la bactérie dans le milieu, diminue les chances de rencontre de la bactérie avec le ligand spécifique sur plot, empêchant par conséquent sa détection spécifique. Il est de ce fait, difficile, voire impossible de détecter rapidement les bactéries viables, si les concentrations sont très faibles (une bactérie à quelques dizaines). Le couplage de la phase d'enrichissement et de détection, permet de palier ce problème, tout en optimisant le temps nécessaire pour l'identification des bactéries. Cette multiplication *in situ*, est de ce fait un avantage qui vient s'ajouter au principe de détection pendant l'enrichissement du milieu, dans le but d'améliorer les seuils de détection (LOD) et d'augmenter ainsi la sensibilité de la méthode.

### III.4 Aspect quantitatif de l'approche dynamique

Les résultats précédents montrent que la durée de l'analyse semble être corrélée avec le nombre de bactéries inoculées. Nous pouvons alors nous poser la question suivante : *La quantification des bactéries à partir de différentes courbes de croissance permet elle de mesurer la quantité initiale des bactéries dans l'échantillon ?* En effet grâce aux résultats de croissance obtenus pour une bactérie donnée à différentes concentrations (inoculations initiales), il est possible d'établir une courbe d'étalonnage, qui permet de remonter à la concentration bactérienne initiale de l'échantillon inconnu, cultivé dans les mêmes conditions.

Par analogie, cette méthode peut être comparée à la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) qui mesure le nombre d'amplicons (portion d'ADN définie par un couple d'amorces), donnant ainsi une estimation de la quantité initiale d'ADN présent dans l'échantillon (tableau 3.2). Le nombre de cycles d'amplification, correspondrait dans notre système au temps de dédoublement d'une génération bactérienne. En revanche, la qRT-PCR ne distinguant pas les bactéries vivantes des bactéries mortes, elle donnerait une fausse estimation de la contamination réelle de l'échantillon, en termes de bactéries vivantes et donc potentiellement pathogènes. Dans ce cas précis, seules les bactéries vivantes ou viables intéressent la détection de la contamination (échantillon médical ou alimentaire) [10].

Des travaux visant à détecter des bactéries viables par PCR quantitative ont été mises en œuvre. Cette méthode utilise un traitement préalable des bactéries à l'aide d'agents intercalants du type EMA ou PMA, permettant d'inhiber l'amplification des micro-organismes non viables par altération de leur ADN. Les résultats de ces travaux restent cependant à optimiser [11, 12].

Méthode CCM-SPRi	Méthode RT-PCR
Doublement cellulaire avec tous les composants (génétiques, protéiques...)	Doublement du matériel génétique uniquement
La viabilité des bactéries est une condition nécessaire pour leur détection	Ne fait pas la différence entre bactéries vivantes et mortes
LOD < 50 ufc/ml	LOD > 10 <sup>2</sup> ufc/ml

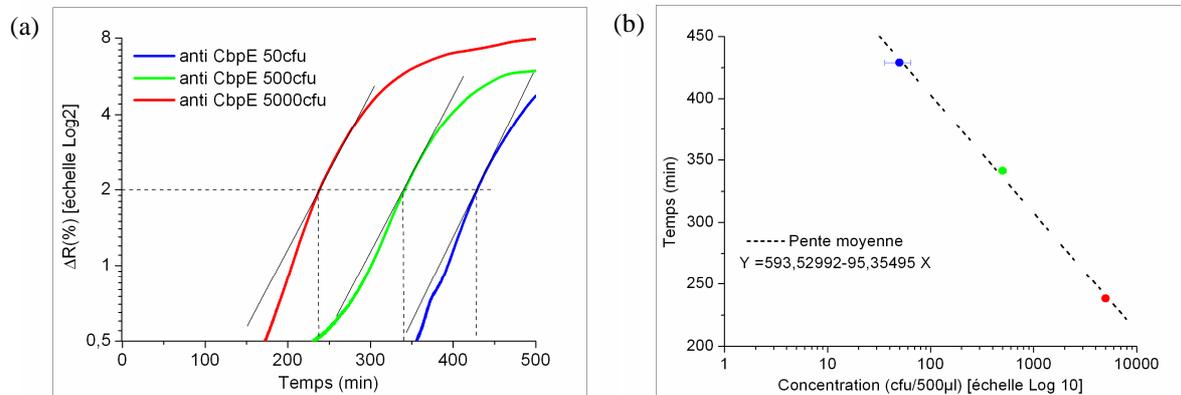
**Tableau 3.2 :** Comparaison du principe de fonctionnement entre la méthode CCM-SPRi et la RT-PCR.

Notre système est capable de détecter de plus faibles charges bactériennes, sans nécessiter un pré-enrichissement, à condition que les bactéries soient cultivables. Le graphique (figure 3.10.a) présente la moyenne des signaux de variation de réflectivité pour les triplicats de l'anti-CbpE dans chaque expérimentation (inoculations à des concentrations différentes : 50, 500 et 5000 ufc/500  $\mu$ l), en fonction du temps. La variation de la réflectivité sur les plots spécifiques est proportionnelle au nombre de bactéries capturées pendant la phase de multiplication, et donc à la concentration des bactéries dans le milieu (l'estimation de la correspondance est calculée plus bas). Cette variation de réflectivité est représentée sur une échelle logarithmique (Log 2) afin de mieux visualiser la partie exponentielle des courbes (ces parties sont linéaires et parallèles sur une échelle logarithmique). Afin de définir les temps de détection spécifiques pour chaque concentration initiale, nous avons choisi de nous placer à un  $\Delta R$  de 2%. Cette différence de réflectivité est située au milieu de la partie linéaire des courbes de croissance (figure 3.10.a), et est représentative du temps optimum de dédoublement sur une courbe de croissance (cf. cycle de croissance bactérienne en annexe). Il est cependant à noter que le  $\Delta R$  aurait pu être choisi plus bas (1% par exemple), sans pour autant changer les résultats. Il faut cependant choisir un  $\Delta R$  en fonction de la linéarité des courbes spécifiques sans interférence avec le niveau de variation des courbes de plots non spécifiques.

La différence  $\Delta t$  entre le point d'inflexion à 2% de la courbe à 50 ufc et celle à 500 ufc ainsi qu'entre la courbe à 500 ufc avec celle à 5000 ufc est constante ( $\sim 98$  min). Ces deux concentrations sont séparées à chaque fois par un facteur 10, qui correspond à  $x = 3,3$  générations (calculé à l'aide de l'équation générale (1) :  $N=N_0.2^x$ ). Le temps de dédoublement expérimental ( $\tau$ ) est facilement déductible et correspond à 29,7 minutes ( $98/3,3$ ). Le temps de dédoublement connu pour *S.pneumoniae* R6 dans les mêmes conditions est de 30 à 35 minutes, ce qui permet de valider le temps de génération calculé par cette méthode.

Une autre présentation des résultats (figure 3.10.b) est de reporter la concentration bactérienne (échelle Log 10) en fonction du temps de détection fixé à 2% de réflectivité, pour chaque concentration initiale. Il en résulte une droite qui peut être utilisée comme courbe d'étalonnage permettant de remonter à la concentration initiale d'un échantillon, dont le taux de contamination avec cette même bactérie est inconnu. L'échantillon doit être cultivé dans les mêmes conditions de température et de milieu de culture que les échantillons étalons. La

plage de validité testée est de [50 à 5000] ufc/ 500 µl. Les limites de linéarité de cette courbe d'étalonnage n'ont pas été explorées, le but étant d'avoir une idée sur la possibilité de quantifier les bactéries par cette approche. Nous explorerons la plage de validité de cette méthode sur un pathogène réel, dans le chapitre 4.



**Figure 3.10 :** Etablissement de la courbe d'étalonnage pour la quantification de *S. pneumoniae* R6 dans un échantillon inconnu **(a)** Suivi du signal de réflectivité sur les plots spécifique anti-CbpE en fonction du temps, pour chaque inoculation. **(b)** Représentation du temps de détection à 2% pour chaque inoculation bactérienne en fonction de la concentration initiale (échelle Log en 10).

Cette stratégie ouvre les portes d'une application intéressante dans le domaine médical et agro-alimentaire, qui serait en l'occurrence la possibilité de quantifier le taux de contamination initial d'un échantillon, en bactéries pathogènes vivantes.

Par la suite, nous avons voulu savoir à quelle concentration bactérienne  $C_0$  correspond un  $\Delta R$  de 2%. Pour cela, nous avons utilisé l'équation de la croissance bactérienne :

$$\text{Log } C_0 = \text{Log } C_i + \frac{t_i}{\tau} \text{Log } 2 \quad (6). \text{ Où :}$$

$C_0$  : concentration bactérienne donnant une réflectivité de 2% (ufc/500 µl)

$C_i$  : concentration initiale de l'échantillon (ufc/500 µl)

$t_i$  : temps nécessaire pour une détection spécifique de  $C_i$  à 2% (minutes)

$\tau$  : temps de génération

A partir de cette équation, on peut déduire la correspondance entre l'équation de la pente moyenne ( $Y = 593,52 - 95,35 X$ ) sur la courbe d'étalonnage (figure 3.10.b) et l'équation théorique, qui est la suivante :

$$ti = \frac{\tau}{\text{Log } 2} \text{Log } C_0 - \frac{\tau}{\text{Log } 2} \text{Log } Ci \quad (7)$$

Il en résulte que :

$$\frac{\tau}{\text{Log } 2} \text{Log } C_0 = 593,53 . \text{ Avec, } \tau = 95,35 \text{ Log } 2 \approx 29 \text{ minutes}$$

Donc :  $C_0 = 1,5 \times 10^6 \text{ ufc} / 500 \mu\text{l}$

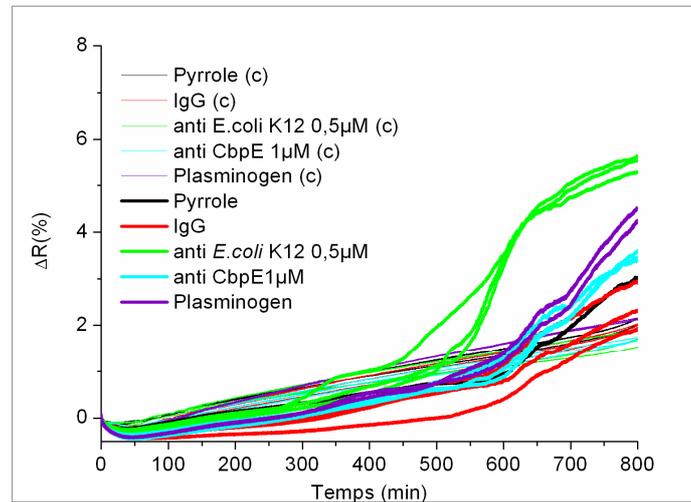
En conclusion, une réflectivité de 2% correspond à la détection d'une concentration de  $1,5 \times 10^6 \text{ ufc} / 500 \mu\text{l}$  (1% correspond donc à  $0,75 \times 10^6 \text{ ufc} / 500 \mu\text{l}$ ). Cette estimation est une approximation qui ne prend pas compte de certains facteurs qui pourraient intervenir tels que la variation des temps de latence par exemple ; néanmoins elle démontre que la sensibilité de la SPR est améliorée par rapport à une détection sans croissance, probablement grâce à une croissance sur plot qui vient s'ajouter à l'enrichissement dans le milieu. Une expérience supplémentaire consistant à suivre la croissance à partir de puce incubée avec des bactéries puis rincée et mise en contact avec du milieu de culture stérile aurait pu être réalisée. Sa réalisation en cuve ouverte nécessite une configuration microfluidique pour s'assurer du rinçage efficace de la surface de la puce sans contamination par le milieu bactérien (bactéries non attachées aux plots spécifiques).

### **III.5 Extension à la détection d'une autre bactérie : *Escherichia coli K12***

L'utilisation du *S.pneumoniae R6* a permis de faire une preuve de concept de l'approche dynamique de la détection bactérienne définie plus haut dans ce chapitre. Afin d'élargir l'utilisation de cette approche, nous avons voulu la tester à l'aide d'une autre bactérie : *Escherichia coli K12*. C'est une bactérie de laboratoire, non pathogène, qui a uniquement servi de modèle de validation pour l'élargissement de cette technique.

Des anticorps anti-*E.coli K12* couplés au pyrrole ont été greffés sur un prisme, en plus des anticorps utilisés précédemment pour la détection du pneumocoque et des contrôles négatifs. *E.coli K12* a été mise en pré-culture durant la nuit dans le milieu de culture nutritif Lysogeny Broth (LB), puis à partir de cette solution mère, nous avons effectué des dilutions dans ce même milieu LB. Dans l'une des deux chambres de la cuve utilisée pour le suivi SPR,

50 ufc/500  $\mu$ l de milieu LB ont été inoculés. Dans l'autre chambre, 500  $\mu$ l du milieu LB stérile ont été déposés (contrôle négatif instrumental en absence de bactéries). La figure 3.11 présente le suivi des signaux de variation de réflectivité en fonction du temps, à l'aide de l'imageur SPR.

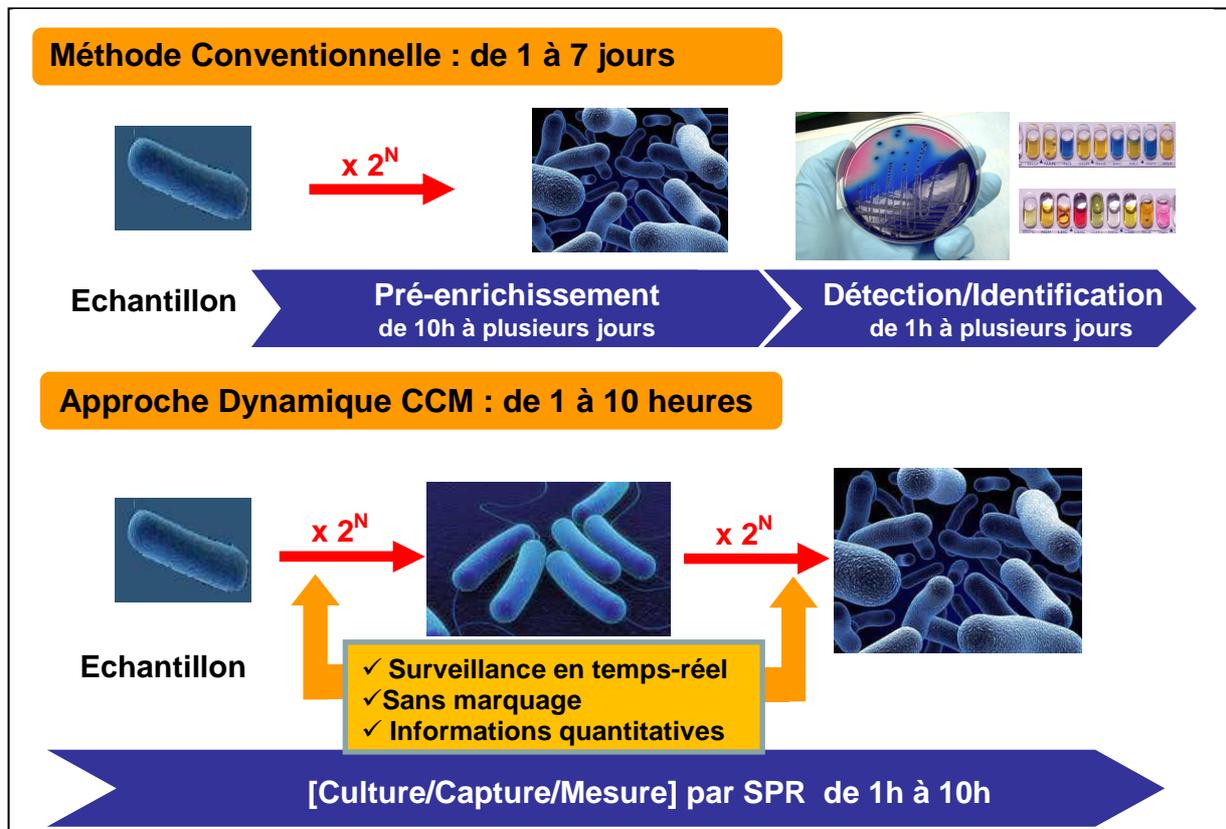


**Figure 3.11 :** Suivi de la croissance d'*E. coli K12* par SPRi en fonction du temps. La variation de réflectivité est positive sur les plots spécifiques (anti-*E.coli K12*), dans la chambre inoculée avec 50 ufc/ 500  $\mu$ l, une augmentation généralisée et tardive sur tout les plots de la chambre inoculée est également observée. Les contrôles (IgG, pyrrole, anti-CbpE et plasminogène) montrent une dérive stable avec le temps dans la chambre contrôle (c).

Cette expérience nous a permis d'observer des signaux de variation de réflectivité positifs spécifiques d'une croissance exponentielle sur les plots spécifiques de l'anti-*E.coli K12* vers 500 minutes. Puis une augmentation massive générale des signaux sur tous les plots. Ce phénomène est attribué à la croissance bactérienne, car il n'est pas observé dans la chambre de contrôle non inoculée où seule une dérive stable est observée. Il est probablement directement lié à la croissance bactérienne par la sédimentation de la charge bactérienne élevée en fin de cycle de culture ou par dépôt de biofilm, comme précédemment décrit avec le pneumocoque. Dans la chambre contenant le milieu de culture stérile, aucune modification n'est observée ; néanmoins, une dérive positive et stable dans le temps est enregistrée (appareil sensible à l'évaporation du milieu de culture à 35°C).

Pour conclure, nous avons présenté au cours de ce chapitre le principe de l'approche dynamique, basée sur la détection spécifique de bactéries pendant leur croissance (figure 3.12), ainsi que leur quantification. Cette approche baptisée l'approche Culture-Capture-

Mesure par SPRi (CCM-SPRi) a fait l'objet d'un dépôt de Brevet [13] et a permis le lancement de la start-up Prestodiag en Mars 2012.



**Figure 3.12 :** Comparaison des étapes nécessaires pour la détection bactérienne, entre une méthode conventionnelle et l'approche dynamique CCM par SPRi.

Après avoir effectué une preuve de concept de l'approche CCM par SPRi à l'aide du modèle *S.pneumoniae R6*, une expérimentation à l'aide d'une nouvelle espèce bactérienne, a permis d'élargir l'utilisation de cette technique à d'autres bactéries, notamment *E.coli K12*. En conclusion, il suffirait de trouver les bons ligands de reconnaissance surfacique spécifique pour une espèce bactérienne donnée (anticorps, phages, aptamères ou autre), pour pouvoir la détecter à l'aide de ce système, même en faible quantité, à condition qu'elle soit viable.

Cette approche, simple a priori, doit être étudiée en utilisant des bactéries pathogènes dans des matrices complexes, pour connaître sa compatibilité avec les échantillons réels. Le chapitre 4 présentera des travaux expérimentés sur un pathogène du secteur agro-alimentaire (*Salmonella*) ainsi qu'une ouverture vers des applications médicales.

### Références bibliographiques du Chapitre III:

- [1] B. Lamy, Automates pour hémoculture an 2005, Bio Tribune Magazine 16 (2005) 35-40.
- [2] L.G. Reimer, M.L. Wilson, M.P. Weinstein, Update on detection of bacteremia and fungemia, Clin Microbiol Rev 10 (1997) 444-465.
- [3] M.P. Weinstein, Current blood culture methods and systems: clinical concepts, technology, and interpretation of results, Clin Infect Dis 23 (1996) 40-46.
- [4] L. Jimenez, Rapid methods for the microbiological surveillance of pharmaceuticals, PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA 55 (2001) 278-285.
- [5] O. Minikh, M. Tolba, L.Y. Brovko, M.W. Griffiths, Bacteriophage-based biosorbents coupled with bioluminescent ATP assay for rapid concentration and detection of Escherichia coli, Journal of microbiological methods 82 (2010) 177-183.
- [6] D.M. Hunter, D.V. Lim, Rapid detection and identification of bacterial pathogens by using an ATP bioluminescence immunoassay, Journal of food protection 73 (2010) 739-746.
- [7] J. Moldenhauer, Overview of Rapid Microbiological Methods, in: S.E. Mohammed Zourob, Anthony Turner (Ed.), Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition, Receptors and Microsystems, Springer, 2008.
- [8] Z. Suo, X. Yang, R. Avci, M. Deliorman, P. Rugheimer, D.W. Pascual, Y. Idzerda, Antibody selection for immobilizing living bacteria, Analytical chemistry 81 (2009) 7571-7578.
- [9] Z. Suo, R. Avci, X. Yang, D.W. Pascual, Efficient immobilization and patterning of live bacterial cells, Langmuir 24 (2008) 4161-4167.
- [10] T. Zhang, H. Fang, Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples, Applied Microbiology and Biotechnology 70 (2006) 281-289.
- [11] S. Slimani, A. Robyns, S. Jarraud, M.I. Molmeret, E. Dusserre, C.I. Mazure, J.P. Facon, G.r. Lina, J. Etienne, C. Ginevra, Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable Legionella by qPCR, Journal of microbiological methods 88 (2011) 319-321.
- [12] Y. Pan, F. Breidt, Jr., Enumeration of viable Listeria monocytogenes cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells, Applied and environmental microbiology 73 (2007) 8028-8031.
- [13] S. Bouguelia, R. Calemzuk, C. Durmort, T. Livache, Y. Roupioz, T. Vernet., Method For Detecting and Quantifying Microorganisms, ORBIT, France, 2010.



