



Exploration de méthodes alternatives pour la détection de bactéries dans le sang

Vincent Templier

► To cite this version:

Vincent Templier. Exploration de méthodes alternatives pour la détection de bactéries dans le sang. Hématologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAS008 . tel-01466763

HAL Id: tel-01466763

<https://theses.hal.science/tel-01466763>

Submitted on 4 Oct 2017

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 LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Vincent TEMPLIER

Thèse dirigée par **Thierry LIVACHE** et

codirigée par **Yoann ROUPIOZ**

préparée au sein du **Laboratoire Chimie pour la
Reconnaissance et l'Études des Assemblages Biologiques du
CEA Grenoble (INAC/ SYMMES / CREAB)**

dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition,
l'Environnement (EDISCE)**

Exploration de méthodes alternatives pour la détection de bactéries dans le sang

Thèse soutenue publiquement le **4 novembre 2016**

devant le jury composé de :

M. Max Maurin

Professeur, CHU Grenoble (Président)

Mme. Wafa ACHOUAK

Directrice de Recherche CNRS, CEA Cadarache (Rapporteur)

M. Damien MARCHAL

Maître de Conférences, Université Paris Diderot (Rapporteur)

M. Frédéric MALLARD

Directeur de Recherche, bioMérieux Grenoble (Examineur)

M. Hervé VOLLAND

Directeur de Recherche, CEA Saclay (Examineur)

M. Thierry LIVACHE

Directeur de Recherche, CEA Grenoble (Directeur de thèse)

M. Yoann ROUPIOZ

Directeur de Recherche CNRS, CEA Grenoble (Co-directeur de thèse)



Note aux lecteurs

Le présent manuscrit est une reproduction partielle du manuscrit ayant été soumis pour l'évaluation de ce travail. Deux parties des chapitres 2 et 4 ont été retirées du manuscrit original pour des raisons de confidentialité sur demande de la société Prestodiag impliquée financièrement dans la réalisation de ce projet. Je remercie donc par avance le lecteur pour sa compréhension.

Remerciements

A l'issue de ces trois années de travail rythmées par les questionnements et l'élaboration d'hypothèses et d'expériences, qui les unes après les autres, ont fait progresser le projet mais aussi naître de nouvelles interrogations, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué chacune à leur manière à la réalisation de ce travail.

Je remercie tout d'abord Mme. Wafa Achouak et M. Damien Marchal d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. J'associe à ces remerciements MM. Max Maurin, Frédéric Mallard et Hervé Volland qui ont pris part à ce jury de thèse, dont les questions et remarques pertinentes constituent des pistes de travail.

Viennent ensuite les remerciements adressés à mes directeurs de thèse, Thierry Livache et Yoann Roupioz. Merci de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ce projet qui vous tenait à cœur et d'avoir (re)découvert avec moi les nombreuses facultés de *Staphylococcus aureus*. Avec vous, c'est aussi l'ensemble des personnes cotoyées dans le laboratoire CREAB que je tiens à remercier. Plutôt que de les nommer une à une au risque d'en oublier, merci à tous et à toutes, pour les petites conversations du quotidien, les réflexions scientifiques poussées et les conseils avisés. Je remercie également Mme. Sandrine Boisset qui a toujours su répondre rapidement à mes questions pratiques sur l'hémoculture et *S. aureus*. Cette collaboration ancrerait encore un peu plus ce projet dans la réalité du diagnostic bactériologique. Enfin, je remercie Mmes. Nicole Thielens et Isabelle Bally pour m'avoir fourni la protéine C1q ainsi que MM. Thierry Vernet et André Zapun pour les échanges constructifs que nous avons pu avoir lors de réunions à l'IBS.

Enfin, merci à tous ceux qui en dehors du travail ont rendu si agréable ce retour proche de mes « origines » vertacomicrobiennes. Je pense tout particulièrement à mes parents, pour qui rien de ce que j'écrirai ne suffira à traduire ma profonde reconnaissance. Merci pour tout ! Et pour finir, merci à toi Claire qui a réussi, je ne sais encore comment, à supporter mon caractère, mes envies de montagne, de vélo, de ski...j'espère que tu les supporteras encore longtemps et que nous partagerons bien d'autres choses ensemble.

Exploration de méthodes alternatives pour la détection de bactéries dans le sang

Table des matières

TABLE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	12
1 Chapitre 1 : Introduction : Bactériémie et diagnostic.....	14
1.1 Développement d'une infection bactérienne et risques associés	15
1.1.1 Infections bactériennes	15
1.1.1.1 Bactériémies et conséquences.....	16
1.1.2 Microorganismes pathogènes impliqués	18
1.1.2.1 Espèce identifiées.....	18
1.1.2.2 Le cas particulier de <i>S. aureus</i>	19
1.2 Méthodes de diagnostic actuellement employées	21
1.2.1 Enrichissement bactérien : l'hémoculture	21
1.2.1.1 Contraintes liées à la détection de bactéries dans le sang	21
1.2.1.2 Déroulement d'une hémoculture	23
1.2.2 Identification des bactéries : méthodes classiques.....	25
1.2.2.1 Coloration de Gram et microscopie	25
1.2.2.2 Croissance sur milieux solides	26
1.2.2.3 Identification	27
1.2.2.4 Antibiogramme.....	27
1.2.2.5 Tests rapides spécifiques d'un microorganisme	28
1.2.3 Nouvelles méthodes d'identification	29
1.2.3.1 Spectrométrie de masse.....	29
1.2.3.2 Tests moléculaires par FISH.....	31
1.2.3.3 Tests moléculaires par PCR	32
1.2.3.4 Combinaisons de techniques, implications et conclusions	32
1.2.3.5 Conclusions sur les techniques d'identification	34
1.3 Les biocapteurs pour la détection de bactéries	35
1.3.1 Les biocapteurs.....	35
1.3.1.1 Définition.....	35
1.3.1.2 Facteurs influençant les performances d'un biocapteur : Importance des ligands..	36
1.3.2 Emploi des biocapteurs pour la détection de pathogènes à l'origine de bactériémies	37

1.3.2.1	Pour la détection de <i>S. aureus</i>	37
1.3.2.2	Concentration des microorganismes	38
1.4	Objectifs de la thèse : vers un raccourcissement du temps nécessaire à l'identification .	39
2	Chapitre 2 : Détection de bactéries par SPRI et recherche de ligands	41
2.1	Principe de la méthode de détection par SPR	42
2.1.1	Le phénomène de résonance plasmonique de surface.....	42
2.1.2	Les apports du mode imagerie en SPR (SPRI).....	43
2.1.3	Emploi de la SPR pour la détection de bactéries.....	45
2.1.3.1	Choix des ligands pour la détection de bactéries.....	45
2.1.3.2	Les anticorps et la réponse immunitaire.....	45
2.1.3.3	Production et purification d'anticorps	47
2.1.3.4	Anticorps autres que les IgG.....	47
2.1.4	Fonctionnalisation de la biopuce	48
2.1.5	L'approche Culture – Capture – Mesure	50
2.2	Recherche de sondes alternatives aux anticorps	51
2.2.1	Aptamères	52
2.2.1.1	Généralités	52
2.2.1.2	Recherche d'aptamères pour la détection de bactéries	54
2.2.2	Tests des aptamères retenus	56
2.3	Ligands à large spectre.....	60
2.3.1	ApoH.....	61
2.3.1.1	Introduction.....	61
2.3.1.2	Résultats expérimentaux.....	62
2.3.2	Protéines de l'immunité (C1q)	65
2.3.2.1	Présentation du rôle de C1q.....	65
2.3.2.2	Résultats expérimentaux.....	66
	CONCLUSIONS DU CHAPITRE	69
3	Chapitre 3 : Détection de <i>S. aureus</i> sur une biopuce à anticorps par SPRI en milieu simple	71
3.1	Mise en évidence des propriétés de <i>S. aureus</i>.....	72
3.1.1	Caractéristiques microbiologiques de <i>S. aureus</i>	72
3.1.1.1	Aperçu des stratégies d'évitement du système immunitaire par <i>S. aureus</i>	72
3.1.1.2	Protéine A.....	73
3.1.1.3	Détournement de la cascade de coagulation de l'hôte par les protéines Coa et vWbp de <i>S. aureus</i>	74

3.1.1.4	Résistance aux antibiotiques, focus sur la méticilline	76
3.1.2	Impact de la protéine A sur la détection de <i>S. aureus</i> avec une biopuce à anticorps ..	78
3.1.3	Biofilm et essais de réduction de sa formation	79
3.1.4	Distinction entre <i>S. aureus</i> sensible et résistant à la méticilline	82
3.1.4.1	Techniques courantes	82
3.1.4.2	Résultats et discussions	84
3.2	Neutralisation des effets de la protéine A dans la détection de <i>S. aureus</i>	85
3.2.1	Emploi d'anticorps IgY	85
3.2.1.1	Introduction	85
3.2.1.2	Résultats expérimentaux	87
3.2.1.3	Validation de l'hypothèse et recherche de solutions	90
3.2.2	Fragmentation des IgG par digestion enzymatique	91
CONCLUSIONS DU CHAPITRE		94
4	Chapitre 4 : Evaluation des effets matrices du sang et de ses dérivés en milieu d'hémoculture sur la détection de bactéries par SPRI	95
4.1	Les milieux d'hémoculture et leur employabilité pour la détection directe de bactéries par SPRI	96
4.1.1	Composition du sang	96
4.1.2	Les milieux d'hémoculture : composition et rôles associés	97
4.1.2.1	L'anticoagulant polyanéthol sulfonate de sodium (SPS) dans les milieux d'hémoculture	98
4.1.2.2	Activité du SPS sur le complément	99
4.2	Compatibilité de la présence de sang et de sérum pour la détection et l'identification de bactéries en cours de culture par SPRI	101
4.2.1	Faisabilité de la détection de <i>S. Enteritidis</i> en sérum et milieu d'hémoculture	101
4.2.2	Compatibilité avec le sang total	102
4.2.3	Effets du stockage des puces à anticorps et de la présence d'un système tampon sur les interférences	103
4.3	Interférences biologiques liées à l'analyte bactérien : <i>S. aureus</i>	104
4.3.1	Empêchement de la détection de <i>S. aureus</i> par les anticorps circulants	104
4.3.2	Etudes des interférences liées à la matrice	107
4.3.2.1	Tentatives de détection de <i>S. aureus</i> dans le milieu d'hémoculture en présence ou non de sérum	107
4.3.2.2	Essai d'élimination des IgG du sérum	111
4.3.2.3	Autres freins potentiels à la détection de <i>S. aureus</i> et pistes de réflexions	113
4.4	La détection de bactéries par SPRI en conditions proches d'une hémoculture est-elle possible ?	114

4.4.1	Détection de <i>S. Enteritidis</i> en petits volumes réactionnels (< 1 mL) dans du sang humain dilué dans le milieu d'hémoculture et analyse du signal	114
4.4.2	Preuve de concept en conditions proches d'une hémoculture	118
4.4.3	Exemple de la détection en sérum et sang de deux souches d' <i>E. coli</i> , O157 : H7 et ATCC11775	121
CONCLUSIONS DU CHAPITRE		123
5	Conclusions et Perspectives	124
6	Matériels et Méthodes.....	129
6.1	Matériel expérimental	130
6.1.1	Appareillages et matériels réutilisables	130
6.1.2	Consommables	130
6.2	Réactifs	131
6.2.1	Milieux de culture et leurs constituants.....	131
6.2.2	Tampons et autres solutions	131
6.2.3	Protéines (hors anticorps)	131
6.2.4	Anticorps	132
6.2.5	Oligonucléotides.....	133
6.3	Bactéries	133
6.4	Protocoles expérimentaux	134
6.4.1	Conservation des bactéries	134
6.4.2	Culture bactérienne.....	134
6.4.3	Préparation de l'inoculum pour les expériences SPR.....	134
6.4.4	Obtention des échantillons sanguins et préparation de sérum	135
6.4.5	Protocole de couplage au pyrrole – NHS des anticorps et autres protéines	136
6.4.6	Procédure de dépôt des anticorps sur le prisme	136
6.4.7	Protocole de digestion des anticorps par la pepsine	137
6.4.8	Protocole de biotinylation des anticorps et révélation par immunofluorescence	138
6.4.9	Protocoles de fonctionnalisation et de dépôt des aptamères	138
6.4.10	Inactivation des bactéries.....	139
Bibliographie		140
Résumé		160
Abstract		160

TABLE DES ABREVIATIONS

ApoH : Apolipoprotéine H

ATCC : *American Type Culture Collection*

BMR : Bactéries multi-résistantes

BSA : *Bovine serum albumine*

CCD : *Charged coupled device* ou dispositif à transfert de charges (caméra)

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CoNS : Staphylocoque à coagulase négative (*Coagulase Negative Staphylococci*)

ϵ : Permittivité diélectrique d'un milieu

EBLSE : Entérobactéries productrices de β -lactamases

Fab : *Fragment antigen binding*, partie de l'anticorps où s'effectue la liaison avec l'antigène

Fc : Fragment cristallisable (d'un anticorps)

FISH : *Fluorescence in-situ hybridization*

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (tampon)

IgG : Immunoglobuline G, désigne une classe d'anticorps produite chez la plupart des mammifères

IgY : Immunoglobuline Y, anticorps produits chez la poule

IgY NI : IgY non immun, anticorps de poulet non dirigé contre un antigène bactérien, utilisé comme contrôle négatif

ISHA : Institut scientifique d'hygiène et d'analyse

KLH : littéralement « *Keyhole Limpet Hemocyanin* », désigne tout au long de ce travail un anticorps monoclonal de souris (IgG1) dirigé contre cette protéine et utilisé comme contrôle négatif.

LED : *Light-emitting diode* (diode électroluminescente)

MALDI-TOF MS: Spectrométrie de masse par « *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* »

n : indice de réfraction d'un milieu

NHS: N-Hydroxysuccinimide

PBP2a : *Penicillin binding protein 2a* (en français, PLP2a pour protéine liant les pénicillines)

PBS : *Phosphate buffered saline*

PCR : *Polymerase chain reaction*

PEEK : *Polyetheretherketone* en français : polyétheréthercétone

pI : Point isoélectrique

Ppy : Polypyrrole

Py-NHS : Pyrrole – NHS

QCM : microbalance à quartz, « *Quartz Crystal Microbalance* »

RMI : Ratio molaire initial

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline, *MSSA (anglais)*

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, *MRSA (anglais)*

SELEX : *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*

SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique

SPR : *Surface plasmon resonance* ou résonance plasmonique de surface

SPR_i : *Surface plasmon resonance imaging* ou imagerie par résonance plasmonique de surface

SPS : *Sodium Polyanethole sulfonate* ou Polyanéthole sulfonate de sodium (anticoagulant)

TSA : *Tryptic soy agar*

TSB : *Tryptic soy broth*

UFC: Unité formant colonie

INTRODUCTION GENERALE

Au cours des années 1860, Louis Pasteur émit la « théorie des germes », étayée par ses travaux antérieurs sur l'implication des levures dans la fermentation et la remise en question de la génération spontanée, opinion alors majoritairement acceptée. Selon sa théorie, les germes présents dans l'environnement sont susceptibles de rendre malades d'autres organismes, comme ils induisent la fermentation d'un milieu initialement stérile. Cette théorie se confirma lorsqu'il isola successivement *Bacillus anthracis* à l'origine de la maladie du charbon affectant le bétail, puis le staphylocoque et le streptocoque respectivement à l'origine d'infections cutanées et de la fièvre puerpérale alors fréquente lors des accouchements à l'hôpital. Les postulats de Koch, établis en 1890, attribuent eux aussi une place centrale aux microorganismes dans la genèse d'une maladie. Ils doivent pouvoir être isolés de la personne souffrante pour confirmer le diagnostic. Depuis les travaux de ces pionniers de la microbiologie, d'immenses avancées ont été faites mais l'identification du microorganisme a toujours une importance cruciale en microbiologie clinique. En effet, les germes identifiés par Pasteur sont encore à l'origine d'infections diverses qui peuvent aboutir à la bactériémie et au sepsis. Pour d'autres, l'incidence a fortement diminuée alors qu'émergent de nouvelles maladies infectieuses. L'apparition des antibiotiques à partir des années 1940 a pu laisser penser un temps que les infections bactériennes ne seraient plus une menace pour l'humanité mais l'émergence rapide de souches résistantes a depuis longtemps chassé cette idée. L'identification rapide des microorganismes pathogènes revêt donc une importance toute particulière pour établir la stratégie thérapeutique la mieux adaptée.

La première partie de ce manuscrit traitera des infections bactériennes, en s'intéressant tout particulièrement à la bactériémie et ses conséquences. Les méthodes actuelles utilisées pour son diagnostic et permettre l'identification des microorganismes issus du sang seront ensuite présentées. Puis, les futurs développements dans ce domaine, dont les biocapteurs pourraient faire partie, seront introduits. La synthèse de ces différents éléments permettra d'établir les objectifs de cette thèse. Une description de l'imagerie par Résonance Plasmonique de Surface (SPRi), employée tout au long de ce travail pour la détection des bactéries sera présentée. Par la suite, les résultats de la recherche de ligands pour la détection de bactéries par SPRi seront exposés. Puis un autre chapitre sera consacré aux stratégies mises en œuvre pour la détection de *Staphylococcus aureus* sur une biopuce à anticorps dans des milieux de culture. Enfin, un dernier chapitre présentera les expériences de détection de *S. aureus* et *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en sérum et sang total dilués dans le milieu d'hémoculture pour aboutir aux conclusions générales de ce travail.

1 Chapitre 1 : Introduction :

Bactériémie et diagnostic

1.1 Développement d'une infection bactérienne et risques associés

1.1.1 Infections bactériennes

L'homme vit au contact constant des bactéries, présentes dans son environnement quotidien mais aussi sur et dans son propre corps. Notre peau et notre tractus intestinal sont ainsi colonisés respectivement par mille et dix mille milliards de bactéries appartenant à une grande variété d'espèces. Au sein même d'une espèce, une multitude de souches coexistent en raison des mutations constantes engendrées par des perturbations dans l'environnement des populations bactériennes, telles que l'adaptation à un nouvel hôte ou l'exposition à un agent bactéricide [1]. Certaines bactéries nous sont directement bénéfiques, comme celles colonisant nos intestins et qui contribuent à la digestion. D'autres, par leur présence, empêchent l'implantation de bactéries potentiellement pathogènes comme cela peut-être le cas après la prise d'antibiotiques oraux [2, 3]. Bon nombre de bactéries, dites commensales, n'ont aucun effet (connu) sur leur hôte. Cependant, quelques souches peuvent devenir pathogènes dans des circonstances particulières, comme lorsqu'elles ont l'opportunité de traverser les barrières naturelles de l'organisme que sont la peau ou les muqueuses. Ces pathogènes opportunistes profitent aussi d'un affaiblissement des défenses immunitaires. Des pathologies telles que le diabète, certains cancers ou une infection par le VIH sont des facteurs de risque supplémentaires favorables au développement d'une infection. Celles-ci sont regroupées avec d'autres (19 pathologies au total) dans l'indice de co-morbidité de Charlson, qui permet d'estimer les chances de survie d'un patient à 1 an. L'infection peut se développer au niveau de différents organes avec une étiologie propre à chaque infection comme l'illustre la Figure 1-1.

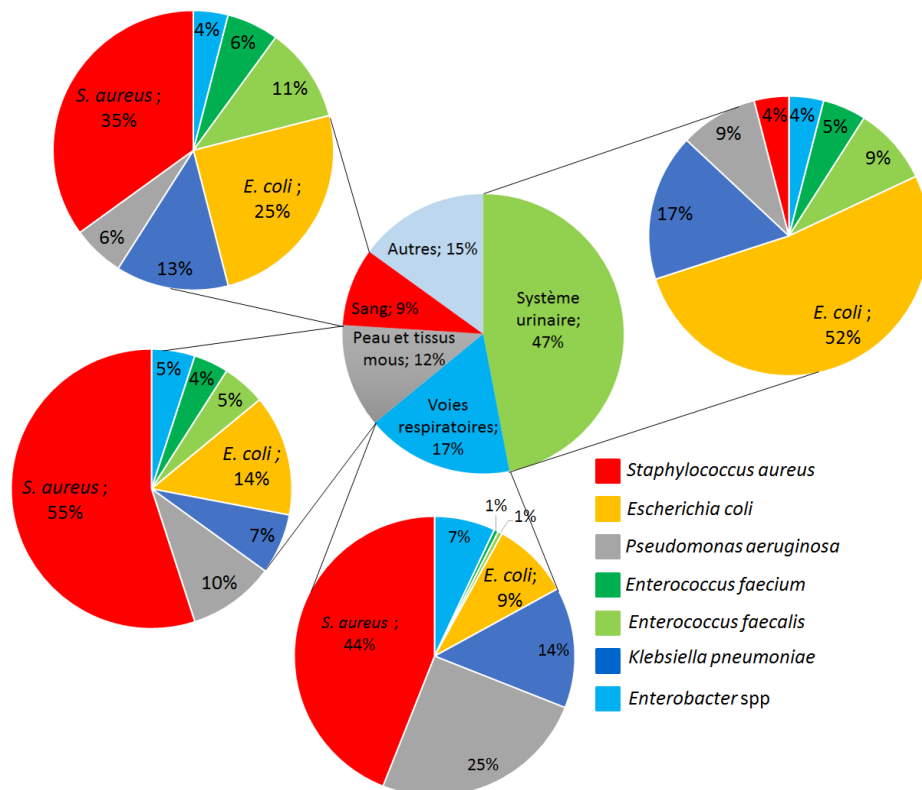


Figure 1-1 : Principales infections bactériennes et pathogènes en cause identifiés entre 2007 et 2010 à l'occasion de 80 089 admissions dans 19 hôpitaux américains, d'après Poolman et al. [4].

Parmi ces infections, l'infection sanguine bactérienne, aussi appelée bactériémie, est définie par la présence de microorganismes viables dans le sang, un milieu normalement stérile.

1.1.1.1 Bactériémies et conséquences

La présence de bactéries dans le sang peut être extrêmement transitoire et sans conséquences pour l'organisme si le système immunitaire parvient à neutraliser les bactéries. En effet, à la moindre coupure, des bactéries entrent inévitablement dans la circulation sanguine sans pour autant induire de conséquences visibles sur l'organisme. Mais il n'en est malheureusement pas toujours ainsi. La bactériémie peut donc être due à l'introduction directe de bactéries dans la circulation sanguine, à l'occasion d'actes médicaux invasifs ou à la présence de cathéters intravasculaires, qui est la première cause de bactériémies nosocomiales [5-8]. Elle peut aussi être la conséquence de la dissémination de bactéries à partir d'un foyer infectieux primaire dans lequel l'organisme ne parvient pas à cantonner les bactéries. Par exemple, la présence d'une infection urinaire impliquant *E. coli* est la première cause de bactériémie impliquant cette bactérie [4]. La capacité du microorganisme à échapper au système immunitaire de l'hôte contribue au maintien et à la dissémination de l'infection. Et, comme pour d'autres infections bactériennes, la faiblesse des défenses immunitaires augmente le risque de développer une bactériémie. Ainsi, si l'âge moyen des patients pour lesquels une bactériémie a été diagnostiquée est de 65 ans, les personnes aux âges extrêmes de la vie, qu'il s'agisse de jeunes enfants ou de personnes âgées, présentent un risque accru de développer cette infection [9]. La présence de comorbidités, traduite par un indice de Charlson supérieur à 1 est un facteur de risque supplémentaire de contracter l'infection et d'y succomber [10-12]. Une disparité notable entre les sexes existe, les hommes représentant 52 à 54% des patients bactériémiques [13, 14]. Du fait de la concentration des populations à risque, environ 20% des bactériémies sont nosocomiales et 35% sont associées à des soins médicaux. Cette infection est cependant loin de se limiter au milieu hospitalier puisque près de 45% des bactériémies sont donc d'acquisition communautaire. Par définition, cela implique qu'une hémoculture réalisée à partir d'un prélèvement effectué moins de 48 heures après l'admission à l'hôpital soit devenue positive sans contacts récents avec une structure de soins [13, 15]. L'incidence annuelle des bactériémies dans les pays occidentaux se situe entre 150 à 200 cas pour 100 000 personnes [13, 14, 16]. Ayant tendance à augmenter au cours des dernières décennies, cette évolution devrait se poursuivre en raison de l'augmentation de la taille des populations à risque. Elle est due à l'allongement de la durée de vie et aux progrès de la médecine qui permettent de maintenir en vie des personnes atteintes de pathologies graves [16]. Les bactériémies représentent aujourd'hui la septième cause de décès dans les pays occidentaux [17].

L'issue potentiellement fatale de cette infection, en moyenne dans 10 à 30% des cas, dépend pour beaucoup de son aggravation vers un état clinique appelé sepsis [18]. Lors d'une infection bactérienne, les cellules du système immunitaire telles que les macrophages et les neutrophiles reconnaissent par l'intermédiaire de leurs récepteurs surfaciques tels que les TLR (pour *Toll Like Receptors*) des motifs bactériens conservés, comme le lipopolysaccharide des bactéries Gram⁻. Cette rencontre provoque la sécrétion par ces cellules de messagers chimiques, les cytokines, qui ont pour effet de recruter de nouvelles cellules immunitaires et d'induire l'inflammation. Ce processus localisé est nécessaire pour lutter contre l'infection. Mais en cas de sepsis, cette réponse inflammatoire est totalement dérégulée et se généralise à l'ensemble de l'organisme entraînant des conséquences délétères [19].

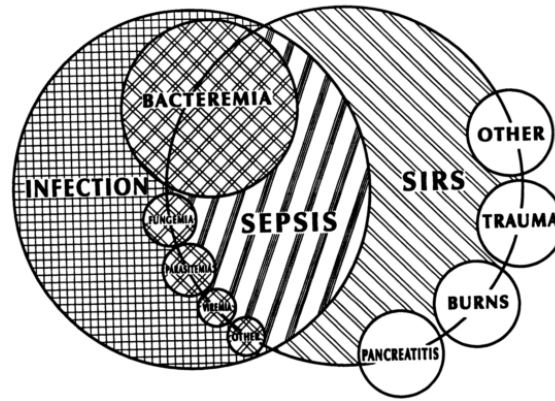


Figure 1-2 : Relations entre le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) aux origines multiples, la présence d'une infection bactérienne et le sepsis. D'après Bone *et al.* [20]

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) est caractérisé par la présence d'au moins deux des symptômes suivant : une température corporelle supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C, une fréquence cardiaque supérieure à 90 pulsations par minute, une pression artérielle en CO₂ inférieure à 32 mmHg (hypotension) ou une anomalie au niveau des globules blancs, dont le nombre est alors soit supérieur à 12000/mm³ soit inférieur à 4000/mm³, ou dont la population est composée pour plus de 10% de globules blancs immatures. Le SIRS peut avoir des causes multiples comme l'illustre la Figure 1-2, mais lorsqu'une infection est mise en évidence, le diagnostic de sepsis est alors posé. Cette dénomination internationalement employée remplace le terme de septicémie qui désignait une infection sanguine bactérienne grave. Cet état est maintenant qualifié de sepsis associé à une bactériémie. Le terme de sepsis, plus générique, permet de décrire les conséquences sur l'organisme d'une infection par un pathogène quel qu'il soit et quel que soit le foyer infectieux [20]. Trois stades de gravité croissante sont ainsi définis : sepsis, sepsis sévère et choc septique, les deux derniers stades pouvant s'accompagner de dysfonction d'organes [21]. La mortalité de l'ordre de 10 à 20% au premier stade atteint 20 à 50% en cas de sepsis sévère et 40 à 80% pour le choc septique [22]. L'incidence annuelle du sepsis sévère est de l'ordre de 50 à 100 cas pour 100 000 personnes, celle du sepsis étant probablement trois à quatre fois plus élevée. C'est une cause fréquente (2%) d'admission à l'hôpital et encore davantage en services de soins intensifs (6-30%) [22]. En France, malgré une diminution de la mortalité ces dernières années, l'incidence du choc septique demeure élevée. Selon les études, des bactéries ont été isolées dans le sang de 13 à 75% des patients en choc septique, rappelant que la bactériémie est une cause fréquente de sepsis bien que d'autres infections le soient également [23, 24]. Même en cas de survie après une bactériémie, les conséquences à long terme, c'est-à-dire au-delà de 30 à 90 jours après la fin de l'hospitalisation sont fréquentes d'autant plus si l'infection a évolué vers le choc septique. En outre, le risque de survenue d'un nouvel épisode bactériémique est augmenté [11]. La qualité de vie peut être affectée par les lésions irréversibles infligées à l'organisme lors du sepsis sévère et du choc septique et l'espérance de vie s'en trouve diminuée. Cela se traduit par une mortalité à 1 an presque doublée entre une cohorte de patients bactériémiques et un groupe contrôle [25]. Cette proportion est également retrouvée pour les bactériémies survenant dans la population active. De plus, une augmentation du recours aux congés maladies dans l'année qui suit le diagnostic d'une bactériémie est observée [26]. Une campagne internationale de prévention et de lutte contre le sepsis¹ a donc été lancée en 2002 pour mieux identifier les patients souffrant de sepsis et initier au plus vite les thérapies adaptées

¹ Surviving Sepsis Campaign, [en ligne], consulté le 12 juillet 2016.