# Chapitre VI

---

*Application à la détection de bactéries  
pathogènes*



## IV.1 Détection d'un pathogène en agroalimentaire : Exemple de la salmonelle

Plus de 60 % des toxi-infections dans le monde et 70% en France (figure 4.1) sont dues à *Salmonella* [1] ; les salmonelloses sont de ce fait, devenues un phénomène de santé publique ce qui justifie l'implication de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans la lutte contre les salmonelloses (Salm-Surv 2005) [2].

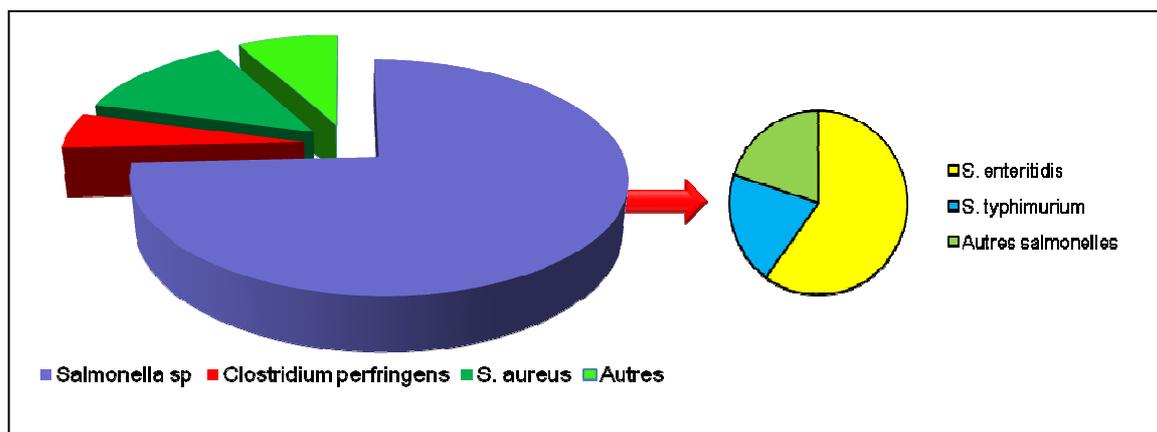


Figure 4.1 : Diagramme des germes identifiés responsables de toxi-infections en France (source ANSES).

En France, il existe un réseau d'épidémiologie-surveillance ciblée de la salmonelle au sein de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES) de l'alimentation de l'environnement et du travail, appelé « Réseau Salmonella ». Ce réseau permet un suivi des salmonelles d'origine non humaine sur l'ensemble de la chaîne alimentaire. Complémentaire de la surveillance des salmonelles d'origine humaine, il participe au dispositif de sécurité sanitaire des aliments. Par ailleurs, une partie des souches collectées par le réseau est analysée par le « Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires », pour caractériser leur sensibilité aux antibiotiques. Les mécanismes de résistance sont étudiés et une activité de vigilance est exercée vis-à-vis de phénotypes de résistance ayant un intérêt au regard de la santé publique.

Le Centre National de Référence des Salmonella et des Shigella (CNRSS) est chargé de sérotyper les souches de Salmonella provenant des laboratoires d'analyse médicale. En 2000, plus de 12 883 souches provenant d'environ 1600 laboratoires, ont été sérotypées [3]. Le CNRSS alerte la Direction Générale de la Santé et l'Institut de Veille Sanitaire lorsqu'il

détecte des cas groupés, des épidémies ou une augmentation de la fréquence d'isolement d'un sérovar, grâce à un système informatisé de surveillance et d'alerte.

La déclaration obligatoire des toxi-infections alimentaires collectives, constitue également une source d'informations très importante. En Europe, ENTERNET (homologue du système FoodNet aux USA) est un système qui surveille en temps réel, via un réseau fermé, des cas d'infections humaines causées par des microorganismes pathogènes transmis par les denrées alimentaires, principalement *Salmonella sp* et *Escherichia coli* vérotoxino-gènes (VTEC) [4]. L'accès à la banque de données est réservé aux microbiologistes responsables des centres nationaux de référence pour les microorganismes concernés, ainsi qu'aux épidémiologistes responsables des activités de surveillance nationale appropriée.

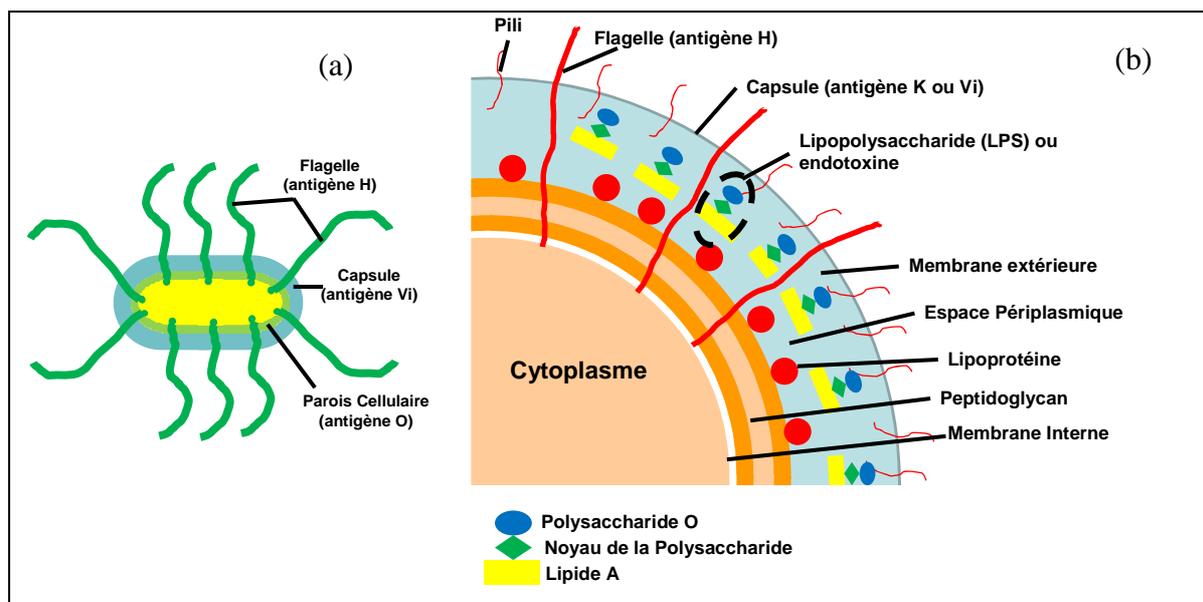
#### **IV.1.1 Classification et caractéristiques de Salmonella (antigène O, H et Vi)**

Les salmonelles appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae et au genre *Salmonella*. Le genre *Salmonella* comprend deux espèces qui sont *Salmonella enterica* et *bongori* [5, 6]. Sur la base de critères phénotypiques, l'espèce *S. enterica* est elle-même subdivisée en six sous espèces: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) et *indica* (VI).

L'habitat commun de la sous-espèce *enterica* (I) sont les animaux à sang chaud [5-7], tandis que l'habitat commun des sous-espèces II, IIIa, IIIb, IV et VI sont les animaux à sang froid et l'environnement [6]. Toutes les espèces du genre *Salmonella* peuvent infecter les humains. *Salmonella enterica* est un bacille à coloration Gram négatif, mobile, non sporulé et anaérobie facultatif mesurant 0,7-1,5 µm par 2,0-5,0 µm [8-10].

La sérologie est basée sur la caractérisation des trois antigènes de surface :

1. l'antigène oligosaccharidique dit somatique (O)
2. l'antigène flagellaire (H)
3. et l'antigène polysaccharidique dit de l'enveloppe (Vi), découvert dans les sérotypes Typhi et Paratyphi [9].



**Figure 4.2 :** Structure de la salmonelle et de ses antigènes de surface. (a) Schéma général d'une salmonelle avec les principaux antigènes de surface (O, H, K ou Vi). (b) Schéma détaillé des composants surfaciques de la salmonelle.

Elle permet le classement des sous-espèces en sérovars (anciennement appelés sérotypes) ; ceux appartenant à la sous-espèce *enterica* sont affectés d'un nom, correspondant fréquemment à un lieu géographique, les autres sont désignés par leur formule antigénique. L'ensemble des sérovars connus est répertorié au sein du schéma de *Kauffmann-White-LeMinor* [11]. La sous-espèce *enterica* seule comprend 2.610 sérotypes différents, les plus connus étant Typhi, Paratyphi, Enteritidis, Typhimurium et Choleraesuis [5]. Il est usuellement accepté d'utiliser les écritures *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhimurium* et *Salmonella typhi* comme synonymes hétérotypiques de *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*. Les épithètes *enteritidis* (enteritidis, Enteritidis), *paratyphi* (paratyphi, Paratyphi), *typhi* (typhi, Typhi) et *typhimurium* (typhimurium, Typhimurium) sont tous des nomenclatures possibles, employés uniquement pour désigner des sérovars.

#### IV.1.2 Les salmonelloses

Les salmonelloses sont des maladies provoquées par des entérobactéries du genre *Salmonella*. La plupart des *Salmonella* sont des parasites intestinaux des animaux vertébrés et des oiseaux transmis à l'homme par le biais d'aliments contaminés. En pathologie humaine,

les salmonelloses comprennent deux principaux types d'affections: gastro-entérites et fièvres typhoïde et paratyphoïdes [12].

#### ***IV.1.2.1 Les gastro-entérites***

##### **a) Epidémiologie**

Vu le large spectre d'animaux pouvant être porteurs de *Salmonella*, une grande variété de produits alimentaires, consommés crus, peu cuits ou ayant fait l'objet d'une contamination post-cuisson, peut être à l'origine d'une contamination humaine : produits carnés - et particulièrement la volaille - œufs et produits laitiers. Plus rarement la contamination peut avoir pour origine un contact direct avec un animal malade ou porteur sain.

Les salmonelloses d'origine alimentaire peuvent donner lieu à des foyers très importants, qui peuvent atteindre une échelle nationale voire internationale si un aliment commercialisé à large diffusion se trouve contaminé. En 1994 aux Etats-Unis, par exemple, une épidémie provoquée par une crème glacée a touché 224.000 personnes. En France, une des plus importantes épidémies, dont la source n'a pu être identifiée, survenue fin 1985, aurait touché 25.000 personnes d'après l'estimation la plus faible. En France toujours, entre 2006 et 2008, 3.127 foyers de toxi-infection alimentaire collective (TIAC), maladie à déclaration obligatoire, concernant 33.404 patients ont été déclarés par les médecins, les biologistes, les responsables d'établissements ou les particuliers aux Autorités de Santé. La moitié des foyers de TIAC dont l'agent infectieux a pu être déterminé était dû aux bactéries du genre *Salmonella*. Le Centre National de Référence des *Salmonella* à l'Institut Pasteur qui est en charge de la surveillance microbiologique des salmonelloses humaines répertorie environ 10.000 isollements annuels de *Salmonella* chez l'homme depuis 2004. Le sérotype majoritaire est Typhimurium (ubiquitaire), suivi par le sérotype Enteritidis (filière œuf). Ces deux sérotypes représentent 70% de tous les isollements de *Salmonella*. Il était jusqu'à présent assez difficile d'avoir une idée du nombre réel de cas annuels (TIAC + cas sporadiques) mais une enquête nationale (Institut Pasteur-Afssaps-InVS) auprès de 3.375 laboratoires de biologie médicale a révélé environ 17.000 cas humains annuels confirmés de salmonellose en France pour l'année 2008.

## **b) Traitements et symptômes**

Les gastro-entérites sont provoquées par des *Salmonella* ubiquistes présentes chez l'homme et les animaux. La durée d'incubation est généralement de 1 à 2 jours et dépend de la dose ingérée, de la santé de l'hôte et des caractéristiques de souche de *Salmonella*.

Les salmonelloses se manifestent par une fièvre, une diarrhée, des vomissements et douleurs abdominales. Chez des adultes de condition physique normale, une gastro-entérite disparaît sans traitement après 3 à 5 jours en moyenne. En revanche, une **antibiothérapie** doit être prescrite chez les personnes âgées, les nourrissons, ou les personnes immuno-déprimées chez lesquels l'infection peut être plus sévère, voire mortelle.

## **c) Prévention**

La meilleure protection contre le risque de salmonellose est une bonne cuisson des aliments, en particulier des viandes, à au moins 65°C pendant 5 à 6 minutes. Pour le steak haché congelé ou surgelé, la cuisson doit être effectuée sans décongélation préalable car elle augmente le risque de multiplication bactérienne. Le froid bloque le développement des bactéries mais ne les tue pas.

De 1985 à 1997, le nombre de cas d'infections par *Salmonella* Enteritidis a fortement augmenté en France : cette souche touche les élevages de volaille et a la particularité d'être présente non seulement à la surface de la coquille de l'œuf, mais dans le contenu même d'œufs intacts. Il est pour cette raison conseillé de conserver les œufs au réfrigérateur, de maintenir au froid les préparations à base d'œufs sans cuisson (mayonnaise, crèmes, pâtisseries ...) et de les consommer le plus rapidement possible après leur fabrication. De plus, les personnes les plus vulnérables (personnes âgées, malades, nourrissons, femmes enceintes) devraient éviter la consommation d'œufs crus ou peu cuits.

#### ***IV.1.2.2 Fièvres typhoïde et paratyphoïdes***

##### **a) Epidémiologie**

Les *Salmonella* responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes ayant l'homme pour seul réservoir, la contamination se fait par ingestion d'eau ou d'aliments ayant subi une contamination fécale d'origine humaine. Comme toutes les maladies à transmission oro-fécale, ces fièvres surviennent le plus souvent dans des zones où l'hygiène est précaire, et frappent principalement les pays en développement en Asie, en Afrique ou en Amérique Latine.

Les données mondiales font état de plus de 20 millions de cas annuels de fièvre typhoïde, et de plus de 200.000 morts. La maladie n'a pas totalement disparu des pays industrialisés. En France métropolitaine, en 1997, une épidémie qui a nécessité l'hospitalisation de 26 personnes est survenue à Utelle, dans les Alpes-Maritimes, probablement due à la consommation de charcuterie lors d'un banquet préparé par un porteur du bacille. Une autre épidémie est intervenue en 1998 à Villeneuve St Georges où, après consommation d'un repas commun, 20 personnes ont présenté une fièvre typhoïde et 95 une gastro-entérite précoce [13]. En 2003 et 2006, deux foyers de 7 à 10 cas groupés liés à un lieu de restauration, ont été détectés à Paris. La source de la contamination a été identifiée pour les deux épisodes, il s'agissait à chaque fois d'un porteur sain travaillant en cuisine.

Les fièvres typhoïde et paratyphoïdes sont causées par des *Salmonella* strictement adaptées à l'homme, majoritairement *Salmonella* Typhi, puis *Salmonella* Paratyphi A, certaines souches de *Salmonella* Paratyphi B et *Salmonella* Paratyphi C. Ce sont des maladies à déclaration obligatoire en France. Depuis 2003, 100 à 250 cas d'infections à *Salmonella* Typhi, isolées en France (mais contractées en zone d'endémie), sont répertoriés chaque année au Centre National de Référence des *Salmonella*. Ces souches proviennent quasi-exclusivement de cas importés (Afrique et sous-continent Indien). L'incidence annuelle des cas en France est environ de 0,2 pour 100.000 habitants.

##### **b) Symptômes et traitement**

Une à trois semaines après la contamination survient une fièvre continue accompagnée de maux de tête, d'anorexie, d'abattement («tuphos» torpeur en grec), de douleurs

abdominales avec diarrhée ou constipation. Dans les formes bénignes, l'état reste stationnaire pendant une quinzaine de jours puis la convalescence dure plusieurs semaines. Dans les formes plus graves où des complications peuvent survenir au niveau de l'intestin, du cœur ou de la vésicule, la fièvre typhoïde peut être fatale en l'absence de traitement. Le taux de mortalité est de 10% en l'absence de traitement antibiotique efficace comparé à moins de 1% pour les autres formes de salmonellose.

Une antibiothérapie appropriée abaisse le risque de mortalité à moins de 1%, mais on isole de plus en plus de souches résistantes aux antibiotiques : en Asie du Sud-est et dans le sous-continent Indien, plus de 90 % des souches isolées sont ainsi de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones, antibiotiques classiquement utilisés, contre moins de 1% en Afrique.

Une particularité épidémiologique de ces infections est qu'il existe des porteurs sains de ces bactéries. En effet, après guérison d'une fièvre typhoïde chronique 2 à 5% des individus continuent à héberger des *Salmonella Typhi* (essentiellement au niveau de la vésicule biliaire) qui sont excrétées épisodiquement dans les selles et qui peuvent être donc à l'origine de cas secondaires.

### c) Prévention

La prévention repose sur la surveillance épidémiologique et la lutte contre le "péril fécal". La dissémination des bactéries peut être enrayée par : une distribution d'eau de qualité, bactériologiquement contrôlée, le traitement des eaux usées, la généralisation du tout-à-l'égout, le contrôle des zones de récolte des coquillages, la pasteurisation des aliments, beurre et lait en particulier et le respect strict des règles d'hygiène pour tous les travailleurs du milieu de la restauration. Un **vaccin anti-typhoïdique** bien toléré, ne nécessitant qu'une seule injection, peut être administré aux voyageurs se rendant dans des régions à risque. L'effet protecteur dure 3 ans et le taux de protection en zone d'endémie est de 60%.

### **IV.1.3 Le Diagnostic de la salmonelle**

#### ***IV.1.3.1 Diagnostic clinique et microbiologique***

Seule une hémoculture ou une coproculture réalisée chez un patient présentant les symptômes d'une salmonellose, permet d'établir un véritable diagnostic ; cette coproculture doit comporter une phase d'isolement puis d'identification de la bactérie, complétée par un antibiogramme.

#### ***IV.1.3.2 Détection dans les aliments, l'eau ou l'environnement***

La recherche des *Salmonella* dans les denrées alimentaires et dans les échantillons environnementaux fait l'objet d'une procédure normalisée tant au niveau international (ISO NF EN 6579). Cette recherche nécessite des phases de pré-enrichissement, puis d'enrichissement sélectif, suivies d'une étape d'isolement sur des milieux sélectifs spécifiques et d'identification biochimique et sérologique. L'ensemble de ces opérations nécessite un délai compris entre 3 et 5 jours.

Nous assistons actuellement à l'émergence de méthodes alternatives permettant de diminuer sensiblement ces temps de réponse (24 à 72 heures) ; celles-ci font appel à des techniques immunoenzymatiques [14], de biologie moléculaire [15-17], d'immuno-séparation ou de concentration magnétique [8, 18]; ces méthodes alternatives peuvent faire l'objet d'une validation nationale selon une procédure normalisée.

### **IV.1.4 Application de l'approche dynamique à la recherche de Salmonella**

Nous avons développé dans le cadre de cette thèse, une technique de diagnostic microbiologique par imagerie SPR basée sur l'approche « Culture-Capture-Mesure » développée dans le chapitre précédent.

#### ***IV.1.4.1 Essais préliminaires dans le milieu de culture artificiellement contaminé***

Ces premiers essais se sont déroulés dans le milieu de culture (eau peptonée tamponnée) artificiellement contaminé par des *Salmonella* Enteritidis. Les anticorps spécifiques utilisés pour la capture de la salmonelle tout au long de ce chapitre sont les suivants :

STE: anticorps polyclonal commercial de lapin d'isotype IgG<sub>1</sub>(AbD serotec 8209-4006), polyvalent pour les antigènes O (somatiques) et H (flagellaires) du groupe *Salmonella*. Cet anticorps a été préparé à partir d'un mélange immunogène de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Heidelberg. En pratique, il est utilisé comme ligand spécifique pour la détection de bactéries du groupe *Salmonella*.

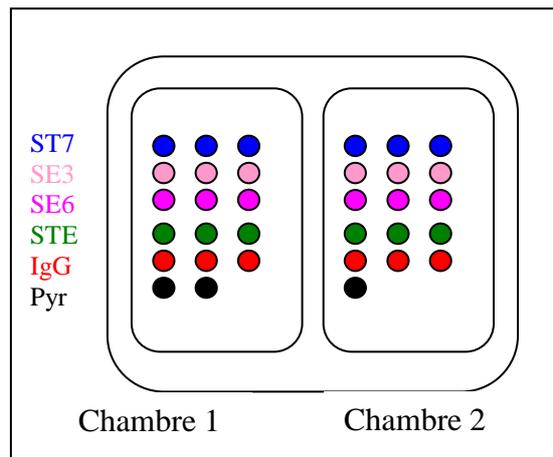
SE3 et SE6: anticorps monoclonaux de souris d'isotype IgG<sub>1</sub> (fourni par M. Hervé Volland, CEA Saclay) spécifiques du sérovar Enteritidis du groupe *Salmonella*.

ST7: anticorps monoclonal de souris d'isotype IgG<sub>2c</sub> (fourni par M. Hervé Volland, CEA Saclay) spécifique du sérovar Typhimurium du groupe *Salmonella*.

De part le procédé de leur fabrication, il est à noter que ces anticorps monoclonaux sont dirigés contre des antigènes de surface non identifiés. Leur spécificité pour un sérovar donné est évaluée à l'aide d'un test de liaison ELISA, avec:

- ✓ Sur la phase solide : différentes souches bactériennes sont testées (famille de *Salmonella* + *E.coli* + *Shigella*).
- ✓ L'échantillon : l'anticorps à tester à différentes concentrations.
- ✓ Un traceur : Ig de chèvre anti-Ig de souris couplée à l'Acétylcholinestérase (AChE).
- ✓ Révélation avec réactif Ellman, lecture des absorbances à 414 nm.

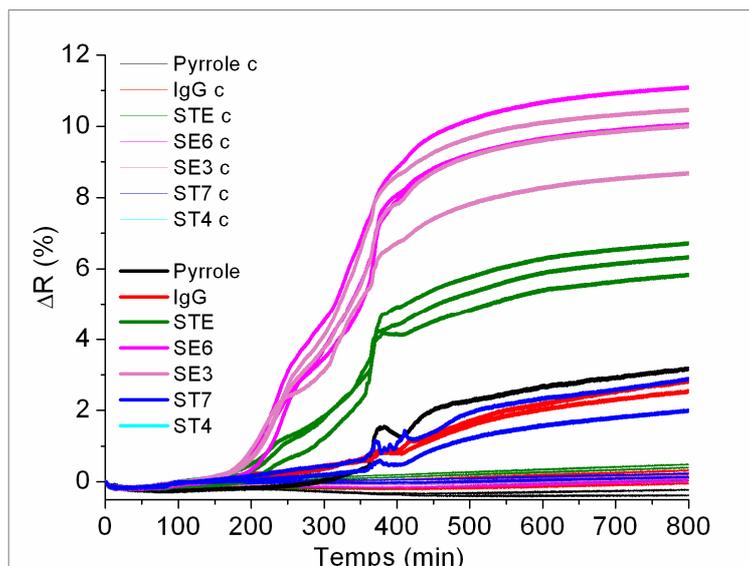
Une biopuce SPRi dédiée à la détection de salmonelle a été réalisée selon le plan de dépôt suivant :



**Figure 4.3 :** Schema du dépôt d'anticorps sur le prisme pour la détection de *Salmonella* Enteritidis.

La souche de *Salmonella* testée est la *S. enterica* sérovar Enteritidis, souche laitière isolée sur du fromage Cantal (référence ISHA 1.191). Après une préculture durant la nuit de la souche *Salmonella* Enteritidis dans de l'eau peptonée tamponnée (EPT) à 37°C, la concentration de la solution bactérienne est estimée entre  $10^8$  et  $10^9$  ufc/ml. Cinq dilutions de dix en dix de la culture bactérienne sont ensuite réalisées dans de l'EPT, la concentration de la sixième dilution (sur puce) est estimée entre 50 et 500 ufc/ 500  $\mu$ l.

En parallèle, 10 ml de la pré-culture bactérienne mère sont centrifugés (3000 rpm, 15min, 20°C) et lavés deux fois à l'aide de PBS filtré stérile. Huit dilutions de dix en dix (1 ml dans 9 ml à chaque fois) sont réalisées dans du PBS puis les dilutions (-6), (-7) et (-8) sontensemencées en profondeur sur des boites de Petri contenant de la gélose Tryptic Soy Agar (TSA), avec 1 ml de la dilution par boite, puis incubées 24 h à 37°C pour le dénombrement. Le prisme est préalablement bloqué avec 1% de BSA pendant 15 minutes puis avec de l'EPT pendant 15 minutes, avant d'être placé dans l'imageur SPR. Ensuite, 500  $\mu$ l d'EPT sont injectés dans la chambre 1 (contrôle) et 500  $\mu$ l de la dilution bactérienne préparée sont injectées dans la chambre 2.



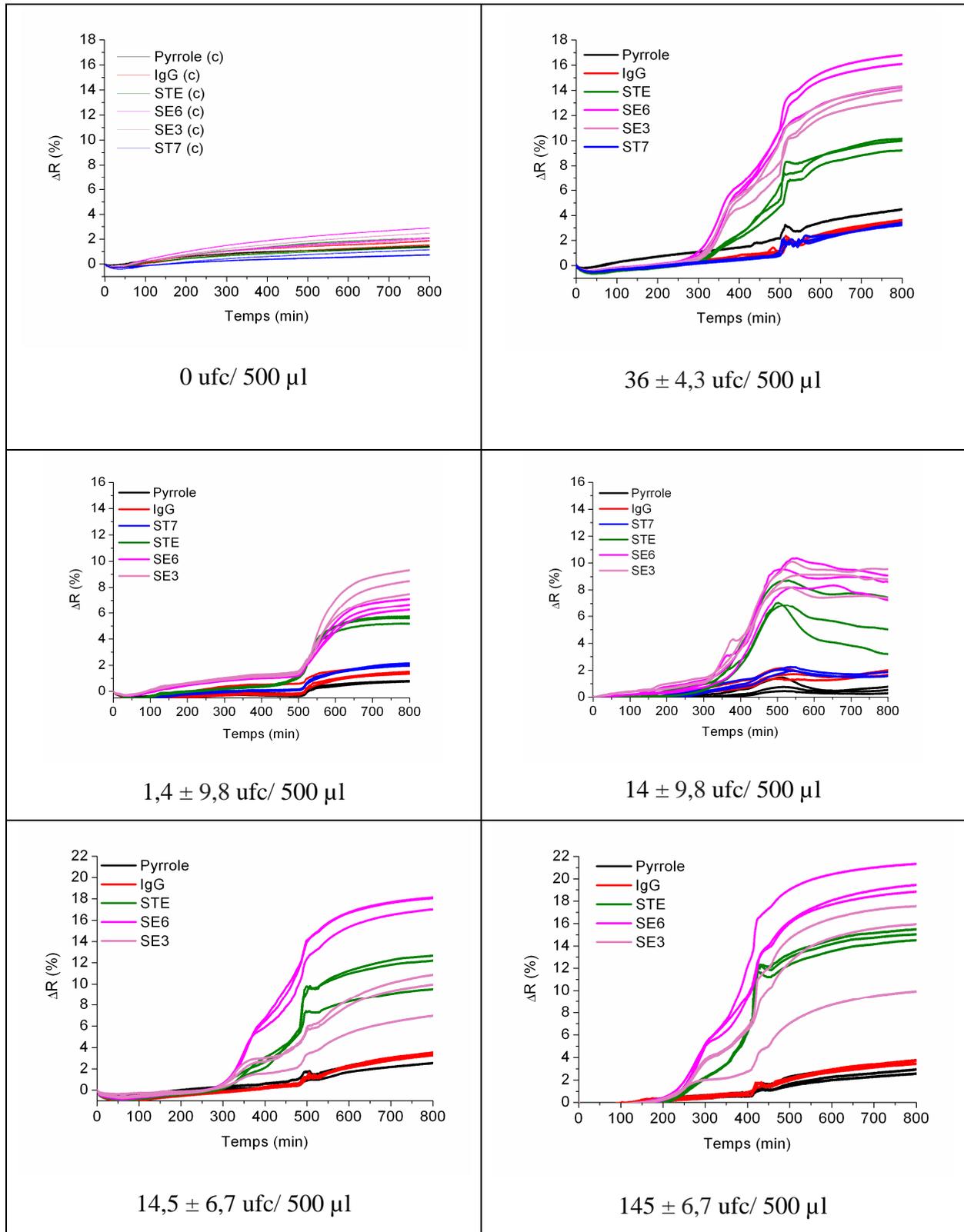
**Figure 4.4 :** Suivi de la culture de *Salmonella* Enteritidis par imagerie SPR. La variation en réflectivité la plus importante est observée sur les plots SE3 et SE6, suivie de STE dans la chambre ensemencée. On observe également une faible variation en réflectivité sur les plots contrôle, mais qui est plus tardive. Dans la chambre contrôle, il n'y a qu'une très faible dérive stable et non spécifique sur tous les plots.

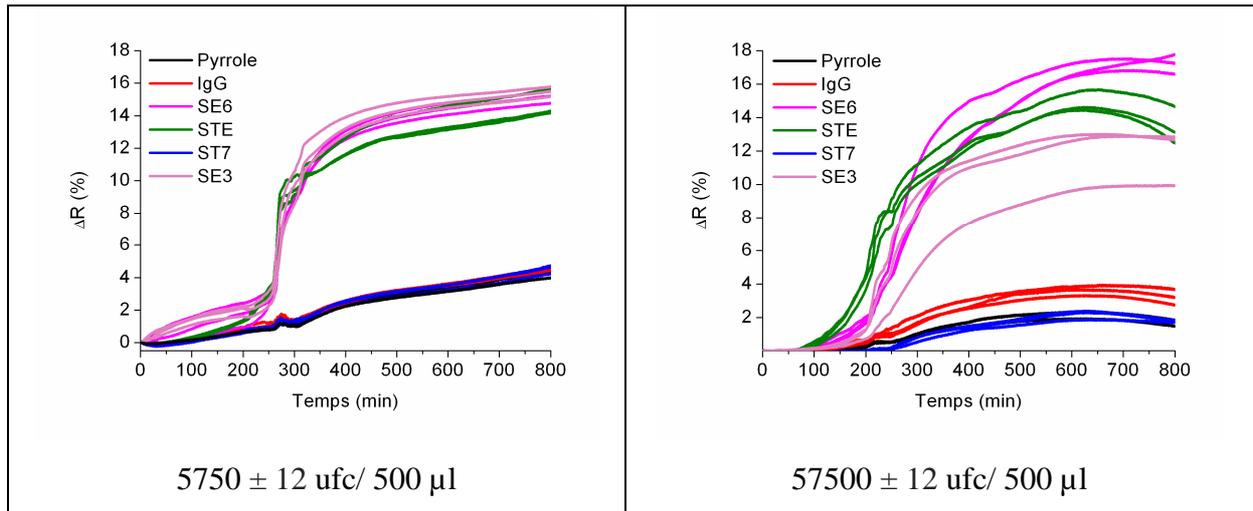
Le signal de variation de réflectivité est observé sur les plots des anticorps monoclonaux SE3 et SE6, spécifiques pour la reconnaissance des bactéries *Salmonella* Enteritidis. L'anticorps commercial STE, est également spécifique pour la salmonelle mais le signal de variation en réflectivité est moins fort. Les autres anticorps n'interagissant pas de façon spécifique avec la bactérie, on n'observe qu'une faible variation de réflectivité.

Le dénombrement sur boîte a permis de faire une estimation sur la concentration de la pré-culture bactérienne de  $7 \times 10^8$  ufc/ml, ce qui nous a permis d'estimer le nombre de bactéries sur puce au moment de l'ensemencement à  $359 \pm 26$  ufc/ 500  $\mu$ l.

#### a) Courbe d'étalonnage et quantification du taux de contamination d'un échantillon inconnu

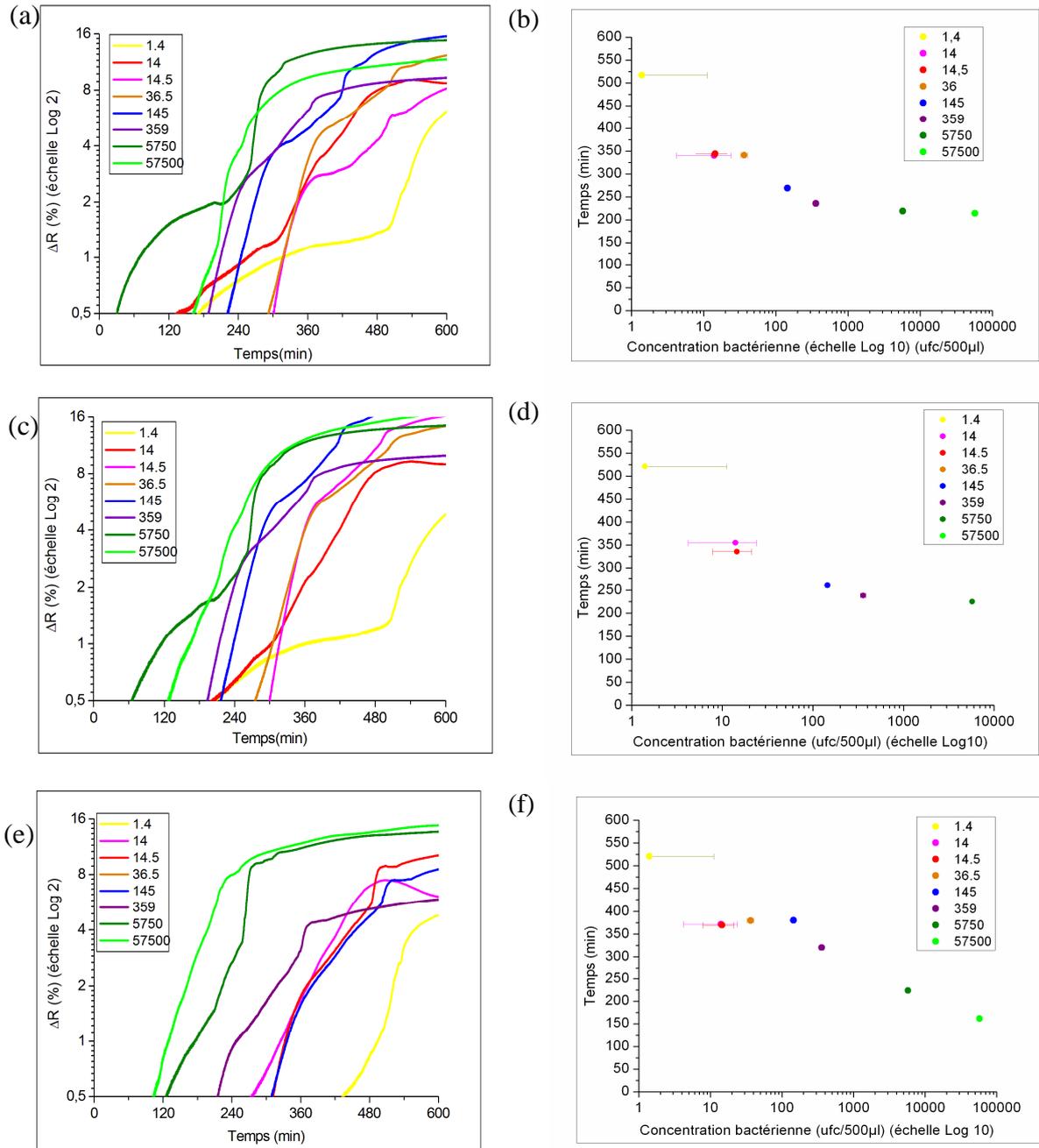
Afin d'établir une courbe d'étalonnage, l'expérience de suivi de la culture par SPRi a été répétée plusieurs fois à différentes concentrations bactériennes initiales. Les deux chambres ont servi pour ensemencer deux concentrations initiales différentes à chaque fois (figure 4.5).





**Figure 4.5 :** Suivi de la croissance de *Salmonella* Enteritidis par SPRi à différentes concentrations initiales.

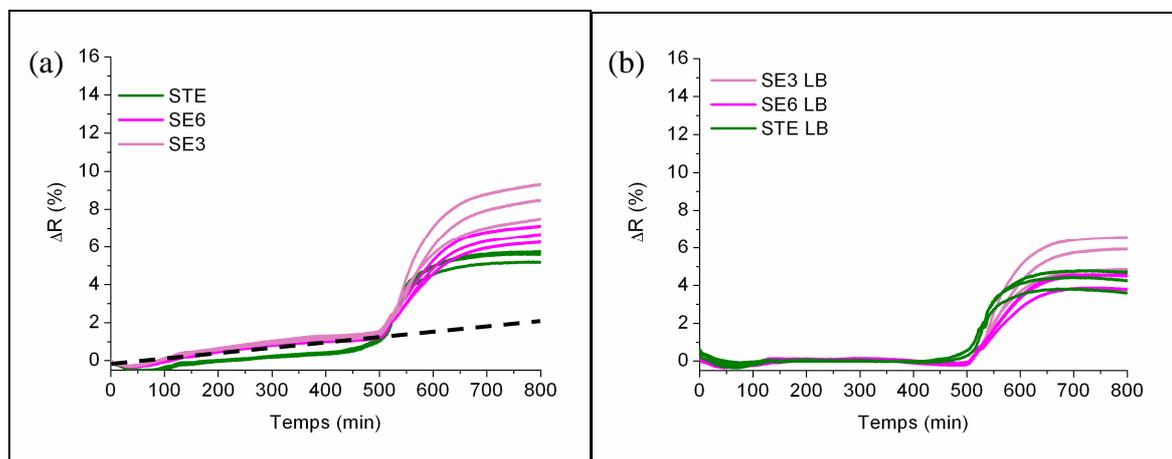
Les concentrations initiales d'échantillons artificiellement contaminés par *Salmonella* Enteritidis ont été ensuite exprimées en fonction du temps nécessaire pour atteindre une variation en réflectivité de 2% sur les trois anticorps spécifiques SE3, SE6 et STE (figure 4.6).



**Figure 4.6 :** Suivi de la variation en réflectivité sur les plots spécifique SE3, SE6 et STE en fonction du temps, pour chaque inoculation de *S. Enteritidis* et représentation du temps de détection à 2% pour chaque inoculation bactérienne en fonction de la concentration initiale (échelle log 10). **(a)** Suivi de la variation en réflectivité sur les plots spécifique SE3 en fonction du temps, pour chaque inoculation. **(b)** Représentation du temps de détection à 2% pour chaque inoculation bactérienne en fonction de la concentration initiale sur les plots SE3 (échelle log 10). **(c)** Suivi de la variation en réflectivité sur les plots spécifique SE6 en fonction du temps, pour chaque inoculation. **(d)** Représentation du temps de détection à 2% pour chaque inoculation bactérienne en fonction de la concentration initiale sur les plots SE6 (échelle log 10). **(e)** Suivi de la variation en réflectivité sur les plots spécifique STE en fonction du temps, pour chaque inoculation. **(f)** Représentation du temps de détection à 2% pour chaque inoculation bactérienne en fonction de la concentration initiale sur les plots spécifique STE (échelle log 10).

L'analyse de ces courbes sur les différentes figures 4.6 (b, d et f) montre que l'alignement des points pour un type de ligand spécifique suit deux régimes. En effet, l'aspect des courbes d'étalonnage pour les anticorps monoclonaux SE3 et SE6 est en forme de décroissance linéaire avec un effet de saturation vers les grandes concentrations (5750 et 57500 ufc), donnant lieu à un deuxième régime (figures 4.6.b et 4.6.d). Seule la première partie linéaire est exploitée pour les essais de quantification. Pour les courbes de l'anticorps polyclonal STE (figure 4.6.f), les pentes des courbes sont plus parallèles mais parfois incohérentes car la détection de 14, 36 ou 145 bactéries se fait au même temps.