Disponible sur : < <http://www.survivingsepsis.org/Pages/default.aspx> >

[21]. Celles-ci comprennent nécessairement une antibiothérapie à large spectre, efficace contre la plupart des germes pouvant être la source de l'infection. Elle est administrée dès lors que les prélèvements pour mettre en évidence la présence d'un pathogène ont été effectués [21, 27]. Il est en effet couramment admis que tout délai dans l'administration d'une antibiothérapie adaptée augmente la mortalité [28]. D'après une étude de Ferrer *et al.*, en cas de sepsis sévère ou de choc septique, la mortalité augmenterait de près de 1% par heure en l'absence d'antibiotiques passant de 24,6% initialement à 33,1% après 6 heures et plus [29]. En cas de choc septique, Kumar *et al.* montrent qu'une antibiothérapie inadaptée réduit d'un facteur 5 les chances de survie, tous types d'infections bactériennes confondus, et d'un facteur 17,6 pour les bactériémies primaires [30] qui regroupent les bactériémies liées aux cathéters et celles dont l'origine n'est pas identifiée comme étant un foyer infectieux primaire. Une antibiothérapie à large spectre est donc initialement préconisée, puis ajustée en fonction des résultats microbiologiques obtenus.

1.1.2 Microorganismes pathogènes impliqués

1.1.2.1 Espèce identifiées

A l'issue de l'identification, réalisée selon différentes méthodes présentées ci-après, il ressort qu'un faible nombre de microorganismes est à l'origine de la grande majorité des bactériémies comme le montre le Tableau 1-1. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative sont les trois isolats les plus fréquemment retrouvés. Par ailleurs, près de 90% des bactériémies sont monomicrobiennes [8, 31].

Tableau 1-1 : Microorganismes isolés à partir d'hémocultures dans le cadre du réseau de surveillance français des bactériémies nosocomiales regroupant 286 établissements en 2004 [32], en Angleterre, tous types de bactériémies en 2008 [14], et dans le cadre du réseau européen de surveillance des bactéries résistantes et des infections nosocomiales en 2012, données pour les services de soins intensifs. De fortes disparités dans la fréquence d'implication d'une bactérie donnée existent entre les pays [33].

Microorganismes	Année 2004 [32] % (n = 4986)	Année 2008 [14] % (n = 97195)	Année 2012 [33] % (n = 6313)
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,1	11,6	10,1
CoNS*	14,5	16,9	22,3
Autres Cocci Gram ⁺ dont <i>Enterococcus</i> spp	10,4	13,2	12,5
<i>Escherichia coli</i>	20,5	22,5	7,6
<i>Klebsiella</i> spp	5,9	5,8	8,9
<i>Enterobacter</i> spp	5,8	2,3	5,4
<i>Serratia</i> spp	1,9	nc	2,7
Autres entérobactéries	5,0	2,9	8,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,0	3,9	8,2
Champignons et levures dont <i>Candida albicans</i>	3,5	nc	8,2
Autres	8,3	21,9	6

*CoNS : « Coagulase negative *Staphylococcus* species » dont *Staphylococcus epidermidis*

L'implication fréquente de bactéries résistantes aux antibiotiques complique le traitement de ces infections [9, 34, 35]. Leur présence est en effet associée à une plus forte proportion d'antibiothérapie initiale inadaptée engendrant une hausse de la mortalité [18, 28]. Parmi ces microorganismes, les staphylocoques résistants à la méticilline (SARM) et les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) font l'objet d'une surveillance particulière au

niveau national [36]. Cette attention se justifie par la fréquence d'implication de ces bactéries dans les infections, la mortalité associée ainsi que la facilité de transfert des mécanismes de résistance. Autrefois cantonnés aux milieux hospitaliers, ces pathogènes sont maintenant également isolés lors de bactériémies d'acquisition communautaire [35]. À l'occasion d'une étude internationale sur les bactériémies nosocomiales, la proportion de souches de bactéries multirésistantes (BMR) était de 49,6% pour *S. aureus*, 41,8% pour *E. coli*, 70,5% pour *K. pneumoniae* et 28,5% chez les entérocoques [28]. En France, l'incidence des infections nosocomiales impliquant les EBLSE a augmenté de 254% entre 2002 et 2011 pour atteindre en 2011 une valeur de 0,46 pour 1000 journées d'hospitalisation, 8% des EBLSE ayant été isolées d'hémocultures [36]. Cette évolution, confirmée au niveau européen pour les seules bactériémies [34], est particulièrement préoccupante car des isolats cliniques virtuellement résistants à tous les antibiotiques connus ont été décrits notamment chez *K. pneumoniae* [28]. Au-delà des conséquences pour la santé du patient, l'implication de bactéries résistantes se traduit par des dépenses de santé augmentées du fait de l'emploi d'antibiotiques de secondes lignes plus coûteux et de l'augmentation de la durée d'hospitalisation [37]. A cela s'ajoutent les conséquences à moyen et long terme pour les patients. L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) a publié en 2014 un rapport de synthèse sur la résistance aux antibiotiques qui met en évidence l'augmentation globale de ce phénomène [38]. Ce constat fait craindre un retour en arrière, lorsque les antibiotiques n'étaient pas encore connus. La mortalité associée à une bactériémie impliquant *S. aureus* pouvait alors atteindre 75 à 83% [39]. Face aux risques réels de voir apparaître des bactéries résistantes à tous les antibiotiques connus, l'antibiothérapie empirique doit être ajustée au plus tôt pour limiter la pression de sélection. Cela passe par une identification rapide des bactéries qui permet de confirmer le diagnostic et de réévaluer le traitement avant la réalisation de l'antibiogramme.

1.1.2.2 Le cas particulier de *S. aureus*

Environ un tiers de la population est colonisé de façon permanente et asymptomatique par *S. aureus* et un tiers supplémentaire peut l'être transitoirement [40]. Les narines sont la niche écologique la plus fréquente, mais *S. aureus* peut aussi être retrouvé sur d'autres parties du corps avec une proportion en lien avec le portage nasal (Figure 1-3). Le fait de séjourner en milieux hospitaliers ou de partager le foyer d'une personne colonisée augmente le risque de devenir à son tour porteur. Un taux de portage plus élevé est également rencontré dans les populations souffrant de pathologies spécifiques telles que le diabète, le VIH, des déficiences rénales ou hépatiques ou des maladies de peau [40]. Ces pathologies sont aussi associées à un risque accru de développer une bactériémie à *S. aureus* d'acquisition communautaire [12]. Les capacités d'adhésion aux tissus de *S. aureus* ajoutées à ses facultés à échapper au système immunitaire de son hôte expliquent sa propension à s'implanter sur l'homme et à l'infecter. Pour illustrer cette capacité à survivre dans la circulation sanguine et à s'en échapper, lorsque 10^7 UFC de *S. aureus* sont introduits dans la circulation sanguine d'une souris seule une infime partie (0,1%) s'y trouve encore six heures plus tard. Toute trace des bactéries disparaît après 24 heures [41]. Si une partie de ces bactéries a effectivement pu être éliminée par l'organisme, elles s'y sont aussi disséminées formant des abcès à l'origine par exemple d'ostéomyélites ou d'endocardites. L'infection du muscle cardiaque est le premier foyer infectieux identifié à l'origine de bactériémies secondaires, dans 11% des cas, avant l'infection pulmonaire représentant 8% [42]. Les facultés de cette bactérie lui confèrent donc une pathogénicité élevée, à l'origine d'une grande variété d'infections touchant la peau, le système respiratoire... [43] (Figure 1-3). En 2009 aux Etats-Unis, 1,8% des hospitalisations étaient imputables à cette seule bactérie [44].

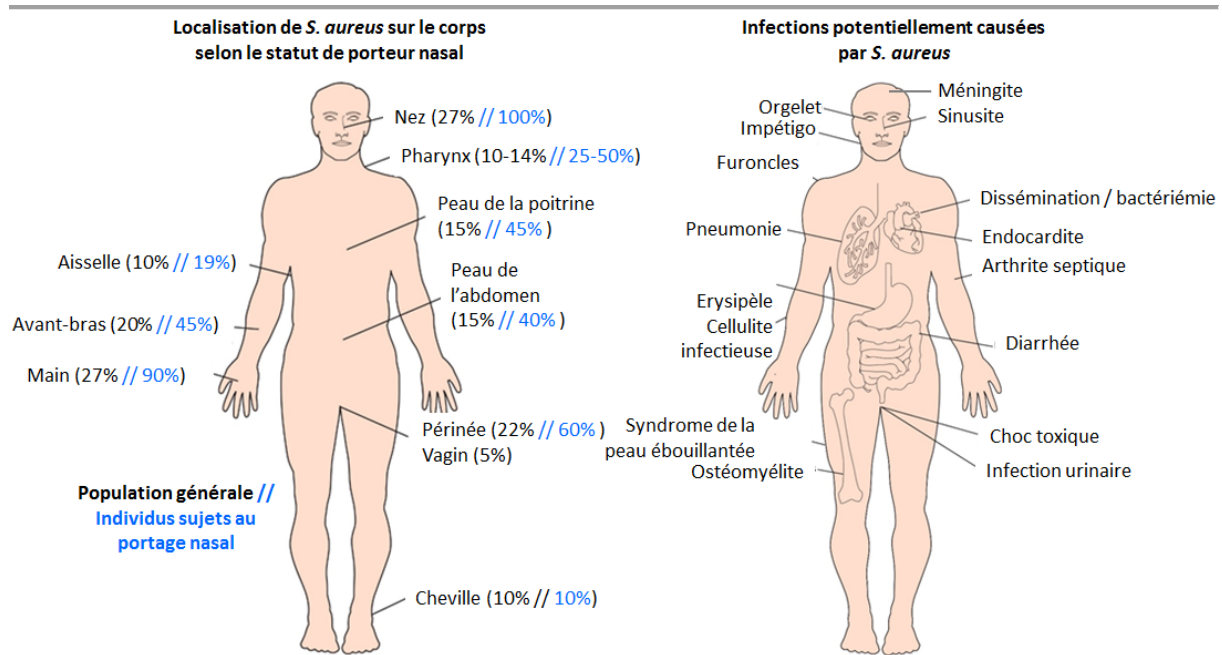


Figure 1-3 : Localisation de *S. aureus* sur le corps des individus selon qu'ils soient ou non sujets au portage nasal et infections bactériennes dont cette bactérie peut-être responsable, d'après Wertheim et al. [40]

Largement répandu, *S. aureus* est le parfait exemple d'un pathogène opportuniste redoutable. La relation entre le portage nasal et le risque d'être infecté par la souche colonisatrice a été clairement établi. Ainsi, en moyenne, 80% des personnes souffrant d'infections de la peau sont porteuses de *S. aureus* et 65% d'entre elles sont infectées par la souche qui les colonise. En milieu hospitalier, les personnes sujettes au portage nasal présentent un risque accru de développer une infection nosocomiale à *S. aureus*. Pour les bactériémies, il est multiplié par trois entre un non porteur et un porteur, celui-ci étant alors infecté dans 80% des cas par sa souche endogène [45, 46]. La colonisation d'autres parties du corps est également un facteur de risque [47]. Cependant, il semble que malgré le risque plus élevé de développer une infection pour les porteurs, une forme d'immunité se développe au contact de la bactérie car la mortalité en cas de bactériémie à *S. aureus* est 4 fois plus faible chez les porteurs que les non porteurs [40, 45]. Face à une incidence grandissante des infections nosocomiales à *S. aureus* (SASM et SARM) et devant de telles évidences, des mesures d'identification des porteurs de SARM à leur entrée à l'hôpital ont été prises. Elles visent à isoler les personnes porteuses et à proposer une décolonisation spécifique avant la réalisation d'actes médicaux [48]. La résistance à la méticilline chez *S. aureus* est retrouvée chez 20% des isolats [36, 42], avec un portage nasal compris entre 1,7 et 3,1% [49]. Ces mesures associées à d'autres initiées depuis le début des années 2000, ont permis de faire baisser l'incidence des infections nosocomiales à SARM, passant de 0,62 pour 1000 jours d'hospitalisation à 0,38 en France [50]. En Ecosse, les bactériémies nosocomiales impliquant des SARM ont diminué de 52% entre 2006 et 2010 pour atteindre une densité d'incidence de 0,07 [49], contre 0,045 en France en 2011 ce qui représente encore 1 cas sur 8 [36]. Si l'efficacité de ces mesures semble avérée [50], des questionnements quant à leurs coûts demeurent [51].

Malgré cette diminution de l'incidence des bactériémies à SARM, il n'en va pas de même pour les SASM et l'identification chez un patient de cette bactérie quel que soit son profil de sensibilité aux antibiotiques est toujours prise très au sérieux. La mortalité associée à une bactériémie à *S. aureus* est de 20% [39]. Dans 8 hôpitaux français entre 2009 et 2011, 54% des bactériémies à *S. aureus*

étaient d'origine nosocomiale, 18% associées aux soins et 26% d'origine communautaire [42]. Parmi les SARM isolés d'hémocultures, 64% ont été acquis à l'hôpital [44]. La présence d'un cathéter intraveineux, ou un récent séjour dans une structure de soins associés ou non à une antibiothérapie augmente le risque d'acquisition d'un SARM. Or, l'implication d'une souche de SARM est généralement associée à une mortalité 1,78 à 1,93 fois plus élevée qu'avec une souche sensible [52, 53], bien que toutes les études ne parviennent pas à cette conclusion [10, 54]. Les facteurs de comorbidité pris en considération peuvent expliquer ces différences. Pourtant, même ces études montrent que l'infection par un SARM augmente le risque de recevoir une antibiothérapie initiale inadaptée avec les conséquences potentielles explicitées précédemment. Entre 52% et 66% des patients chez qui un SARM a été isolé ont reçu une antibiothérapie initiale inefficace contre seulement 21% et 14% pour ceux infectés par un SASM [10, 55]. En revanche, l'emploi d'un antibiotique de seconde ligne tel que la vancomycine sur une souche de SASM pour laquelle des β -lactames suffiraient n'a pas d'effet négatif sur les chances de survie du patient [56]. Ce type de traitement doit pourtant être autant que possible évité pour ne pas induire une pression de sélection favorable à l'apparition de souches résistantes à la vancomycine, certaines à la susceptibilité intermédiaire ayant déjà été observées [57]. Associé si possible au retrait du foyer infectieux, s'il est identifié, l'emploi de la vancomycine doit donc rester un traitement de seconde ligne, dès lors que l'identification est obtenue [57].

1.2 Méthodes de diagnostic actuellement employées

1.2.1 Enrichissement bactérien : l'hémoculture

1.2.1.1 Contraintes liées à la détection de bactéries dans le sang

Même en cas de bactériémie avérée, le nombre de bactéries viables dans le sang est très faible. Chez les adultes, la charge bactérienne du sang excède rarement quelques bactéries par millilitre de sang et cette proportion peut s'abaisser jusqu'à une bactérie pour dix millilitres [58-60]. Lors de bactériémies chez l'enfant, le nombre de bactéries dans le sang, généralement plus élevé, se situe entre 100 à 1000 UFC.mL⁻¹ voire davantage [59]. Cette différence peut s'expliquer par l'immaturité du système immunitaire chez les jeunes enfants qui élimine donc moins efficacement les bactéries de la circulation sanguine. Le sang constitue donc un environnement extrêmement inhospitalier pour les bactéries, exposées aux cellules du système immunitaire et à diverses protéines de défenses (anticorps, peptides antimicrobiens) dont l'action conjointe a pour effet de lyser les bactéries. La très faible charge bactérienne sanguine en est la conséquence. Or, comme cela va être présenté par la suite, aucune méthode de détection n'est actuellement suffisamment sensible pour détecter directement et de manière certaine un si faible nombre de bactéries, qui plus est dans un milieu d'une extrême complexité. Le sang est en effet composé de cellules, de protéines et d'autres solutés susceptibles d'interférer avec la détection des bactéries. Une phase d'enrichissement bactérien à partir de l'échantillon sanguin est donc nécessaire, c'est le rôle de l'hémoculture qui permet d'augmenter la concentration bactérienne confirmant ainsi la présence anormale d'une bactérie dans le sang.

En cas de suspicion de bactériémie, un prélèvement sanguin de 20 à 30 millilitres est donc effectué en veillant à l'asepsie du site de prélèvement, afin d'éviter l'introduction de bactéries commensales pouvant provoquer des faux-positifs [58]. Cette analyse sanguine est fréquente puisqu'à titre d'exemple, lors d'une étude danoise, sur 179 917 patients admis à l'hôpital, au moins une hémoculture a été réalisée dans les premiers 2 jours pour 19,8% d'entre eux [61]. Elle est utilisée aussi bien pour confirmer qu'infirmer le diagnostic de bactériémie. L'échantillon sanguin est réparti

dans différents milieux dédiés à la croissance de microorganismes en présence de sang. La composition de ces milieux sera plus largement exposée dans le chapitre 3. La sensibilité de l'hémoculture est directement dépendante du volume de sang prélevé et mis en culture (Figure 1-4). Ce paramètre, induit par la faible charge bactérienne du sang, est celui qui a le plus d'influence sur la capacité de l'hémoculture à détecter la présence d'un pathogène [58, 59, 62, 63].

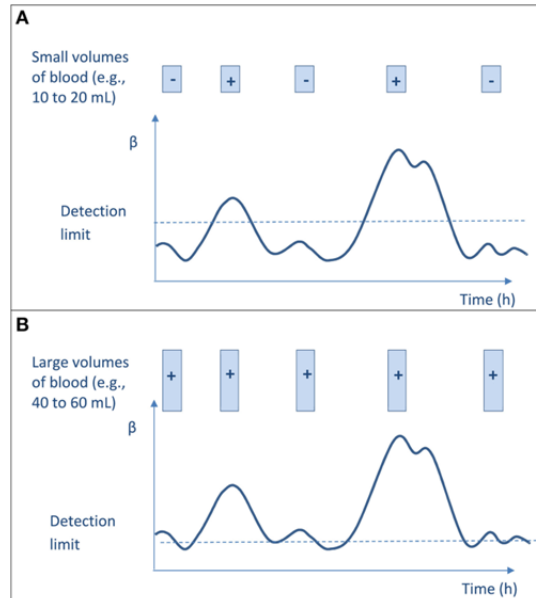


Figure 1-4 : Influence du volume de sang prélevé sur la sensibilité de l'hémoculture [60]. « β » représente la charge bactérienne sanguine, qui varie au cours du temps mais n'est jamais nulle. **A.)** En cas de prélèvement d'un faible volume de sang (10 à 20 mL), la probabilité d'introduire dans les bouteilles d'hémoculture un nombre de microorganismes inférieur à la limite de détection (matérialisée par la ligne pointillée) est plus élevée qu'en cas de prélèvement d'un volume plus conséquent (cas **B.**), 40 à 60 mL).

Pour un adulte, idéalement entre 8 à 10 millilitres de sang doivent être introduits dans chaque bouteille, mais le sous-remplissage est fréquent [64], parfois au détriment de la sensibilité. Chez l'enfant, la mise en culture de trois millilitres de sang par bouteille est préconisée, d'une part car la charge bactérienne plus élevée ne justifie pas un volume aussi important que chez l'adulte, et d'autre part car le volume total de sang prélevé ne doit pas excéder 1% du total de l'organisme pour ne pas provoquer d'anémie [58].

Comme l'illustre la Figure 1-4, le nombre de bactéries dans le sang oscille au cours du temps. Il a longtemps été préconisé d'effectuer un premier prélèvement sanguin de 20 à 30 millilitres dans l'heure suivant une poussée de fièvre ou de frissons sensée être corrélée avec un pic bactériémique. Ce prélèvement est ensuite renouvelé une fois dans les heures qui suivent [65]. Plusieurs études font en effet ressortir que quatre prélèvements de 20 millilitres, chacun répartis dans deux bouteilles sont nécessaires à la détection de plus de 99% des pathogènes décelables par hémoculture [63, 66]. Le premier ensemble de bouteilles permettant la détection de seulement 75 à 80% de ce total. Le prélèvement de 30 millilitres à deux reprises paraît être supérieur à cette première méthode en augmentant d'environ 10% le nombre d'hémocultures positives [63]. En France, le « réseau de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales et associées aux soins » (CCLin) va même jusqu'à préconiser un prélèvement unique de 40 à 60 millilitres par 24h [60]. Enfin, dans la mesure du possible, le prélèvement sanguin devra être réalisé avant toute administration d'antibiotiques pour éviter que leur présence dans le sang n'inhibe la croissance des microorganismes mis en culture

[59]. Dans les faits, cette condition est parfois difficile à respecter puisque 28 à 63% des patients reçoivent déjà une antibiothérapie lors du prélèvement [5, 67, 68]. Cette proportion peut même être plus élevée lors de bactériémies nosocomiales où les patients ont plus de chances d'être déjà soumis à une antibiothérapie en raison d'une infection avérée ou supposée [69].

La réussite de l'hémoculture, première étape indispensable à l'identification des bactéries, est donc conditionnée par plusieurs éléments susceptibles de nuire à son bon déroulement. Le respect de recommandations précises permet de maximiser les chances de détection d'un pathogène.

1.2.1.2 Déroulement d'une hémoculture

Une fois remplies, les bouteilles d'hémoculture sont incubées à 35°C dans des automates de culture dédiés qui permettent le suivi simultané d'un grand nombre de bouteilles. Trois systèmes commerciaux et leurs milieux associés se partagent la quasi-totalité du marché : BD Bactec™ (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et VersaTREK® (TREK Diagnostics Systems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis). L'activité respiratoire des microorganismes en croissance permet de déceler leur présence. L'appareil VersaTREK détecte les changements de pression dans la bouteille, alors que les deux autres systèmes sont basés sur la détection du dioxyde de carbone produit par le métabolisme bactérien [70]. Au fond des bouteilles BacT/ALERT et BD Bactec, visibles sur la Figure 1-5, se trouve un senseur de pH, respectivement colorimétrique et fluorescent, sensible à l'acidification du milieu induite par la dissolution du CO₂. Une lecture automatique, toutes les 10 minutes, du fond des bouteilles permet d'observer une modification du pH, révélant la présence probable d'un microorganisme en cours de multiplication.

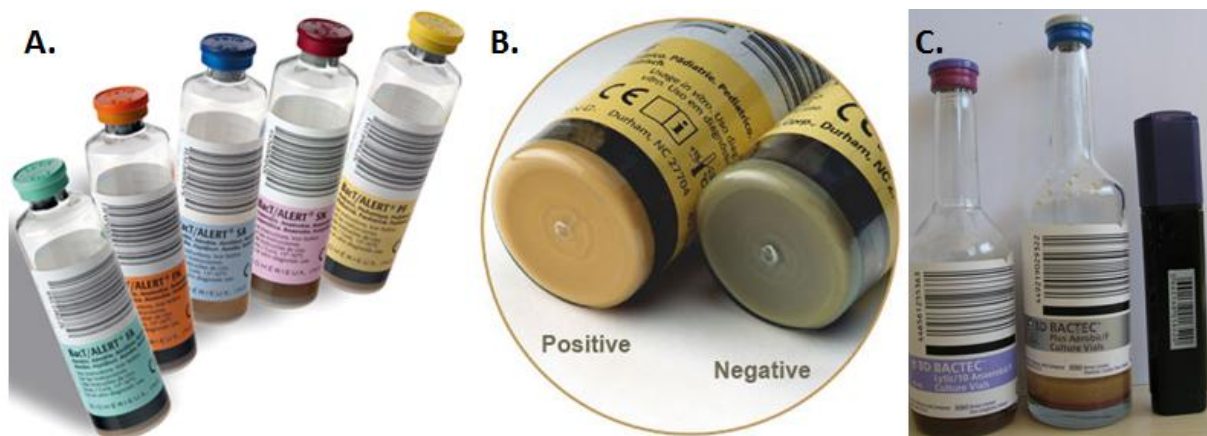


Figure 1-5 : **A.)** Bouteilles d'hémocultures BacT/ALERT®. **B.)** Changement de coloration du senseur de pH lors de la croissance d'un microorganisme dans la bouteille. **C.)** Bouteilles d'hémocultures BD BACTEC™. Les images « A » et « B » sont visibles sur le site de bioMérieux²

L'incubation est rarement prolongée au-delà de cinq jours si aucune croissance n'a été détectée jusque-là, sauf en cas de suspicion d'une bactériémie provoquée par un microorganisme à croissance lente comme les champignons [60]. La présence des pathogènes les plus fréquents, à croissance rapide dans les conditions d'incubation, est la plupart du temps détectée en moins de 24h (Figure 1-6).

² BacT/ALERT Culture Media. [En ligne]. Consulté le 29 août 2016.

Disponible sur : < <http://www.biomerieux-diagnostics.com/bact-alertr-culture-media> >

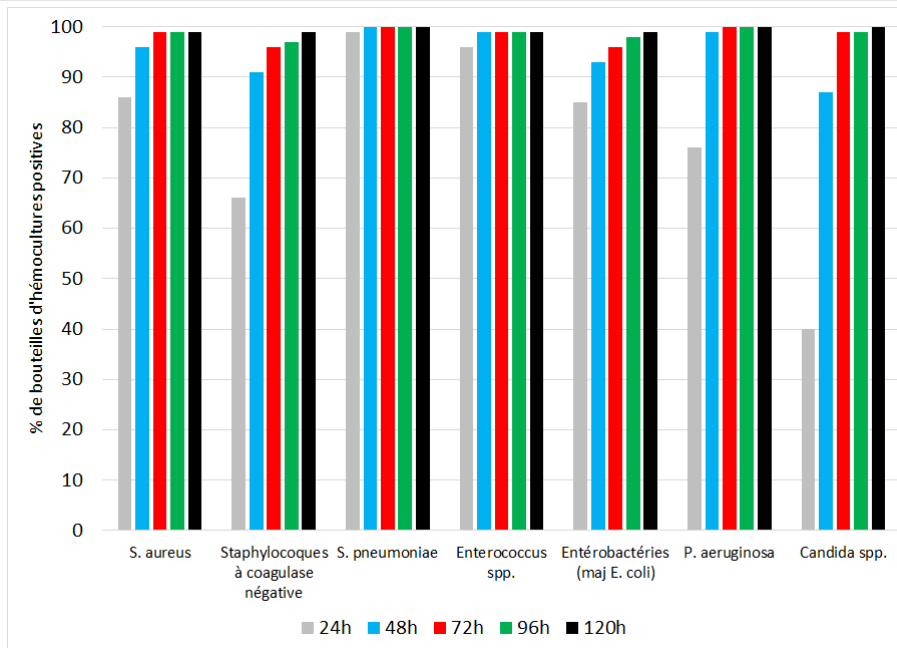


Figure 1-6 : Pourcentage d'hémocultures positives passé un délai de 1 à 5 jours d'incubation pour certains des pathogènes les plus fréquents s'ils sont initialement présents, justifiant une incubation maximale de 5 jours [71]

L'étude de Cockerill *et al.*, réalisée sur une période de 8 ans aux Etats-Unis, entre 1984 et 1992, répertorie les bactéries isolées à partir de 281 797 hémocultures réalisées. Parmi elles, 9,2% se sont révélées positives c'est-à-dire qu'une bactérie s'est développée dans au moins l'une des bouteilles du groupe contenant le même échantillon sanguin. Après exclusion des contaminants probables 6,8% des analyses ont été classifiées comme de véritables bactériémies [31]. Ces proportions d'hémocultures positives et de contaminations sont représentatives de la plupart des études d'envergure publiées [61]. Cependant, la proportion de patients bactériémiques au moment même du prélèvement est vraisemblablement plus élevée que celle des hémocultures positives. Ainsi de 0,3 à 15,3% des bouteilles d'hémoculture contenant initialement un microorganisme ne donnent pas de signal positif [60]. Ces faux-négatifs peuvent être provoqués par un délai trop important entre le prélèvement et la mise en culture de la bouteille qui peut être fatal aux quelques bactéries présentes. Un mauvais remplissage de la bouteille peut aussi être en cause [58, 64]. Pour près de 50% des patients souffrant de sepsis et recevant une antibiothérapie, les hémocultures réalisées sont négatives alors que l'infection est bien réelle [21]. Il appartient alors aux médecins, conscients de ce point, de poursuivre le traitement en prenant en considération l'intégralité du tableau clinique. Pour cette raison, des biomarqueurs du sepsis, dont le taux de procalcitonine, régulièrement évoqué, sont activement recherchés et évalués mais aucun n'est à ce jour totalement prédictif de cet état clinique [72-74]. Parmi les hémocultures positives, 30 à 50% s'avèrent être dues à des contaminations ou classifiées comme telles [31, 75, 76]. Cette proportion variable d'un centre de soins à l'autre peut être plus faible que celle évoquée. Néanmoins, un certain seuil de contamination sur l'ensemble des hémocultures réalisées, de l'ordre de 2 à 3%, demeure inévitable malgré des règles strictes d'asepsie lors du prélèvement [75, 76]. Ces faux-positifs génèrent des coûts supplémentaires associés à l'identification de la bactérie isolée de l'hémoculture et peut poser question quant au caractère pathogène ou non de ce microorganisme. En effet, ces contaminants fréquents, issus de la flore commensale de la peau, peuvent ponctuellement être à l'origine de bactériémies bien réelles. C'est le cas notamment de *S. epidermidis*, quasi-ubiquitaire sur notre peau, fréquemment responsable d'infections liées aux dispositifs médicaux invasifs (cathéters...) [77]. Pour qu'un contaminant

fréquent soit considéré comme la cause d'une bactériémie avérée, il doit être isolé de deux hémocultures positives inoculées par des échantillons dont les prélèvements sont espacés dans le temps et réalisés à des endroits différents du corps. La présence et la proximité de cathéters est également à considérer. Ainsi, sur 1595 hémocultures positives avec des staphylocoques à coagulase négative, environ 30% ont été classées comme de vraies bactériémies [78]. En revanche, la bactériémie est immédiatement considérée comme réelle si l'un des microorganismes suivant est identifié après avoir été isolé d'une ou plusieurs bouteilles : *S. aureus*, *E. coli* et autres entérobactéries, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* [62]. Mais avant de parvenir à ce niveau d'identification, plusieurs étapes sont nécessaires, l'hémoculture indiquant (seulement) la présence anormale de microorganismes dans le sang. Lorsque leur croissance dans la bouteille est finalement détectée, la concentration est alors comprise entre 10^7 à 10^8 UFC.mL⁻¹ [79, 80]. C'est seulement à partir de cet instant que l'identification des microorganismes va débiter.