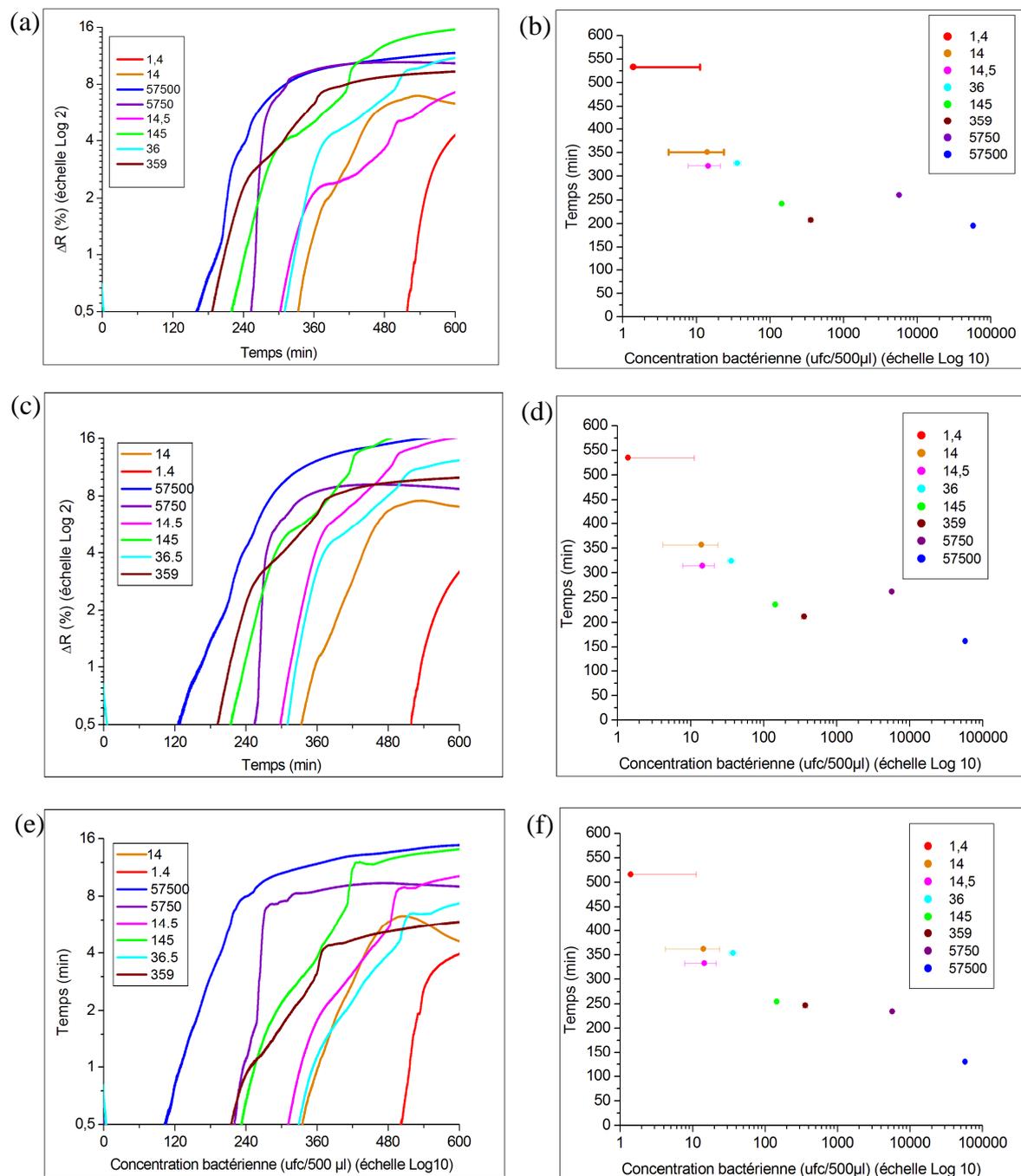
Cependant, une dérive initiale non spécifique du signal SPR lié à la croissance bactériennes sur certaines expériences (exemple des courbes à 1,4 ufc et 5750 ufc/ 500  $\mu$ l), génère une fausse estimation du temps nécessaire pour une détection spécifique lors ce qu'un seuil de réflectivité comme 2% est fixé. Nous avons donc décidé de faire un ajustement pour éliminer cette dérive primaire sur la courbe de croissance en phase exponentielle. Sans raison apparente cette dérive semble être plus prononcée sur les courbes des anticorps monoclonaux SE3 et SE6. Ci-dessous (figure 4.7) est présenté un exemple d'ajustement par soustraction d'une ligne de base pour la courbe à une concentration initiale de 1,4 ufc/ 500  $\mu$ l.



**Figure 4.7 :** Courbes de suivi de la croissance spécifique de 1,4 ufc/ 500  $\mu$ l de *Salmonella* Enteritidis. **(a)** Avant soustraction de la ligne de base : cette ligne de base est déterminée à l'aide d'un « fit » de la moyenne des courbes. **(b)** après soustraction de la ligne de base : les pentes des courbes sont nulles jusqu'à la phase exponentielle de croissance spécifique.

Suite à l'ajustement des courbes SE3, SE6 et STE (présence de dérive), nous avons retracé les courbes d'étalonnage. L'aspect des courbes est plus homogène avec un bon parallélisme des pentes sur

la partie R=0,5 à 4% (figure 4.8). Nous avons sélectionné un seuil de 1% pour la seconde représentation, qui semble être plus représentatif de la réalité.



**Figure 4.8 :** Etablissement de la courbe d'étalonnage à partir des différentes inoculations bactérienne. **(a)** Suivi du signal de réflectivité sur les plots spécifique SE3 en fonction du temps, pour chaque inoculation, après soustraction de la ligne de base. **(b)** Représentation du temps de détection à 1% en fonction de la concentration initiale (échelle log 10), après soustraction de la ligne de base. **(c)** Suivi du signal de réflectivité sur les plots spécifique SE6 en fonction du temps, pour chaque inoculation, après soustraction de la ligne de base. **(d)** Représentation du temps de détection à 1% en fonction de la concentration initiale (échelle log 10), après soustraction de la ligne de base. **(e)** Suivi du signal de réflectivité sur les plots

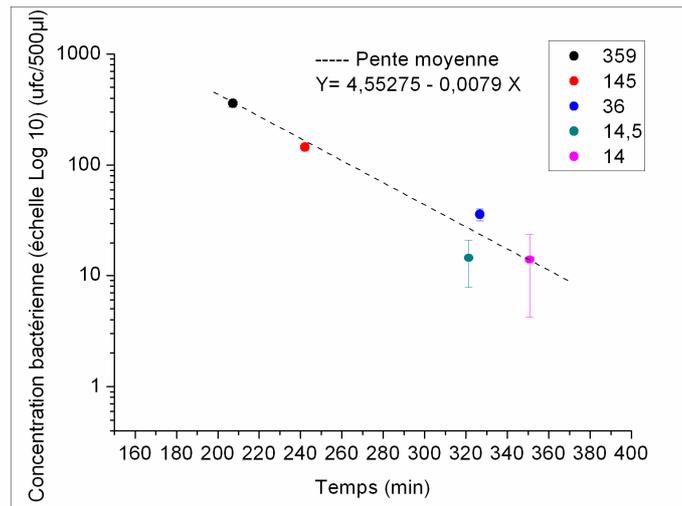
spécifique STE en fonction du temps, pour chaque concentration initiale, après soustraction de la ligne de base. (f) Représentation du temps de détection à 1% pour en fonction de la concentration initiale de *Salmonella* Enteritidis (échelle log 10), après soustraction de la ligne de base.

Pour la suite des analyses nous avons choisi de travailler sur les courbes SE3 uniquement (similaires au SE6). La déduction de la concentration initiale d'un échantillon contaminé ne peut se faire que sur une plage de validité de la courbe d'étalonnage (partie linéaire) se trouvant à des concentrations initiales entre 5 et 500 ufc/ 500 µL. Au-delà de ces concentrations apparaît un phénomène de saturation (partie non linéaire). Ceci s'explique par le fait que les concentrations sont suffisamment élevées pour une détection rapide, car la concentration bactérienne nécessaire pour une détection spécifique, correspondant à 1% en réflectivité ( $C_{\Delta 1\%}$ ) est rapidement atteinte. Cependant, il faudrait faire plus d'expériences pour conforter la courbe d'étalonnage et renforcer la fiabilité des résultats, cela à cause de la grande marge d'erreur au niveau des faibles taux de contamination.

Par la suite, nous avons voulu savoir quelle concentration bactérienne ( $C_{\Delta 1\%}$ ) génère un  $\Delta R$  de 1%. Sur la fenêtre de linéarité et en prenant en compte les points expérimentaux (plots SE3): 14 ufc, 14,5 ufc, 36 ufc, 145 ufc et 359 ufc / 500 µl, - le point 1,4 ufc/ 500 µl n'a pas été pris en compte à cause de la grande barre d'erreur sur un si petit nombre, donnant une trop grande disparité de la pente moyenne-. Nous avons tracé la pente moyenne de la concentration (échelle log 10) en fonction du temps (figure 4.10), dont l'équation de la pente ( $Y = 4,55275 - 0,00979 X$ ) correspond à l'équation de croissance bactérienne suivante :

$$\text{Log } C_i = \text{Log } C_{\Delta 1\%} - \frac{\text{Log } 2}{\tau} t_i \quad (1)$$

Il en résulte que  $C_{\Delta 1\%} = 3,5 \times 10^4$  ufc/ 500 µl, avec un temps de génération  $\tau = 30,7$  minutes.



**Figure 4.10 :** Représentation logarithmique de la concentration initiale inoculée en fonction des temps de détection spécifiques pour une valeur de seuil à 1% sur les plots SE3.

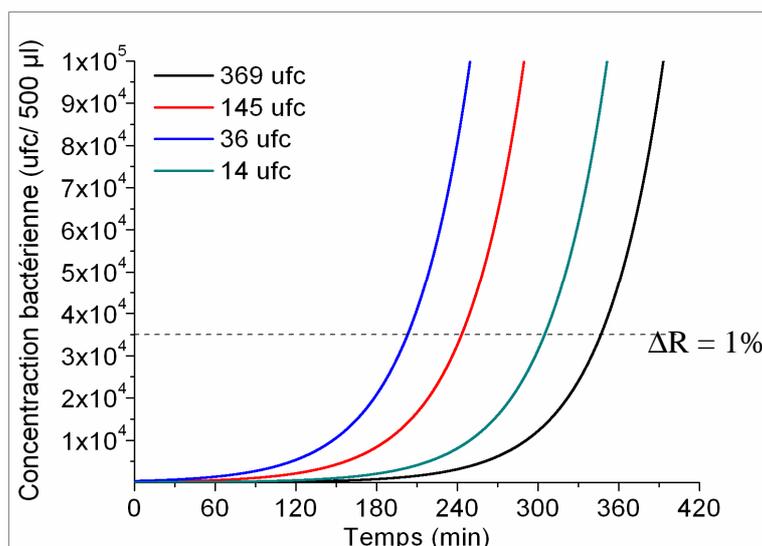
En conclusion, une variation en réflectivité de 1% correspond donc à la détection d'une concentration de  $3,5 \times 10^4$  ufc / 500 µl pour *Salmonella* Enteritidis, contre une concentration de  $0,75 \times 10^6$  ufc/ 500 µl pour le *S. pneumonie R6* calculée dans le Chapitre 3. La différence de concentration observée entre ces deux approximations peut être expliquée par le fait que la *Salmonella* Enteritidis soit une bactérie flagellée qui est par conséquent mobile et peut nager dans le milieu, atteignant ainsi la surface de façon plus rapide que le pneumocoque, où seuls des phénomènes de diffusion et de sédimentation sont mis en jeu. Ainsi, la salmonelle, grâce à sa mobilité, génère une variation de signal en SPR plus rapidement.

#### **b) Modélisation des courbes théoriques de croissance sur la plage de validité linéaire**

Nous avons tracé un modèle théorique de croissance bactérienne, en prenant en compte un temps de dédoublement expérimental ( $\tau$ ) de 30,7 minutes, ainsi que les concentrations : 14, 36, 145 et 359 ufc/ 500 µl correspondant à la partie linéaire de la courbe d'étalonnage. Les courbes de croissance exponentielle théoriques dont l'équation est :

$$C = C_i 2^{\frac{t}{\tau}}$$

ont été tracées (figure 4. 11).



**Figure 4.11 :** Courbes théoriques calculées de la croissance de *Salmonella* Enteritidis à différentes concentrations en fonction du temps.

La concentration  $C_0$  qui, rappelons-le, correspondant à la concentration bactérienne nécessaire pour la détection spécifique de *Salmonella* Enteritidis à une variation de réflectivité de 1%, a été calculée. Elle est de  $3,5 \times 10^4$  ufc/ 500 μl. Les temps de détection théoriques correspondants à ces concentrations sont très proches des temps de détection expérimentaux fixés à 1% en variation de réflectivité (tableau 4.1).

	Temps de détection théoriques (min)	Temps de détection spécifique moyen (min)	% d'écart
<b>14 ufc</b>	347	351	0,04 %
<b>36 ufc</b>	305	327	0,22 %
<b>145 ufc</b>	243	242	0,01 %
<b>359 ufc</b>	202	207	0,05 %

**Tableau 4.1 :** Comparaison des temps de détection spécifiques correspondant à 1% de variation en réflectivité dans le modèle expérimental et à  $C_0$  dans le modèle théorique de croissance exponentielle des bactéries.

Par conséquent, cette modélisation vient conforter les estimations de concentration et de temps de dédoublements calculés et prouve que le signal enregistré en réflectivité correspond à une courbe de croissance exponentielle des bactéries, très proches du modèle

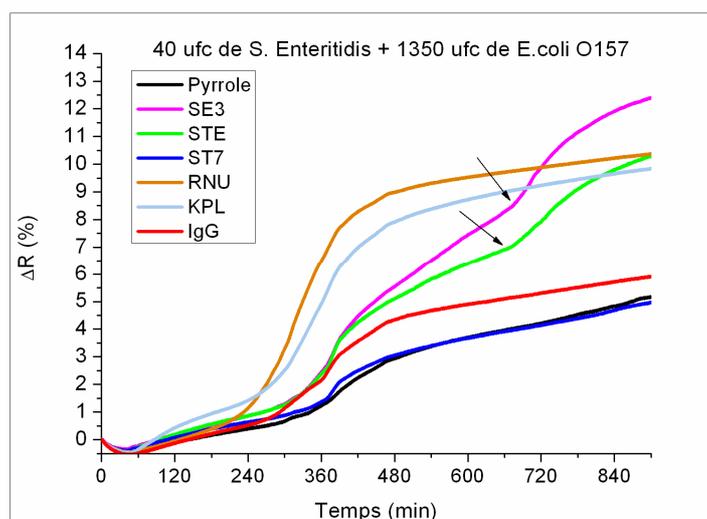
théorique de croissance selon l'équation :  $C = C_i 2^{\frac{t}{\tau}}$  (2)

#### IV.1.4.2 Détection de *Salmonella* dans un mélange de populations bactériennes

Après avoir effectué une preuve de concept sur la détection d'un pathogène réel (*S. Enteritidis*) à l'aide de l'approche CCM, nous nous sommes intéressés à la détection de cette bactérie dans un échantillon contaminé par d'autres souches bactériennes, ce qui est souvent le cas dans une matrice alimentaire (non stérile). Le but de ce qui suit est de savoir s'il est toujours possible de détecter la bactérie recherchée en présence d'autres souches bactériennes.

Une concentration de 40 ufc/ 500µl *S. Enteritidis* en présence de 1350 ufc/ 500 µl *E.coli O157* a été testée (ratio 1 :30). Pour cela, une puce comportant des anticorps spécifiques de *S. Enteritidis* (SE3, STE), d'*E. coli O157* (KPL, RNU) et des plots de contrôle (IgG, ST7, pyrrole) a été réalisée.

Le résultat figure 4.12 montre la détection spécifique d'*E. coli O157* sur les plots KPL et RNU, suivi d'une légère augmentation du signal sur tous les plots confondus vers 400 minutes. Cette augmentation est probablement due à la précipitation des *E. coli* en grande concentration, en fin de cycle de croissance. Vers 700 minutes, une variation en réflectivité spécifique de la croissance de *S. Enteritidis* est observée sur les plots spécifiques (SE3 et STE). Pour des raisons de clarté de la figure, ne sont représentées que les moyennes des triplicats de pour chaque ligand.



**Figure 4.12** : Suivi de la culture d'un mélange de 40 *S. Enteritidis* et de 1350 *E. coli O157* par SPRi. La détection des *E. coli O157* se fait plus tôt que celle des salmonelles car elles sont en nombre supérieur. Les flèches indiquent le début de la détection de la croissance de *S. Enteritidis* sur ses plots spécifiques.

Par conséquent, l'approche dynamique moyennant optimisation, peut être utilisée pour la détection d'un pathogène en faible concentration dans un milieu non stérile, et peut éventuellement être utilisée pour détecter la présence simultanée de deux pathogènes.

#### ***IV.1.4.3 Détection de bactéries dans une matrice alimentaire complexe***

Une matrice alimentaire est un terme désignant un aliment solide ou liquide composé d'un ou plusieurs analytes qui définissent sa complexité (par ex., aliment transformé, matières brutes, etc). Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera homogénéisé (quand il est de nature liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile (quand il est de nature solide), ce qui constitue en fait la première dilution.

Pour les produits liquides (ou semi-liquides) une agitation manuelle vigoureuse en présence de billes de verre permet d'obtenir une homogénéité satisfaisante. Pour les produits solides diverses techniques de broyage sont utilisables :

- ✓ Broyage manuel au Potter ou en présence de billes de verre stériles (mortier).
- ✓ Broyage mécanique à l'aide un broyeur du type STOMACHER (digesteur) par exemple. Cet appareil utilise des sacs plastiques stériles à deux compartiments séparés par un filtre ; il permet de disperser dans des conditions relativement douces l'aliment dans le diluant et de récupérer ce qui est dissous dans le deuxième compartiment. Le but étant de faire passer les bactéries dans le compartiment liquide.

La prise d'essai de l'échantillon dans le cas d'un aliment liquide est toujours diluée au dixième dans le diluant. Pour les échantillons solides, la prise d'essai est le plus souvent de 10 g (ou 25 g) d'aliment et de 90 ml (ou 225 ml) de diluant. Cette procédure est considérée comme une dilution au dixième également.

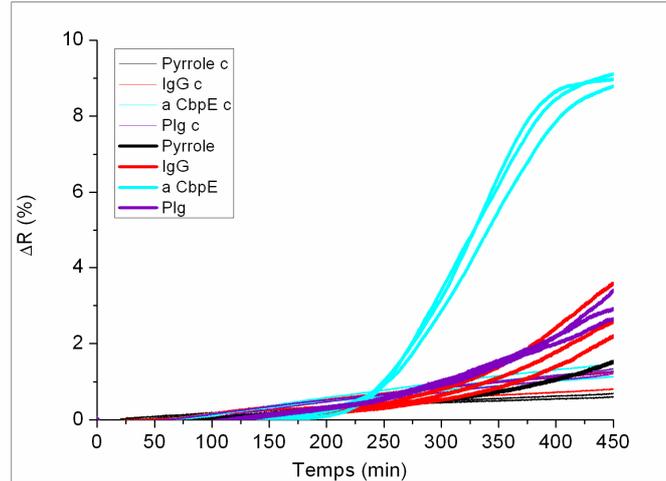
L'intérêt ultime recherché par le présent travail, est l'application de l'approche dynamique sur des échantillons réels. Pour ce faire, nous avons choisi de volontairement contaminer des matrices alimentaires, afin de mimer des applications dans le milieu agro-industriel et de tester la sensibilité et la robustesse du système dans ce genre d'échantillons.

### a) Expériences sur le modèle du pneumocoque

Lors des premiers essais, où nous n'avions pas encore acquis la souche *Salmonella*, nous avons artificiellement contaminé de la viande hachée « fraîchement » achetée à la boucherie locale avec du pneumocoque *R6*. Le traitement habituel et la mise en culture de portions alimentaires se font selon les protocoles standards utilisés en microbiologie alimentaire pour la recherche de pathogènes. Pour la viande hachée par exemple, le protocole de recherche de pathogènes préconise l'utilisation de 25g de viande hachée dans 225 ml de diluant. Pour cela, nous avons mélangé des proportions dix fois plus petites mais avec un même ratio de mélange : 2,5 g de viande hachée avec 22,5 ml milieu de culture TH (le milieu d'enrichissement du pneumocoque a été utilisé comme diluant). Ensuite, nous avons récupéré le jus filtré à l'aide de papier Whatman. Le résultat de l'analyse SPR n'était pas probant, comparé à du jus de viande haché non contaminé. Il y avait de la réflectivité sur tous les plots confondus, et la complexité du milieu ne nous a pas permis d'identifier la cause de ces interférences.

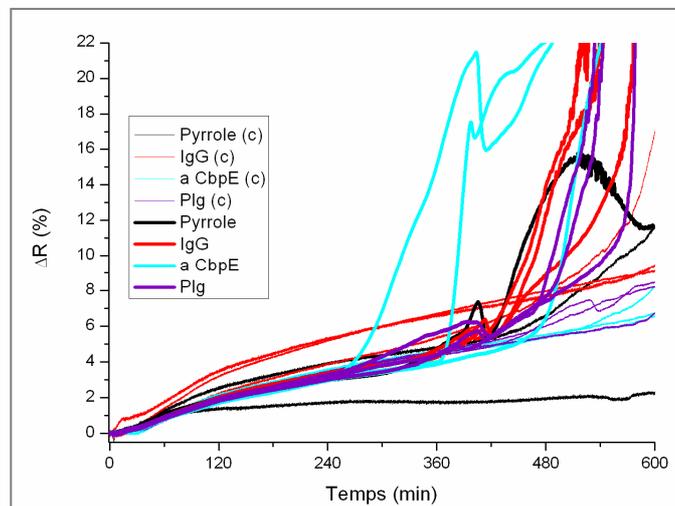
Par la suite, Nous avons contaminé du lait demi écrémé UHT (Lactel ®) ainsi que du lait cru dilués au dixième dans le diluant (milieu de culture TH), avec du pneumocoque. La dilution au dixième du milieu complexe est un protocole classiquement utilisé dans la méthode conventionnelle de recherche de pathogènes dans le lait.

Le résultat obtenu sur le lait demi écrémé stérile dilué au 10<sup>ème</sup> dans le milieu TH était intéressant (figure 4.13). En effet, la variation en réflectivité des plots d'anti-CbpE était spécifique pour la détection de la croissance du pneumocoque, cependant le plasminogène n'a pas reconnu les pneumocoques de façon spécifique. Il a probablement été affecté par la composition du milieu complexe, car il est moins stable que l'anticorps.



**Figure 4.13 :** Suivi de la croissance par SPRi de 500 ufc/ 500  $\mu$ l de *S. pneumoniae* R6 dans du lait demi écrémé stérile dilué au  $10^{\text{ème}}$  dans du milieu TH. La variation en réflectivité spécifique n'est observée que sur les plots de l'anti-CbpE, qui reconnaissent la bactérie dans ce milieu.

Dans le lait cru, milieu non stérile, la présence de bactéries lactiques acidifie le milieu, donnant du lait caillé, qui interfère avec la détection de la bactérie. Néanmoins, deux plots du triplicat des anticorps spécifiques anti-CbpE ont donné une variation en réflectivité spécifique de la détection du pneumocoque (figure 4.14).

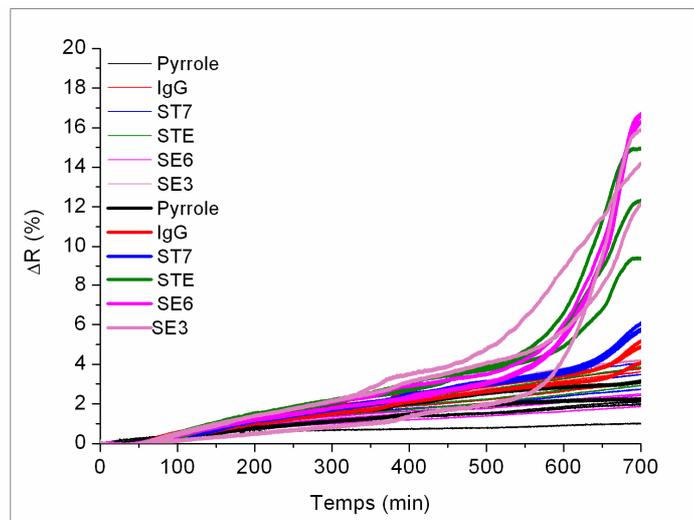


**Figure 4.14 :** Suivi de la croissance par SPRi de 500 ufc/ 500  $\mu$ l de *S. pneumoniae* R6 dans du lait cru dilué au  $10^{\text{ème}}$  dans du milieu TH.

## b) Etude d'un pathogène d'intérêt dans les matrices alimentaires

L'acquisition de la souche *S. Enteritidis* de nature lactique (isolée sur du fromage), nous a permis de tester la détection de ce pathogène dans des matrices alimentaires telles que le lait demi écrémé et dans le lait cru.

Une expérience de croissance de *S. Enteritidis* dans du lait demi écrémé UHT (Lactel®) a été réalisée (figure 4.15). La contamination artificielle avec une dizaine de bactérie a été faite sur du lait dilué au dixième dans le milieu EPT.



**Figure 4.15 :** Suivi de la croissance de  $10 \pm 4$  ufc/ 500  $\mu$ l *S. Enteritidis* dans du lait demi écrémé dilué au dixième dans de l'EPT, par SPRi. La variation en réflectivité sur les plots spécifiques (SE3, SE6 et STE) atteste d'une détection de la bactérie dans le lait.

Le test de contamination artificielle à l'aide de *S. Enteritidis* dans du lait cru, ne nous a pas permis de détecter la salmonella dans ce milieu complexe. Il est possible que les autres bactéries lactiques présentes dans le lait cru, en acidifiant le milieu, fassent précipiter des protéines lactiques comme la caséine. Pour vérifier cette théorie, des travaux récents au laboratoire, visant à faire un test contrôle de lait stérile au dixième additionné d'acide acétique, versus du milieu de culture sans le lait additionné d'acide acétique également, ont été effectués. Il en a résulté une augmentation du signal dans la chambre contenant le lait au dixième uniquement, suggérant une précipitation des protéines du lait.

Au moment de la rédaction du présent manuscrit, des tests de contamination artificielle de viande hachée avec de la *Salmonella Enteritidis*, ont été également effectués. La

détection réussie de salmonelle dans la viande hachée à l'aide des anticorps spécifiques, permet d'étendre l'application de l'approche CCM à des matrices alimentaires de type carné. Moyennant l'optimisation des protocoles, la détection des salmonelles dans du lait cru est également possible.

En conclusion, nous avons utilisé l'approche expérimentale CCM développée au cours de ce travail, pour la détection de la salmonelle dans des matrices alimentaires complexes, stériles ou non stériles. Cette approche est en cours de mise au point pour la détection en conditions réelles de différentes bactéries d'intérêt. Il reste cependant à explorer les limites de mesure et de performances, comprenant l'éventail de souches bactériennes détectables, le panel d'échantillons biologiques utilisables, les limites et spécificité de détection pour chaque matrice testée, la fiabilité des mesures, le taux d'échec etc.); et ainsi de confronter ces performances aux dispositifs analytiques actuellement utilisés dans les laboratoires d'analyse.

## IV.2 Ouverture vers des applications médicales : l'Antibiogramme intégré

### IV.2.1 Introduction

L'antibiogramme désigne une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus. Le principe consiste à placer une culture pure de bactéries en présence du ou des antibiotiques, et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut par exemple placer plusieurs pastilles de papier imbibées d'antibiotiques sur une souche bactérienneensemencée dans une boîte de Petri (figure 4. 16).



**Figure 4.16 :** Photo d'un antibiogramme sur milieu solide : Les disques imbibés d'antibiotiques sont déposés sur milieu solide. Après une incubation de 16 à 18 h, à 35 °C, le diamètre des auréoles autour des disques (zones d'inhibition de la croissance) est mesuré pour définir la sensibilité de la bactérie à l'antibiotique (notion de CMI). (Source Wikipedia)

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante. En simplifié, c'est un test de laboratoire permettant de déterminer la sensibilité de bactéries à des antibiotiques donnés. Il fait appel à la notion de concentration critique inférieure (c) et de concentration critique supérieure (C).

- ✓ c : dose minimale d'antibiotique qu'un malade peut recevoir sans danger et qui fait effet sur la souche bactérienne.
- ✓ C : dose maximale d'antibiotique qu'un malade peut recevoir sans danger et qui fait effet sur la souche bactérienne.

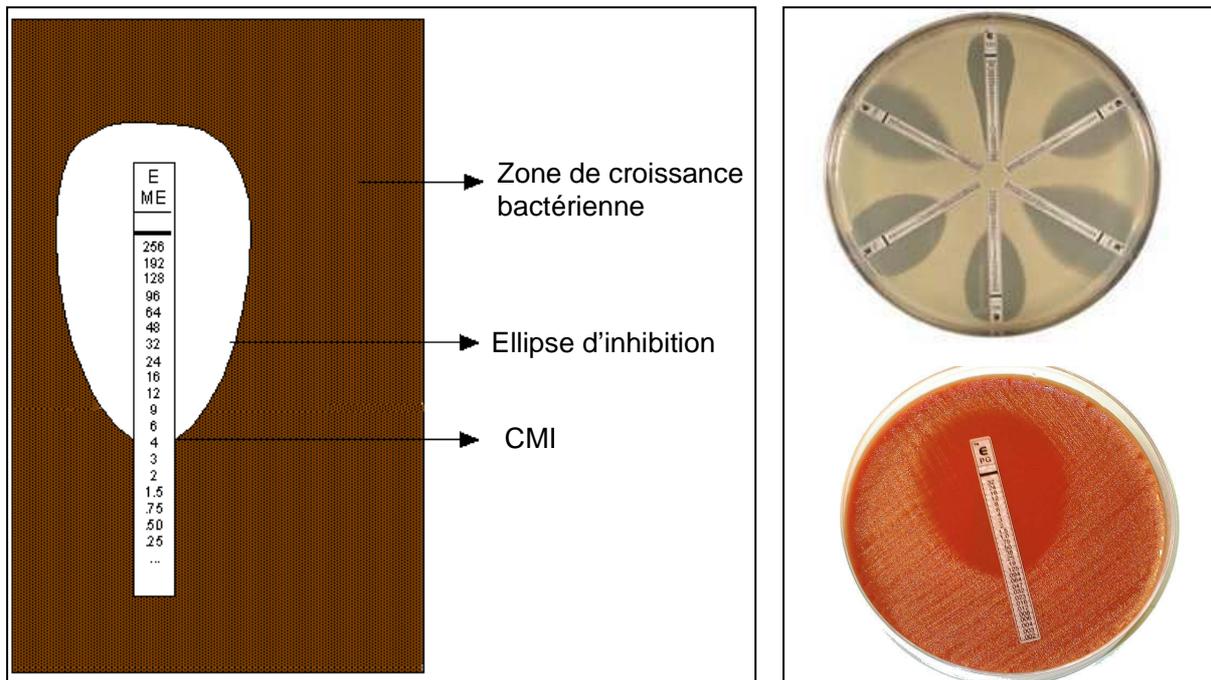
Il faut savoir que chez un individu correctement traité par un antibiotique, la concentration d'antibiotique dans l'organisme est supposée osciller entre la concentration critique inférieure et supérieure, pendant la durée du traitement. Pour chaque couple bactérie-antibiotique, on détermine une concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible. En comparant la CMI aux concentrations critiques, on peut déterminer la sensibilité ou la résistance de la bactérie à l'antibiotique : (i) la bactérie est sensible à l'antibiotique quand la CMI est inférieure à la concentration critique inférieure. Concrètement, cela signifie qu'il suffit d'une faible concentration d'antibiotique pour tuer les bactéries et que la dose nécessaire est encore plus faible que la plus faible des doses qu'on peut administrer chez l'homme. Donc en clair, si on traite un individu avec l'antibiotique, la concentration de celui-ci dans l'organisme sera toujours suffisante pour tuer les bactéries ; (ii) la bactérie est résistante à l'antibiotique quand la CMI est supérieure à la concentration critique supérieure. Concrètement, la dose nécessaire pour tuer les bactéries est bien trop élevée pour être supportée chez l'homme sans effets secondaires importants. Cet antibiotique ne peut pas être utilisé pour traiter une infection ; (iii) enfin, la bactérie a un profil intermédiaire à l'antibiotique quand la CMI est comprise entre les deux concentrations critiques. En pratique, cela correspond à une situation où la concentration est tantôt suffisante pour tuer les bactéries, tantôt insuffisante. Il faut considérer que la bactérie sera résistante *in vivo* et il ne faut pas utiliser cet antibiotique.

L'identification d'un microorganisme et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques sont les éléments indispensables que le clinicien exige pour définir le traitement d'un patient. En effet, l'antibiogramme est réalisé dans les cas d'infections graves (choc septique, infections nosocomiales...) ou lorsque les antibiotiques choisis en probabaliste ne fonctionnent pas. Cette attitude aboutit à l'utilisation répétée des mêmes antibiotiques et contribue à l'émergence de souches résistantes. L'émergence de ces nouvelles souches résistantes a créé un besoin d'intégrer les antibiogrammes au diagnostic bactériologique rapide.

En phase solide sur gélose, jusqu'à 50 antibiotiques usuels peuvent être testés. Il est important de souligner que la lecture de l'antibiogramme doit se faire de façon critique ; par exemple, si un *Staphylococcus aureus* (Staphylocoque doré) est résistant à l'oxacilline (ancienne méticilline), il faut le considérer résistant à toutes les bêta-lactamines (toutes les pénicillines et toutes les céphalosporines deviennent inutilisables). Une telle bactérie est

appelée un SARM pour *Staphylocoque aureus* résistant à la métiline (ou MRSA en anglais). Il est donc utile de connaître les résistances naturelles des bactéries, pour diminuer le nombre de tests d'antibiotiques à effectuer et d'adapter l'antibiogramme en fonction des informations connues pour certaines espèces bactériennes. En revanche, certaines résistances sont hétérogènes et ne vont toucher qu'une partie des souches, dans ce cas là, il faudra intégrer plus d'antibiotiques à tester.

La détermination précise de la CMI par la méthode de référence est difficilement utilisable en pratique quotidienne. La commercialisation d'une technique rapide et simple, le E-test® (AB Biodisk), peut être une alternative pratique de l'antibiogramme en disques imbibés. Après l'ensemencement des bactéries sur boîte de Petri, une bande E-test qui comprend un gradient d'antibiotique croissant d'une extrémité à l'autre est déposée. Une échelle de lecture, imprimé sur la bande, permet une interprétation rapide de la CMI. La boîte est mise en incubation, puis la lecture de la CMI se fait directement à l'intersection de l'ellipse d'inhibition avec la bande (figure 4.17).



**Figure 4.17 :** Lecture d'un antibiogramme E-test. (a) La CMI est directement lue au point d'intersection entre la zone d'inhibition et la bande d'antibiotique. (b) Images photographiques d'un E-test après incubation (en haut : test à 6 antibiotiques, test à 1 antibiotique. (Source site web de BioMérieux).

De nos jours, il existe des antibiogrammes automatisés où les bactéries sont déposées en suspension dans un récipient, la machine aspire le liquide et le dépose sur une carte (format

carte de crédit) dans laquelle il y a de petites zones correspondant à chaque antibiotique. La machine lit ensuite cette carte et donne automatiquement les résultats (sensible, intermédiaire, résistant), c'est l'exemple de l'ATB VET de BioMérieux.

La détermination de la sensibilité peut également se réaliser en milieu liquide, en testant la sensibilité de la souche bactérienne vis-à-vis des concentrations critiques supérieures et inférieures des différents antibiotiques ou uniquement vis-à-vis des concentrations critiques inférieures. Ces méthodes simplifiées sont commercialisées, par exemple "ATB Antibiogramme" (bioMérieux) ou "ATB VET" (bioMérieux), ce qui les rend accessibles aux laboratoires de diagnostic. L'inoculation des galeries et la lecture des résultats peuvent se réaliser manuellement ou à l'aide d'automates.

#### IV.2.2 Arrêt de la croissance de bactéries par un antibiotique suivi en SPRi

Nous avons voulu tester la faisabilité d'un antibiogramme via un capteur SPR. Pour ce faire, nous avons utilisé la souche *S. pneumoniae* R6 connue pour sa sensibilité à l'érythromycine (figure 4. 18). Cet antibiotique fait partie de la famille des macrolides, qui empêchent la croissance des bactéries, en interférant avec la synthèse des protéines. En effet, l'érythromycine se lie avec la sous unité ribosomique 50S et empêche ainsi la translocation des peptides et la formation de polypeptides. La croissance des bactéries est ainsi bloquée sans effet lytique.

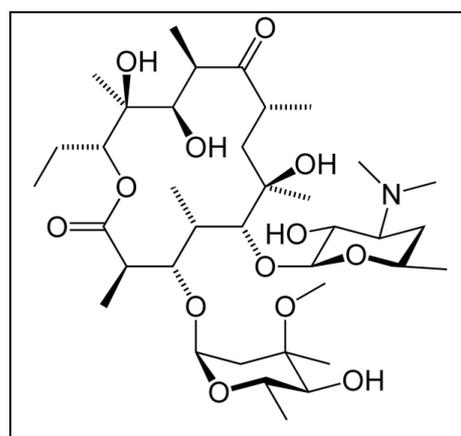
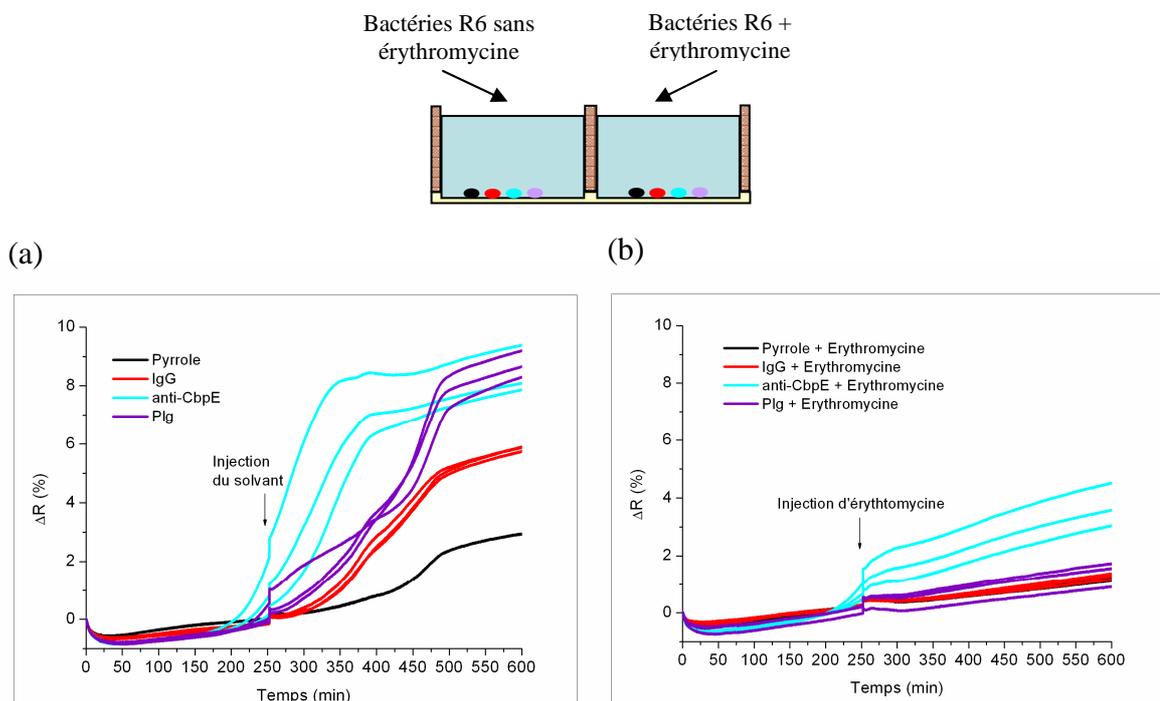


Figure 4.18 : Structure chimique en 2 dimensions de l'érythromycine.

Une biopuce fonctionnalisée avec des anticorps anti-CbpE spécifiques du *S. pneumoniae*, du plasminogène (Plg), des IgG non spécifiques de *S. pneumoniae*, et du pyrrole

a été réalisée. La biopuce a ensuite été bloquée avec de la BSA 1% TH pendant 15 minutes. Après inoculation de la cuve à deux chambres avec 5000 ufc/ 500  $\mu$ l de *S. pneumoniae* R6 dans du milieu de culture TH (dans chaque chambre) et une croissance pendant 250 minutes à 35°C, une variation spécifique en réflectivité est enregistrée. Après 250 minutes, l'érythromycine est injectée dans la première chambre à une concentration finale de 40 mg/l (concentration bactériostatique), et d'éthanol à la concentration finale de 0,08%. La présence de traces d'éthanol est due au fait que l'érythromycine n'est pas directement soluble dans l'eau aux concentrations de travail. Seul le solvant contenant de l'éthanol à 0,08% final est ajouté dans la deuxième chambre.