1.2.2 Identification des bactéries : méthodes classiques

Malgré l'émergence de techniques moléculaires pour l'identification des bactéries, les techniques microbiologiques classiques restent encore largement utilisées. Elles ont néanmoins profité d'une certaine automatisation dans la mise en œuvre ou la lecture des résultats [81-83].

1.2.2.1 Coloration de Gram et microscopie

Dès la détection d'une possible croissance dans une bouteille d'hémoculture, une partie de son contenu est soumis à une coloration de Gram et à une observation microscopique. Cet examen repose sur les différences de composition de la paroi bactérienne (Figure 1-7). Fixées sur une lame de microscope, les composants cytoplasmiques des bactéries sont colorés avec le colorant de Gram (violet de gentiane). Lors du rinçage à l'alcool effectué par la suite, les bactéries Gram⁻ dont la paroi pauvre en peptidoglycane est perméable à l'alcool sont décolorées. Les bactéries Gram⁺ quant à elles, conservent la coloration violette en raison de l'épaisse paroi de peptidoglycane qui les entoure. Afin de faciliter l'observation des bactéries Gram⁻, une nouvelle coloration à la fuscine ou à la safranine les fait paraître roses. L'observation au microscope de la morphologie des bactéries complète cet examen initial.

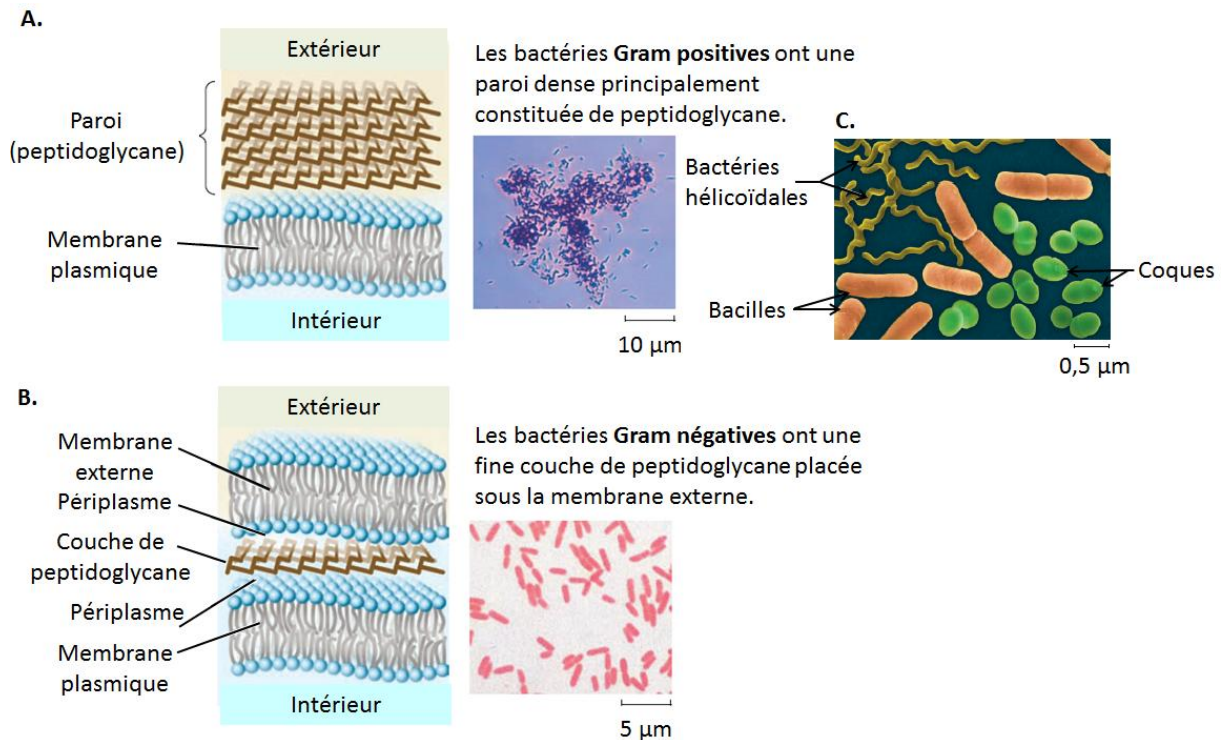


Figure 1-7 Composition schématique de la membrane bactérienne expliquant le résultat de la coloration de Gram. **A.)** Les bactéries Gram⁺, ont une paroi épaisse, riche en peptidoglycane. **B.)** Les bactéries Gram⁻ ont une fine couche de peptidoglycane comprise entre la membrane externe et la membrane plasmique. **C.)** Principales morphologies des bactéries. Images issues du livre de Sadava *et al.* [84]

Ces observations permettent d'éliminer d'éventuels faux-positifs en confirmant la présence de bactéries, et donnent en moins d'une heure un premier niveau d'identification qui permet d'ajuster l'antibiothérapie sur la base des données épidémiologiques. Néanmoins, des étapes supplémentaires sont encore nécessaires pour parvenir à une caractérisation complète du pathogène.

1.2.2.2 Croissance sur milieux solides

Une partie du contenu de l'hémoculture positive est étalé sur différents milieux solides sélectifs ou non. L'objectif est d'obtenir des colonies isolées qui seront ensuite utilisées pour terminer l'identification. La durée de cette étape, comme pour l'hémoculture, est conditionnée par la croissance des bactéries. Elle peut prendre entre 12 à 24 heures pendant lesquelles les géloses sont incubées à 35°C. Des géloses au sang (par exemple 5% sang de mouton), extrêmement riches, sont couramment employées pour permettre la croissance des microorganismes les plus exigeants. L'aspect des colonies bactériennes à l'issue de la croissance donne une indication supplémentaire quant à la nature du germe isolé.

Pour gagner du temps sur l'identification et l'antibiogramme, il est possible d'étaler une partie de l'échantillon sur des géloses sélectives dont le choix aura éventuellement été orienté par les résultats de la coloration de Gram. Cela peut permettre, en cas de bactériémie polymicrobienne, d'isoler les germes responsables. Une activité métabolique propre à certaines espèces, ou la capacité à se développer dans des milieux particuliers peut aussi être mise en évidence. Par exemple, les staphylocoques (Gram⁺) ont la capacité de se développer en présence de fortes concentrations en sels (75 g.L⁻¹ pour le milieu de Chapman). A l'inverse, ils se développent peu ou pas dans le milieu EMB (éosine bleu de méthylène) qui inhibe la croissance de la plupart des Gram⁺. Certains milieux contiennent des substrats chromogéniques qui, s'ils sont utilisés par les bactéries, feront nettement

ressortir leurs colonies [85]. D'autres comportent également des antibiotiques permettant ainsi de déceler précocement une éventuelle résistance. Les gammes chromID™ (bioMérieux) ou BBL™ CHROMagar™ (Becton Dickinson) offrent un panel complet de géloses pour l'isolement et l'identification directe de bactéries après croissance. Cependant, l'emploi de certains de ces milieux pour l'identification d'une bactérie à partir de l'hémoculture n'est pas validé par leurs fournisseurs. C'est le cas par exemple des milieux permettant l'identification directe de SARM comme chromID™ MRSA, (bioMérieux), Hardy CHROM™ MRSA (Hardy Diagnostics, Santa Maria, Etats-Unis) ou encore BBL™ CHROMagar™ MRSA II (Becton Dickinson) ce qui limite leur intérêt dans ce cadre précis. Le plus souvent, l'identification se poursuit donc à partir des colonies isolées pour une dernière étape.

1.2.2.3 Identification

Dans la continuité de ce qui vient d'être évoqué, l'identification des bactéries va s'achever par la mise en évidence d'un ensemble de caractéristiques biochimiques, qui finalement réunies, permettent de connaître le genre et l'espèce bactérienne de l'isolat. L'activité des enzymes bactériennes et la capacité à croître en présence de substrats particuliers constituent la base de ces tests. Le principe est donc celui des galeries API, dont le fonctionnement, la lecture et l'interprétation des résultats ont été miniaturisés et automatisés. Les principaux automates réalisant cette analyse sont au nombre de trois : Vitek® 2 (bioMérieux), BD Phoenix (Becton Dickinson) et Micro-Scan WalkAway® (Beckman Coulter, Brea, Etats-Unis). Très largement comparés, ces trois automates permettent l'identification spécifique au niveau du genre et de l'espèce de la plupart des isolats cliniques [86], quelques écarts acceptables pouvant subsister notamment pour des pathogènes rares [87]. Tous disposent de plusieurs « cartes d'identification » dont le choix est conditionné par le résultat de la coloration de Gram. Plus de 40 puits réactionnels composent ainsi les cartes d'identification [88, 89]. Ils contiennent des substrats fluorescents séchés qui sont resuspendus par l'inoculum. Celui-ci est constitué de colonies resuspendues dans une solution saline (ou autre milieux dédiés) pour atteindre une concentration de 0,5 McFarland équivalent à environ $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ [88, 89]. Régulièrement, une lecture optique de la carte permet d'interpréter les éventuels changements dans les puits. Cette analyse conduit à l'identification des microorganismes en quelques heures.

1.2.2.4 Antibiogramme

Information cruciale lors d'infections bactériennes graves, le profil de sensibilité aux antibiotiques complète l'identification. Il est particulièrement important dans un contexte d'augmentation de la résistance aux antibiotiques. Parallèlement à l'identification, les automates peuvent effectuer l'antibiogramme de l'isolat clinique [90]. Le fonctionnement est donc très similaire, avec cette fois des « cartes d'antibiogramme » communes ou non avec celles d'identification, constituées d'une série de puits réactionnels contenant une quantité décroissante, en général d'un facteur 2, d'un antibiotique donné (Figure 1-8). Le multiplexage permet de déterminer simultanément la concentration minimale inhibitrice (CMI) de plusieurs antibiotiques pour la bactérie testée et de proposer alors une antibiothérapie spécifique. L'inoculum est constitué d'une suspension diluée de celui utilisé pour l'identification, de manière à atteindre une concentration initiale d'environ 10^5 UFC.mL⁻¹. Le temps d'obtention du résultat est conditionné par la vitesse de croissance du microorganisme qui doit s'être développé suffisamment pour permettre une distinction entre les puits où la croissance est inhibée de ceux où elle ne l'est pas. Entre 2 et 16h sont nécessaires, la différenciation étant facilitée par les appareils, là où l'œil humain aurait des difficultés à percevoir des changements. L'inoculation des cartes d'identification et d'antibiogramme avec un inoculum

préparé directement à partir des bouteilles d'hémoculture offrirait une possibilité de raccourcir le temps de rendu du résultat [91, 92]. Bien que des études aient montrées que les résultats obtenus étaient dans l'ensemble cohérents avec le protocole complet, cette procédure n'est pas validée en routine. Les différences importantes observées avec les coques Gram⁺ et l'exclusion des bactériémies polymicrobiennes lors de ces études en sont notamment les raisons [91, 92].

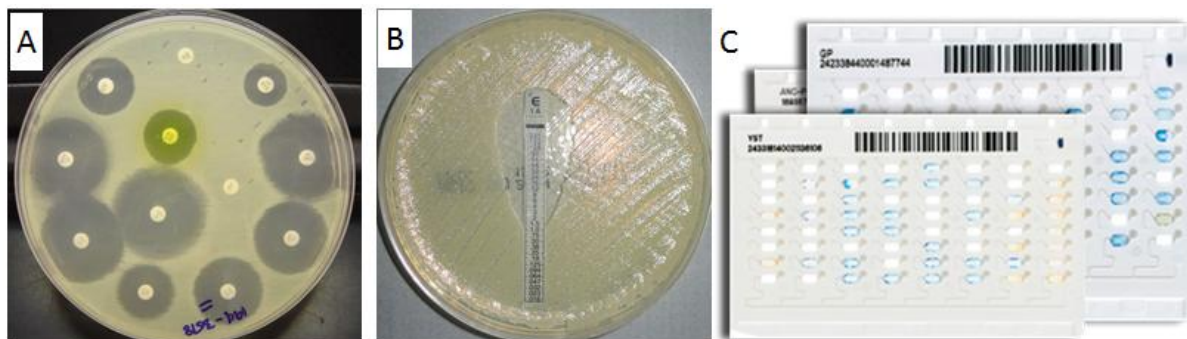


Figure 1-8 : Différentes possibilités pour réaliser l'antibiogramme d'un microorganisme : **A.)** Par diffusion de disques imprégnés, relevé des diamètres des zones d'inhibition et comparaison avec des tables, image issue de Jorgensen *et al.* [93]. **B.)** Par bandelette E-Test®, ici la CMI de la vancomycine pour *S. aureus* BAA-1720 lue est de 1 µg.mL⁻¹ montrant sa sensibilité. **C.)** Cartes d'antibiogramme pour l'automate Vitek®³

L'antibiogramme est encore parfois réalisé manuellement grâce à un ensemble de méthodes largement éprouvées. Celle dite de « microdilution » ressemble en bien des points aux automates actuels. Des dilutions d'un facteur deux d'une solution antibiotique sont réparties dans les puits d'une microplaque. Une suspension bactérienne préparée à partir de colonies isolées y est alors ajoutée. Après une incubation d'une nuit à 35°C, la croissance est contrôlée visuellement dans les puits [93]. La CMI peut également être déterminée sur milieu solide par diffusion de l'antibiotique dans la gélose. Des disques ou des bandelettes imprégnés d'antibiotiques (Etest®, bioMérieux) sont déposés sur la gélose où a été préalablement étalée une suspension bactérienne ($1-2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) permettant la formation d'un tapis bactérien après incubation (Figure 1-8). La lecture de la CMI s'effectue soit directement avec la bandelette Etest, soit en interprétant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide de tables révisées annuellement par des organismes publics [94]. Ces documents de référence contiennent un ensemble d'informations régulièrement actualisées pour aider à l'interprétation des résultats de l'antibiogramme.

Qu'elle soit obtenue par des automates ou de manière plus classique, la CMI d'un antibiotique pour un isolat clinique est une aide précieuse pour l'ajustement de l'antibiothérapie. Ces méthodes phénotypiques basées sur la croissance des microorganismes sont le seul moyen de connaître cette valeur. Cependant, la détection de marqueurs de résistances tels que les gènes ou les protéines qui y sont associées permet parfois l'identification précoce d'une résistance comme cela sera présenté au travers d'exemples par la suite.

1.2.2.5 Tests rapides spécifiques d'un microorganisme

Devant l'importance que revêt l'identification précoce d'un microorganisme, des tests rapides ont été développés pour certains d'entre eux. Ils se basent sur la connaissance de propriétés spécifiques d'un microorganisme donné. Pour *S. aureus* par exemple, la présence de coagulase absente chez

³ Vitek®2 AST Cards, [en ligne], consulté le 07 juillet 2015.

Disponible sur : < <http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-2-ast-cards> >

d'autres staphylocoques, est recherchée lors de test de coagulation ou d'agglutination de particules de latex, en plus de la protéine A et des polysaccharides de surface. Il s'agit par exemple des tests Staphaurex™ (ThermoFisher Scientific) ou Pastorex Staph Plus (Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis) [95]. La présence de la protéine PBP2a, marqueur de résistance aux antibiotiques de la famille des pénicillines est recherchée par des tests immunochromatographiques tels que Alere™ PBP2a (Waltham, Etats-Unis) ou d'agglutination comme Oxoid™ PBP2' (Oxoid, ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) à partir d'une colonie lysée (Figure 1-9). La protéine PBP2a y est alors reconnue grâce à un anticorps.

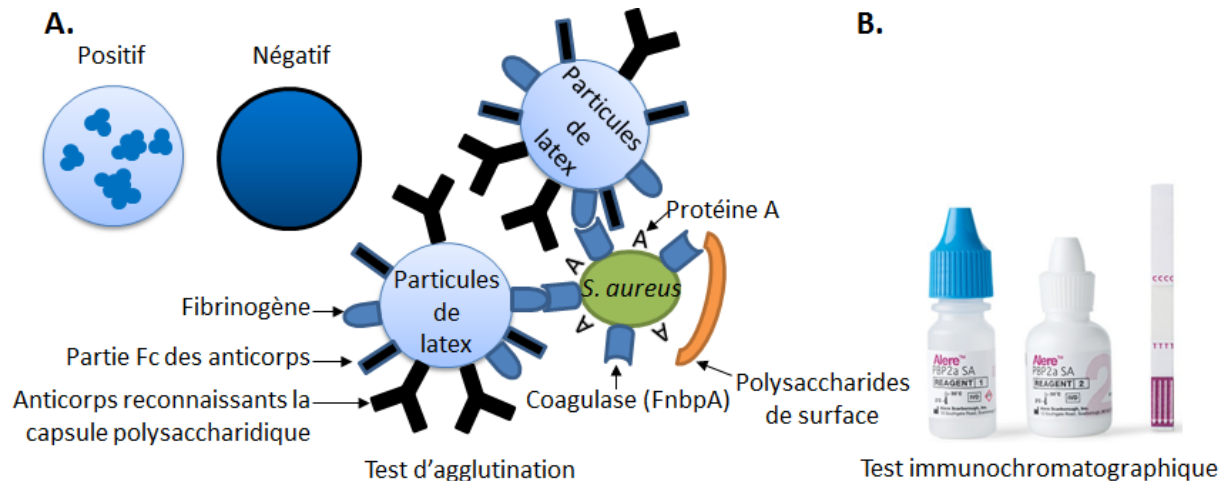


Figure 1-9 : A.) Principe des tests d'agglutination pour la détection de *S. aureus* : ils se basent sur 3 caractéristiques propres à *S. aureus* qui sont la présence de protéine A, d'une coagulase membranaire et éventuellement de polysaccharides de surface, recherchés respectivement par l'intermédiaire de fibrinogène, de la fraction Fc d'IgG et d'anticorps reconnaissant les polysaccharides capsulaires fixés aux particules de latex. La présence de *S. aureus* rapproche les particules qui forment des agrégats visibles à l'œil nu. B.) Test immunochromatographique Alere™ PBP2a⁴ et ses réactifs. Les deux tests s'effectuent à partir de colonies isolées.

A partir d'une colonie isolée, le résultat est connu en 10 à 20 minutes. Des tests pour l'identification des streptocoques et de plusieurs pathogènes alimentaires existent également. Ils peuvent être employés en cas de forte suspicion de l'implication d'un microorganisme et permettre un ajustement précoce de l'antibiothérapie.

1.2.3 Nouvelles méthodes d'identification

1.2.3.1 Spectrométrie de masse

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse s'est imposée dans les laboratoires de microbiologie clinique comme une alternative ou un complément aux techniques jusqu'à lors utilisées pour l'identification [96, 97]. La méthode employée est appelée MALDI-TOF pour « *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight* ». Son principe est présenté sur la Figure 1-10.

⁴Alere™ PBP2a Culture Colony Test. [En ligne]. Consulté le 07 juillet 2016.
Disponible sur : < <http://www.alere.com/fr/home/product-details/pbp2a.html> >

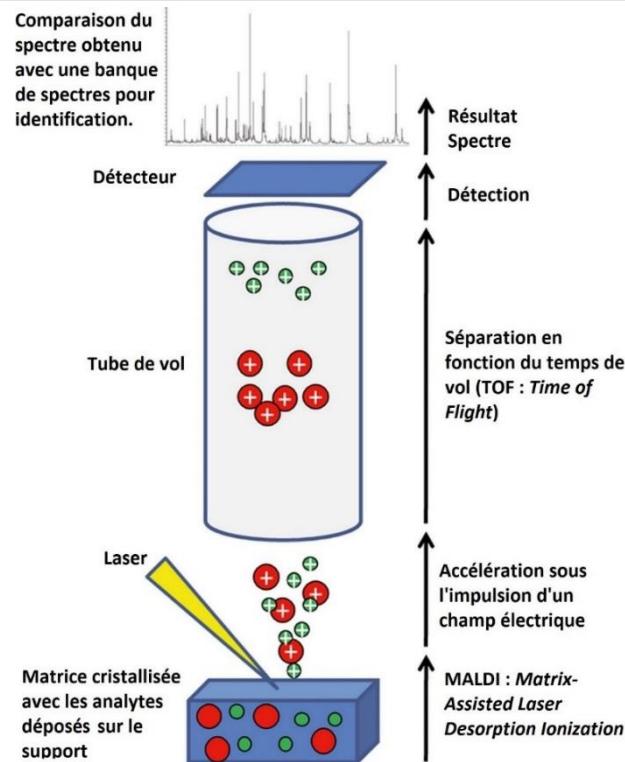


Figure 1-10 : Principe de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse d'après Croxatto *et al.* [97]. Les bactéries lysées dans la matrice d'analyse, composée de divers acides organiques, sont déposées sur le support métallique où elles cristallisent après séchage. Sous l'impulsion d'un bombardement laser, les protéines bactériennes sont désorbées du support et s'ionisent en récupérant les protons de la matrice. Leurs charges constituent alors un premier niveau de séparation. Un champ électrique les entraîne ensuite vers un canal au bout duquel se trouve un détecteur. Le temps de vol nécessaire aux différents ions pour atteindre le détecteur dépend de leur masse, les plus petits arrivant les premiers. Un spectre de masse est ainsi généré, composé d'un ensemble de pics d'intensité variable séparant les ions selon le ratio masse sur charge (m/z).

Deux spectromètres de masse MALDI-TOF sont majoritairement employés, il s'agit des appareils MicroFlex LT associé au logiciel BioTyper (Bruker Daltonics, Billerica, Etats-Unis) et Vitek MS (bioMérieux). L'analyse requiert une colonie isolée, à partir de laquelle le spectre de masse obtenu est comparé avec la bibliothèque de spectres de l'appareil. Une identification est alors proposée avec une indication du niveau de confiance allant de 0 à 3. Pour un score supérieur à 2,3, l'identification du genre et de l'espèce est hautement probable. Entre 1,7 et 2, l'identification est fiable au niveau du genre, en-deçà, elle n'est pas certaine et l'utilisateur en est informé [96]. L'identification est correcte pour plus de 80% des isolats voire davantage. La lyse incomplète des bactéries peut-être l'une des causes d'une non-identification. L'ajout de la matrice sur les bactéries est généralement suffisante pour les lyser, mais des protocoles d'extraction des protéines, plus longs, peuvent permettre d'améliorer la sensibilité de l'analyse [96, 98]. Cela peut par exemple être nécessaire pour les bactéries Gram⁺ rendues plus difficiles à lyser par leur paroi. L'enrichissement progressif de la bibliothèque de spectres contribue à réduire les erreurs d'identification de microorganismes rares.

Entre 10^5 à 10^6 UFC sont nécessaires à l'obtention de spectres de qualité suffisante pour permettre l'identification des bactéries [99, 100]. Elles sont donc en principe en nombre suffisant dans la bouteille d'hémoculture positive pour permettre leur identification directe sans avoir recours à une étape de culture sur gélose. Cette possibilité a fait l'objet de plusieurs études prometteuses [101-105] et un kit commercial pour l'obtention de bactéries à partir de l'hémoculture positive est maintenant disponible (Sepsityper, Bruker) [100]. Le succès de cette approche est conditionné par le

caractère monomicrobien de la bactériémie [102], et par la capacité à s'affranchir de la complexité du milieu d'hémoculture et du sang duquel il est indispensable d'extraire les bactéries. Pour cela, des étapes successives de centrifugation pour éliminer les cellules sanguines, de lyse des érythrocytes et de lavage sont nécessaires à l'obtention d'un culot bactérien analysable. A cette condition, Prod'Hom *et al.* obtenaient une identification au niveau de l'espèce dans 78,7% des isolats, avec plus de difficultés pour les streptocoques et les staphylocoques dans une moindre mesure [103]. Pour les entérobactéries, l'identification fiable [101] a permis un ajustement plus précoce de l'antibiothérapie dans 35,1% des bactériémies causées par ces organismes [105]. Pour éviter les problèmes potentiellement liés à l'analyse directe de bactéries issues de l'hémoculture, certaines équipes cherchent plutôt à pratiquer l'identification sur des micro-colonies obtenues après seulement quelques heures d'incubation sur boîtes [106, 107]. L'étalement sur gélose d'une partie de l'hémoculture est de toute façon encore nécessaire puisque pour l'heure, l'obtention d'informations sur une éventuelle résistance aux antibiotiques des bactéries identifiées ne fait pas partie des apports de la spectrométrie de masse en microbiologie clinique. L'antibiogramme est donc toujours réalisé par les automates présentés auparavant. Toutefois, Charretier *et al.* ont récemment démontré la possibilité d'identifier par spectrométrie de masse *S. aureus* et de mettre en évidence la présence de marqueurs de résistance comme PBP2a soit à partir de colonies soit directement depuis une hémoculture [108]. La recherche d'autres marqueurs de résistance ou la mise en évidence de la dégradation d'un antibiotique par des enzymes bactériennes comme les β -lactamases figurent probablement parmi les développements futurs de la spectrométrie de masse pour la microbiologie clinique [109].

1.2.3.2 Tests moléculaires par FISH

Parmi les tests moléculaires réalisables sur une bouteille d'hémoculture positive sans amplification préalable de l'ADN bactérien figurent les techniques d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) et les « *microarrays* » (ou puce à ADN). De quelques dizaines à quelques centaines de microlitres de l'hémoculture positive sont utilisés pour la réalisation de ces tests. Là encore, le résultat de la coloration de Gram oriente le choix des sondes qui vont être employées pour l'identification. En effet, la plupart des produits comportent plusieurs gammes dédiées à l'identification des bactéries Gram⁺ ou Gram⁻. L'hybridation des sondes avec leur ADN cible est visualisée sous un microscope à fluorescence. Les tests hemoFISH (Miacom Diagnostics, Dusseldorf, Allemagne), PNA FISH®, QuickFISH™ et Xpress FISH® (AdvanDx, Vedbaek, Danemark) permettent l'identification en quelques heures des pathogènes les plus fréquents et pour le dernier, la détection du gène *mecA*. La sensibilité et la spécificité de ces tests sont supérieures à 90% [110, 111].

Le test Verigene® (Luminex Corporation, Nanosphere, Northbrook, Etats-Unis) repose lui sur le principe des *microarrays*. Il se compose de deux panels pour l'identification des Gram⁺ et Gram⁻ et comporte des sondes pour les gènes de résistances à la vancomycine et à la méticilline. Celui pour les Gram⁺ permet l'identification de 95% des isolats en 2,5 à 3h soit plus de 30h avant que l'identification et l'antibiogramme par automates ne soient disponibles [112]. Le test Prove-it™ sepsis (Mobidiag, Espoo, Finlande) procède à l'amplification PCR de l'ADN bactérien suivie de l'analyse des séquences amplifiées sur des puces à ADN. Il comporte des sondes ADN pour 60 bactéries, 13 champignons et levures et 3 gènes de résistance.

1.2.3.3 Tests moléculaires par PCR

D'autres tests reposent sur la PCR multiplexe en temps réel. L'ADN bactérien est alors amplifié en présence de sondes spécifiques. Le suivi des courbes de fusion lors des cycles successifs permet d'identifier la séquence amplifiée. Ces tests peuvent être dédiés à l'identification d'un seul pathogène comme *S. aureus*, bactérie pour laquelle les cliniciens disposent de dispositifs tels que GeneXpert MRSA/SA (Cepheid, Etats-Unis), BD GeneOhm™ ou StaphSR (Becton Dickinson). Possédant une spécificité et une sensibilité équivalente aux méthodes phénotypiques, ces tests réduisent le temps nécessaire à l'identification après l'hémoculture [113]. D'autres permettent la détection de la majorité des pathogènes retrouvés dans les hémocultures, soit environ 90 à 95%. Il s'agit par exemple du test FilmArray® Blood Culture ID (bioMérieux) qui cible 27 séquences dont 3 marqueurs de résistance [114]. En moyenne, 65 à 70 min sont nécessaires à l'identification, obtenue dans 91,6% des hémocultures positives contenant une seule bactérie [114].