**Figure 4.19 :** Suivi de la croissance de 5000 ufc/ 500  $\mu$ l de *S. pneumonie* R6 par SPRi dans une cuve à deux chambres. (a) Injection du solvant seul à t250 minutes, avec une concentration finale d'éthanol de 0,08% dans la première chambre (contrôle de croissance). (b) Injection de 4 $\mu$ l d'érythromycine à t250 minutes, dans la deuxième chambre à une concentration finale de 40 mg/l diluée dans l'éthanol à la concentration finale de 0,08%.

La figure 4.19 présente l'impact de l'ajout d'un antibiotique (l'érythromycine) ciblant les pneumocoques, à la concentration finale de 40 mg/l, sur la variation en réflectivité due à une croissance de *Streptococcus pneumoniae*,ensemencé à 5000 ufc/ 500  $\mu$ l, après 250 minutes de culture. Il en résulte que l'ajout de l'érythromycine provoque un arrêt net de la croissance, concrétisé par une nette diminution de la pente des courbes reflétant la variation en réflectivité particulièrement marquée pour les plots d'anti-CbpE et du plasminogène. La

diminution est donc liée à une inhibition de la croissance bactérienne. Par ailleurs, aucune diminution n'est observée lors de l'ajout de solution contrôle à la même concentration d'éthanol mais sans l'érythromycine, ce qui démontre que l'inhibition de la croissance bactérienne précédemment observée est directement imputable à l'action de l'antibiotique et non pas à un effet de solvant.

Par conséquent, nous pouvons envisager le parallélisme de ce type de mesures et ainsi proposer un nouvel outil de mesure de sensibilité aux antibiotiques.

#### IV.2.3 Test simultané de deux souches aux profils de résistance aux antibiotiques différents

Nous avons voulu comparer les profils de sensibilité et de résistance d'une même espèce bactérienne (résistance acquise) et pour un antibiotique donnée. Pour ce faire, nous avons utilisé la souche *S. pneumoniae* R6 sauvage (naturellement sensible à la kanamycine) et une souche *S. pneumoniae*  $\Delta AdcA II$ , qui a été transformée avec un plasmide contenant un gène de résistance à la kanamycine (GP, IBS).

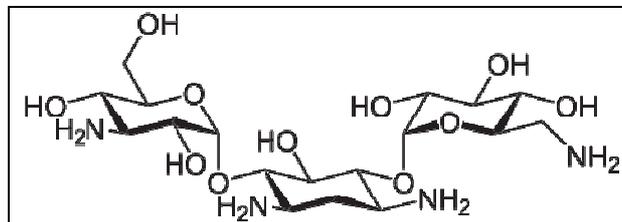
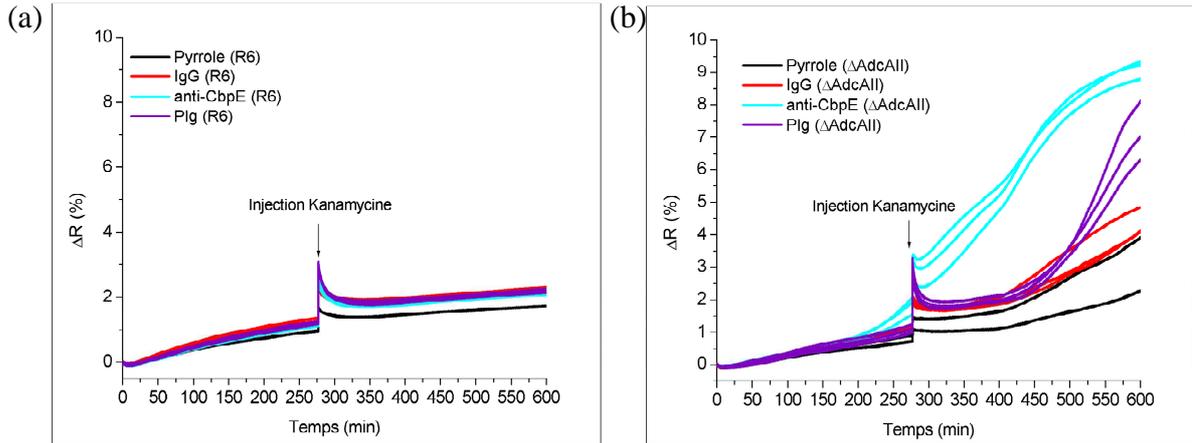


Figure 4. 20 : Structure chimique en 2 dimensions de la kanamycine.

La kanamycine est un antibiotique à large spectre de la famille des aminosides (figure 4.20) qui agit en se liant à la sous-unité 30S des ribosomes bactériens. Cette interaction interfère avec la traduction des ARN messagers en induisant des erreurs dans le décodage des codons. Ces erreurs entraînent l'arrêt de la traduction ou la synthèse de protéines tronquées, aberrantes ou inactives. L'incapacité à synthétiser des protéines normales et fonctionnelles provoque la mort des bactéries.

L'expérience figure 4.21, montre l'effet de la kanamycine (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sur la souche sensible du pneumocoque (R6) et celle résistante à la kanamycine ( $\Delta AdcA II$ ).



**Figure 4.21 :** Suivi de l'effet de la kanamycine sur la croissance de *S. pneumoniae* R6 et de *S. pneumoniae*  $\Delta AdcA II$ . (a) Suivi de la croissance par SPRi de 5000 ufc/ 500  $\mu$ l de *S. pneumoniae* R6 dans la chambre 1 puis injection de kanamycine à T= 275 min. (b) Suivi de la croissance par SPRi de 5000 ufc/ 500  $\mu$ l de *S. pneumoniae*  $\Delta AdcA II$  dans la chambre 2, puis injection de la kanamycine à T275 min. La kanamycine est rajoutée dans les deux chambres à une concentration finale de 300  $\mu$ g/ml diluée dans de l'eau. La pente de croissance de la souche sensible (R6) est en déclin par rapport à la souche résistante.

L'ajout de la kanamycine à 275 minutes, à une concentration finale de 240  $\mu$ g/ml, provoque une diminution de la pente des courbes reflétant la variation en réflectivité particulièrement marquée sur les pots de l'anti-CbpE et du plasminogène et ralentie par conséquent la croissance du *Streptococcus pneumoniae* R6,ensemencé à 5000 ufc/ 500  $\mu$ l. Par ailleurs, aucune diminution n'est observée lors de l'ajout du même antibiotique à la souche résistante  $\Delta AdcA II$ , ce qui démontre que l'inhibition de la croissance bactérienne observée est liée à sensibilité connue de la R6 à la kanamycine.

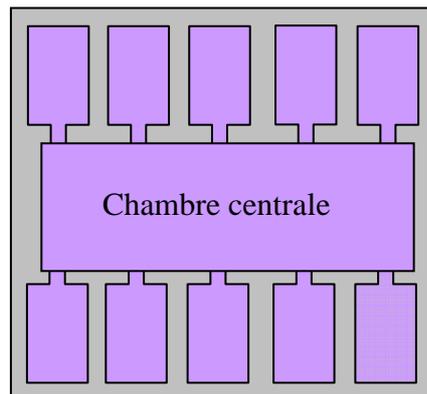
En conclusion, l'approche dynamique de suivi de la culture bactérienne permet d'établir un profil de résistance ou de sensibilité à un antibiogramme et également de discriminer deux souches de la même famille, lorsqu'il y a une acquisition nouvelle d'un gène de résistance.

#### IV.2.4 Conclusion et Perspectives d'intégration d'un antibiogramme à la technique de CCM

Le système actuel tel qu'utilisé pour la détection spécifique des bactéries par la méthode CCM en imagerie SPR, ne permet pas de faire des tests avec plusieurs antibiotiques

à la fois. Il faudra substituer la cuve ouverte actuellement utilisée par un système multiplexe multicanaux pour tester différentes substances antibiotiques.

Nous pouvons imaginer une cuve avec une chambre centrale de pré-enrichissement et de capture spécifique, qui alimente des chambres secondaires, dans lesquelles, différents antibiotiques sont déposés (figure 4.22).



**Figure 4.22 :** Vue du dessus d'une cuve comportant une chambre centrale de croissance, ainsi que des puits secondaires contenant des antibiotiques. Une fois la bactérie détectée dans la chambre centrale, les valves sont ouvertes et le liquide passe dans les puits pour un suivi multiplexe de la croissance en présence de différents antibiotiques.

Il sera alors nécessaire d'utiliser des valves uni-sens ou tout simplement un système de pression mécanique ou fluide, afin de réguler les passages de liquide, de la chambre centrale vers les chambres secondaires et de l'enclencher au moment voulu.

En conclusion, l'approche dynamique permet aujourd'hui d'établir des profils de sensibilité et de résistance à un antibiotique donné et pour une bactérie donnée. Un montage plus élaboré, tel que proposé, permettrait de tester plusieurs antibiotiques à la fois dans un milieu liquide de façon beaucoup plus rapide qu'un antibiogramme classique sur boîte de Petri. Cependant, comme la concentration de l'antibiotique en milieu liquide est fixe, on ne peut pas parler de gradient de concentration ni de CMI. Les concentrations en antibiotiques utilisées correspondent généralement aux concentrations critiques inférieures établies pour l'homme. Après ensemencement avec un inoculum standardisé, la lecture est basée sur l'observation de la croissance dans chacune des chambres. Une absence de croissance correspond à une bactérie sensible et une croissance correspond à une bactérie résistante.

Dans ce système, les bactéries de sensibilité intermédiaire sont considérées comme résistantes. Cette approche mérite donc d'être étudiée plus amplement.

## Références bibliographiques du Chapitre IV:

- [1] [www.afssa.fr/](http://www.afssa.fr/), Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Avril 2012)
- [2] <http://www.who.int/gfn/GSSProgressReport2005.pdf>, WHO GLOBAL SALM-SURV PROGRESS REPORT, (Avril 2012).
- [3] [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr), Institut de Veille Sanitaire (Mai 2012)
- [4] [www.ceses.org/eurosurveillance](http://www.ceses.org/eurosurveillance), Eurosurveillance (Avril 2012).
- [5] L.H. Su, C.H. Chiu, Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature, *Chang Gung Med J* 30 (2007) 210-219.
- [6] B. Patrick R. Murray, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A, *Manual of Clinical Microbiology*, 9 ed., ASM Press, Washington, 2007.
- [7] S. Porwollik, E.F. Boyd, C. Choy, P. Cheng, L. Florea, E. Proctor, M. McClelland, Characterization of Salmonella enterica subspecies I genovars by use of microarrays, *Journal of bacteriology* 186 (2004) 5883-5898.
- [8] H. Wang, Y. Li, A. Wang, M. Slavik, Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three foodborne pathogens using magnetic nanobead-based immunoseparation and quantum dot-based multiplex immunoassay, *Journal of food protection* 74 (2011) 2039-2047.
- [9] M.S. Bronze, and Greenfield, R.A, *Biodefense: Principles and Pathogens*, Horizon Bioscience, 2005.
- [10] G.M.B. Garrity, Don J.; Krieg, Noel R.; Staley, James R., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed., Springer, New York, 2005.
- [11] M.Y. Popoff, J. Bockemuhl, F.W. Brenner, Supplement 1997 (no. 41) to the Kauffmann-White scheme, *Res Microbiol* 149 (1998) 601-604.
- [12] Institut Pasteur, Fiche-sur-les-maladies-infectieuses/salmonelloses, pp. <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/salmonelloses> (Mai 2012).
- [13] L.F. Haeghebaert S., Vaillant V., Delarocque Astagneau E. et Bouvet P, Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998, *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2001.
- [14] E. Galikowska, D. Kunikowska, E. Tokarska-Pietrzak, H. Dziadziuszko, J.M. Los, P. Golec, G. Wegrzyn, M. Los, Specific detection of Salmonella enterica and Escherichia coli strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30 (2011) 1067-73.
- [15] F. Savoye, P. Feng, C. Rozand, M. Bouvier, A. Gleizal, D. Thevenot, Comparative evaluation of a phage protein ligand assay with real-time PCR and a reference method for the detection of Escherichia coli O157:H7 in raw ground beef and trimmings, *Journal of food protection* 74 (2011) 6-12.
- [16] C. Lofstrom, J. Hoorfar, Validation of an open-formula, diagnostic real-time PCR method for 20-h detection of Salmonella in animal feeds, *Veterinary microbiology* 17 (2012) 583-4315.
- [17] S. Perelle, F.o. Dilasser, B. Malorny, J.l. Grout, J. Hoorfar, P. Fach, Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting Salmonella spp. in milk and meat samples, *Molecular and Cellular Probes* 18 (2004) 409-420.
- [18] Q. Li, P. Chen, C. Ren, Comparison of different magnetic beads for adsorption of pathogenic bacteria, *Wei Sheng Yan Jiu* 41 (2012) 293-297.



# Chapitre V

---

## *Conclusions et Perspectives*



Le contexte dans lequel ce travail de thèse s'est inscrit est celui du développement de biopuces SPR dédiées à la détection de micro-organismes pathogènes et plus particulièrement à la détection de bactéries pathogènes d'origine alimentaire ou médicale.

Nous nous sommes, dans un premier temps, attachés à décrire les différentes méthodes conventionnelles ainsi que les technologies émergentes utilisées dans le domaine de la détection bactérienne. Cette étude bibliographique a notamment permis d'introduire les biocapteurs, et plus particulièrement le capteur de type résonance plasmonique de surface qui a été utilisé dans ces travaux. A la vue des performances des différentes technologies recensées, il a été conclu que leurs performances étaient similaires notamment en termes de rapidité et de seuils de détection. Cependant, la sensibilité décrite des technologies reste insuffisante dans le cas d'une détection spécifique où le principe de la « tolérance zéro » est appliqué.

Une description détaillée des capteurs optiques de type SPR a permis de présenter leurs principales caractéristiques ainsi que d'introduire la stratégie adoptée pour la détection spécifique des bactéries. Nous avons développé la mise en œuvre de différentes méthodes visant à l'amélioration de performances des expérimentations. Les limites de détection obtenues à l'aide de notre imageur SPR étaient concordantes avec celles observées dans la littérature, selon des modes de réalisation similaires.

Après cette validation du bon fonctionnement des immunocapteurs dans la configuration « statique », nous avons introduit une nouvelle approche « dynamique » de la détection bactérienne. Cette approche dynamique vise à diminuer les seuils de détection, en associant l'enrichissement bactérien à la capture et à la détection spécifique. Grâce au modèle d'étude *S. pneumoniae* R6, nous avons pu faire la preuve de concept de cette hypothèse et de détecter la présence de faibles quantités bactériennes (dizaines de ufc) en quelques heures seulement. L'amélioration des limites de détection grâce à l'approche dynamique, peut notamment combiner une croissance des bactéries dans le milieu de culture, mais également à la surface du capteur, grâce aux bactéries immobilisées au niveau des plots spécifiques. Nous avons ensuite établi une courbe d'étalonnage, pour tenter de rendre la technique quantitative et pouvoir estimer la concentration d'un échantillon inconnu, traité de la même façon. La réalisation de la courbe d'étalonnage a notamment permis d'établir une équivalence entre la

variation en réflectivité et la concentration bactérienne, en confrontant l'équation théorique de croissance avec les résultats SPR.

Nous avons ensuite appliqué cette technique à la détection d'un pathogène réel en agroalimentaire, la salmonelle. Dans un premier temps, une détection dans le milieu de culture de la bactérie a été réalisée avec succès. Une courbe d'étalonnage a également été réalisée. La partie linéaire de la courbe permettait la quantification de bactéries dans des échantillons inconnus. Cependant vers les concentrations bactériennes supérieures à  $10^4$  ufc/ml) un phénomène de saturation est observé. Nous avons également pu estimer la correspondance entre la concentration des salmonelles et la variation en réflectivité, grâce à la courbe d'étalonnage. En comparant les correspondances concentration/variation en réflectivité pour la *Salmonella* Enteritidis et le *S.pneumoniae* R6, nous avons constaté que pour une même réflectivité, la concentration de salmonelles estimée était plus faible que celle du pneumocoque. Ceci peut s'expliquer par le fait que contrairement au pneumocoque, la salmonelle est une bactérie mobile qui arrive par conséquent plus rapidement au contact des plots à la surface de la biopuce, car non limitée par les phénomènes de la diffusion et des mouvements browniens.

A la suite de ces résultats préliminaires, nous avons voulu tester la robustesse de notre système dans des échantillons alimentaires complexes. La question de savoir s'il est possible de détecter la bactérie pathogène recherchée, en faible concentration et en présence d'autres pathogènes a été abordée. Nous avons démontré que la présence d'*E.coli* dans le milieu de culture ne gênait pas la détection de la salmonelle. La détection des bactéries par contamination artificielle du lait UHT avec le pneumocoque ou la salmonelle a été réalisée avec succès. Dans le lait cru, l'interprétation des résultats était moins évidente. En effet, nous avons émis l'hypothèse que dans une matrice alimentaire complexe non stérile de type lait cru, les bactéries naturellement présentes dans la matrice pouvaient inhiber la détection de la bactérie recherchée notamment par acidification du milieu. Le milieu acidifié précipiterait les protéines du lait et masquerait par conséquent les ligands spécifiques de la bactérie recherchée.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la réalisation d'un antibiogramme rapide, en milieu liquide et intégré à notre système de détection. Nous avons démontré que l'ajout d'un antibiotique à une culture sensible en pleine croissance sur la biopuce permet de bloquer la

croissance. En effet la variation de la réflectivité sur les plots spécifiques est arrêtée après ajout de l'antibiotique à la souche sensible, indiquant un blocage de la croissance de cette dernière. Par conséquent, il pourrait être envisageable de construire un système multiplexe avec un antibiogramme intégré dans le biocapteur, permettant ainsi d'identifier rapidement les profils de résistances aux antibiotiques.

Quelques essais en système microfluidique ont également été évalués au cours de cette thèse. Cependant, notre choix s'est porté sur l'approfondissement de l'étude sans système microfluidique dans le but de décomplexifier les expériences et de comprendre les phénomènes de base.

Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont permis de conduire vers le développement de nouveaux tests de diagnostic *in vitro* dans le domaine de la microbiologie pour la santé et l'agro-alimentaire ; tout particulièrement l'identification rapide des microorganismes, ainsi que l'établissement éventuel des profils de résistance aux antibiotiques. Après la préparation de l'échantillon à analyser par le manipulateur, ce système a l'avantage d'être totalement autonome et automatisable pour l'identification des bactéries. Ce travail en amont du développement d'une technologie prometteuse, ouvre les frontières vers de nouveaux projets applicatifs dans différents secteurs (santé, agro-alimentaire, militaire).

Une étude préliminaire sur la possibilité de désorber les bactéries vivantes de la surface de la puce de façon spécifique et donc de les trier a été également abordée (voir Annexe E). Cette technique permettrait notamment de cultiver les bactéries en aval, après leur première identification, dans le but de faire un diagnostic plus poussé (ex : confrontation génotypique de la souche isolée avec les sources potentielles de contamination).

Afin d'améliorer le système de détection actuel et de le rendre commercialisable, il faudrait explorer les limites de mesures et de performances. Plus particulièrement déterminer l'éventail de souches bactériennes détectables, le panel d'échantillons biologiques utilisables, les limites et spécificités de détection pour chaque matrice testée. Réaliser la détection dans de plus gros volumes est essentielle par exemple. La fiabilité des mesures, le taux d'échec sont également des points à évaluer. Ensuite, il serait souhaitable de confronter ces performances aux dispositifs analytiques actuellement utilisés dans les laboratoires d'analyse. Le

multiplexage du système actuel permettrait de faire plusieurs tests à la fois et notamment d'intégrer l'antibiogramme pour certaines applications. Ainsi, il procurerait une détection simple et rapide de multiples pathogènes, diminuerait les coûts et permettrait un gain de temps important non seulement pour les industriels mais aussi pour la société qui sera protégée de façon plus efficace. Enfin, la miniaturisation possible du système de détection et la fabrication de kits de diagnostics ciblés pour les différents secteurs permettrait de rendre l'outil portable et facile d'utilisation. Il permettrait notamment de faire un diagnostic au lit du malade (le *point of care*), de détecter la contamination des aliments dans l'industrie alimentaire avant la libération des lots, ou même de vérifier rapidement des éléments suspects en cas d'attaque de bioterrorisme.

Nous pouvons entrevoir ici les enjeux sanitaires mais également économiques pour ce genre développements. Un brevet sur la détection et la quantification de micro-organismes a été déposé en Décembre 2010, suivi de la création d'une Start Up « PrestoDiag » en Mars 2012, qui s'est lancée dans le développement industriel d'un nouvel outil de détection de bactéries pathogènes, basé sur l'exploitation de l'approche CCM étudiée dans ce travail de thèse. Actuellement, une étude sur la simplification de l'instrumentation est également menée par M. T.Mercey, porteur du projet Prestodiag.