Certains tests PCR commerciaux sont réalisables directement sur le sang d'une personne présumée atteinte de sepsis [82]. Tous comportent une étape d'enrichissement par PCR, pouvant être inhibée par des composants sanguins ou la présence d'anticoagulants. De plus, l'extraction des quelques copies de génome bactérien depuis le sang complet est un réel défi technique. Comme pour l'hémoculture, le volume de sang analysé influence fortement la sensibilité [115], de 1 à 5 millilitres pouvant l'être selon les appareils. Or, l'étude de Loonen *et al.* montre qu'à une concentration de 1 UFC.mL⁻¹, la présence d'ADN bactérien après extraction est détectée au mieux dans 75% des échantillons artificiellement contaminés. Le pourcentage de détection pouvant alors même être inférieur à 50% [115]. L'amélioration de la sensibilité passe sans doute par la capacité à travailler à partir de volumes d'échantillons plus élevés. Le test Light Cyclor® SeptiFast (Roche Diagnostics, Meylan, France) est celui ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études [116, 117]. Capable d'analyser 1,5 millilitre de sang, sa limite de sensibilité d'après le fournisseur⁵ est de 300 UFC.mL⁻¹, la littérature évoquant parfois une sensibilité inférieure (3 à 30 UFC.mL⁻¹) [118, 119]. Il permet en 6h la détection de 25 pathogènes parmi les plus fréquemment isolés et du gène *mecA*. La revue de littérature effectuée par Chang *et al.* et l'évaluation par Warhust *et al.* font ressortir que la spécificité (86-92%) est supérieure à la sensibilité (50-75%) [116, 117]. Cette limite de sensibilité engendrant des faux négatifs, pour 20 à 39% des hémocultures positives, est l'une des limitations majeure de ce test [69, 117] et plus largement du diagnostic à partir de sang total [118-120]. Malgré tout, ce test révèle dans certains cas la présence de pathogènes cliniquement pertinents alors même que l'hémoculture reste négative [120, 121]. Ces résultats discordants posent question quant à la signification d'un test PCR positif et d'une hémoculture négative. Dans leur revue, Croxatto *et al.* appellent à une meilleure compréhension de l'origine et de la persistance de l'ADN bactérien dans le sang qui peut provenir de bactéries mortes et donc inoffensives. Trois autres dispositifs PCR, SepsitTest (Molzym, Brême, Allemagne), MagicPlex (Seegene, Séoul, Corée du sud) et VYOO® (SIRS-Lab, Jena, Allemagne) présentent des résultats proches de ceux du Light Cyclor® SeptiFast mais ont été moins largement évalués [118, 119]. Le recours à ces techniques ne peut donc être envisagé pour l'heure qu'en complément de l'hémoculture.

1.2.3.4 Combinaisons de techniques, implications et conclusions

Chaque technique présente des avantages et des inconvénients, liés aussi bien à des aspects pratiques qu'économiques. Ainsi, l'emploi systématique de tests PCR relativement coûteux comme le

⁵Roche Molecular Diagnostics, LightCycler® SeptiFast Test MGRADE [en ligne], consultée le 08 juillet 2016
Disponible sur : < <http://molecular.roche.com/assays/Pages/LightCyclerSeptiFastTestMGRADE.aspx> >

GeneXpert MRSA à chaque isolement d'une bactérie Gram⁺ est difficilement concevable. Clerc *et al.* ont donc proposé d'utiliser ce test après que l'identification de *S. aureus*, réussie dans 94,5% des cas, ait été réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF, directement sur les bactéries collectées dans les bouteilles d'hémoculture. Dans cette étude, 94% des patients recevaient déjà une antibiothérapie empirique efficace car la plupart étaient identifiés comme porteurs de SARM. Néanmoins, l'emploi du système GeneXpert MRSA, aboutissant à un résultat après 97 minutes en moyenne, a permis de diminuer plus précocement l'emploi inutile de glycopeptides contre les SASM. Cette proportion est ainsi passée de 26,1% dans le groupe de patients dont le sang a été testé selon le protocole standard à 8,1% pour les patients dont l'échantillon a été testé par la combinaison spectrométrie de masse et PCR [122]. Anciennement Ibis T5000 [123], le système PLEX-ID (Abbott, Des Moines, Etats-Unis) combine l'amplification PCR des génomes présents dans un échantillon avec l'analyse des amplicons par spectrométrie de masse (ESI, *Electrospray ionization*). Des virus comme des bactéries provenant d'échantillons divers peuvent ainsi être analysés. Dans le cadre des bactériémies, les problématiques liées à l'analyse de sang total ont déjà été discutées. Ce dispositif, permettant l'analyse complète en 5 à 6 heures de 5 millilitres de sang, a été employé dans deux études répertoriées dans la revue de Jordana-Lluch *et al.* La sensibilité de ce système est inférieure à celle de l'hémoculture. Il a néanmoins permis dans environ 7% des cas la détection de pathogènes cliniquement pertinents, non détectés par l'hémoculture [124]. Il peut donc, dans certains cas, la compléter et s'avérer utile pour d'autres d'échantillons biologiques.

Le recours combiné à la spectrométrie de masse pour l'identification et aux automates pour la réalisation de l'antibiogramme est désormais couramment employé. L'identification précoce, plus précise que la seule coloration de Gram permet d'ajuster encore un peu plus l'antibiothérapie. Machen *et al.* démontrent que ces deux analyses peuvent être conduites sans préculture préalable sur milieu solide. Le temps nécessaire entre le prélèvement sanguin et la caractérisation du microorganisme est alors divisé par deux par rapport au protocole standard [125]. Dans le même ordre d'idée, Ilevich *et al.* proposent une nouvelle étude « preuve de concept ». Dix millilitres de sang humain artificiellement contaminé avec 1 à 100 UFC.mL⁻¹ de différentes bactéries sont centrifugés, puis le culot est directement étalé sur des géloses. L'identification par spectrométrie de masse combinée à la réalisation de l'antibiogramme par l'automate Vitek 2 sont effectuées lorsque les colonies qui se développent fournissent suffisamment de biomasse pour les analyses. Ainsi, dans la plupart des cas, l'identification est terminée avant même que l'hémoculture réalisée en parallèle ne soit devenue positive. L'antibiogramme débute lui aussi le plus souvent avant le terme de l'hémoculture. Moins de 24h sont alors nécessaires à la caractérisation complète du microorganisme et les auteurs en appellent à reconsidérer la possibilité de cultiver le sang directement sur milieu solide [126].

1.2.3.5 Conclusions sur les techniques d'identification

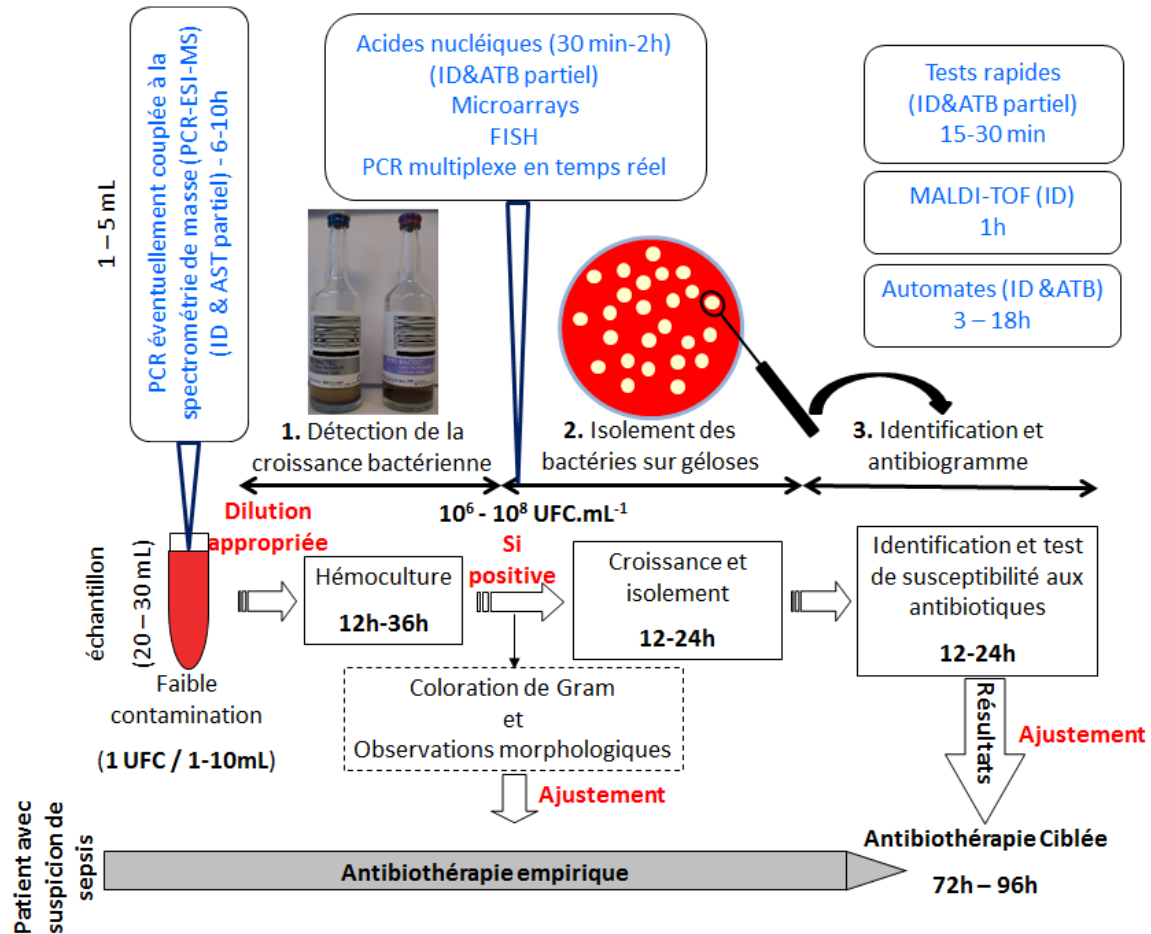


Figure 1-11 : Schéma récapitulatif des principales méthodes de détection actuelles des bactériémies. Le diagnostic à partir du sang total présente encore une sensibilité limitée, en raison notamment du faible volume de sang analysable (1-5 mL). La plupart des méthodes d'identification s'appliquent donc après la détection de la croissance bactérienne dans l'hémoculture, voire même à partir de colonies obtenues suite à une nouvelle incubation de 12 à 24h. Seuls les automates ou les méthodes de microbiologie classique permettent d'obtenir une CMI pour un ensemble d'antibiotiques.

L'introduction de la spectrométrie de masse [127], des tests rapides basés sur les acides nucléiques [128] et d'une manière générale de toute méthode permettant une identification précoce d'une bactérie et d'éventuels marqueurs de résistance [129, 130] a eu un impact bénéfique pour les patients. La durée de l'antibiothérapie empirique est raccourcie au profit d'antibiotiques ciblés et efficaces contre le germe identifié. Cela a pour effet de raccourcir les durées de traitement et d'hospitalisation et de réduire la mortalité [127]. La plupart de ces méthodes sont au mieux applicables à partir d'une hémoculture positive, celles s'effectuant à partir de sang total étant encore insuffisamment sensibles et caractérisées. Certaines méthodes comme la spectrométrie de masse nécessitent un investissement financier initial important et la mise à jour régulière de la base de données alors que pour d'autres analyses (PCR), les consommables et les différentes étapes nécessaires à leur emploi constituent des inconvénients. Les calculs de coûts engendrés par l'emploi d'une méthode plutôt qu'une autre peuvent influencer leur utilisation. Quoi qu'il en soit, l'hémoculture demeure pour le moment incontournable dans le diagnostic des bactériémies.

1.3 Les biocapteurs pour la détection de bactéries

1.3.1 Les biocapteurs

1.3.1.1 Définition

Un biocapteur est un outil analytique composé de deux parties indissociables, le bio-récepteur ou sonde de nature biologique ou bio-inspiré d'une part, et le transducteur d'autre part (Figure 1-12) [131]. Ce dernier permet de convertir l'interaction moléculaire entre l'analyte d'intérêt et la sonde disposée à la surface du biocapteur en un signal physiquement mesurable. Trois moyens de transduction, optique, massique et électrochimique sont principalement utilisés. Idéalement, la liaison de la sonde avec sa cible peut être suivie en temps réel, sans marquage. L'ajout de réactifs secondaires parfois employés pour amplifier le signal initial n'est pas souhaitable car il augmente le coût du test. Principalement évoqué dans la littérature scientifique pour la détection de pathogènes alimentaires, l'emploi des biocapteurs est également envisagé en clinique [131]. L'exemple emblématique dans ce domaine est le biocapteur électrochimique à glucose qui permet un suivi régulier de la glycémie. Il représente à lui seul près de 85% du marché des biocapteurs [132]. Néanmoins, un nombre croissant de publications rapporte la détection de bactéries entières par des biocapteurs [131].

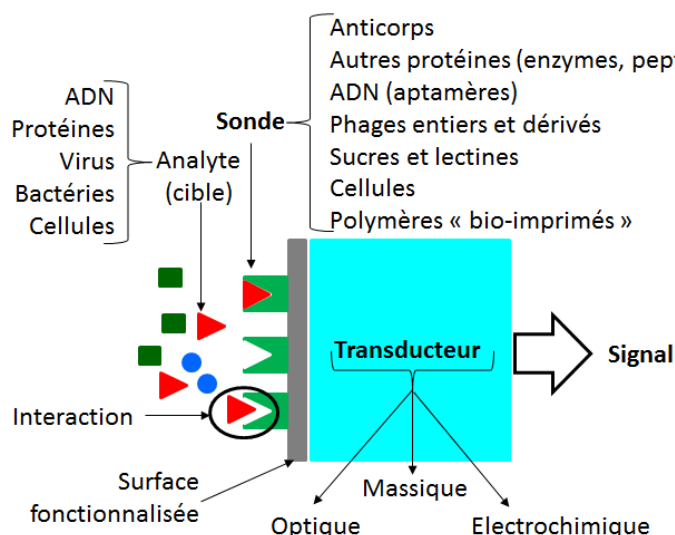


Figure 1-12 : Schéma de principe d'un biocapteur

Les biocapteurs électrochimiques et optiques sont davantage utilisés pour la détection de bactéries que les biocapteurs massiques [131, 132]. Ces derniers, parmi lesquels figurent la microbalance à cristal de quartz (QCM) et les micro-leviers mesurent le changement de fréquence de résonance du dispositif consécutif au dépôt de l'analyte.

La transduction électrochimique peut se décomposer en trois types de mesures : potentiométrique, impédimétrique et ampérométrique. Pour les capteurs impédimétriques, la liaison de l'analyte à sa sonde fixée sur l'électrode de travail modifie la résistance de cette dernière au passage du courant électrique. Ce changement d'impédance, proportionnel au nombre d'analytes fixés, permet le suivi en temps réel et sans marquage des interactions [133]. Cette technique est de loin la plus employée parmi les transducteurs électrochimiques pour la détection directe de bactéries entières. En effet, le principe de fonctionnement des autres méthodes restreint leur usage à cette fin. C'est la présence nécessaire d'une espèce électro-active qui est limitante pour les capteurs ampérométriques [131, 132]. Sous l'action d'une enzyme, elle est oxydée ou réduite au voisinage d'une électrode ce qui

induit un changement de courant. Les capteurs potentiométriques sont quant à eux sensibles à la concentration des ions en solution. L'un des avantages des capteurs massique et électrochimique sur les capteurs optiques est la possibilité de fonctionner dans des solutions aux propriétés optiques changeantes.

Ils ne sont toutefois pas plus épargnés par d'autres effets matrices comme l'adsorption non spécifique de constituants de l'échantillon à leur surface. L'effet de matrice désigne l'influence du milieu dans lequel se trouve l'analyte recherché sur sa détection. Il peut conditionner le choix d'une méthode analytique ou d'une sonde plutôt qu'une autre. Cependant, les capteurs optiques et notamment la SPRi qui opère en temps réel et sans marquage offrent la possibilité d'étudier simultanément de multiples régions d'une surface, fonctionnalisées avec des sondes aux spécificités différentes. Ceci est particulièrement appréciable lorsque plusieurs pathogènes potentiels doivent être recherchés sans connaissance préalable de leur nature. Bien que critiquée pour sa limite de détection encore élevée, de l'ordre de 10^3 UFC.mL⁻¹, et le recours à une instrumentation complexe, des biocapteurs basés sur la SPR ont pourtant pu être miniaturisés au point d'être intégrés dans un téléphone portable et ainsi permettre la détection de bactéries [134, 135]. L'aboutissement de ces travaux sur les biocapteurs pourrait conduire à la réalisation d'analyses rapides « au chevet du patient ». Mais, beaucoup reste encore à faire pour parvenir à un tel dispositif intégrant les analyses effectuées en laboratoire pour diagnostiquer la présence d'un agent infectieux [136, 137].

1.3.1.2 Facteurs influençant les performances d'un biocapteur : Importance des ligands

Un biocapteur, comme tout autre appareil analytique, est caractérisé d'une part par sa sensibilité, matérialisée par sa limite de détection, et d'autre part par sa spécificité, c'est-à-dire sa capacité à différencier des analytes aux structures parfois similaires. Dans le cas des bactéries, il doit donc idéalement permettre de distinguer plusieurs sérotypes au sein d'une même espèce ou plusieurs espèces d'un genre bactérien partageant des motifs membranaires communs. Pour assurer ces deux points essentiels, les sondes choisies ont un rôle de premier plan. Une description plus détaillée d'un certain nombre d'entre elles, dont les anticorps et les aptamères, sera présentée dans les chapitres suivants. Les sondes employées ne se limitent cependant pas à ces deux molécules, puisque des phages entiers et des protéines phagiques, responsables de la reconnaissance de la bactérie hôte ont été utilisés pour la détection de bactéries à l'aide de biocapteurs [138-140]. La présence de sucres à la surface des bactéries a donné l'idée de recourir à des lectines pour les détecter [141, 142] et inversement [143]. Le choix des ligands est encore largement inspiré de la nature, mais des ligands synthétiques émergent progressivement [144]. Combiné à la capacité de rechercher les plus affins pour une cible donnée parmi de vastes collections, une multitude de ligands paraissent potentiellement utilisables pour la détection de bactéries. Les conditions d'utilisation (pH, température, milieu...) qui peuvent altérer leurs capacités sont à prendre en considération.

Une fois choisi, le ligand doit être déposé à la surface du biocapteur. Il peut y être simplement adsorbé, déposé dans une monocouche, auto-assemblée ou polymérisée, dans laquelle il forme des liaisons covalentes soit maintenu à la surface grâce à l'affinité d'une protéine pour une autre [131, 145]. La surface peut par exemple être recouverte de protéines telles que l'avidine [146, 147] ou les protéines A ou G, permettant respectivement la liaison affine du ligand auquel est fixée une biotine ou d'un anticorps par sa portion constante. Bien qu'étant la plus simple à mettre en œuvre, l'adsorption non spécifique est moins reproductible que les deux autres méthodes qui aboutissent généralement à de meilleures performances du capteur [145]. La densité de greffage des biomolécules et leur maintien à la surface tout au long de l'emploi du biocapteur explique en partie ce résultat. De plus, dans le cas de sondes comme les anticorps qui possèdent un site actif,

l'orientation de la molécule à la surface peut avoir une influence sur les performances du capteur. La fonctionnalisation d'une surface avec les protéines A ou G permet par exemple de fixer tous les anticorps par leur partie constante [148-150].

Après avoir choisi la sonde et sa technique d'immobilisation, d'autres éléments conditionnent les performances d'un biocapteur. Certains sont inhérents au mode de transduction choisi, mais d'autres sont communs. C'est le cas notamment du transport de l'analyte d'intérêt, ici les bactéries, vers la surface fonctionnalisée [151]. Contrairement à une biomolécule inerte, certaines bactéries sont mobiles ce qui peut contribuer à leur rencontre avec les sondes. Pour la faciliter, beaucoup de biocapteurs opèrent par injection de l'échantillon dans des canaux fluidiques. Mais la création de forces de cisaillement, peut perturber la liaison de la sonde avec sa cible si elles deviennent trop importantes, limitant ainsi le débit maximal employable [151, 152]. Si le volume de l'échantillon est supérieur au millilitre, le temps nécessaire à l'analyse peut alors devenir non négligeable. À l'inverse, un débit trop faible ou en l'absence totale de flux, la diffusion des bactéries vers les sondes peut devenir limitante [152]. Cela peut aussi aboutir à l'adhésion non spécifique de composés issus des matrices complexes dans lesquelles sont recherchées les bactéries. Les phénomènes imputables aux milieux dans lesquels se trouvent les bactéries seront d'ailleurs étudiés au cours de ce travail.

1.3.2 Emploi des biocapteurs pour la détection de pathogènes à l'origine de bactériémies

1.3.2.1 Pour la détection de *S. aureus*

Il existe encore très peu d'exemples dans la littérature de détection de bactéries dans des échantillons sanguins par des biocapteurs. La majorité concerne plutôt la détection de pathogènes alimentaires dont *S. aureus* fait également partie. Dans leurs travaux, Tokel *et al.* parviennent à détecter $3,2 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ d'*E. coli* en PBS [135]. A une concentration cent fois supérieure, la variation d'indice de réfraction est 3,4 fois plus faible dans du fluide issu de dialyse péritonéale que dans du PBS, illustrant l'effet de l'échantillon sur la sensibilité de l'analyse. Le contrôle employé pour prouver la spécificité est en revanche insuffisant. Alors que tout au long du développement, *E. coli* est utilisée comme modèle avec un anticorps la reconnaissant, elle devient le contrôle négatif pour démontrer la spécificité du dispositif. Les auteurs ont alors recours à un second anticorps dirigé cette fois contre *S. aureus*. L'injection de *S. aureus* à la surface du biocapteur produit bien un signal contrairement à celle d'*E. coli*. Mais, l'expérience inverse, c'est-à-dire au cours de laquelle les auteurs auraient cherché à détecter spécifiquement *E. coli* en employant *S. aureus* comme contrôle négatif n'est pas présentée. Elle aurait sans doute été plus problématique et il n'est jamais fait mention de la protéine A. Cette omission aux conséquences pourtant non négligeables comme cela sera présenté, est fréquente lorsqu'il s'agit de la détection de *S. aureus* par des anticorps (IgG), pour lesquels la protéine A possède une affinité pour le fragment constant d'une majeure partie d'entre eux.

Tableau 1-2 : Mise en œuvre des biocapteurs pour la détection de *S. aureus* entier

Technique	Sonde	Échantillon	Limite de détection (UFC.mL ⁻¹)	Volume analysé et/ou débit	Références
SPR	Anticorps	PBS et fluide issu de dialyse péritonéale	$3,2 \times 10^5$ (PBS) pour <i>E. coli</i>	100 μ L débit 5 μ L.min ⁻¹	[135]
SPR	Phage	PBS	$10^3 - 10^4$	100 - 111 μ L.min ⁻¹	[139, 140]
Impédimétrique	Anticorps	PBS	$10^8 - 10^9$	10 μ L	[153]
Potentiométrique	Aptamère	PBS	8×10^2 ou 10^{7a}	500 μ L	[154]

^alimite de détection donnée respectivement pour l'immobilisation covalente et non covalente de l'aptamère.

Après une modification initiale de l'impédance due à la liaison de *S. aureus* à son anticorps, un prolongement de l'incubation en présence d'antibiotique permet de différencier les souches sensibles et résistantes qui en continuant de se multiplier augmentent l'impédance de la solution [153]. Une approche indirecte pour la détection de *S. aureus* dans le sang de patients bactériémiques est basée sur la détection de l'activité d'une enzyme staphylococcique, la nucléase micrococcace. En clivant une sonde nucléotidique elle révèle sa présence [155]. Ce travail est mentionné ici comme exemple pour rappeler que d'autres méthodes que les biocapteurs sont envisagées pour le diagnostic des bactériémies [155]. Mais aucune méthode n'est suffisamment sensible pour réaliser une détection directe à partir de sang comme l'illustre le Tableau 1-2.

1.3.2.2 Concentration des microorganismes

Face à ce constat, la possibilité de concentrer suffisamment les microorganismes à partir de sang total pour parvenir à la limite de détection d'une technique d'analyse quelle qu'elle soit a été étudiée. Dans l'hypothèse où des analyses microbiologiques classiques comme l'antibiogramme devraient être conduites sur les microorganismes, leur viabilité ne doit pas être altérée lors de la concentration. Dans leurs travaux, Bisceglia *et al.* obtiennent grâce à l'application d'un champ électrique un taux de capture et de survie de 97% pour *E. coli* dans le sang humain [156]. Mais, malgré la possibilité soulignée par les auteurs d'effectuer la concentration dans une multitude de canaux microfluidiques en parallèles, le débit employé de 18 μ L.h⁻¹ est pour l'heure trop faible pour être appliqué au volume d'un échantillon réel [156]. Sur le même principe, Cheng *et al.* parviennent à concentrer des bactéries à partir d'un échantillon de 50 μ L devant au minimum contenir 5×10^3 UFC.mL⁻¹ [157]. A cette condition, les auteurs parviennent à identifier les bactéries concentrées par spectrométrie RAMAN [157]. Des particules magnétiques fonctionnalisées avec de la vancomycine ont aussi été utilisées pour concentrer et précipiter les bactéries, préalablement à cette analyse compatible avec le sang total [158]. Mais la récupération dans un millilitre d'eau de seulement 30% d'une suspension bactérienne à 10^2 UFC.mL⁻¹ montre avec les deux exemples précédents que le volume à analyser encore une fois imposé par la faible charge bactérienne initiale est l'une des principales difficultés à surmonter pour ces approches. De plus, les concentrations effectivement employées, entre 10^2 et 10^4 UFC.mL⁻¹, nécessitent une préculture [156, 157]. Dans leur étude, Boardman *et al.* parviennent à récupérer des bactéries viables dans plus de 70% des échantillons composés de dix millilitres de sang artificiellement contaminés avec 3 UFC.mL⁻¹. Les auteurs suivent un protocole de lyse des cellules sanguines et de centrifugations successives,

compatible avec l'analyse par PCR en temps réel [159]. Des protocoles similaires à l'issue de l'hémoculture ont été proposés [103]. Compte tenu du temps requis, relativement court, pour qu'une hémoculture devienne positive, la concentration de microorganismes à partir de sang total et l'identification qui suivra doivent être fiables et rapides pour apporter une réelle plus-value.

1.4 Objectifs de la thèse : vers un raccourcissement du temps nécessaire à l'identification

La présence de bactéries viables dans le sang peut donc dans certaines circonstances aboutir au sepsis, diagnostic qui engage alors le pronostic vital du patient. L'identification du pathogène en cause, nécessaire au diagnostic, repose sur l'hémoculture qui reste une première étape indispensable. En plus de confirmer la présence anormale dans le sang d'un microorganisme en détectant sa croissance, elle permet sa multiplication et fournit une quantité de biomasse conséquente pour les tests à suivre. C'est en effet la très faible charge bactérienne du sang, souvent inférieure à 1 UFC.mL⁻¹, qui rend l'analyse directe extrêmement difficile et impose de fait la mise en culture d'au moins 20 à 30 millilitres de sang répartis dans plusieurs bouteilles d'hémoculture. La nature complexe du sang ainsi que le volume nécessaire à la recherche de bactéries, ajoutés aux risques d'introduire des contaminants ou d'éliminer les quelques bactéries présentes, n'encouragent pas les essais de concentration des microorganismes à partir du sang total. Elle est néanmoins pratiquée pour les méthodes de détections basées sur les acides nucléiques qui ne requièrent pas de bactéries viables. Leur sensibilité reste insuffisante pour remplacer l'hémoculture, qui doit alors être réalisée simultanément. Ces tests peuvent toutefois s'avérer utiles dans le cas de microorganismes difficilement cultivables.

Les autres méthodes employées pour l'identification du microorganisme débutent au mieux immédiatement après l'hémoculture et parfois après 12 à 24h supplémentaires, nécessaires à l'isolement sur gélose des bactéries. Deux à cinq jours sont ainsi requis pour l'obtention de l'identification et de l'antibiogramme complet d'un microorganisme par les automates, information qui permet ensuite d'adapter le traitement. Ce délai dans l'identification est au détriment du patient qui, dès le prélèvement sanguin effectué, reçoit un traitement antibiotique à large spectre sensé être efficace contre la plupart des bactéries pouvant être la cause de l'infection. Ce traitement peut pourtant se révéler inefficace notamment lorsque des bactéries résistantes aux antibiotiques sont impliquées. Or, il a été montré que le temps nécessaire à la prescription d'un traitement antibiotique adapté influe sur la survie des patients souffrant de sepsis et augmente les coûts liés à l'hospitalisation [30, 54, 160, 161]. De plus, l'emploi inadapté de ces antibiotiques peut, à plus grande échelle, favoriser l'acquisition et la propagation de gènes de résistances dans les populations bactériennes. Le contexte actuel est extrêmement alarmant, avec l'apparition sporadique chez certaines espèces de souches résistantes à tous les antibiotiques connus. Afin d'éviter la multiplication de ces impasses thérapeutiques alors même que peu de nouveaux antibiotiques sont mis sur le marché, l'emploi inutile d'antibiotiques de seconde ligne doit être réduit. Il faut pour cela raccourcir le temps nécessaire à l'identification des bactéries en la combinant si possible avec la réalisation de l'antibiogramme.