Photo de l'imageur SPRi actuel, utilisé pour ce travail de thèse :



# Chapitre VI

---

## *Section expérimentale*



Ce chapitre introduit tous les éléments nécessaires à la réalisation des expérimentations dont les résultats ont été discutés dans les chapitres précédents du présent manuscrit.

Une liste exhaustive du matériel utilisé est présentée (produits chimiques, biomolécules, milieux de culture, bactéries). Puis des protocoles détaillés concernant les expérimentations sont décrits. Une description étape par étape de ces procédures permet de reproduire les manipulations si nécessaire dans le futur.

## **VI. 1 Matériel et réactifs**

### **VI.1.1 Produits chimiques :**

- ✓ Ethanol (70%, 99,9%) (Carlo Erba reagents)
- ✓ Pyrrole (Tokyo Casei, Japan)
- ✓ Pyrrole acide undécanoïque sufo-N-Hydroxysuccinimide (Py-NHS) (fabriqué au laboratoire selon Grosjean 2005)
- ✓ Biotine (Thermo Fischer Scientific, France)
- ✓ Streptavidin, R-phycoerythrin (SAPE) (Invitrogen, France)
- ✓ Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Invitrogen, France)
- ✓ Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Applied Science, France)

### **VI.1.2 Matériel consommable :**

- ✓ Prisme en verre (angle 60°) couvert par une double couche métallique : Titane 5nm et or 45nm d'épaisseur (Horiba Scientific-Genoptics, France)
- ✓ Lame de microscope couverte d'une double couche métallique ; chrome 2 nm et or 55 nm (Schott Swiss SA, Suisse)
- ✓ Concentrateurs par centrifugation (500 $\mu$ L) 30kDa et 50kDa MWCO (VivaScience, France)
- ✓ Colonnes Nap<sup>TM</sup> 5, PD-10, Sephadex<sup>TM</sup> G-25 (GE Healthcare, UK)

### **VI.1.3 Matériel non consommable :**

- ✓ Centrifugeuse Sigma 1K15 (Bioblocj Scientific)
- ✓ Imageur SPR (Horiba Scientific GenOptics)
- ✓ Microscope optique (Olympus BX60)
- ✓ Appareil de chromatographie (GE Pharmacia ÄKTA™ Purifier)
- ✓ Sonicateur (Sonicator 3000®, Misonix)
- ✓ FLUOstar OPTIMA abs pour la lecture des microplaques ELISA (BMG Labtech)

### **VI.1.4 Anticorps :**

- ✓ SE3 monoclonal anti *Salmonella Enteritidis* (source H. Volland, CEA Saclay)
- ✓ SE6 monoclonal anti *Salmonella Enteritidis* (source H. Volland, CEA Saclay)
- ✓ ST4 monoclonal anti *Salmonella Typhimurium* (source H. Volland, CEA Saclay)
- ✓ ST7 monoclonal anti *Salmonella Typhimurium* (source H. Volland, CEA Saclay)
- ✓ STE Polyclonal anti groupe *Salmonella* (ABD serotech)
- ✓ Anti-CbpE dirigé contre le *Streptococcus pneumoniae* (source IBS grenoble)
- ✓ IgG monoclonal non spécifique (CEA Marcoule)

### **VI.1.5 Protéines :**

- ✓ Plasminogène (Sigma Aldrich, France)
- ✓ Choline Binding Protein CbpE (purifié à l'IBS)
- ✓ Bovine Serum Albumine (Sigma Aldrich, France)
- ✓ EcoRI enzyme 20,000 U/ ml (New England Biolabs, UK)
- ✓ PvuII enzyme 10,000 U/ ml (New England Biolabs, UK)

### **VI.1.6 Tampons :**

- ✓ Phosphate Buffer Saline ou tampon PBS (Sigma Aldrich, France)
- ✓ Tampon d'électro-polymérisation (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, Glycerol et eau, pH 6.8)
- ✓ Tampon Tris (trishydroxyméthylaminométhane), 1 M, pH 8.0

- ✓ Tampon A pour la chromatographie (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 40 mM Imidazole).
- ✓ Tampon B pour la chromatographie (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole).

#### **VI.1.7 Milieux de culture :**

- ✓ Eau peptonée tamponnée (EPT) (AES Chemunex)
- ✓ Gélose Tryptic Soy Agar (TSA) (AES Chemunex)
- ✓ Gélose Tryptic Soy Broth (TSB) (AES Chemunex)
- ✓ Milieu Todd Hewitt (TH) (Sigma Aldrich)
- ✓ Milieu Lysogeny broth (LB) (Sigma Aldrich)
- ✓ Gélose Columbia Blood Agar (CBA) (Sigma Aldrich)
- ✓ Milieu Hektoen (AES Chemunex)
- ✓ Tryptone sel (AES Chemunex)

#### **VI.1.8 Bactéries :**

- ✓ *Streptococcus pneumoniae* R6, collaboration avec T. Vernet de l'institut de Biologie Structurale (IBS Grenoble, France)
- ✓ *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis, collaboration avec l'ISHA.
- ✓ *Escherichia coli* K12, JM109 (E4107), achetée chez New England Biolabs, UK.
- ✓ *Escherichia coli* BL 21 (DE3) RIL, Institut de Biologie Structurale (IBS Grenoble, France).
- ✓ *Escherichia coli* O157H7, Réf. CIP 105917, CRB Institut Pasteur, France.

## **VI. 2 Procédures expérimentales**

Les biopuces ont été préparées soit sur prisme en verre doré (pour les expérimentations SPR) ou sur lame dorée (pour les essais d'immunofluorescence).

## VI. 2. 1 Réaction de couplage des IgG et des protéines au Pyrrole

Les IgG sont préalablement diluées à 0.5 mg/ ml, correspondant à 3.33  $\mu\text{M}$ , (Masse molaire des IgG : 150 kDa). Elles sont lavées dans des colonnes Vivaspin (MWCO 30kDa) pour éliminer l'azide de sodium (produit de conservation dans les stocks commerciaux), en déposant 200 $\mu\text{l}$  de PBS sur les colonnes, puis en centrifugeant 15 minutes, 4°C, 15 000g (Centrifugeuse Sigma, rotor 12110). Ensuite déposer 200 $\mu\text{l}$  des IgG à 0.5 mg/ ml sur les colonnes, puis centrifuger 15 minutes, 4°C, 15 000g. Laver deux fois les IgG avec 100 $\mu\text{l}$  de PBS à chaque fois, en centrifugeant. Ajouter 50 $\mu\text{l}$  de PBS dans le tube (homogénéiser doucement) puis transvaser dans un tube Eppendorf, répéter la même manipulation. Enfin, ajouter 100 $\mu\text{l}$  de PBS dans ce dernier.

Entre temps, préparer une solution de Py-NHS à 200 $\mu\text{M}$  pour faire le mélange.

Le mélange :

- ✓ 200 $\mu\text{l}$  d'IgG à 3.33 $\mu\text{M}$  (RMI=10, le Ratio Molaire Initial est le ratio de la concentration Py-NHS en sur la concentration en anticorps)
- ✓ 34 $\mu\text{l}$  de Py-NHS à 200 $\mu\text{M}$
- ✓ 166 $\mu\text{l}$  de PBS

Incuber le mélange à température ambiante pendant minimum 2 heures ou à +4°C sur la nuit. Une fois les IgG couplées, il faut laver l'excès de Py-NHS libre. Laver les colonnes en déposant 200 $\mu\text{l}$  de PBS sur les colonnes, centrifuger 15 minutes à 15 000 g. Déposer les échantillons sur les colonnes : 200 $\mu\text{l}$ , centrifuger, puis répéter la même manipulation. Laver deux fois les IgG en déposant 200 $\mu\text{l}$  de PBS, puis centrifuger.

Ajouter 40 $\mu\text{l}$  de tampon d'électro-copolymérisation (homogénéiser doucement), puis transvaser dans un tube Eppendorf ; répéter la même manipulation.

Enfin, faire un dosage UV des IgG pour vérifier leur concentration. Le volume final des échantillons est d'environ 90 $\mu\text{l}$ , donc la concentration attendue est de 1.1 mg/ ml pour chaque échantillon. Il est possible que le rendement soit plus faible que la concentration attendue, en fonction de l'anticorps ou la protéine utilisée (agglutination sur membranes).

Remarque : Le même protocole de couplage a été utilisé pour le plasminogène (masse moléculaire : 90 kDa, coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 149390 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## VI.2. 2 Purification des IgG polyclonaux (anti-CbpE) par colonne d'exclusion

### VI.2.2.1 Production et purification de la protéine recombinante CbpE

A partir d'un stock glycérolé, faire une culture de bactéries *E.coli* BL 21 (DE3) RIL transformées avec un plasmide contenant le locus *spr0831* codant pour la protéine CbpE dans un litre de milieu LB (37°C). A  $DO_{600\text{ nm}} = 0,8$  à 1 : induire la production de la protéine avec 0,5 mM d'IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalacto pyranoside). Puis mettre en incubation 15°C sous agitation durant la nuit.

Après centrifugation de la culture à 4000 g pendant 20 minutes, récupérer le culot et le dissoudre avec 40 ml du tampon A (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 40 mM Imidazole). Ajouter une pastille de *Complete EDTA-Free Protease Inhibitor* pour éviter la digestion de la protéine d'intérêt.

Ensuite, la sonication de la solution (sonicator 3000®, Misonix) permet de lyser les cellules et libérer la protéine CbpE. Centrifugation du lysat à 18000 g pendant 20 minutes, puis récupération du surnageant contenant la protéine.

La protéine recombinante CbpE est produite avec une extrémité comportant une étiquette Histidine. Sa purification se fait par chromatographie d'affinité sur colonne His trap ®. Après chargement du surnageant sur la colonne et rinçage à l'aide du tampon A, un autre tampon B (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 40 mM Imidazole), permet de décrocher la protéine à l'aide d'un gradient d'imidazole.

Un gel d'acrylamide SDS 12,5 % des fractions correspondants à l'élution de la protéine, permet de vérifier sa pureté et son poids moléculaire (72kDa).

Enfin, il faut rassembler les fractions pertinentes (selon l'aspect de la protéine sur le gel SDS) et mesurer la  $DO_{280\text{ nm}}$  afin de déterminer la concentration de la protéine produite.

### ***VI.2.2.2 Purification de l'anticorps anti-CbpE***

La résine d'affinité utilisée est : « CNBr activated sepharose 3B ». Dans un premier temps, il faut fixer la protéine recombinante sur la résine d'affinité, selon le protocole suivant :

- ✓ Utiliser 1g de résine dans 1 mM de HCl (~ 3 ml de résine).
- ✓ Lavage par 200 ml de 1 mM HCl et 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.0 ; 0,5 M NaCl.
- ✓ Dialyse de 3 ml de la protéine CbpE purifiée (3 mg/ ml) contre 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.0 et 0,5 M NaCl.
- ✓ Incubation de 3 ml de résine avec les 3 ml de la protéine CbpE dialysée pendant 2h à température ambiante sur la roue d'agitation.
- ✓ Lavage de la résine par 200 ml de 0,1 M de NaHCO<sub>3</sub> pH 8.0 ; 0,5 M NaCl.
- ✓ Saturation des sites par 50 ml de 0,1 M Tris pH 8.0, pendant 1 heure sur la roue d'agitation.
- ✓ Lavage de la résine par 3 cycles de 50 ml de :
  - 0,1 M NaAc pH 4.0 ; 0,5 M NaCl
  - 0,1 M Tris pH 8.0 ; 0,5 M NaCl
- ✓ Mesure de l'absorbance de la CbpE avant et après incubation de la résine (la concentration de la CbpE doit normalement diminuer).

Ensuite, pour purifier l'anticorps anti-CbpE présent dans du sérum de lapin immunisé avec la protéine recombinante CbpE :

- ✓ Incuber 4 ml de sérum anti-CbpE de lapin avec 1 ml de résine-CbpE dans une colonne, pendant 1h à température ambiante sur la roue d'agitation.
- ✓ Laver la colonne avec 0,05 M Hepes ph 7.5 et 0,15 M NaCl
- ✓ Enfin, éluer à l'aide de 0,1 M de Glycine ph 3.0 et récupérer les fractions dans des eppendorfs par 500 µl avec 25 µl de 2 M Tris Ph 8.0 (pour tamponner).
- ✓ Faire un gel d'acrylamide 12,5 % des fractions récoltées, puis rassembler les fractions pertinentes.

Afin de se débarrasser des résidus Tris gênantes pour le couplage au pyrrole, le tampon doit être substitué par 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.0 ; 0,5 M NaCl à l'aide d'une colonne

PD10/Nap5 (GE Healthcare) ou par dialyse. Enfin, un test ELISA peut être effectué pour vérifier la réactivité de l'anticorps purifié vis-à-vis de la protéine CbpE.

### **VI.2.3 Culture bactérienne**

Une préculture durant la nuit (16 à 18 heures) à 37°C de la souche bactérienne est réalisée dans le milieu adéquat à partir d'une ou deux colonies caractéristiques prélevées sur la boîte de Petri dans 10 ml de milieu de culture. Pour certaines souches on peut également directement inoculer à partir d'un glaçon du stock glycérolé du souchier à -80°C ou Cryobilles à -20°C (dans ce cas là prélever une bille et la mettre dans le Facon contenant 10 ml du milieu de culture).

Vérifier la densité optique de la suspension bactérienne, à l'aide du densitomètre, il faut que la densité de la solution bactérienne soit entre 0,8 et 1,2 Mc Ferland après la culture. La concentration de la pré-culture après croissance est estimée à terme entre  $[10^8-10^9]$  ufc/ml (saturation de la culture).

Des dilutions de dix en dix de la culture bactérienne sont ensuite réalisées dans le milieu de culture de la bactérie, l'ensemencement sur puce est fait en fonction de la dilution/concentration souhaitée. En parallèle, la pré-culture bactérienne mère (10 ml) est centrifugée (1500 rpm, 15 min, 20°C) et lavée deux fois à l'aide de PBS filtré stérile.

Huit dilutions de dix en dix (1 ml dans 9 ml à chaque fois) sont réalisées dans du PBS ou du tryptone sel puis les dilutions (-6), (-7) et (-8) sont ensemencées en profondeur (dans la masse) sur des boîte de Petri dans le milieu solide adéquat (1ml de la dilution/boîte). Le milieu de culture gélosé doit être préalablement fondu dans un bain marie à 100°C puis refroidi  $\approx 45^\circ\text{C}$ . Une fois que le milieu prend en masse, incuber les boîtes 18h à 37°C pour le dénombrement.

Une estimation de la concentration bactérienne par mesure de densité optique à 600 nm (turbidité) est également possible (utilisée dans le cas du pneumocoque) à condition qu'une courbe d'étalonnage de la souche soit déjà établie, c'est-à-dire, le suivi de la  $\text{DO}_{600\text{ nm}}$  à différents temps de croissance, avec le dénombrement sur boîte de Petri à chaque point de mesure de DO à 600 nm.

**Le dénombrement des bactéries** se fait par comptage du nombre de colonies formées à la surface et/ou dans le milieu de culture. Il est à préciser que pour les faibles concentrations (< 100 ufc/ ml) il faut faire la moyenne des 30 boîtes pour une même dilution afin d'obtenir une concentration avec une marge d'erreur acceptable qui correspond à deux fois l'écart type ( $2\sigma$ ).

#### **VI. 2. 4 Les expérimentations Culture-Capture-Mesure des bactéries par SPRi**

Dans l'imageur SPR, régler l'incubateur à la température optimale de croissance de la souche. Placer la cuve à 2 chambres dans le dispositif de mesure par SPR et mettre en place le prisme préalablement greffé et bloqué en surface, sur le porte prisme. Puis insérer le montage dans le rail prévu à cet effet. A l'aide de la vis, remonter le montage « prisme/porte prisme » jusqu'à plaquer la surface dorée du prisme sur le bas de la cuve.

Mettre 100  $\mu$ l du milieu de culture dans chaque chambre pour éviter le séchage des plots. Faire le réglage nécessaire sur le logiciel SPR View. Ensuite, compléter avec 400  $\mu$ l du milieu de culture stérile dans la chambre 1 et 350  $\mu$ l du milieu de culture et 50  $\mu$ l de la dilution bactérienne souhaitée dans la chambre 2 (dilution au dixième de travail). Recouvrir la cuve avec un film imperméable aux liquides pour minimiser l'évaporation du milieu. Enfin, lancer le suivi cinétique.

# **Annexes**

---

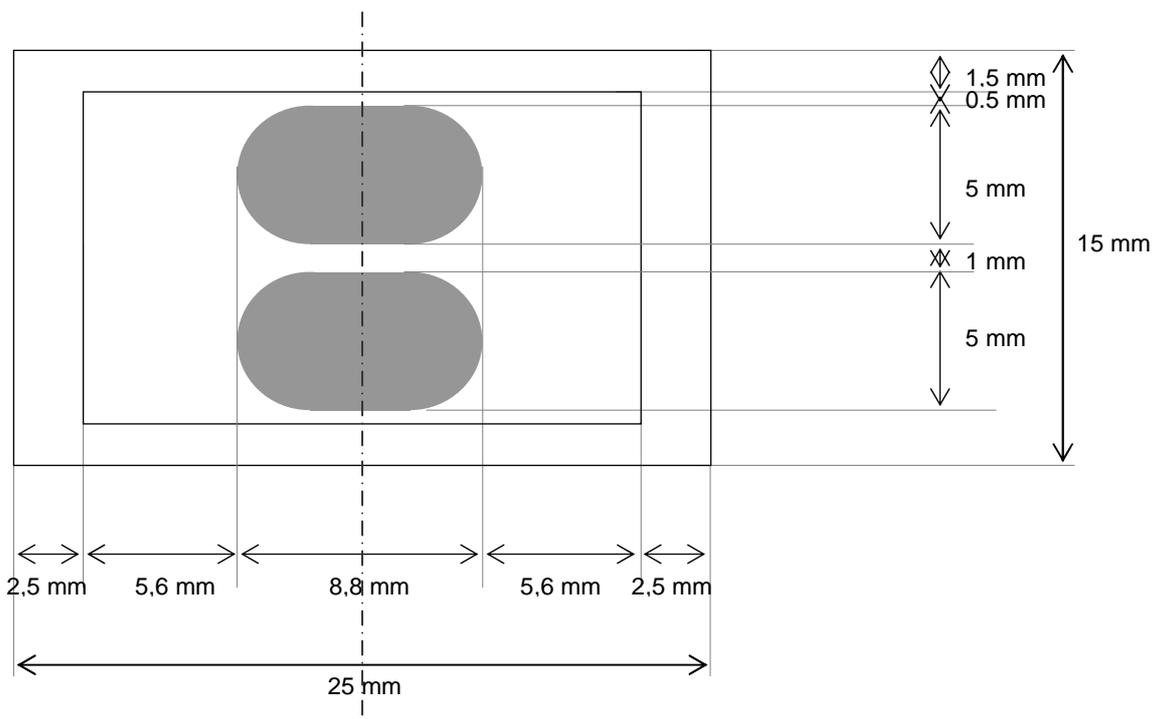


## Annexe A : Traitements de données SPRi

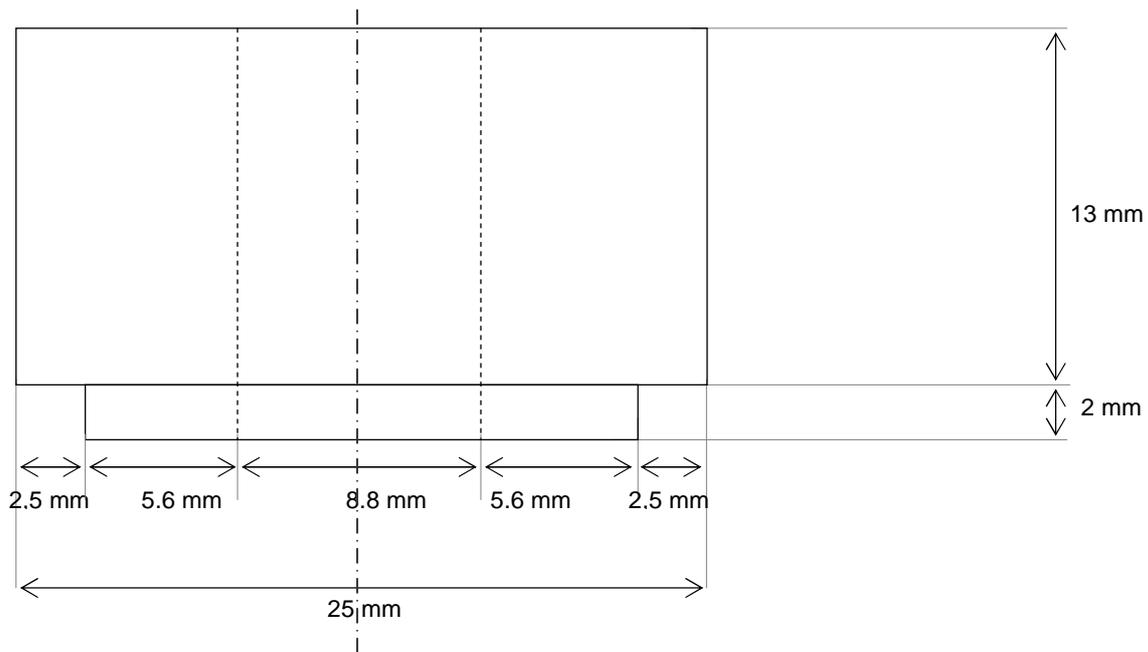
Les données SPR brutes ont été traitées à l'aide du logiciel Origin Pro afin de remettre à zéro la réflectivité initiale de chaque plot. La remise à zéro consiste à soustraire la réflectivité à  $t = 0$  pour chaque colonne de réflectivité de chaque plot en fonction du temps. On parle alors de différence de réflectivité  $\Delta R$  et non pas de la réflectivité de chaque plot.