Les biocapteurs ont un rôle à jouer dans ces recherches puisqu'ils pourraient à terme effectuer les analyses au chevet du patient. Cependant, il y en a encore peu d'exemples de leur mise en œuvre, même expérimentale, pour l'identification de pathogènes dans le sang total. Et bien que l'hémoculture soit incontournable, il n'existe pas à notre connaissance de dispositifs permettant une identification au cours de cette phase, ce qui représenterait pourtant un gain de temps conséquent. L'objet du travail

effectué au cours de cette thèse est donc d'évaluer la faisabilité d'une identification lors de la phase d'hémoculture, afin de raccourcir le temps nécessaire au diagnostic. Ainsi, alors que les tendances actuelles tendent à l'analyse de petits volumes d'échantillons, l'un des enjeux analytiques de cette application est de détecter les microorganismes dans plusieurs dizaines de millilitres de milieu complexe, constitué de sang et du milieu d'hémoculture.

La technique de détection employée est l'imagerie par résonance plasmonique de surface (SPR_i). Elle permet de suivre en temps réel et sans marquage les interactions entre un analyte et son ligand déposé dans des plots localisés. A condition de disposer des sondes adéquates, elle permettrait donc une identification précoce des principaux pathogènes à l'origine de bactériémie. Après avoir évalué certains ligands potentiels pour fonctionnaliser la surface du biocapteur, ceux retenus seront mis en œuvre pour la détection en sérum et sang total dilués dans les milieux d'hémoculture. Une attention particulière sera portée à la détection de *S. aureus*. Cette « hémoculture sur puce », dont le principe a déjà été employé pour la détection de bactéries dans les matrices alimentaires, est généralisable à d'autres types d'échantillons cliniques. Étant une méthode non destructrice qui permet la croissance des bactéries, cette approche serait compatible avec les analyses actuelles.

2 Chapitre 2 :

Détection de bactéries par SPRi et recherche de ligands

2.1 Principe de la méthode de détection par SPR

2.1.1 Le phénomène de résonance plasmonique de surface

La première observation du phénomène de résonance plasmonique de surface remonte à 1902. Sans pouvoir alors en déterminer l'origine, R.W. Wood constata de fortes variations dans l'intensité de la lumière réfléchie, matérialisées par des bandes noires dans le spectre de diffraction, alors qu'il éclairait un réseau de diffraction métallique avec de la lumière blanche [162]. Simultanément, en 1968, A. Otto [163] d'une part, et E. Kretschmann et H. Raether [164] d'autre part, démontraient que l'observation effectuée par Wood était due à l'excitation des plasmons de surface du métal par la lumière ayant pour conséquence une atténuation de l'intensité de la lumière réfléchie. Ces travaux constituent le point de départ de l'exploitation du phénomène de résonance plasmonique de surface pour différents usages comme les biocapteurs [165]. Ces progrès ont été rendus possibles par la combinaison de plusieurs champs de compétences scientifiques à commencer par l'optique, mais également la chimie de surface qui permet de greffer des molécules à la surface des capteurs. En 1990, la société suédoise Biacore, leader mondial des instruments SPR, commercialisait son premier modèle d'instrument SPR dédié à l'étude des interactions entre biomolécules, « BIA » signifiant littéralement « *biomolecular interaction analysis* »⁶. Le fonctionnement de ce dispositif est basé sur le principe détaillé dans la suite de cette partie.

La génération de plasmons de surface se produit à l'interface entre deux milieux de permittivité opposée (Figure 2-1). La surface du métal doit être riche en électrons libres et bien que plusieurs métaux répondent à ce critère, l'or est le matériau de prédilection notamment en raison de sa résistance à l'oxydation et à la disponibilité de techniques de greffage pour des biomolécules. L'épaisseur de la couche métallique est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres de sorte que le faisceau de lumière puisse la traverser [166-168].

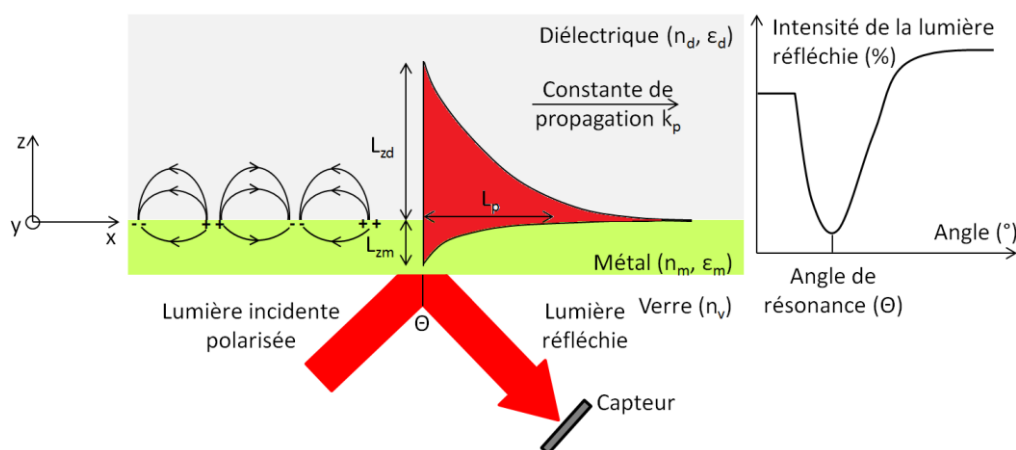


Figure 2-1: Propagation d'une onde plasmonique de surface à l'interface entre un métal et un diélectrique de permittivités ϵ de signes opposés. Sous l'effet de la lumière incidente, l'oscillation des charges à la surface du métal donne naissance à l'onde plasmonique de surface qui se propage selon les axes x et z . Les longueurs de pénétration de l'onde dans le métal et le diélectrique sont différentes avec ($L_{zd} > L_{zm}$). La courbe de droite représente la variation de l'intensité de la lumière réfléchie en fonction de l'angle d'incidence, intensité qui atteint un minimum au niveau de l'angle de résonance.

⁶ Biacore. Biacore Life Sciences. [En ligne], consulté le 23 février 2016.

Disponible sur :< <https://www.biacore.com/lifesciences/index.html> >

Comme représenté sur la Figure 2-1, lorsque la surface du métal est éclairée par une source de lumière monochromatique et polarisée, dans les conditions de réflexion interne totale définies par Otto et Kretschmann, la totalité de la lumière incidente est réfléchi. A un angle d'incidence particulier, appelé angle de résonance, les photons de la lumière entrent en résonance avec les électrons du métal donnant naissance à la surface à une onde plasmonique (d'où l'appellation de « résonance plasmonique de surface »). L'onde évanescente ainsi créée se propage alors à l'interface entre le métal et le milieu diélectrique avec une amplitude qui décroît exponentiellement avec la distance à la surface. En milieu liquide, la pénétration de cette onde est de l'ordre de 100 à 200 nm [152]. La valeur de l'angle de résonance dépend de plusieurs paramètres à commencer par les indices de réfraction des milieux placés de part et d'autre de la surface d'or, l'épaisseur même de cette surface et la température du milieu. Deux configurations dites d'Otto et de Kretschmann permettent l'excitation des plasmons de surface. Dans la configuration d'Otto, le milieu diélectrique est placé entre la couche d'or et un prisme de verre ce qui limite son application pour les biocapteurs. En revanche, dans la configuration de Kretschmann dont il sera uniquement question par la suite, le milieu diélectrique est au-dessus de la couche d'or elle-même déposée sur un prisme de verre (Figure 2-2)

Les conditions de réflexion interne totale, nécessaires au phénomène de SPR, peuvent être obtenues par l'emploi d'un prisme de verre d'indice de réfraction élevé sur lequel une fine épaisseur d'or est déposée. L'onde évanescente qui se propage dans le milieu diélectrique est extrêmement sensible à toute modification de l'indice optique au voisinage de la surface. Ainsi, dans la limite de pénétration de l'onde évanescente dans le milieu, l'interaction d'un analyte avec une sonde greffée à la surface sera mesurable car elle modifiera les conditions de propagation de l'onde évanescente. De ce fait, la configuration de Kretschmann est largement exploitée pour la SPR_i [169-171].

2.1.2 Les apports du mode imagerie en SPR (SPRI)

Un schéma de principe de la configuration de Kretschmann utilisée en SPR_i est présenté sur la Figure 2-2.

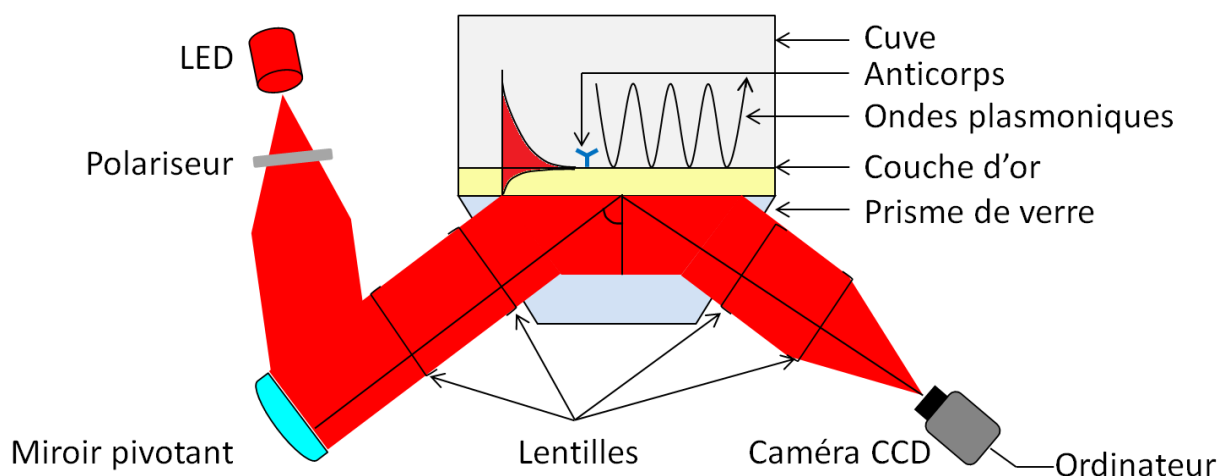


Figure 2-2 : Principe d'un imageur SPR basé sur la configuration de Kretschmann (couplage par prisme).

L'image de « balance optique » est parfois utilisée pour décrire la SPR. Cette comparaison trouve son fondement dans le fait que tout dépôt à la surface est détecté car il modifie localement l'indice de réfraction du milieu et donc la propagation de l'onde plasmonique de surface. L'indice de réfraction, proche de 1,33 pour une solution aqueuse, est en effet dépendant de la concentration des espèces

en solution. Elle peut être modifiée localement, par exemple, au niveau d'un ligand greffé à la surface auquel se fixe l'une des espèces présentes en solution, modifiant ainsi l'indice de réfraction. Ce changement entraîne le décalage de l'angle de résonance comme représenté sur la Figure 2-3. Au-delà de l'angle de résonance, la variation de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence est quasi-linéaire. C'est dans cette zone que l'angle de travail est fixé pour toute la durée de l'acquisition. L'intensité de la lumière réfléchie pour cet angle est mesurée en continu. Lorsque se produit l'interaction, l'intensité de la lumière réfléchie est modifiée par rapport à l'état initial. C'est l'évolution de cette différence de réflectivité par rapport à la réflectivité mesurée avant le début de l'acquisition qui est représentée au cours du temps. Ce mode de mesure à angle et longueur d'onde fixes a été employé tout au long de cette thèse. Mais, il est aussi possible d'effectuer l'acquisition en réalisant des balayages angulaires successifs, permettant ainsi de suivre le décalage de l'angle de résonance suite aux interactions.

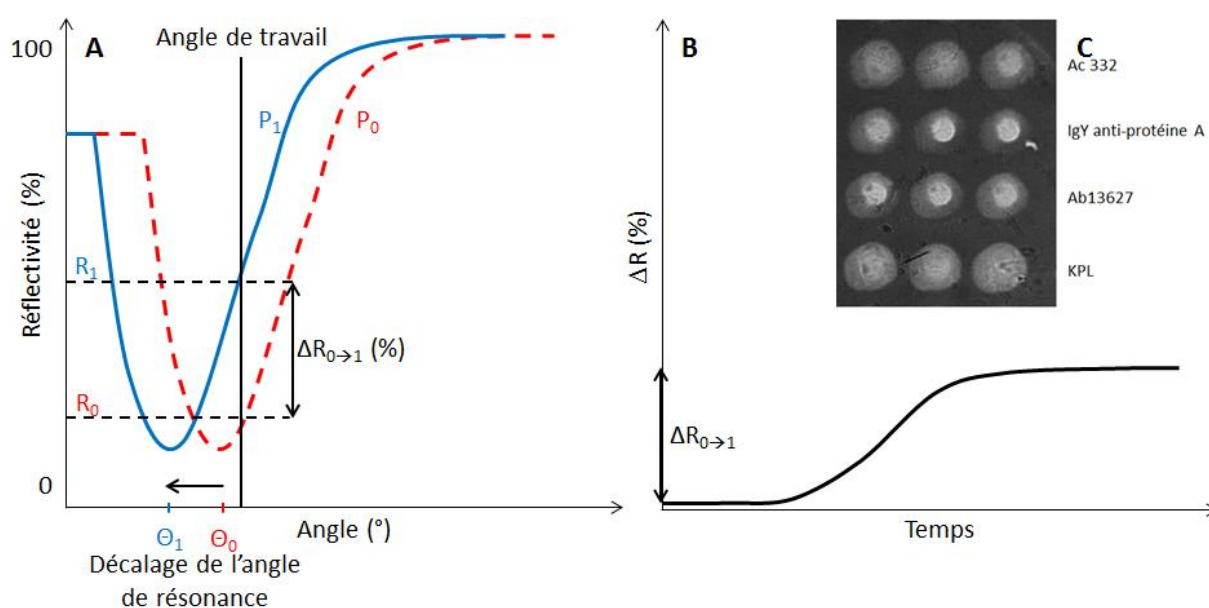


Figure 2-3 : A.) Décalage de l'angle de résonance consécutif à une interaction à la surface du métal. Pour une mesure effectuée à angle de travail fixe, matérialisé ici par une droite verticale, ce décalage se traduit par une réflectivité R_1 supérieure à la réflectivité initiale R_0 . B.) La mesure en continu et en temps réel de ces modifications permet d'obtenir des cinétiques de variations de la réflectivité (ΔR) en fonction du temps. C.) Exemple de dépôts inhomogènes.

Les premiers appareils SPR offraient seulement la possibilité de mesurer l'interaction entre une surface fonctionnalisée par une unique sonde et différents analytes injectés successivement. Les progrès de la chimie de surface permettant de déposer différentes biomolécules dans des plots isolés ont accompagné le développement de l'imagerie SPR levant cette limitation. Les interactions sont visualisables en temps réel au travers d'une caméra CCD (« *charge coupled device* ») qui permet de mesurer simultanément l'intensité de la lumière réfléchie et d'observer la surface du prisme [172]. La vue de la surface permet de définir des zones d'intérêt individualisées, généralement formées par les dépôts comme sur la Figure 2-3, où sera mesurée la variation de réflectivité au cours du temps. Pour l'ensemble des zones d'intérêts définies, un seul angle de travail peut être choisi ce qui implique que les dépôts doivent être homogènes. Dans le cas contraire comme sur l'image « C » de la Figure 2-3, la plage de réponse correspondant à la variation de réflectivité maximale pouvant être mesurée peut être très variable entre les dépôts. Par exemple, sur la Figure 2-3, si P_0 et P_1 sont maintenant les courbes plasmons de deux espèces différentes, la variation maximale de réflectivité pouvant être

atteinte pour P_0 est nettement supérieure à P_1 . Une variation de réflectivité plus importante pour une espèce donnée doit donc toujours être interprétée en prêtant attention à l'homogénéité des dépôts. L'imagerie permet d'effectuer un contrôle visuel des dépôts et de détecter toute anomalie à la surface lors de l'analyse (bulle, biofilm). L'acquisition conjointe des cinétiques et des images permet si besoin d'analyser ces dernières après l'expérience avec des logiciels dédiés. L'imagerie SPR complète donc idéalement les propriétés de la SPR classique en permettant l'analyse sans marquage et en temps réel des interactions survenant sur les dépôts de différentes sondes greffées sur la surface (multiplexage). Les limitations de la SPRi sont notamment liées à la résolution optique, au transfert de l'analyte vers la surface où il devra être détecté par des sondes adaptées [152, 173]. Ce dernier point sera approfondi au cours des prochaines parties.

2.1.3 Emploi de la SPR pour la détection de bactéries

2.1.3.1 Choix des ligands pour la détection de bactéries

La surface d'or non fonctionnalisée est en principe non sélective pour les bactéries. Afin d'exploiter au mieux les propriétés de la SPRi, des sondes plus ou moins sélectives doivent être disposées à la surface pour permettre d'identifier les bactéries présentes. Dans le cadre des bactériémies, les sondes choisies doivent permettre en premier lieu de déceler la présence d'une bactérie dans l'échantillon, révélant ainsi l'infection, et ensuite de l'identifier aussi précisément que possible. Comme évoqué dans le chapitre précédent, des ligands de différentes natures ont été employés sur des biocapteurs pour la détection de bactéries [144]. Même si les ligands qui offrent un éventail de motifs reconnus aussi large que les anticorps sont rares, certains comme les aptamères semblent pouvoir rivaliser. Ils ont donc été évalués au cours de ce travail comme sondes potentielles pour la détection de bactéries avec d'autres molécules. Comme les performances des ligands alternatifs sont souvent comparées à celles des anticorps qui restent pour beaucoup une sonde de référence, y compris dans notre laboratoire où les travaux portant sur la détection de *S. Enteritidis* et *E. coli* O157:H7 ont recours aux anticorps [174, 175], une description des conditions d'obtention des anticorps est proposée ci-dessous. Elle sera également utile lors de l'interprétation des résultats obtenus dans les échantillons sanguins où sont présents des anticorps circulants.

2.1.3.2 Les anticorps et la réponse immunitaire

Véritables effecteurs de l'immunité humorale, les anticorps forment avec leurs antigènes des complexes immuns activant la voie classique du complément. Ils favorisent également l'élimination par phagocytose de l'antigène auquel ils se fixent grâce aux interactions entre leur fragment constant (Fc) et certaines cellules immunitaires. Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines constituées de quatre chaînes polypeptidiques reliées entre elles par un ensemble de liaisons covalentes (pont disulfure) et non covalentes (Figure 2-4).

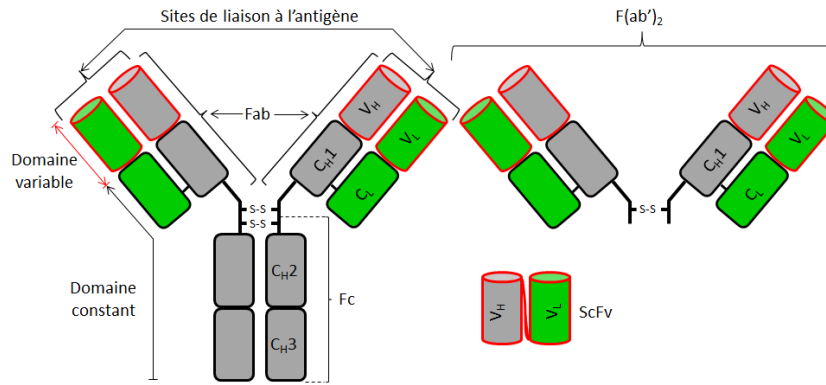


Figure 2-4 : Schéma simplifié d'une IgG constituée de deux chaînes lourdes (en gris, « H » pour *Heavy*) reliées entre elles par des ponts disulfure, et deux chaînes légères (en vert, « L » pour *Light*) elles-mêmes reliées aux chaînes lourdes par un pont disulfure. Principaux fragments pouvant être obtenus à partir d'un anticorps : Fc, Fab, F(ab')₂ et ScFv d'après Byrne *et al.* [176].

Il existe chez les mammifères cinq classes d'anticorps, IgG (70-75%), IgM (10%), IgA (15%), IgD (>1%) et IgE (>1%), les pourcentages entre parenthèses indiquant leur proportion relative dans le sérum. La constante d'affinité, K_a ($=1/K_d$), de ces molécules pour leur antigène varie de 10^4 à 10^{11} M^{-1} [177]. Ces molécules diffèrent par le type de chaîne lourde qui les constitue et elles sont retrouvées en des temps et des lieux différents de la réponse immunitaire. Ainsi, les IgM et les IgD constituent les récepteurs membranaires des lymphocytes B naïfs. Lorsqu'un antigène est introduit dans l'organisme, des motifs à sa surface sont reconnus par certains lymphocytes B naïfs présents dans le répertoire immunitaire de l'hôte et dont les récepteurs membranaires ont une affinité pour l'antigène. Cette reconnaissance provoque l'activation de ces lymphocytes et leur multiplication appelée expansion clonale. Les lymphocytes B peuvent ensuite se différencier en plusieurs types cellulaires à commencer par les plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps. Lors du premier contact avec un antigène, les plasmocytes sécrètent principalement des IgM ayant la même affinité et spécificité que les IgM membranaires du lymphocyte B activé. Cependant, certains des lymphocytes B activés subissent un phénomène de commutation isotypique qui les conduira à synthétiser des IgG, IgA ou IgE plutôt que des IgM. L'affinité pour l'antigène n'est en revanche pas modifiée puisque les modifications isotypiques concernent la région constante des chaînes peptidiques. Les lymphocytes exprimant des IgG sont alors soumis par l'organisme à une nouvelle sélection appelée maturation d'affinité. Ils migrent tout d'abord dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) où se forme un complexe germinatif dans lequel les lymphocytes B activés se multiplient rapidement. Cette multiplication s'accompagne de mutations ponctuelles dans la séquence des gènes codants pour la région variable des anticorps. Une nouvelle population de lymphocytes B présentant une affinité hétérogène pour l'antigène est ainsi créée. Pendant ce processus, l'antigène a été au moins en partie neutralisé par le système immunitaire. Des cellules présentatrices d'antigène, dites cellules dendritiques folliculaires, exposent l'antigène aux lymphocytes B du centre germinatif. Seuls ceux ayant la capacité de se lier à l'antigène seront conservés, les autres étant éliminés par apoptose. Les lymphocytes ayant la meilleure affinité pour l'antigène sont alors conservés par l'organisme sous forme de lymphocytes B mémoire. Leur rôle est particulièrement important lors du renouvellement de l'exposition à l'antigène, puisqu'il contribue à ce que la réponse immunitaire soit à la fois plus rapide, plus intense et plus spécifique. En effet, lors de cette réponse secondaire, les plasmocytes sont produits à partir de ces lymphocytes B mémoire. Le nombre d'anticorps spécifiques, et notamment d'IgG, dans le sang augmente alors rapidement et plus durablement.

2.1.3.3 *Production et purification d'anticorps*

La production induite d'anticorps exploite la réponse immunitaire d'un hôte à l'introduction d'un corps étranger. La plupart des anticorps sont produits chez la souris, le rat, la chèvre ou le mouton, des critères de choix variés pouvant intervenir. Les IgG majoritaires dans le sang constituent de fait une part importante des anticorps disponibles commercialement. Les anticorps monoclonaux vendus sont presque toujours des IgG en raison de leur affinité et spécificité supérieure aux IgM. Les IgG se divisent encore en quatre sous – classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4), la numérotation correspondant à l'ordre décroissant dans lequel elles sont retrouvées dans le sang. Des différences structurales et fonctionnelles existent entre ces molécules notamment au niveau des ponts disulfures reliant les chaînes lourdes. Leur masse molaire est d'environ 150 kDa. Chaque animal subit des injections successives de l'antigène qui peut être une suspension de bactéries inactivées, une protéine... La plupart des antigènes arborent plusieurs motifs immunogènes pouvant être reconnus par les anticorps, ce sont les épitopes. À l'issue du protocole d'immunisation, le sang de l'hôte contient entre 2 et 5% d'anticorps spécifiques, majoritairement des IgG. La réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène identique varie entre individus d'une même espèce. La part aléatoire du processus de maturation d'affinité aboutit à la production de plasmocytes par l'organisme qui ne peuvent pas être rigoureusement identiques entre deux individus. Les anticorps présents dans le sang sont produits par l'ensemble des plasmocytes actifs d'un organisme. Ils constituent un mélange polyclonal contenant plusieurs classes et isotypes d'anticorps, spécifiques ou non de l'antigène utilisé. Plusieurs épitopes de l'antigène peuvent être reconnus, chacun par des anticorps différents contenus dans ce mélange. Par opposition, les anticorps dits monoclonaux reconnaissent un seul épitope de l'antigène. Leur production est plus longue et laborieuse que celle d'un mélange d'anticorps polyclonaux (1 à 2 mois contre au moins 6 mois pour des anticorps monoclonaux). Elle débute elle aussi par l'immunisation de l'animal. Alors que pour un mélange d'anticorps polyclonaux, une ou plusieurs étapes de purification des anticorps à partir du sang clôturent la production, celle des anticorps monoclonaux se poursuit. Les plasmocytes sont extraits à partir de la rate puis fusionnés avec une cellule immortelle (myélome) formant un hybridome. Il conserve les propriétés des deux cellules mères qui sont la production d'anticorps d'une part, et la multiplication rapide et durable d'autre part. Chaque hybridome produit un anticorps monoclonal dont l'affinité pour l'antigène est évaluée. Les hybridomes produisant les anticorps d'intérêts sont alors conservés durablement. Ils peuvent ensuite être cultivés en milieu liquide dans lequel ils excrètent leurs anticorps, ou être injectés dans la cavité péritonéale d'un animal, les anticorps s'y accumulant alors jusqu'au drainage de ce liquide d'ascite. Cette seconde méthode permet d'obtenir des titres d'anticorps plus élevés que la première.

Qu'ils s'agissent d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, ils peuvent être séparés des protéines avec lesquels ils sont en solution par chromatographie d'affinité avec des protéines bactériennes (A, G, L) ayant une forte affinité pour leur fragment Fc. Si l'immunisation a été effectuée avec une protéine comme antigène, il est souhaitable surtout pour un mélange d'anticorps polyclonal d'effectuer une autre chromatographie d'affinité contre cette protéine, puis d'éluer les IgG affins, pour augmenter la spécificité du mélange.

2.1.3.4 *Anticorps autres que les IgG*

La production d'anticorps chez d'autres espèces animales est parfois évoquée dans la littérature scientifique. Les « *nanobodies* » dérivés des anticorps produits chez les camélidés ont la particularité d'avoir un site de liaison unique à l'antigène [178]. Nous reviendrons également plus en détail par la

suite sur les anticorps produits chez les oiseaux. L'obtention de fragments d'anticorps peut-être réalisée par digestion d'immunoglobulines ou par criblage d'une banque de phages exprimant à leur surface les fragments Fab ou plus fréquemment ScFv (*Single chain variable fragment*) [179]. Ce fragment recombinant de 25 kDa est constitué seulement des régions variables des anticorps (domaines V_H et V_L). En pratique, l'ARN messager de ces régions est cloné à partir du répertoire des lymphocytes B naïfs ou mémoires puis amplifié par PCR inverse (RT-PCR) et introduit dans le génome phagique. Des mutations aléatoires peuvent y être introduites afin d'augmenter encore la diversité de la bibliothèque [180]. Les fragments ScFv sont ensuite exposés à la surface du phage en étant fusionnés à des protéines de surface. Cette bibliothèque comporte jusqu'à 10¹⁰ à 10¹² particules phagiques différentes. Mis en présence des antigènes d'intérêts fixés sur une surface, les phages exprimant des fragments ayant une affinité pour l'antigène s'y fixent, les autres étant élués. Les phages fixés représentent généralement 1/10⁸ – 1/10⁷ de la population initiale [181]. Ces phages sélectionnés sont amplifiés chez une bactérie hôte avant qu'une nouvelle sélection soit conduite. En général, trois à quatre cycles de sélection / amplification suffisent pour obtenir des fragments de haute affinité dont il ne reste plus qu'à déterminer les séquences et à les produire [182]. La technique de « *phage display* » imite *in vitro* le processus de sélection naturel des anticorps. Le phage filamenteux M13 et sa bactérie hôte *E. coli* sont le plus souvent utilisés pour cette application. Ainsi, la détection de *L. monocytogenes* par SPR a pu être réalisée après fixation d'un phage exprimant un fragment ScFv spécifique d'un motif bactérien [183]. La sélection d'anticorps par *phage display* n'est cependant pas limitée à la détection de bactéries mais aussi à l'étude des interactions entre protéines et le développement de thérapies basées sur les anticorps [180, 182].

2.1.4 Fonctionnalisation de la biopuce

La méthode de dépôt des anticorps ou d'autres biomolécules sur l'or par électropolymérisation du pyrrole a été développée dans le laboratoire où a été réalisée cette thèse [184, 185]. Elle peut s'appliquer aussi bien pour le dépôt de protéines que de sucres ou d'acides nucléiques [143, 184, 186]. La condition *sine qua non* à son emploi est la présence d'amines primaires sur la molécule à déposer avec lesquelles la molécule de pyrrole – NHS réagit. L'ester activé de pyrrole – NHS est obtenu au préalable selon la méthode décrite dans le brevet de Levy *et al.* développé au laboratoire [185]. Mis en présence de protéines, il réagit sur les fonctions amines primaires libres dans les chaînes latérales formant ainsi un conjugué covalent entre la protéine et le pyrrole (Figure 2-5). Cette réaction de transamidification implique essentiellement la lysine, seul acide aminé porteur d'une amine primaire sur sa chaîne latérale. Afin de diminuer statistiquement le nombre d'acides aminés impliqués dans cette réaction, il est possible de faire varier la proportion de Py – NHS par rapport aux protéines présentes. Ce critère est décrit par la valeur du ratio molaire initial, noté RMI, dont la valeur est fixée à 10 dans le milieu réactionnel pour le dépôt des anticorps.

$$RMI = \frac{[Py - NHS]}{[Anticorps]} \text{ les concentrations étant exprimées en mol. L}^{-1}$$

Pour le dépôt, les anticorps conjugués au Py – NHS sont mis en présence de molécules de pyrrole libres. Sous l'effet d'une différence de potentiel, les monomères de pyrrole forment un film insoluble de polypyrrole déposé sur l'or. Dans ce film de polypyrrole figurent certains des monomères liés aux anticorps qui sont donc fixés à la surface. La chaîne carbonée qui relie le monomère de pyrrole à l'anticorps peut être considérée comme un bras espaceur puisqu'il éloigne ce dernier du film de

polypyrrole formé à la surface. Les protocoles de couplage et d'électropolymérisation sont présentés dans la partie « Matériels et Méthodes » (6.4.5, page 136).

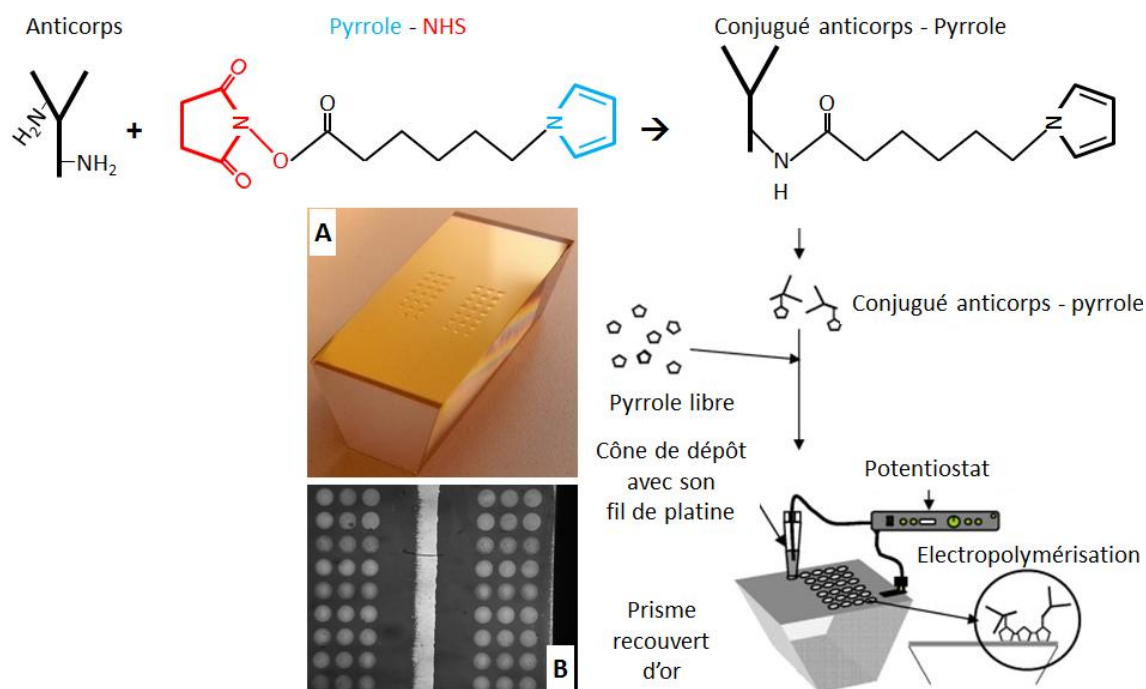


Figure 2-5 : Principe du dépôt des anticorps par électropolymérisation du pyrrole d'après Grosjean *et al.* [186]. A.) Photographie d'un prisme après dépôt des anticorps et B.) Dépôts vus avec la caméra CCD avant le début de l'acquisition.

Comme représenté sur la Figure 2-5, l'orientation des anticorps n'est pas contrôlée. Elle dépend notamment du positionnement de la lysine ayant réagi avec le pyrrole - NHS. Néanmoins, les anticorps ou d'autres protéines demeurent accessibles et fonctionnels à la surface, comme le démontrent les nombreuses expériences de suivi des interactions biomoléculaires par fluorescence et SPRI [175, 186]. La quantité d'anticorps déposée est bien proportionnelle à la concentration en anticorps dans la solution soumise à l'électrochimie [186]. Pour la détection de bactéries, une concentration de 1 μ M de conjugués pyrrole – anticorps représente un bon compromis entre robustesse du signal SPRI et quantité d'anticorps utilisée. C'est donc cette valeur qui est aujourd'hui utilisée au laboratoire [175].

Le diamètre des plots oscille entre 500 μ m à 700 μ m et dépend notamment du diamètre interne du cône de dépôt. La charge nécessaire à l'électropolymérisation influence également l'épaisseur du dépôt généralement voisine de 4 à 6 nm. Les risques de coalescence entre plots sont évités grâce à un espacement de 1 mm. Ainsi, il est théoriquement possible de déposer autant de molécules différentes qu'il y a de plots dans la limite du champ de la caméra, de la résolution spatiale de la SPRI et de la surface de la biopuce (1 cm²). Sur une telle surface entre 60 et 80 plots peuvent aisément être effectués, ce nombre pouvant être considérablement augmenté en réduisant leurs diamètres. En pratique, chaque espèce est généralement déposée en triplicata pour contrôler la reproductibilité des interactions. Cette technique de dépôt permet donc de fonctionnaliser une surface restreinte avec plusieurs biomolécules rendant ainsi possible l'analyse d'échantillons variés avec une même puce.

2.1.5 L'approche Culture – Capture – Mesure

Quelle que soit la nature de l'échantillon analysé ou le dispositif de mesure employé, il existe une limite de détection en-dessous de laquelle il est impossible de détecter la présence de l'analyte recherché. Cela est aussi vrai pour la plupart des analyses microbiologiques. La grande majorité des biocapteurs SPR mis en œuvre pour la détection de bactéries analysent des suspensions bactériennes après que la croissance se soit produite. L'échantillon à analyser est alors injecté au contact de la biopuce fonctionnalisée afin d'observer les interactions qui s'y produisent. Les limites de détection annoncées en détection directe sont le plus souvent de l'ordre de 10^5 à 10^6 UFC.mL⁻¹ [187].

Comme cela a été présenté en introduction, les méthodes d'identification actuelles débutent après une phase de croissance des bactéries destinée à obtenir suffisamment de matériel pour les analyses à suivre. Ainsi, en combinant la croissance des microorganismes à leur identification, le gain de temps est réel. La détection et l'identification sont simultanées puisque l'échantillon est considéré comme contaminé dès lors que des interactions se produisent au niveau des anticorps spécifiques d'une bactérie donnée. En outre, le dépôt de plusieurs anticorps reconnaissant chacun une bactérie différente permet d'effectuer une analyse multiplexe ce que ne permette pas certains biocapteurs SPR dont la surface est fonctionnalisée avec une sonde unique. Cette méthode qualifiée de Culture – Capture – Mesure, (Figure 2-6) a été employée pour la détection de *Salmonella* Enteritidis et *E. coli* O157 : H7 dans des matrices alimentaires. Des niveaux de contaminations initialement inférieurs à 10 UFC.mL⁻¹ ont ainsi pu être détectés en une dizaine d'heures [174, 175]. Dans cette méthode, le temps d'analyse est donc gouverné par le taux de croissance du microorganisme présent puisque plus il sera élevé, plus vite la population atteindra le seuil de détection du capteur.

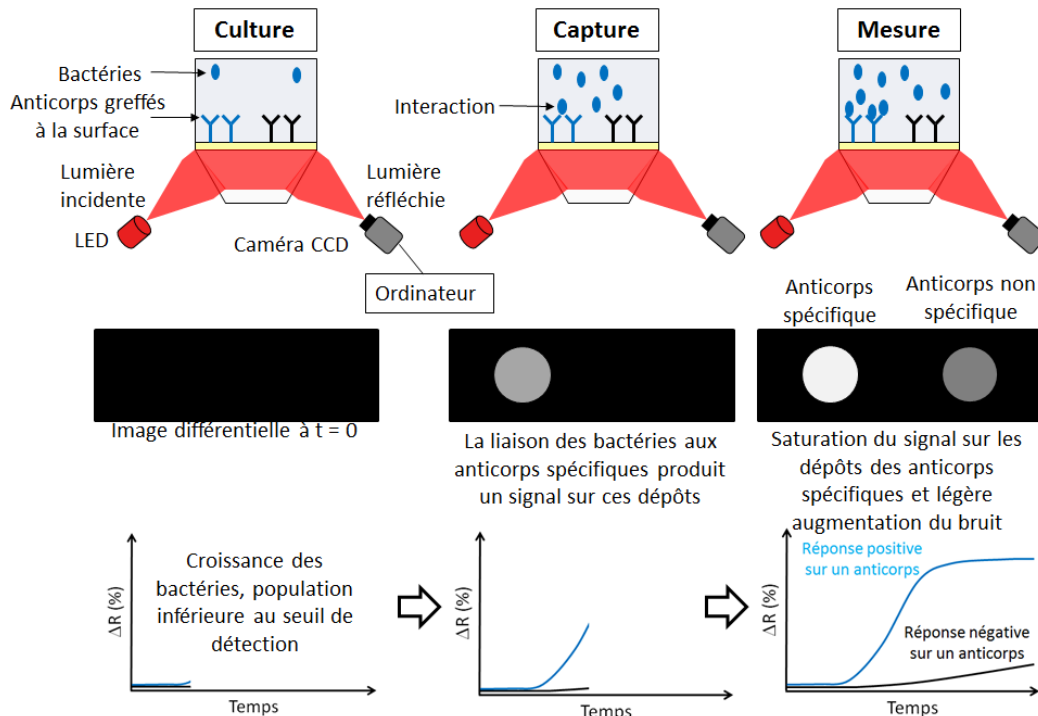


Figure 2-6 : Principe de la méthode Culture – Capture – Mesure développée au laboratoire pour la détection de bactéries par SPRi [174, 175]. Les bactéries initialement présentes en faible nombre dans l'échantillon se multiplient et finissent par interagir avec les anticorps disposés à la surface à condition que certains aient une affinité pour elles. Ces interactions sont visualisées soit sur les images différentielles où une différence des niveaux de gris par rapport aux niveaux initiaux est effectuée, soit sur les cinétiques de variation de réflectivité (ΔR) en fonction du temps.

En pratique, deux types de représentations retrouvées tout au long de ce manuscrit peuvent être utilisées pour exposer les résultats :

- Graphiquement, les cinétiques de variation de réflectivité représentent le niveau de réflectivité moyen d'une zone d'intérêt *i.e.* un dépôt.
- Les images différentielles obtenues par soustraction de l'image de la surface du prisme au début de l'acquisition avec celle à un instant « t ». Elles permettent de mettre en évidence les zones où se produisent les interactions.

Ce sont deux manières complémentaires de présenter les signaux collectés. En effet, la réalisation automatique de moyenne de niveau de gris par le logiciel pour le tracé des cinétiques peut parfois conduire à de mauvaises interprétations si l'interaction au niveau d'un plot ne s'effectue pas de manière homogène d'où l'importance d'analyser les images.

La méthode Culture – Capture - Mesure appliquée directement à l'hémoculture peut donc être extrêmement pertinente si elle parvient à identifier précocement les principaux pathogènes. Étant une méthode non destructive, à l'issue de l'analyse, des prélèvements peuvent être effectués pour compléter et / ou poursuivre l'identification et l'antibiogramme.

2.2 Recherche de sondes alternatives aux anticorps

Des ligands spécifiques des pathogènes ciblés sont donc indispensables à leur identification par SPRI. Si les anticorps sont largement utilisés, d'autres sondes ont également été employées pour la détection de bactéries par des biocapteurs (Figure 2-7).

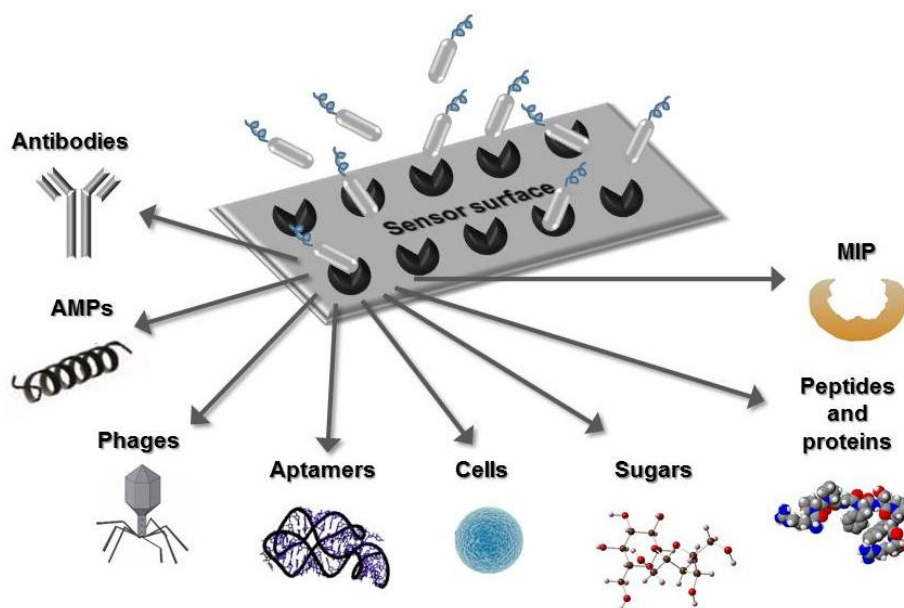


Figure 2-7 : Ligands utilisés pour la détection de bactéries entières à l'aide de biocapteurs. D'après Templier *et al.* [144].

Dans le cadre de ce travail, certaines sondes alternatives ou complémentaires aux anticorps ont donc été testées, à commencer par les aptamères.

2.2.1 Aptamères

2.2.1.1 Généralités

Autrefois perçues comme des molécules inertes simplement porteuses de l'information génétique, certaines séquences oligonucléotidiques d'ARN exercent *in vivo* des activités catalytiques. Par exemple, l'activité de maturation des ARN de transferts par la ribonucléase P, enzyme ubiquitaire du monde vivant est due à la présence d'un ARN catalytique qualifié de ribozyme [188]. Son action est rendue possible par la liaison spécifique de l'ARN à sa cible grâce aux structures secondaires tridimensionnelles qu'il adopte. L'activité catalytique de séquences oligonucléotidiques simple brin *in vivo* a été identifiée seulement pour les ARN. En revanche, la capacité à adopter des structures tridimensionnelles complexes n'est pas réservée aux seuls ARN mais concerne également l'ADN pour lequel des activités catalytiques ont été décrites *in vitro* [189, 190]. La capacité de ces courtes séquences oligonucléotidiques à se lier avec une affinité et une spécificité élevées à divers composés a commencé à être exploitée à partir de 1990 et la mise au point de la méthode SELEX [191, 192]. Cette méthode dont l'acronyme signifie littéralement « *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* » permet de sélectionner quelques séquences simple brin (d'ADN ou d'ARN) reconnaissant une cible donnée dans une grande bibliothèque. Il peut s'agir de protéines, de composés chimiques ou même de bactéries entières comme le montre la Figure 2-8. La sélection de séquences capables de reconnaître des bactéries intègres est particulièrement intéressante car elle garantit que les motifs reconnus sont bien présents et accessibles à la surface des pathogènes vivants. L'emploi de cibles moléculaires isolées (protéines, sucres) est aussi possible à condition d'être bien identifiées. Comme pour la technique de phage display, la méthode SELEX est constituée d'un cycle itératif de trois étapes. Il débute par l'incubation de la collection de séquences dégénérées avec la cible, suivie de l'élimination des séquences non fixées puis de l'élution et de l'amplification par PCR des séquences ayant une affinité pour la cible. De part et d'autre de la séquence variable constituée de 20 à 60 nucléotides, des amorces PCR permettent d'amplifier les aptamères retenus avant de débiter un nouveau cycle. Entre 8 et 15 cycles sont nécessaires pour la sélection de quelques séquences à partir d'une collection en comprenant initialement entre 10^{12} et 10^{15} . Son étendue est théoriquement limitée par le nombre de nucléotides (« n ») de la séquence variable et vaut au maximum 4^n , pour les quatre bases qui peuvent se substituer dans la séquence. Pour des raisons pratiques, la taille de la collection est souvent inférieure à la taille maximale envisageable pour avoir au minimum une copie de chaque séquence. La sélection de quelques séquences à partir d'une bibliothèque peut prendre de quelques jours à plusieurs mois selon la complexité de la cible. Généralement, au fur et à mesure des cycles, la taille du groupe de séquences se réduit. Ainsi, les aptamères entrent en compétition pour se lier à la cible et ceux ayant l'affinité la plus élevée sont sélectionnés. Pour assurer la spécificité des séquences retenues, une ou plusieurs étapes de contre sélection avec d'autres bactéries phylogénétiquement proches de la bactérie ciblée sont réalisées [193, 194]. L'affinité des aptamères retenus est généralement de l'ordre du nanomolaire. Tous facteurs susceptibles d'influencer le repliement de l'aptamère dans la structure tridimensionnelle favorable à la reconnaissance de sa cible peut modifier son affinité. Il s'agit entre autres de la température et de la composition du milieu.

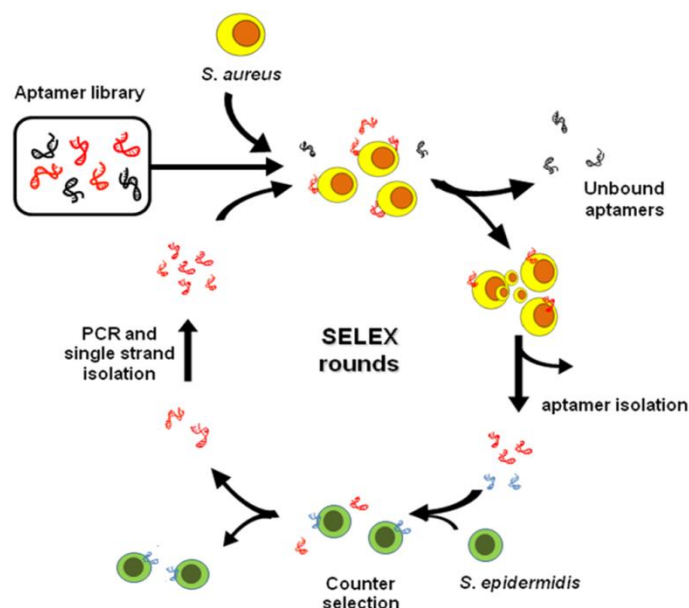


Figure 2-8 : Principe de la méthode SELEX sur bactéries entières appliquée à la sélection d'aptamères reconnaissant *S. aureus*, d'après Chang *et al.* [195]

Souvent présentés comme une alternative potentielle aux anticorps, les aptamères ont en effet plusieurs avantages à commencer par le processus de sélection qui permet d'obtenir des ligands pour des molécules non immunogènes car trop petites par exemple. Inversement, certaines cibles peuvent être trop toxiques pour être injectées telles quelles chez un organisme qui risquerait d'en mourir sans avoir eu le temps de produire des anticorps. Dans ce cas, ces cibles doivent être modifiées, offrant ainsi moins de garanties quant à la reconnaissance de la cible native par les anticorps produits. Pour les aptamères dont la sélection est effectuée *in vitro* cette limitation est totalement levée. Une fois identifiées, les séquences sont synthétisées par voie chimique limitant les problèmes de reproductibilité parfois rencontrés entre des lots d'anticorps polyclonaux. Cette synthèse est plus rapide et moins onéreuse que la production d'anticorps. A condition de contrôler le maintien de l'affinité et de la spécificité, il est plus facile de modifier chimiquement les aptamères que les anticorps pour leur conférer des propriétés supplémentaires. A titre d'exemple, dans ce travail, l'ajout d'une base inversée en 3' des séquences permet d'empêcher la digestion par les nucléases présentes dans le sang et dont l'activité s'exerce le plus souvent de 3' vers 5' [196, 197]. D'autres modifications sont possibles pour augmenter la durée de vie des aptamères dans les milieux complexes ou pour les fixer sur une surface. Les anticorps sont également plus susceptibles d'être dénaturés par des composés chimiques ou par l'exposition à des températures élevées que les aptamères qui peuvent changer de conformation de manière réversible. Bien que moins utilisés que leurs homologues protéiques, les aptamères ont un champ d'application très étendu. Ils peuvent être employés pour la purification par affinité de molécules, comme agents thérapeutiques à part entière, ou pour l'adressage de composés actifs dans une zone donnée de l'organisme [198]. Leurs propriétés en font également d'excellents candidats pour la fonctionnalisation de biocapteurs y compris ceux destinés à la détection de bactéries [193, 194].

2.2.1.2 Recherche d'aptamères pour la détection de bactéries

La sélection et l'emploi d'aptamères reconnaissant des bactéries est une application plus récente puisque la première revue de littérature à y être consacrée date de 2009. A cette date, encore peu d'aptamères reconnaissant des bactéries étaient répertoriés, davantage étant consacrés aux virus [193]. Depuis, des séquences affines pour plusieurs bactéries pathogènes ont été identifiées et employées pour les détecter [194, 199]. Ces récents développements sont prometteurs et en appellent de nouveaux pour valider l'emploi des aptamères pour la détection de bactéries.

Les aptamères retenus pour ce travail l'ont été sur la base de plusieurs critères. Les aptamères constitués d'ARN ont d'emblée été exclus de nos choix car ils sont davantage sujets à la digestion par les nucléases que leurs homologues ADN, également plus stables chimiquement. Comme évoqué auparavant, des modifications sont possibles pour atténuer ce phénomène mais l'application visée devant se dérouler *in fine* dans des milieux complexes, le composant le plus stable a été retenu. Lorsqu'un aptamère ADN a été décrit dans la littérature, son emploi ultérieur par d'autres équipes prouvant son efficacité a été recherché. Les conditions expérimentales à savoir la température, le tampon employé et l'éventuelle fixation de l'aptamère à un support ont été considérées tout comme les bactéries utilisées pour la contre sélection. Cette recherche bibliographique a fait l'objet du stage de master 2 de Marie Galvin au printemps 2015. Une cinquantaine de séquences se liant aux principaux pathogènes alimentaires avaient alors été répertoriées. Parmi elles, certaines ont été retenues pour ce travail et ont été testées avec *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* et *E. coli* O157 : H7. Seuls seront présentés ici les résultats obtenus avec *S. aureus* et *S. Enteritidis*.

Les premiers aptamères pour *S. aureus* ont été identifiés en 2009 [200]. Cinq séquences (SA20, SA23, SA31, SA34 et SA43) de 45 nucléotides encadrées par des amorces PCR ont été retenues à l'issue de la procédure SELEX au cours de laquelle une contre-sélection contre *S. epidermidis* et *Streptococcus* A5005 fût réalisée. Couplés à un fluorochrome pour les besoins de la cytométrie en flux et de la microscopie de fluorescence, la combinaison de ces cinq aptamères permet une meilleure détection de *S. aureus* que chaque aptamère employé séparément. L'aptamère SA31 issu de ces premiers travaux a ensuite été utilisé dans un capteur électrochimique pour la détection de *S. aureus* [154]. La fixation covalente de l'aptamère à l'électrode a permis la détection d'un inoculum minimal de 8×10^2 UFC.mL⁻¹ tout en étant insensible à des populations d'*E. coli* ou *S. epidermidis* allant jusqu'à 10^8 UFC.mL⁻¹. Un autre de ces aptamères, SA43 a été couplé à des nanoparticules dopées aux lanthanides dans deux publications successives de Duan, S *et al.* [201, 202]. La stratégie repose sur la détection de la luminescence émise par ces particules fonctionnalisées après exposition à une source lumineuse. L'émission de lumière est affectée par la présence des bactéries cibles sur lesquelles se concentrent les nanoparticules. Une limite de détection de quelques dizaines de bactéries par millilitre de tampon est avancée. Les aptamères SA20 et SA43 ont également été fixés à des nanoparticules d'or et d'argent. Après concentration de *S. aureus* grâce à des billes magnétiques, les nanoparticules fixées à sa surface permettent sa détection par la technique de diffusion RAMAN exaltée par effet de surface (SERS) [203]. Enfin, les 3 autres séquences identifiées par Cao *et al.* (SA20, SA23 et SA34) ont été utilisées *in vivo* pour réaliser une scintigraphie chez la souris visant à déceler la présence de *S. aureus* dans des tissus inflammés [204]. En 2013, deux nouvelles séquences reconnaissant *S. aureus* nommées SA17 et SA61 ont été identifiées puis employées pour sa détection (Figure 2-9) [195].

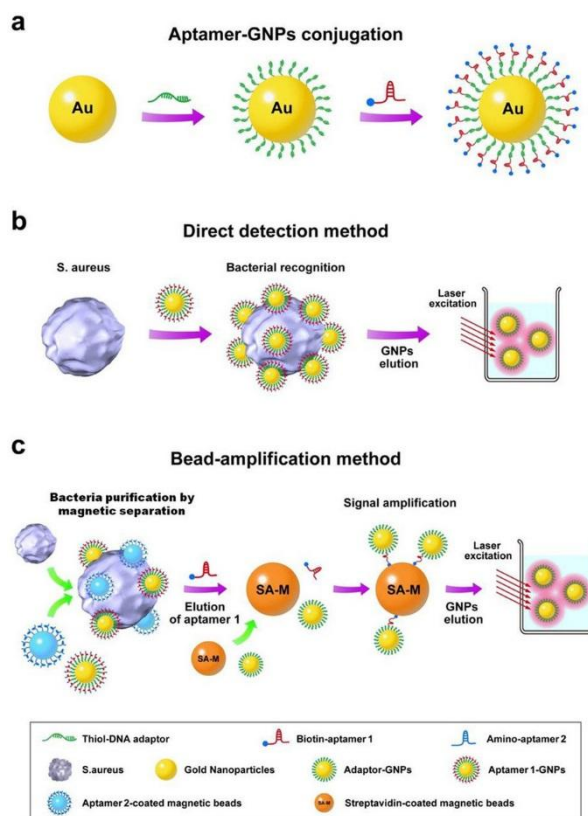


Figure 2-9 : Détection de *S. aureus* avec des nanoparticules fonctionnalisées avec les aptamères SA17 et SA61, d'après Chang *et al.* [195] **A.)** Fonctionnalisation des nanoparticules d'or (60 nm) avec les aptamères thiolés. **B.)** Détection directe de *S. aureus* avec les nanoparticules fonctionnalisées: incubation de 10^9 nanoparticules avec les bactéries à 4°C, rinçage des particules non fixées puis élution par chauffage des nanoparticules retenues par les bactéries et excitation lumineuse. **C.)** Amplification du signal : incubation avec *S. aureus* des 2 aptamères liés pour SA61 (aptamère 1) à des nanoparticules d'or et pour SA43 à des billes magnétiques permettant la capture et la concentration des bactéries. Après rinçage, l'aptamère 1 est élué par chauffage. Ces séquences biotinylées sont alors incubées avec d'une part des billes coatées avec de la streptavidine et d'autre part des NP d'or coatées avec la séquence complémentaire de l'aptamère 1. L'aptamère 1 forme un pont entre les 2 nanoparticules augmentant ainsi leur nombre et de fait le signal après excitation laser.

D'après les auteurs de ce travail, les affinités en solution des aptamères SA17 et SA61 pour *S. aureus* sont respectivement de 35 nM et 129 nM. La fixation de ces séquences à des nanoparticules semble même accroître leur affinité pour *S. aureus*, puisqu'elle a été déterminée pour ces structures à 3,03 nM pour SA17 et 9,9 nM pour SA61. Ce résultat est attribué à la proximité de plusieurs séquences sur les nanoparticules permettant une liaison coopérative à la bactérie. En effet, une bactérie unique peut sembler-t-il être reconnue simultanément par plus d'un millier de chacun de ces deux aptamères [195]. L'aptamère SA17 a été employé pour la détection de *S. aureus* par d'autres équipes que celle qui l'avait identifié [205-207]. Ainsi, disposé dans une série de puits moulés en PDMS, SA17 est relié à un marqueur fluorescent rendu inactif par le dépôt de l'aptamère dans le puits. Sa fixation à *S. aureus*, introduit dans les puits par un canal microfluidique, entraîne un changement de conformation de l'aptamère activant l'émission de fluorescence et indiquant la présence de la bactérie [205]. Abbaspour *et al.* ont mis au point une détection en sandwich semblable à celle présentée sur la Figure 2-9 exceptée pour la détection finale électrochimique plutôt qu'optique. Ces travaux se basent sur les aptamères SA17 et SA61. SA17 permet la liaison spécifique de nanoparticules d'argent auxquelles il est fixé avec *S. aureus*. Également reconnues par SA61 fixé à des billes magnétiques, les bactéries peuvent être concentrées. Les nanoparticules

d'argent retenues sont alors éluées et détectées par voltammétrie, le signal étant proportionnel aux bactéries initialement présentes [206]. SA17 a également été utilisé fixé à des nanoparticules dopées pour la détection de *S. aureus* comme ce fût le cas pour les premières séquences identifiées puis reprises par Duan *et al.* [201, 202]. A nouveau dans cet essai, deux types de particules entrent en jeu. Les premières, émettrices d'une fluorescence caractéristique lors d'une exposition à une longueur d'onde précise sont fonctionnalisées avec l'aptamère. Pour les secondes, il s'agit là encore de billes magnétiques auxquelles est fixée une séquence complémentaire de l'aptamère anti-bactérien. En l'absence de bactéries, ces deux particules sont donc réunies et l'intensité de la lumière émise est maximale. En présence de bactéries, le complexe des deux particules est dissocié, l'affinité pour les bactéries cibles étant plus forte que celle pour la séquence complémentaire. L'intensité de la lumière émise est alors atténuée proportionnellement à la quantité de bactéries présentes [207]. L'ensemble des travaux reprenant les séquences identifiées par Cao *et al.* d'une part, et Chang *et al.* d'autre part, montrent qu'elles sont capables de reconnaître spécifiquement *S. aureus*, y compris après avoir été fixées à des surfaces, le plus souvent de particules métalliques. Depuis trois nouvelles études ont identifié des aptamères contre *S. aureus* dont certains contre la protéine A [208-210] mais ils ont encore été peu utilisés, raison pour laquelle les séquences SA17, SA61, SA31 et SA43 ont été retenues dans le cadre de ce travail.