## Annexe B : Cotes de la cuve en PEEK utilisée pour la CCM

Vue dessus échelle 5 :1



Vue face échelle 5 :1



## Annexe C: Méthode de référence pour la détection de la salmonelle dans les aliments

La méthode conventionnelle pour la recherche et le dénombrement de salmonelles dans les aliments, est une méthode de référence qui s'applique à la recherche des *Salmonella* spp., incluant *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi* dans les :

- Produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.
- Echantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de produits alimentaires

Il faut noter que cette méthode de référence peut ne pas permettre de retrouver toutes les *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi*. La recherche des *Salmonella* selon la méthode de référence nécessite 4 phases successives :

- Pré-enrichissement en milieu **non sélectif** liquide : eau peptonée tamponnée (EPT)
- Enrichissement en **bouillons sélectifs** :
  - ✓ Bouillon Rappaport Vassiliadis Soja (RVS)
  - ✓ Bouillon Muller-Kauffman au Tétrathionate-Novobiocine (MKTTn)
- Isolement sur **2 milieux sélectifs** gélosés :
  - gélose Xylose-Lysine-Désoxycholate (XLD)
  - gélose RAPID' *Salmonella* (RS) ou gélose Haektoen

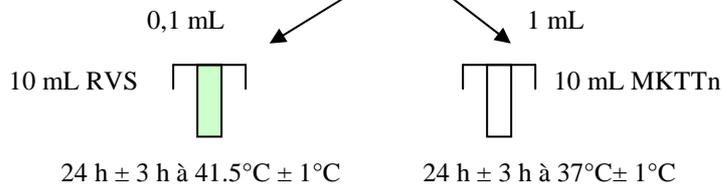
**J<sub>0</sub> :**  
**PRE-ENRICHISSEMENT**  
**NON SELECTIF**



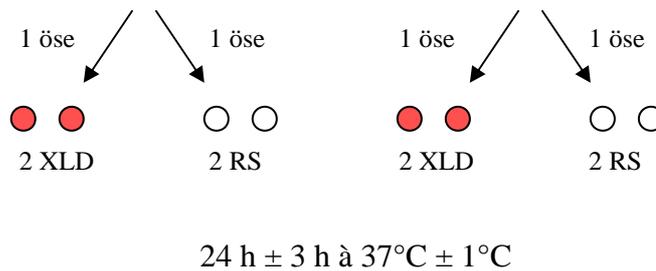
Dilution au 1/10 dans EPT  
 = Solution-mère

18 h ± 2 h à 37°C ± 1°C

**J<sub>+1</sub> :**  
**ENRICHISSEMENT**  
**SELECTIF**



**J<sub>+2</sub> :**  
**ISOLEMENT**



**J<sub>+3</sub> :**  
**LECTURE**

- Repérer les colonies caractéristiques *Salmonella* sur chaque boîte de Petri.

**REPIQUAGE**

- Isoler sur gélose nutritive, au maximum **5 colonies caractéristiques** par type de milieu d'isolement

- Incuber 24 h ± 3 h à 37°C ± 1°C

**J<sub>+4</sub>**  
**CONFIRMATION**  
**BIOCHIMIQUE**

- Faire le test de l'oxydase. Continuer la confirmation si oxydase négative.

**J<sub>+5</sub>**  
**CONFIRMATION**  
**SEROLOGIQUE**

- Ensemencer une galerie API 20 E pour une colonie par type de milieu d'isolement (les 4 autres ne seront confirmées que si la première n'est pas identifiée *Salmonella*)

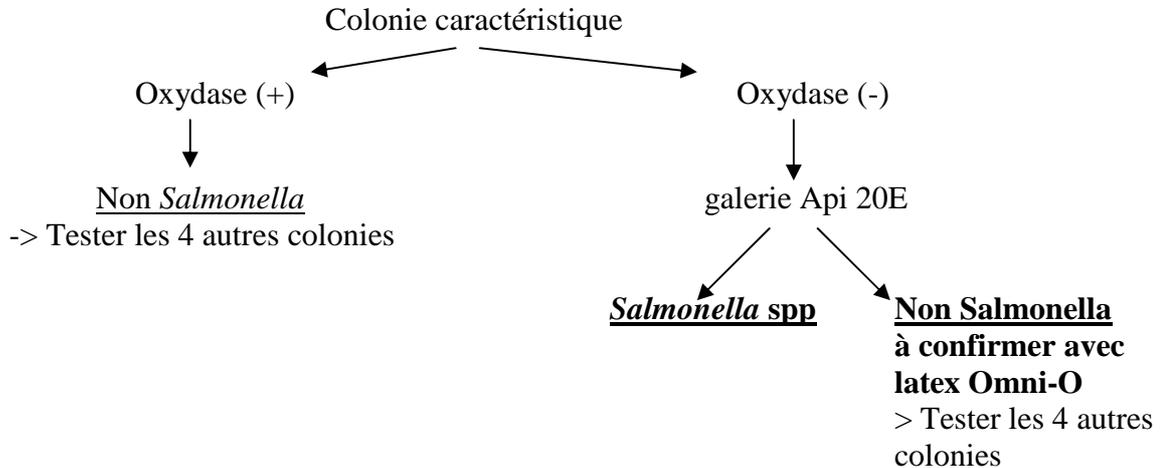
**INTERPRETATION/**  
**RESULTAT**

- Incuber la galerie 18 à 24 heures à 37°C ± 1°C

- Confirmer les souches identifiées « *Salmonella* » avec le sérum omni-O

Résultat : absence ou présence

Interprétation des résultats :



Selon les résultats des confirmations, la présence ou l'absence de *Salmonella spp* dans la prise d'essai de produit analysé est indiquée.

## Annexe D : Références normatives en microbiologie alimentaire

- NF EN ISO/CEI 17025 de Septembre 2005 « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais »
- NF EN ISO 6887-1 de Septembre 1999 « Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales »
- NF EN ISO 6887-2 de Janvier 2004 « Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 2 : Règles spécifiques pour la préparation des viandes et produits à base de viande »
- NF EN ISO 6887-3 de Janvier 2004 « Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 3 : Règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche »
- NF EN ISO 6887-4 de Janvier 2004 « Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 4 : Règles spécifiques pour la préparation de produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche »

- NF EN ISO 6887-5 de Août 2010 « Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 4 : Règles spécifiques pour la préparation du lait et des produits laitiers produits autres que les produits laitiers »
- NF EN ISO 8261 d'Octobre 2001 : « Lait et produits laitiers - Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.
- NF ISO 7218 d'octobre 2007 « Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations »
- LAB GTA 59 de Novembre 2010 « Guide Technique d'Accréditation – Analyses microbiologiques des produits et environnement agro-alimentaires »
- NF EN ISO 6579 de Décembre 2002 « Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp.»

## **Annexe E : Capture et désorption de bactéries sur puce (système de tri cellulaire)**

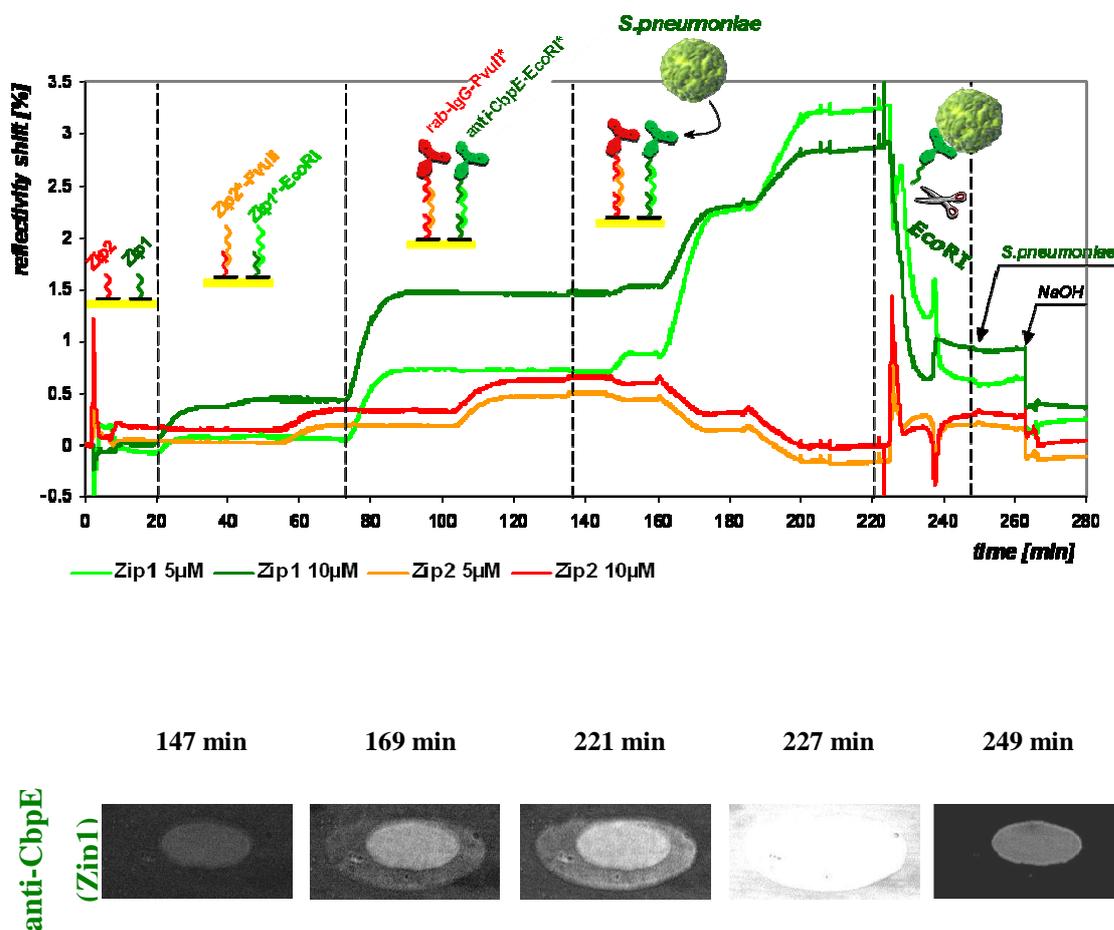
Afin d'effectuer des analyses complémentaires telles que le géotypage d'une souche bactérienne après son identification sur biopuce, nous proposons une méthode de relargage séquentiel des bactéries capturées, selon leur nature. La stratégie adoptée pour la libération spécifique des cellules, se base sur un montage moléculaire ADN-IgG hybride immobilisé sur support solide, où un clivage enzymatique des substrats d'ADN est possible grâce à un site de restriction incorporé dans la séquence d'ADN. Il s'agit d'une séquence de 4 à 8 paires de bases qu'une enzyme peut cliver rapidement et spécifiquement. Pour un site de restriction donné (ADN), il n'existe qu'une enzyme spécifique et nous n'associons cet ADN qu'à un seul type anticorps ; ainsi la sélectivité du tri est totale. Cette méthode de tri a l'avantage de respecter les conditions de l'analyse cellulaire, car contrairement à des méthodes thermiques, chimiques ou radiatives, les enzymes utilisées agissent en milieu aqueux à un pH physiologique, évitant ainsi tout dommage ou stress des bactéries.

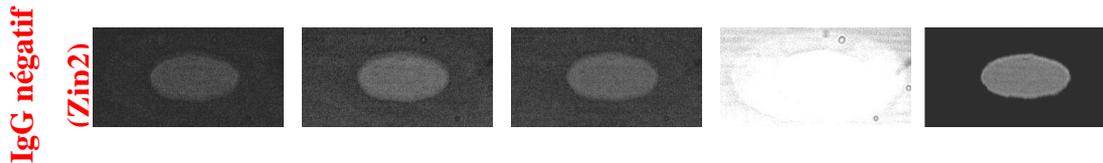
La méthode de tri par clivage enzymatique proposée dans ce travail, peut être utilisée pour le relargage sélectif de différentes populations cellulaires (Bombera *et al.*) [1]. L'application de cette approche dans la détection bactérienne, trouve son intérêt, dans le séquençage des espèces identifiées par SPR, parmi d'autres populations bactériennes. Il serait par exemple nécessaire d'identifier une bactérie potentiellement pathogène dans un

échantillon, mais également, de remonter à la source de contamination de cet échantillon. Ceci ne peut se faire qu'en confrontant les séquences génomiques des bactéries isolées de l'échantillon avec celles isolées de la source potentielle de contamination (ex : monitoring de contamination, test de toxicité).

Dans le présent travail nous avons combiné la technique SPR à la chimie de conjugaison IgG-ADN développée par R. Bombera au laboratoire, afin de détecter et de re-larguer de façon sélective les bactéries d'intérêt.

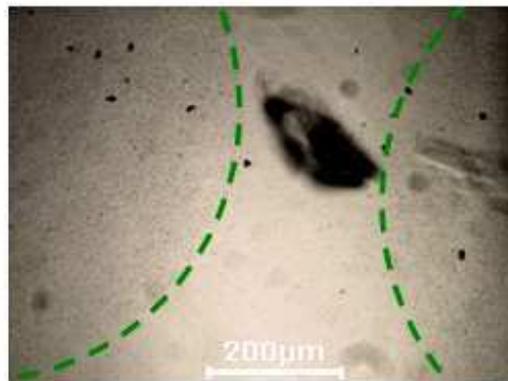
Nous avons utilisé la souche *Streptococcus pneumoniae* R6 comme modèle d'étude. Les anticorps anti-CbpE ont été couplés à des oligonucléotides, afin d'adresser les anticorps sur une puce d'ADN. En effet, l'ADN est une cible enzymatique intéressante pour faire un clivage enzymatique, sans altérer les cellules. La capture sur puce des bactéries injectées ainsi que leur désorption de la surface par digestion enzymatique sont suivis par la technique SPRi en temps réel. (Figure 6.1).





**Figure 1 :** Suivi SPR de la capture et la désorption de *S. pneumoniae* R6. Etape 1: hybridation du brin intermédiaire d'ADN (Zip1\*–EcoRI, Zip2\*–PvuII); Etape 2: immobilisation du conjugué IgG–ADN (anti-CbpE–EcoRI\*, rab-IgG–PvuII\*); Etape 3: injections de bactéries suspendues dans le PBS; Etape 4: Relargage enzymatique de *S. pneumoniae* par clivage EcoRI; la répétition de l'injection de l'échantillon bactérien (250min) confirme que les anti-CbpE sont efficacement enlevés. Enfin, la biopuce ADN peut être régénérée par lavage au NaOH (260min). Tous les signaux SPR sont rectifiés par la soustraction du signal non spécifique (sonde de contrôle négatif).

L'anticorps anti-CbpE est covalentement conjugué à la séquence nucléotidique *EcoRI* (enzyme spécifique utilisée pour le clivage enzymatique d'une séquence spécifique d'ADN) comme décrit dans l'approche synthétique décrite par R. Bombera *et al.* [1]. Le conjugué IgG-ADN obtenu est utilisé pour réaliser un assemblage moléculaire capable de capturer *S. pneumoniae* sur la biopuce. Avant utilisation, la surface en or fonctionnalisée avec les sondes d'ADN (Zip1, Zip2 and Zip3) est saturée avec une solution de PBS contenant 10  $\mu$ M BSA.



**Figure 2 :** Capture spécifique de *S. pneumoniae* sur la sonde Zip1 (anti-CbpE) visualisée sous microscope. Les bactéries sont visibles sur les deux plots délimités en vert.

L'expérimentation est conduite dans le tampon PBS (pH 7.4) et incubée à 37°C. Les étapes de la construction de l'assemblage moléculaire sur la puce sont suivies par SPRi, pour la validation du bon assemblage (figure1). Après l'immobilisation spécifique du conjugué anti-CbpE-*EcoRI*, l'échantillon bactérien ( $10^9$  ufc/ml) est inoculé dans la cuve (200  $\mu$ l). Après deux incubations successives d'environ 20 min, on observe une variation de réflectivité positive sur les sondes Zip1 qui est attribuée à la réponse de l'anticorps spécifique de *S. pneumoniae*. La capture spécifique est confirmée par la comparaison des signaux de la sonde

Zip1 avec ceux de la sonde Zip 2 comportant des IgG non spécifiques et caractérisée par une faible variation de réflectivité (interprétée comme étant due au changement global de l'indice de réfraction la solution). La capture spécifique de la bactérie *S. pneumoniae* est en outre confirmée sur des images différentielles SPR et par des observations microscopiques réalisées par un test indépendant (figure 2).

Une fois les bactéries immobilisées sur la surface de la biopuce, l'étape de désorption est réalisée par l'injection de l'enzyme *EcoRI* spécifiquement dirigée contre le substrat d'ADN sous-jacent aux cellules *S. pneumoniae*. Il en résulte une coupure de l'ADN détectée par une diminution spécifique du signal de réflectivité de Zip 1, confirmé par les images issues de l'imageur SPR. Après l'étape de digestion enzymatique, l'échantillon est récupéré en point final à la sortie du réacteur. Un nombre considérable d'objets cocobacillaires isolés attribuables aux *S. pneumoniae* libérés sont observés au microscope optique.

Enfin, la désorption du matériel biologique (anticorps + bactéries) à partir des emplacements appropriés de la biopuce, peut être en outre confirmée par l'injection répétée des bactéries, réalisée à la fin de l'expérience. L'absence de signal SPR lié à cette injection signifie une absence d'interaction spécifique et prouve que la couche d'anticorps et par conséquent celle des bactéries a été efficacement enlevée.

Ces résultats illustrent une preuve de concept, de la possibilité de programmer les biopuces pour le relargage spécifique pour des identifications et caractérisations plus poussées sur les isolats bactériens de provenances variées.

[1] R. Bombera, L. Leroy, T. Livache, Y. Roupioz, DNA-directed capture of primary cells from a complex mixture and controlled orthogonal release monitored by SPR imaging, *Biosensors & bioelectronics* 33 (2011) 10-16.

## **Annexe F : Liste des communications scientifiques**

**Brevet WO 2012/073202 A1:** « Procédure de détection et de quantification de micro-organismes ».

### **Communications orales et posters :**

- Communication orale à la Conférence Internationale Biosensors 2012 : 15-18 Mai 2012 – Cancun, Mexique. « Real-time Monitoring of Bacterial Growth using a Label-Free Biosensor ». S. Bouguelia, Y. Roupioz, C. Durmort, T. Vernet et T. Livache.
- Présentation d'un poster à la 2ème Conférence Internationale sur les Bio-Sensing Technologies: 10-12 Octobre 2011 – Amsterdam, Pays Bas. « Biopuce dédiée à la capture et au tri de bactéries ». S. Bouguelia, R. Bombera, Y. Roupioz et T. Livache.
- Prix de la meilleure présentation à l'école doctorale (EDISCE) : 7 Juin 2011– Campus universitaire, Grenoble. « Nouvelle méthode pour la détection et quantifications rapide de bactéries ». S. Bouguelia, Y. Roupioz, C. Durmort, T. Vernet et T. Livache.
- Présentation de poster aux “Journées de la Recherche Médicale”: 15-16 Avril 2011, Département de Pharmacie, Université Joseph Fourier, Grenoble. « Nouvelle méthode pour la détection et quantifications rapide de bactéries ». S. Bouguelia, Y. Roupioz, C. Durmort, T. Vernet et T. Livache.