Concernant les aptamères reconnaissant d'autres bactéries que *S. aureus*, ils seront décrits plus succinctement ici. En effet, dans les expériences présentées, tous hormis SE-3 ont été employés uniquement comme contrôle négatif, c'est-à-dire en l'absence de la bactérie qu'ils sont supposés reconnaître. Ils illustrent bien la diversité des applications envisagées pour les aptamères. L'aptamère STYP-3 permet ainsi la distinction de *S. Typhimurium* parmi d'autres bactéries du genre *Salmonella* sur un capteur impédimétrique. La contre-sélection lors du cycle SELEX ayant été effectuée contre des bactéries inactivées, cet aptamère est sensé reconnaître spécifiquement les bactéries vivantes ce qu'indiquent bien les résultats obtenus par Labib *et al.* [211]. L'aptamère SE-3 a été retenu parmi des séquences possédant une activité antibactérienne à l'encontre de *S. Enteritidis*, précisément car lui n'en exerçait pas et possédait néanmoins une affinité pour cette bactérie [212].

Après avoir identifié des aptamères d'intérêt dans la littérature, il restait à tester leur emploi comme sonde pour la détection de bactéries par SPRI, ce qui est l'objet de la partie suivante.

2.2.2 Tests des aptamères retenus

Contrairement aux anticorps, couplés au pyrrole – NHS, les oligonucléotides sont fonctionnalisés par une molécule de thiol – NHS afin d'être déposés sur la surface d'or où ils forment une mono-couche auto-assemblée. Il s'agit d'un dépôt sans contact puisque quelques nanolitres des solutions contenant les aptamères sont projetés à la surface du prisme qui est ensuite conservé en atmosphère humide (80-85%). Ainsi, dans la gamme de concentration employée au cours de ce travail, une monocouche auto-assemblée se forme comme ont pu le mettre en évidence C. Daniel puis F. Méline lors de leurs travaux de thèse au laboratoire [213, 214]. Les conditions de préparation des aptamères présentées dans la partie Matériels et Méthodes s'appuient sur celles mises en place lors de ces deux précédentes thèses.

Avant toute chose, il faut s'assurer de la présence des aptamères sur les prismes à l'issue du dépôt. Pour cela, une séquence biotinylée complémentaire de la séquence contrôle Zip9 est mise en présence de plots de différentes espèces greffées sur une lame d'or pendant 15 min à 42°C. Après

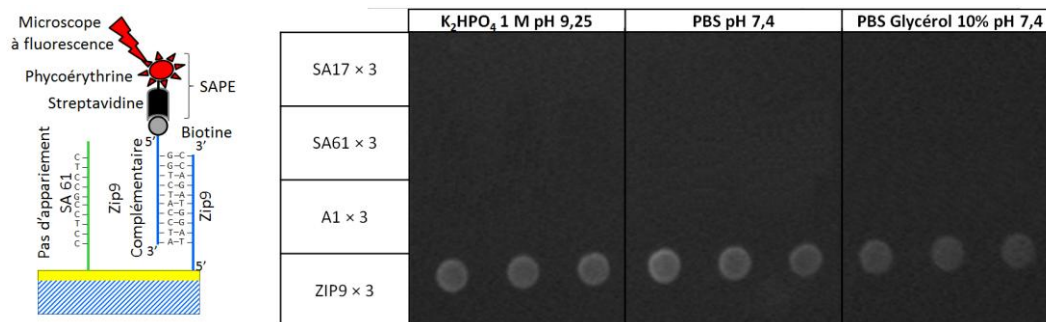


Figure 2-10 : Principe de la révélation de la présence de l'aptamère Zip9 à la surface d'une lame d'or à l'aide de son brin complémentaire biotinylé et du conjugué R-phycoérythrine streptavidine et mise en application. Le brin complémentaire de Zip9 s'apparie avec ce dernier alors que tout appariement est impossible avec d'autres séquences comme SA61 sur le schéma. Après rinçage, seuls les brins complémentaires appariés demeurent à la surface au niveau des dépôts de Zip9. Leur présence est révélée sous un microscope à fluorescence après 5 min d'incubation avec la SAPE. Trois tampons de greffage des aptamères sont employés ici.

Ce premier résultat est vérifié pour les trois tampons de greffage dans lesquels sont dissous les aptamères. Plusieurs compositions ont été testées en raison de leur influence supposée sur l'organisation des dépôts à la surface du prisme. La goutte de solution projetée à la surface par le robot de dépôt doit sécher lentement pour assurer l'homogénéité des plots à la surface. En première intention, le tampon utilisé était du phosphate de potassium dibasique à 1 M ayant un pH de 9,25. Dans certaines solutions de greffage, les aptamères sont mélangés avec des molécules de polyéthylène glycol thiolées de 2 kDa, à raison de 10 µM d'aptamères et 10 µM de PEG-thiolés. L'ajout de ce composé ($\text{CH}_3\text{O}-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{44}-\text{SH}$) dans la solution de greffage améliorerait la sensibilité dans le modèle de détection de la thrombine par aptamères [214]. Avec ces conditions, la détection de *S. aureus* en milieu de culture (TSB) par SPRI est testée (Figure 2-11).

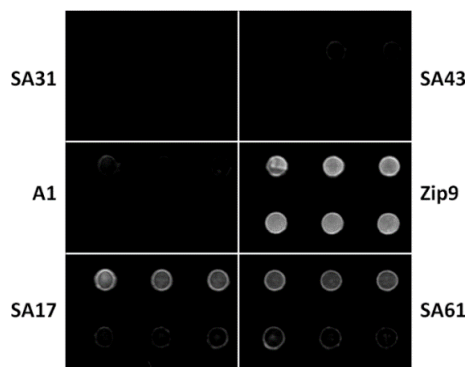


Figure 2-11 : Images différentielles montrant les interactions des aptamères SA17, SA31, SA43, SA61, Zip9 et A1 avec *S. aureus* en TSB. Pour chaque espèce, la ligne supérieure est constituée de 20 µM d'aptamères, la ligne inférieure de 10 µM d'aptamères + 10 µM de PEG, le tampon de greffage employé est du K_2HPO_4 1 M, pH 9,25.

Des interactions nettes se produisent avec les aptamères SA17 et SA61 et de manière inattendue avec Zip9. Au contraire, aucune interaction n'est notée au niveau de l'aptamère A1, spécifique d'*E. coli* O157:H7 [215], employé ici comme contrôle négatif. Plus surprenant, ni SA31 ni SA43 pourtant spécifiques de *S. aureus* ne semblent interagir avec la bactérie. En l'absence de Zip9, la conclusion de l'expérience présentée sur la Figure 2-11 serait que les interactions entre *S. aureus* et les aptamères SA17 et SA61 sont spécifiques. Mais les interactions de *S. aureus* avec Zip9 sèment le doute quant à leur spécificité. Elles sont cependant indéniables car elles ont été confirmées lors de plusieurs expériences indépendantes. Pourtant, cette séquence interne au laboratoire ayant servi à l'étude de l'hybridation de brins d'ADN par SPRI n'a à priori aucune affinité pour cette bactérie. Devant ces résultats, il est difficile d'affirmer avec certitude que les interactions observées au niveau des aptamères SA17 et SA61 sont dues à leur affinité pour *S. aureus*.

Contrairement aux aptamères sensés reconnaître des bactéries, la séquence Zip9 ne comportait pas de base inversée en 3' pour la protéger d'une éventuelle digestion par les nucléases. Pour vérifier si ces enzymes pouvaient être impliquées dans la reconnaissance de Zip9 une révélation par fluorescence de la présence de Zip9 avant et après incubation avec les bactéries a été réalisée. Elle ne laisse pas apparaître de diminution importante de la quantité de Zip9 dans les dépôts après incubation avec les bactéries. Le signal observé sur les dépôts de Zip9 en présence de *S. aureus* n'implique donc pas les nucléases. Cette interaction s'est pourtant confirmée tout au long des expériences et ce quel que soit le tampon de greffage (Figure 2-12 pour K_2HPO_4 et PBS données non présentées). C'est finalement le tampon K_2HPO_4 qui a été préféré au PBS sur le critère de l'homogénéité des dépôts après séchage. Aussi influencée par la concentration en sels dans le tampon de greffage, ce paramètre semble agir sur l'intensité des interactions avec les bactéries. La charge de la molécule d'ADN suivant les conditions expérimentales, dont le pH du milieu, est probablement l'une des causes de ces différences.

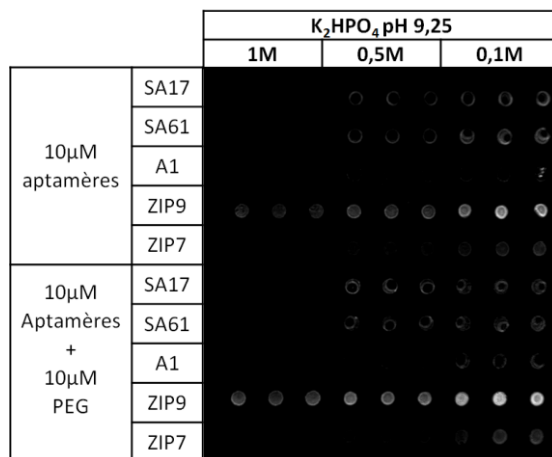


Figure 2-12 : Image différentielle montrant l'influence de la concentration en sels K_2HPO_4 dans le tampon de greffage sur l'interaction des aptamères avec *S. aureus* en TSB.

La nature et les raisons exactes de ces interactions entre *S. aureus* et certaines séquences est néanmoins difficile à déterminer. La matrice extracellulaire qui compose les biofilms bactériens contient notamment de l'ADN extracellulaire provenant au moins en partie chez les staphylocoques de la lyse de certaines bactéries sous l'action d'une enzyme, l'autolysine. Pour *S. aureus*, cet ADN extracellulaire est essentiel à l'adhésion initiale des bactéries au support puis au maintien de la structure du biofilm [216]. Il est possible d'envisager que les interactions avec Zip9 soient l'une des

premières étapes de l'attachement des bactéries à la surface. Mais cela n'expliquerait alors pas pourquoi l'ensemble des séquences ne sont pas concernées par ce phénomène. Il n'est pas non plus totalement exclu que, par hasard, Zip9 ait une structure permettant de reconnaître des motifs de surface de *S. aureus*. Pour vérifier si la séquence de Zip 9 présente des similarités avec les aptamères répertoriés dans la littérature comme reconnaissant *S. aureus* [200, 208, 209, 217], une comparaison de séquence a été entreprise. Ainsi 111 séquences d'aptamères spécifiques de *S. aureus* issues de 4 publications ont été comparées à celles de Zip 7 et Zip 9 à l'aide du programme BLAST disponible en ligne⁷. Huit séquences d'aptamères comportent des similarités avec celle de Zip9, similarités qui se limitent au mieux à un enchaînement commun de 6 nucléotides pouvant être le fruit du hasard. Pour Zip7, n'interagissant pourtant pas avec *S. aureus*, une succession de 9 nucléotides est commune avec un aptamère se liant à *S. aureus*. Les séquences SA17 et SA61 présentent elles des similarités significatives avec plusieurs autres identifiées lors du même cycle SELEX qu'elles [195] et d'autres non significatives. Au contraire, SA31 et SA43 n'ont aucune homologie avec d'autres séquences identifiées, ce qui montre que la comparaison des séquences ne suffit pas à prédire d'éventuelles interactions avec les bactéries. Néanmoins les similarités de Zip9 avec un aptamère connu ne sont pas significatives et ne permettent donc pas d'expliquer les résultats observés.

Des essais expérimentaux répétés avec d'autres bactéries incluant *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium et Enteritidis, n'ont pas permis de déceler la moindre interaction entre les bactéries et les séquences identifiées dans la littérature. Pour l'essentiel, les résultats ne sont pas présentés ici. Cela montre tout de même la difficulté de valider les résultats obtenus par d'autres équipes de recherche avec ces séquences, et justifie la stratégie initiale de retenir les aptamères ayant été employés par plusieurs laboratoires qui offraient plus de chances de réussite. Afin de montrer que les conditions expérimentales employées lors de ces expériences permettaient bien la croissance des bactéries et leur détection par SPRI, l'expérience présentée sur la Figure 2-13 a été menée. Elle supposait la présence combinée d'aptamères et d'anticorps sur un même prisme pour montrer qu'au minimum les interactions avec les anticorps étaient possibles.

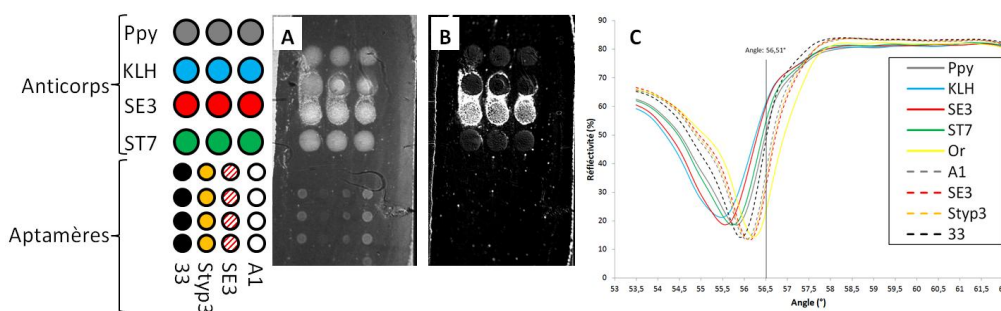


Figure 2-13 : Présence combinée d'aptamères et d'anticorps sensés reconnaître *S. Enteritidis*. **A.)** Image du prisme à 4h montrant les dépôts des 2 types de biomolécules, la présence des bactéries est visible au niveau de l'anticorps SE3. **B.)** Image différentielle également à 4h permettant de distinguer plus nettement les interactions au niveau de l'anticorps SE3 et leur absence totale au niveau des aptamères. **C.)** Courbes plasmons montrant que malgré l'hétérogénéité des dépôts, une variation de réflectivité est en principe mesurable pour toutes les espèces, celle-ci pouvant même être plus importante pour les aptamères (traits pointillés) que pour les anticorps (traits pleins), la plage de variation de réflectivité étant plus grande pour les aptamères.

⁷ BLAST, [consulté le 27 avril 2016]. D'après Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller et David J. Lipman (1997), « Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs », *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Disponible sur : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

C'est bien la conclusion de cette expérience où *S. Enteritidis* est reconnue par l'anticorps SE3 alors même qu'aucune interaction n'est perceptible sur l'aptamère du même nom supposé spécifique de cette bactérie. La population bactérienne présente initialement s'est suffisamment développée dans les cuves permettant sa détection.

Face à l'impossibilité répétée de détecter des interactions entre les aptamères et les bactéries testées, les essais ne se sont pas poursuivis. La spécificité des aptamères pour les bactéries contre lesquelles ils ont été sélectionnés n'est pas pour autant remise en question. Pour cela, il aurait fallu vérifier la liaison des aptamères avec les bactéries présentes au laboratoire dans les mêmes conditions que celles utilisées pour leur sélection. Cependant, pour l'application recherchée les aptamères se devaient d'être fixés à une surface, raison pour laquelle leur capacité à se lier aux bactéries n'a été testée que dans ces dispositions. Les conditions expérimentales retenues, à commencer par la fixation sur la surface plane du prisme diffèrent de la plupart des travaux cités où les aptamères fonctionnalisent des nanoparticules en suspension colloïdale. Il n'est pas exclu que la fixation des aptamères sélectionnés les empêche d'adopter la structure tridimensionnelle responsable de leur spécificité pour les bactéries. Ce n'est cependant pas le cas de tous les aptamères puisque les conditions employées ont permis la détection successive de deux protéines, la thrombine puis l'adénosine dans ce laboratoire [213, 214]. Néanmoins les conditions requises à la détection de bactéries diffèrent peut-être. La densité de greffage estimée lors de l'emploi d'une solution à 20 μM est de l'ordre de 8 picogrammes d'oligonucléotides par cm^2 [213]. Partant de cette valeur, il est possible d'estimer approximativement le nombre d'aptamères par plot dont le diamètre est d'environ 250 μm soit une surface de $4,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$. Un plot contient donc environ $3,9 \times 10^{-3}$ pmol et après multiplication par le nombre d'Avogadro, le nombre de molécules d'aptamères peut être estimé à $2,4 \times 10^{12}$. Il est donc très largement excédentaire par rapport au nombre pouvant se fixer sur une bactérie estimé autour d'un millier pour SA17 et SA61 [195]. Même si une faible proportion des aptamères présents est effectivement fonctionnelle, ils devraient permettre la reconnaissance des bactéries. De plus, une publication évoquant la détection de trois bactéries (*Lactobacillus acidophilus*, *S. Typhimurium* et *P. aeruginosa*) par LSPR (« long range surface plasmon resonance ») met en oeuvre des conditions de dépôt des aptamères sur l'or extrêmement proches de celles employées au cours de ce travail [218]. En effet, une solution contenant 10 μM d'aptamères thiolés en PBS est déposée sur la surface d'or puis laissée sécher pendant 4 h sous atmosphère humide. Au-delà de la concentration de 10 μM , les auteurs n'observent pas d'amélioration des conditions de détection. Les bactéries sont laissées au contact de la biopuce pour une durée d'une heure permettant une limite de détection de l'ordre de 10^2 UFC.mL^{-1} et un signal linéaire entre 10^4 et 10^9 UFC.mL^{-1} . Ces densités bactériennes étaient elles aussi atteintes à l'issue des cultures sur puce sans pour autant observer un signal.

2.3 Ligands à large spectre

A l'image de l'hémoculture, dont la fonction première est de déceler la présence éventuelle de bactéries dans un échantillon normalement stérile, il serait pertinent de disposer de ligands moins spécifiques que les anticorps, capables de reconnaître plusieurs espèces voir genres bactériens. Dans une certaine mesure, les anticorps notamment les mélanges polyclonaux peuvent remplir cette fonction car ils sont susceptibles de reconnaître des épitopes conservés chez de nombreuses bactéries. Néanmoins, certains anticorps testés en ce sens et dont les résultats n'ont pas été présentés dans ce manuscrit n'ont pas donné satisfaction en se révélant incapables de fixer une bactérie quelle qu'elle soit. Ce fut notamment le cas pour des anticorps sensés reconnaître le

lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram⁻ ou l'acide lipotéichoïque des bactéries Gram⁺. Une recherche de ligands ayant un spectre de reconnaissance plus large que les anticorps a donc été entreprise. Leur rôle serait d'interagir spécifiquement avec plusieurs pathogènes potentiels signalant la contamination de l'échantillon et apportant une information complémentaire à l'identification plus précise par les anticorps. Ainsi, même en l'absence d'anticorps sur la biopuce permettant de déterminer précisément la nature du pathogène, sa présence probable dans l'échantillon attirerait l'attention. Mais il faut aussi noter que du fait des propriétés de la SPRI, la croissance bactérienne est généralement perceptible même en l'absence d'anticorps spécifiques du fait soit d'interactions directes des bactéries avec la surface, soit par la modification des propriétés du milieu. Les résultats montrés tout au long de ce manuscrit permettent de le constater. Les résultats obtenus avec les ligands retenus sont présentés dans les sections suivantes avant qu'une conclusion ouvrant sur d'autres possibilités ne termine cette partie.

2.3.1 ApoH

2.3.1.1 Introduction

Connue pour son implication dans le syndrome des anti-phospholipides, la « beta-2 glycoprotéine I » (β 2-GPI) également appelée apolipoprotéine H (ApoH) est un composant de l'immunité innée [219, 220]. Ses fonctions dans ce cadre précis sont encore mal comprises et peu étudiées au regard de la littérature abondante concernant le syndrome des anti-phospholipides. L'absence de la β 2-GPI n'est par exemple associée à aucune pathologie particulière. En revanche, elle occupe une position centrale bien qu'indirecte dans cette maladie auto-immune caractérisée par la formation de caillots. Cette protéine de 50 kDa, présente dans la circulation sanguine dans une gamme de concentration de 0,05 à 0,5 g.L⁻¹ peut se lier aux composés anioniques dont les phospholipides, grâce à un domaine particulier chargé positivement [220]. Celui-ci serait aussi impliqué dans l'interaction de la protéine avec le lipopolysaccharide bactérien [219, 221]. Parmi les cinq domaines qui composent la β 2-GPI, seul le domaine V serait capable de fixer le LPS [219]. Le complexe formé entre la protéine et le LPS serait ensuite internalisé par les cellules immunitaires présentant à leurs surfaces des récepteurs phospholipidiques permettant la neutralisation de cette toxine [219]. Plusieurs séquences peptidiques issues du domaine riche en acides aminés chargés positivement de la β 2-GPI ont une activité anti-bactérienne contre les bactéries Gram⁺ et Gram⁻ [222]. Ces peptides sont libérés après le clivage de la β 2-GPI par des protéases de cellules immunitaires. En revanche, certaines souches de *S. pyogenes* possédant des protéines de surface (H et M1) capables de lier la protéine β 2-GPI entière sont protégées car le clivage ne peut avoir lieu [222]. L'interaction de la protéine Sbi de *S. aureus* avec la β 2-GPI a également été documentée et peut laisser imaginer un rôle analogue [223]. Chez ces deux espèces, la liaison de la β 2-GPI aux surfaces bactériennes semble être davantage le fait des bactéries plutôt qu'attribuable à l'affinité de la protéine pour ces surfaces. Il n'existe à notre connaissance pas d'exemple dans la littérature scientifique d'emploi de cette protéine pour la détection de bactéries.

Néanmoins, la société ApoH Technologies⁸ basée à Montpellier commercialise plusieurs produits, basés sur la protéine ApoH, pour la capture et la concentration de pathogènes incluant champignons, virus et bactéries. La protéine purifiée à partir de sang humain ou recombinante est pour cela fixée sur des billes magnétiques. Le kit APOH-CAPTOBAC destiné à la capture de bactéries dans des

⁸ ApoH Technologies. In Sedicom+FMC. [en ligne] 2010. [consulté le 03 mai 2016]
Disponible sur : < <http://www.apohtech.com/index.php?id=2&L=0> >

échantillons variés comprend des billes magnétiques couplées à ApoH et un tampon optimisant leur capture. D'après un exemple présenté par la société, il permet la capture de 1 UFC de *S. aureus* dans 5 millilitres de sang, la détection étant ensuite assurée par PCR. Toujours d'après leurs données une interaction aurait été observée entre ApoH et près de 70 types de bactéries dont *S. aureus*, *E. coli*, *Listeria spp* et *Salmonella spp*. Elle pourrait également remplacer l'anticorps primaire dans certains tests ELISA. La protéine seule étant également commercialisée, c'est elle qui a été testée ici avec le support technique de la société ayant déposé un brevet et publié une revue de littérature sur ApoH [224, 225].

2.3.1.2 Résultats expérimentaux

Afin de s'assurer de la présence de la protéine ApoH sur les prismes, elle a été déposée dans les mêmes conditions que celles utilisées lors d'une expérience avec les bactéries. En revanche, le reste de l'expérience est effectué en flux, pour vérifier la liaison de l'anticorps reconnaissant ApoH aux plots contenant la protéine. Le principe de la SPR en flux est proche de celui décrit pour les expériences réalisées en statique jusqu'à maintenant. La principale différence réside dans l'injection de l'échantillon dans un canal fluïdique dont le contenu est ensuite entraîné vers le prisme par un tampon (PBS / HEPES). Cette configuration permet d'observer des cinétiques d'interactions entre les sondes déposées à la surface et l'analyte injecté, présentées sous forme de sensorgrammes (Figure 2-14).

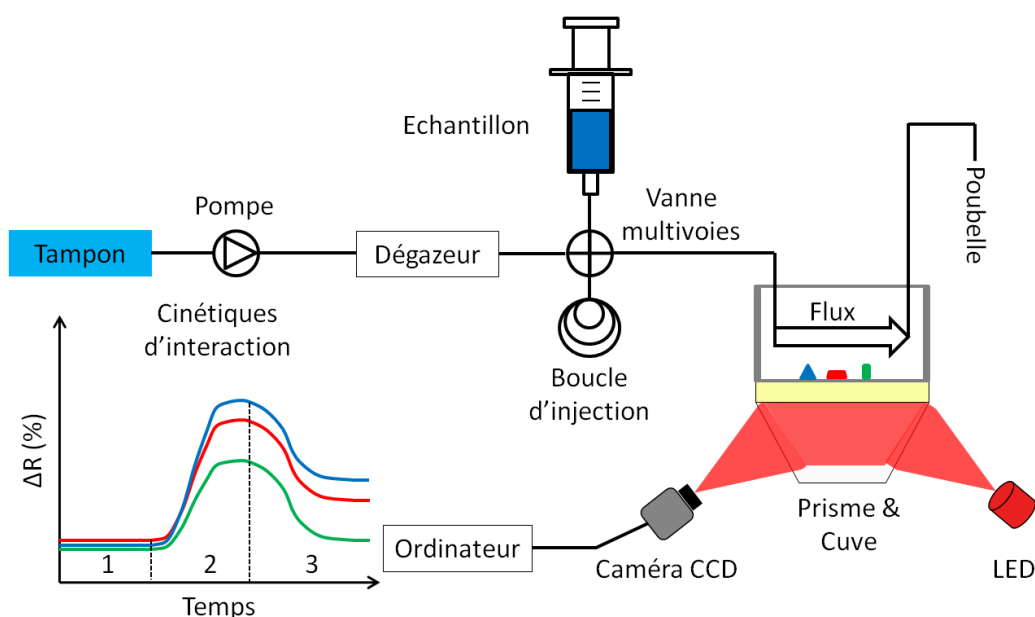


Figure 2-14 : Principe de suivi des interactions en fluïdique par SPRI. En phase dite de remplissage, le tampon de course (PBS ou HEPES) préalablement dégazé est injecté à la surface de la biopuce (phase 1). Lorsque le signal est stabilisé, l'échantillon à analyser est introduit à l'aide d'une seringue dans une boucle d'injection (volume 250 μ L ou 500 μ L). Il est ensuite poussé dans la cuve par le tampon de course qui est introduit dans la boucle d'injection par une redirection de la vanne multivoies. Des cinétiques d'interactions différentes en fonction de la concentration et de l'affinité des sondes disposées à la surface pour l'analyte présent dans l'échantillon sont alors mesurées (phase 2). Après un laps de temps nécessaire à ce que le contenu de la boucle d'injection parvienne à la surface du prisme, la vanne multivoies est réorientée pour qu'à nouveau seul du tampon parvienne dans la cuve (phase 3). Les analytes non fixés sont alors chassés de la surface. Après une nouvelle stabilisation du signal, un autre échantillon peut être injecté ou une solution pour régénérer la surface de la biopuce en rompant les interactions de l'analyte avec les sondes.

L'anticorps polyclonal, (fourni par la société ApoH Technologies) a été injecté à une concentration de 250 nM en PBS. Il se fixe bien au niveau de l'ensemble des dépôts supposés contenir ApoH avec une variation de réflectivité dans l'ensemble proportionnelle à la concentration d'ApoH dans les solutions déposées (Figure 2-15). Ce résultat prouve que la quantité de protéines déposée est bien dépendante de leurs concentrations dans les solutions de dépôt. Ce résultat démontre la présence d'ApoH à la surface du prisme dans une conformation telle qu'elle peut être reconnue par un anticorps qui lui est spécifique. La formation du complexe antigène – anticorps au niveau des dépôts atteste également de l'accessibilité et d'une certaine intégrité de la protéine. Le couplage au pyrrole – NHS et l'électrochimie n'endommagent donc pas les épitopes reconnus par ce mélange d'anticorps polyclonal. L'intégrité du site actif impliqué dans la reconnaissance des bactéries n'est pas pour autant garantie, mais la présence d'ApoH dans les dépôts dans une conformation reconnue par un anticorps est un élément convaincant.

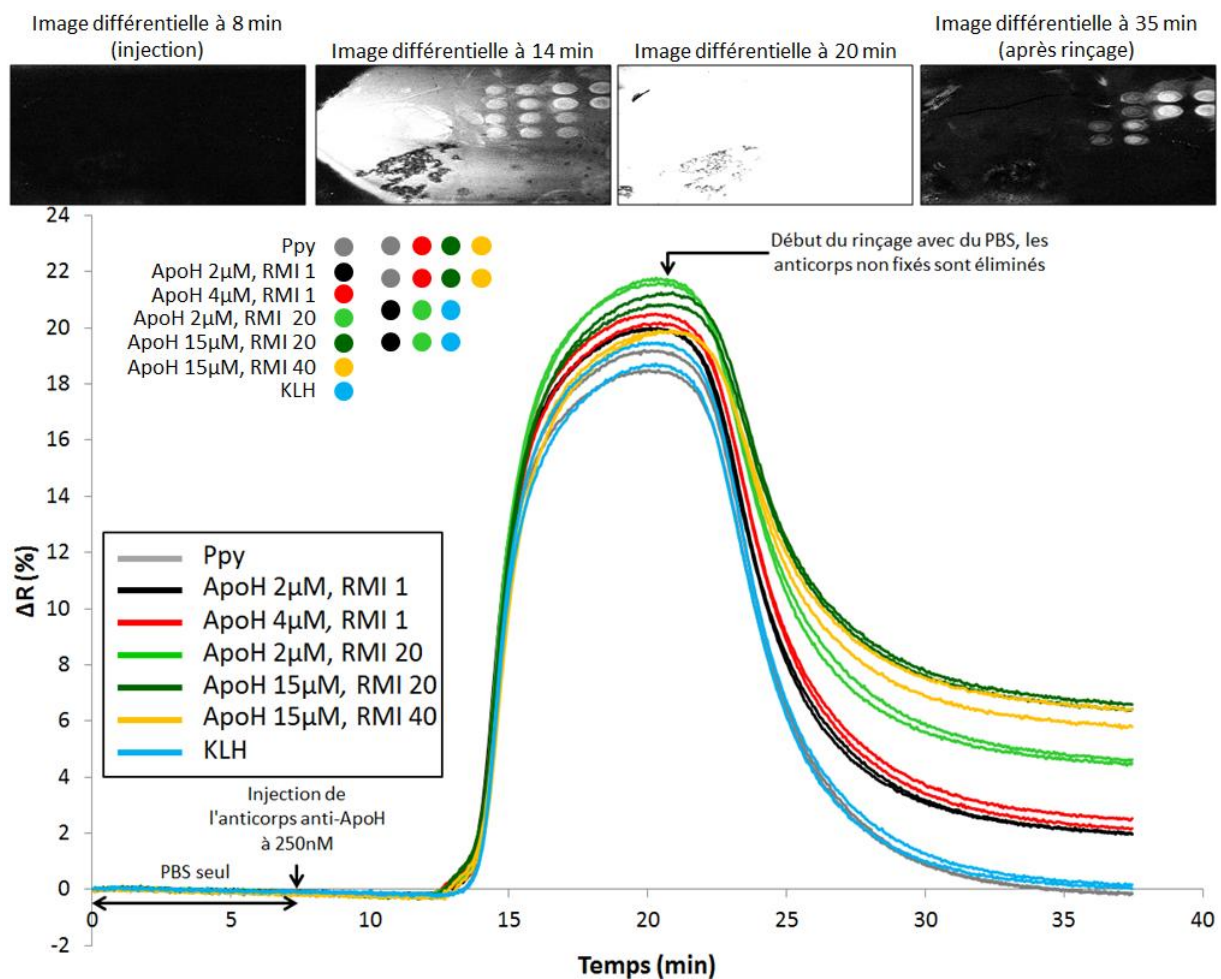


Figure 2-15 : Vérification de la présence de la protéine ApoH à la surface du prisme par SPRI (en fluide). Injection d'un anticorps anti – ApoH, à 250 nM dans du PBS. Fixation de l'anticorps sur les plots contenant la protéine ApoH.

Après avoir vérifié la présence d'ApoH sur les prismes, des expériences de détection de bactéries « en statique » comme pour la plupart des expériences présentées dans ce manuscrit ont été réalisées (Tableau 2-1). Aucune interaction entre ApoH et les trois bactéries testées (*S. aureus*, *S. Enteritidis* et *E. coli* O157:H7) n'a été constatée. Plusieurs paramètres expérimentaux ont été modifiés pour essayer de placer la protéine dans des conditions pouvant favoriser la reconnaissance des bactéries (Tableau 2-1). La concentration de la protéine dans les solutions déposées a ainsi varié

entre 0,5 μM et 15 μM , les concentrations de chaque solution ayant été dosées juste avant le dépôt pour écarter toute erreur de mesure lors de leur préparation. Lors du couplage d'ApoH au Py – NHS, plusieurs RMI ont été testés dans l'hypothèse où des acides aminés essentiels à la liaison d'ApoH aux bactéries seraient impliqués dans la réaction de couplage ce qui affaiblirait alors la reconnaissance. Pour le RMI de 2, le temps de contact entre le Py – NHS et ApoH a également été divisé par 4 (6 h au lieu de 24 h) pour la même raison. Malgré cela, aucune interaction avec les bactéries n'a été constatée même aux RMI les plus bas, où statistiquement peu de lysines sont concernées par la réaction de couplage. Lors de plusieurs expériences, une solution de la protéine à 4 μM a même été déposée par électrochimie à la surface du prisme sans avoir été au préalable conjuguée au Py – NHS sans plus de résultats. La protéine était alors retenue car piégée dans le réseau de polypyrrole se formant à la surface et aux liaisons s'établissant entre ses acides aminés et l'or. Pour finir, des additifs sensés faciliter la liaison d'ApoH aux bactéries comme les ions Cu^{2+} ou le tampon de capture commercial ont été ajoutés au milieu. Ce tampon de capture de composition inconnue distribué par la société ApoH contiendrait des cofacteurs métalliques incluant des ions Cu^{2+} dont l'utilisation est citée dans un exemple de la demande de brevet concernant l'emploi d'ApoH pour la capture de bactéries [225]. L'ajout de ces composés n'a pas pour autant amélioré les résultats obtenus. Dans l'optique de se rapprocher des conditions natives de la protéine ApoH, des expériences de détection en présence de sérum de veau fœtal ont été réalisées sans plus de résultat.

Tableau 2-1 : Conditions testées pour la détection de bactéries par SPRI avec ApoH employée comme sonde et fixée sur le prisme à différentes concentration après avoir été ou non couplée au pyrrole – NHS avec des RMI variables

RMI et [ApoH] dans la solution déposée (μM)	Milieu	Bactéries
RMI 1 ; C = 0,5 ; 1 ; 2 ; 4	TSB seul puis supplémenté de 2 mM de CuSO_4 ou du « tampon de capture »	<i>Salmonella</i> Enteritidis et <i>S. aureus</i>
RMI 2 ; C = 0,5 ; 1 ; 2 ; 4		
RMI 2 ; C = 0,5 ; 1 ; 2 ; 4, durée du couplage pyrrole raccourcie		
RMI 10 ; C = 0,5 ; 1 ; 2 ; 4		
ApoH non couplée, C = 4		
RMI 1 ; C = 2 ; 10	TSB et RPMI (Roswell Park Medium Institute) supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal)	<i>Salmonella</i> Enteritidis et <i>E. coli</i> O157 : H7
RMI 10 ; C = 2 ; 10		
RMI 20 ; C = 2 ; 15 μM		
RMI 40 ; C = 2 ; 15 μM		

En plus des conditions listées dans le Tableau 2-1, un test de détection de *S. Enteritidis* avec ApoH en solution a été tenté. Pour ce faire, l'anticorps employé dans l'expérience de révélation de la présence d'ApoH dans les dépôts (Figure 2-15) a été fixé sur le prisme. La protéine ApoH a ensuite été ajoutée dans la cuve à une concentration de 1 μM dans l'espoir qu'elle se fixe sur l'anticorps puis interagisse dans un deuxième temps avec les bactéries. Là encore, aucune interaction n'a été constatée mais nous ne sommes pas en mesure d'affirmer qu'ApoH s'est bien fixée sur l'anticorps car aucune interaction n'a été perçue après son ajout. Et si le complexe anticorps – ApoH s'était formé, rien ne dit qu'elle aurait ensuite pu se lier aux bactéries.

La société ApoH Technologies recommande lors des tests de la protéine l'emploi de souches pathogènes plutôt que de collections, suspectées d'avoir perdu certains déterminants impliqués dans la reconnaissance par ApoH. Lors des essais présentés ici, les souches proviennent certes de collections mais sont toutes à l'origine isolées lors d'infections ce qui est déjà contradictoire et ne

pouvait pas être fait autrement. Si la dérive des souches au fil des générations est aujourd'hui reconnue [226], et dépend des conditions de culture, la recommandation pourrait aussi être interprétée différemment. Le niveau d'expression des protéines bactériennes dédiées à l'évitement de la réponse immunitaire de l'hôte, dont ApoH fait partie, est en général plus important chez des souches pathogènes que d'autres de la même espèce ce qui explique leur « succès » aux dépens de l'organisme infecté. Comme évoqué au début de cette partie, des bactéries comme *S. pyogenes* et *S. aureus* possèdent des protéines dont le niveau d'expression varie selon les souches et qui reconnaissent ApoH [222]. En l'état, il est impossible de dire qui d'ApoH ou des protéines bactériennes est à l'origine de l'interaction. La liaison d'ApoH au LPS de bactéries Gram⁻ pourtant documentée n'a été observée ni avec *E. coli* O157:H7 ni avec *S. Enteritidis*. La littérature n'évoque cependant que rarement la liaison avec des bactéries entières. De plus, d'après Gries *et al.*, la liaison de la β 2-GPI avec le LPS n'est pas spécifique. Ils en appellent à de nouvelles études pour une meilleure compréhension du rôle de cette protéine dans l'immunité innée [221]. Enfin, ApoH peut se présenter sous différentes conformations selon les conditions du milieu et d'éventuelles interactions avec des surfaces anioniques. Il ne peut pas être exclu que la conformation dans laquelle elle se trouve à la surface empêchait la reconnaissance des bactéries. Cependant, l'ajout lors de plusieurs expériences des composés sensés améliorer cette capacité n'a rien changé. En conclusion, dans ces conditions, la protéine ApoH ne peut pas être utilisée comme ligand à large spectre pour la détection de bactéries par SPRI, aucun élément ne permettant d'attester d'une interaction avec les bactéries testées. Aucune publication hormis la demande de brevet déposée par la société ne reporte à ce jour l'emploi de la protéine ApoH sur un biocapteur pour la détection de bactéries.

2.3.2 Protéines de l'immunité (C1q)

2.3.2.1 Présentation du rôle de C1q

Une autre protéine de l'immunité, C1q a été évaluée. Sa fixation aux pathogènes par l'intermédiaire d'anticorps fixés à leur surface est la première étape de la voie classique du complément. Une déficience de cette protéine augmente la susceptibilité aux infections bactériennes mais son rôle ne se limite cependant pas à cette seule fonction. Possédant de multiples partenaires dans l'organisme, elle contribue à maintenir son intégrité. Cette protéine hexamérique de 460 kDa présente une structure en forme de bouquet de tulipes (Figure 2-16).

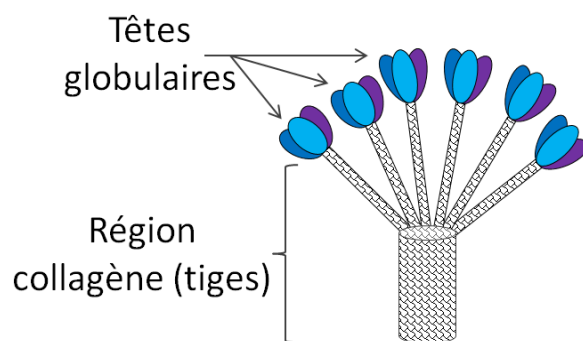


Figure 2-16 : Représentation schématique de la protéine C1q en forme de « bouquet de tulipes ». Elle est constituée de six sous-unités identiques, elles-mêmes composées de trois chaînes polypeptidiques (A, B et C) qui s'assemblent sous forme hélicoïdale. La partie C –terminale de cet assemblage s'achève par une tête globulaire où se produisent les interactions avec les anticorps fixés à leurs antigènes ou directement avec des motifs bactériens. Les parties N –terminales de ces six hétérotrimères se réunissent formant la « base » du bouquet où se fixe notamment le complexe C1s-C1r-C1s-C1s initiant la première étape de la voie classique du complément. Cette partie est également reconnue par des récepteurs cellulaires de cellules immunitaires comme les phagocytes [227].

Les interactions directes des têtes globulaires avec certaines bactéries sont susceptibles d'activer la voie classique du complément en l'absence d'anticorps [228]. Cette propriété de C1q a initialement été mise en évidence par la constatation de l'effet bactéricide d'un sérum même en l'absence d'anticorps spécifiquement dirigés contre une bactérie. Les mécanismes à l'origine de ce phénomène ont donc été recherchés [229]. Ils impliquent l'activation de toutes les voies du complément, y compris de la voie classique. Cette capacité a notamment été montrée lors de la découverte d'une interaction directe entre C1q et une porine (OmpK36) de *K. pneumoniae*. Cette interaction implique des acides aminés chargés comme le laissent présager les points isoélectriques opposés de ces deux protéines (10,3 pour C1q et 4,5 pour la porine) [230]. L'activation du complément induite par la reconnaissance directe de protéines membranaires de *Legionella pneumophila* a également été indiquée [231]. L'interaction de C1q avec les membranes des bactéries Gram⁻ impliquerait aussi le LPS. Cependant la présence d'une capsule à la surface des bactéries inhiberait cette fixation également rencontrée chez d'autres bactéries Gram⁻ comme les salmonelles [229]. L'influence de cette capsule sur la liaison de C1q se retrouve également chez les bactéries Gram⁺. Pour les streptocoques, l'absence de capsule augmente encore la capacité de liaison de C1q à la surface des bactéries [232, 233]. Confirmée récemment, cette interaction entre C1q et la surface de *S. pneumoniae* semble être détournée par la bactérie pour faciliter son adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte puis leur invasion [233]. Les têtes globulaires fixées aux bactéries exposent la « tige » de collagène, partie qui est reconnue par les cellules de l'organisme. Dans ce cas précis, cette orientation semble faciliter l'infection par *S. pneumoniae*. Testée chez plusieurs souches de *S. pyogenes* et *E. coli*, cette capacité à retourner à son avantage la fixation de C1q pour coloniser les cellules épithéliales n'a pas été retrouvée alors que la protéine était bien fixée à leurs surfaces. La liaison de C1q à la surface des streptocoques s'effectue par les protéines qui y sont exposées comme le prouve la moindre fixation à des bactéries préalablement incubées avec des protéases qui éliminent les protéines de surface [233]. La liaison directe de C1q avec plusieurs bactéries est donc visiblement effective et son affinité pour ces structures a été acquise au cours de l'évolution.

L'équipe de l'Institut de Biologie Structurale « Protéines de l'immunité innée à l'interface hôte-pathogène » dirigée par N. Thielens a pu nous fournir un échantillon de la protéine C1q extraite à partir de sang humain. Ce groupe étudie les protéines de l'immunité innée telles que C1q ou les ficolines placées respectivement au sommet de la voie classique et de la voie des lectines du complément. Il s'intéresse tout particulièrement aux mécanismes d'interactions entre ces protéines et les pathogènes d'une part, et les cellules et protéines de l'hôte d'autre part. Ils sont notamment parvenus à produire une protéine C1q recombinante puis à identifier le site de liaison du complexe C1s-C1r-C1s-C1s à C1q [234]. Les mécanismes de liaisons et d'activation de C1q par différentes molécules anioniques comme l'héparine ou le désoxyribose ont également été caractérisés [235]. La liaison directe de la ficoline à l'acide téichoïque de certains pneumocoques a récemment été démontrée [236]. La protéine C1q fournie par ce groupe a donc été testée comme ligand pour la détection de bactéries par SPRI.

2.3.2.2 Résultats expérimentaux

Les protocoles de couplage et de fixation de C1q sont identiques à ceux suivis avec les anticorps. Comme pour ApoH, la présence de C1q sur les prismes est vérifiée en fluide par SPRI à l'aide d'un anticorps monoclonal reconnaissant C1q (MCA2603, AbD Serotec) injecté à 250 nM. Les dépôts sur le prisme sont effectués juste avant l'expérience pour prévenir une éventuelle dégradation de la

protéine lors de sa conservation. Une solution de PBS + 1% BSA est déposée pendant 20 min à la surface de la biopuce avant sa mise en place.

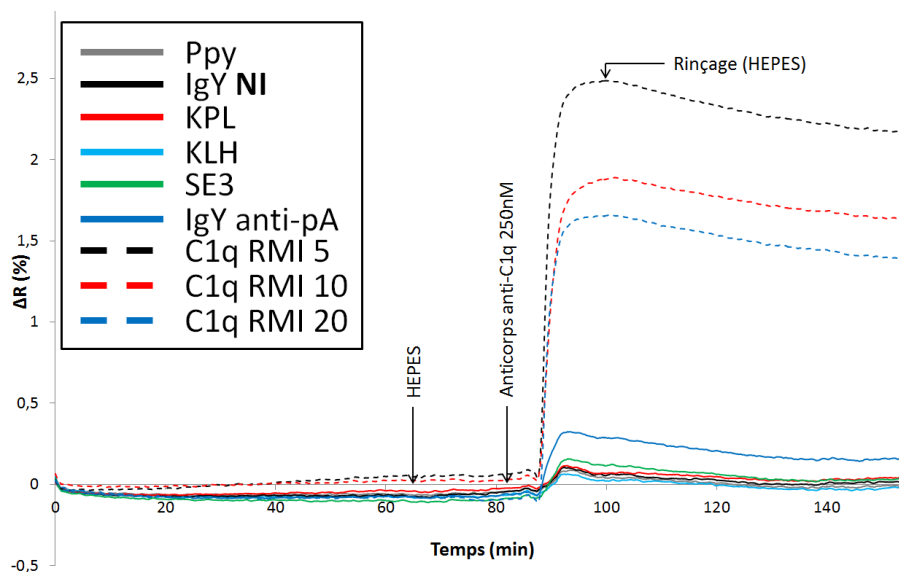


Figure 2-17 : Fixation d'un anticorps monoclonal spécifique de C1q sur les dépôts effectués avec des solutions à 1 μ M prouvant ainsi la présence de la protéine sur le prisme.

A nouveau, la fixation de l'anticorps au niveau des dépôts contenant C1q prouve la présence de la protéine dans une conformation reconnue par un anticorps spécifique. Les dépôts sont effectués dans des conditions identiques à la Figure 2-17 pour la détection de bactéries en statique avec C1q, assurant ainsi qu'elle se trouve bien sur le prisme. Autre indication de sa présence, le décalage de l'angle de résonance entre les dépôts composés de C1q, de l'anticorps KPL, du polypyrrole seul ou l'or nu (Figure 2-18). Par rapport à l'or nu, l'angle de résonance se décale d'autant plus vers la gauche que la taille du composé déposé est importante, C1q ayant une masse molaire trois fois supérieure aux IgG.

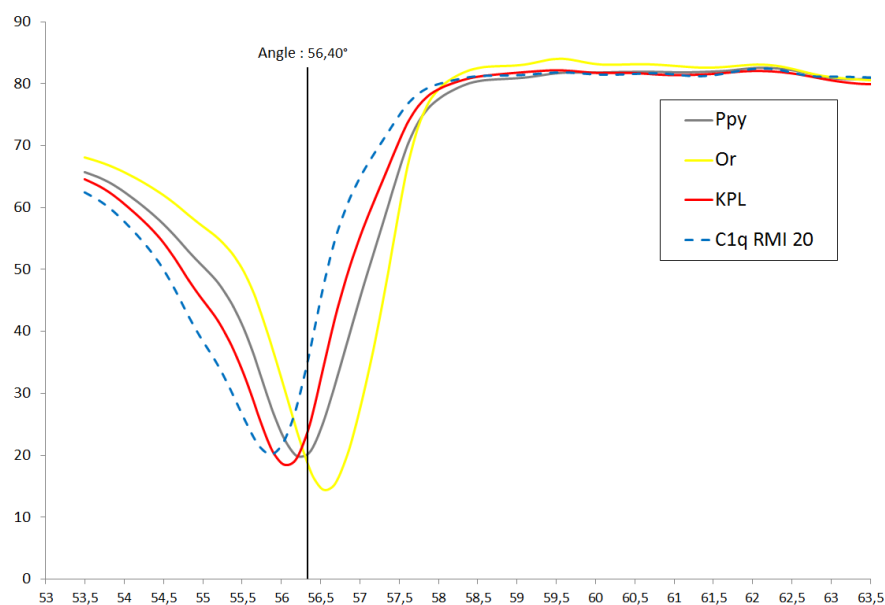


Figure 2-18 : Angles de résonance pour l'or nu et des dépôts constitués de la protéine C1q, de l'anticorps KPL ou de polypyrrole seul (moyenne pour 4 plots).

Des essais de détection en TSB de *S. Enteritidis*, *E. coli* ATCC11775, *L. monocytogenes* 4.51 et *S. aureus* avec C1q ont été entrepris. Seules des interactions entre *S. aureus* et C1q ont été observées dans ces conditions (Figure 2-19).

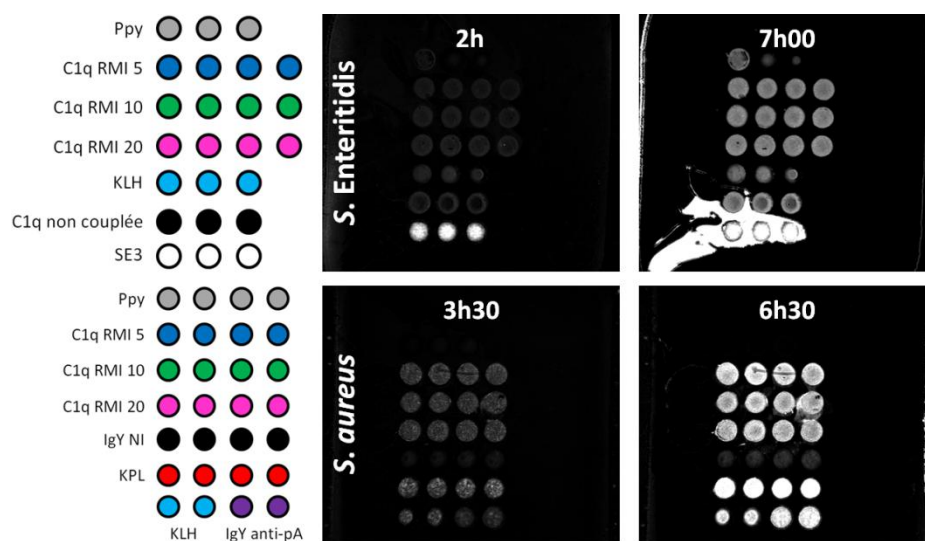


Figure 2-19 : Images différentielles montrant l'absence d'interactions en TSB entre C1q et *S. Enteritidis* et au contraire, leur présence avec *S. aureus* comme sur les anticorps KPL, KLH et IgY anti-protéine A pour des raisons qui seront explicitées dans le prochain chapitre.

D'après la bibliographie, au moins une protéine staphylococcique est susceptible de se lier à C1q empêchant ainsi l'activation de la voie classique du complément. Il s'agit d'une adhésine de la famille des MSCRAMM [228, 237-239]. Il est possible que l'interaction observée soit le fait de cette protéine plutôt que d'une affinité de C1q pour des déterminants à la surface de *S. aureus* même s'il n'est pas possible de le déterminer à partir de ces résultats. Cette interaction a pu être observée à plusieurs reprises. Pour les autres bactéries employées, il faudrait tester d'autres souches car les interactions sont bien documentées dans la littérature. Néanmoins, comme cela sera évoqué dans le chapitre 3 à l'occasion de l'étude des interférences se produisant dans les milieux d'hémoculture en présence de sang, C1q est sujette à d'importantes interférences ce qui complique son utilisation dans ces conditions (**partie Erreur ! Source du renvoi introuvable., page Erreur ! Signet non défini.**).

CONCLUSIONS DU CHAPITRE

La recherche de ligands susceptibles de remplacer les anticorps ou de compléter les informations qu'ils apportent est une tâche complexe. Les aptamères, prometteurs à l'étude de la bibliographie ont permis la détection d'interactions avec *S. aureus*. Néanmoins, si les interactions constatées avec certaines séquences sont indéniables, elles restent difficilement explicables du fait de l'implication de la séquence contrôle Zip9. La présence d'interactions électrostatiques est une explication possible. Il n'a en revanche pour l'heure pas été possible de détecter d'autres bactéries notamment Gram⁻ avec les aptamères. Pourtant, les conditions expérimentales dans lesquelles ces molécules ont été employées sont théoriquement favorables à la liaison avec leur cible.

Les résultats obtenus avec les ligands à large spectre

Concernant la protéine ApoH, l'absence totale de liaisons même minimales avec les bactéries testées pose question quant à l'affinité réelle de cette protéine pour les bactéries. Il ne peut cependant pas être exclu que la fixation altère son activité mais dans ce cas qu'en est-il sur les billes magnétiques ? Finalement peu de travaux rapportent les interactions de cette protéine avec les bactéries, la plupart se concentrant sur la maladie auto-immune où elle est la cible des anticorps. Elle n'est vraisemblablement pas le ligand universel qu'elle paraissait être à la lecture de sa description. Pour la protéine C1q, les conclusions sont plus nuancées. Il existe clairement des interactions entre elle et certaines bactéries comme l'ont montré les expériences avec *S. aureus*. Les implications biologiques de ces interactions ne peuvent être déduites de ces expériences mais résultent possiblement de l'une des multiples composantes de la stratégie d'évitement du système immunitaire de l'hôte par *S. aureus*.

D'autres protéines de l'immunité comme les « *Toll-Like Receptors* » reconnaissant des motifs à la surface des bactéries pourraient être testées. Elles ont l'avantage d'avoir été sélectionnées au cours de l'évolution et présentent donc de bonne chance de réussite au moins en terme d'affinité. Les peptides antimicrobiens naturellement présents dans le sang constituent une autre piste envisageable. Néanmoins, l'association de ces molécules avec d'autres provenant de l'organisme pouvant se retrouver dans l'échantillon sanguin est une source potentielle d'interférences.

Le choix des ligands potentiels doit donc être conduit en gardant l'ensemble de ces critères à l'esprit. De nombreux ligands ont été employés pour la détection de bactéries entières sur des biocapteurs [144]. Parmi les ligands spécifiques, les phages et surtout leurs protéines impliquées dans la reconnaissance de leurs bactéries hôtes pourraient être pertinents. Pour des ligands plus génériques, l'emploi de sucres ou de lectines immobilisées [142, 143] pourrait apporter des indications concernant la bactérie présente dans l'échantillon sanguin sous condition que leur emploi y soit possible sans trop de perturbations. Ainsi, une multitude de critères conditionnent le choix des ligands à tester à commencer par l'affinité et la spécificité pour les bactéries, la possibilité de les immobiliser à la surface d'un biocapteur en préservant leur activité et la compatibilité avec les échantillons testés. Seuls des tests comme ceux effectués ici permettent de se prononcer sur leur employabilité.

À la lumière de ces résultats, les anticorps ont été choisis pour la suite de ce travail. L'emploi de longue date des anticorps constitue un avantage car une littérature abondante décrit leur utilisation pour la détection de bactéries, notamment dans des biocapteurs, ce qui peut faciliter les applications

futures [176]. En SPR, les anticorps ont été employés pour la détection de nombreux pathogènes alimentaires incluant *S. aureus* [187, 240]. Enfin, un nombre important d'anticorps reconnaissant un large panel d'antigènes est disponible commercialement ce qui permettra d'en évaluer plusieurs. Le prochain chapitre traite de l'optimisation de la détection de *S. aureus* sur une biopuce à anticorps en milieu de culture simple.

3 Chapitre 3 :

Détection de *S. aureus* sur une biopuce à anticorps par SPRi en milieu simple

3.1 Mise en évidence des propriétés de *S. aureus*

3.1.1 Caractéristiques microbiologiques de *S. aureus*

3.1.1.1 Aperçu des stratégies d'évitement du système immunitaire par *S. aureus*

La pathogénicité de *S. aureus* pour l'homme tient dans sa capacité à coloniser de nombreux environnements et à échapper aux défenses immunitaires de son hôte. L'arsenal protéique dont dispose cette bactérie y contribue grandement. *S. aureus* peut exprimer jusqu'à 24 protéines différentes à sa surface selon le milieu dans lequel il se trouve [237]. Elles ont généralement de multiples rôles et interagissent par conséquent avec plusieurs protéines de l'hôte. Parmi ces protéines bactériennes, la famille des MSCRAMM pour « *Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules* » est impliquée dans l'adhésion des bactéries aux tissus biologiques ou aux surfaces inertes. Il s'agit notamment de la protéine A, du « *Clumping factor A*, ClfA » ou des protéines liant la fibronectine, « *Fibronectin binding protein*, FnBP » responsables de l'adhésion des bactéries aux plaquettes. D'autres protéines comme les « *Iron-Regulated Surface determinants*, Isd » permettent à la bactérie de capter le fer de l'hémoglobine. La plupart des isolats cliniques de *S. aureus* disposent d'une capsule polysaccharidique qui peut recouvrir partiellement leur surface et les protéines qui s'y trouvent. Trois sérotypes capsulaires, 5, 8 et 336 représentent la majorité des souches isolées d'infections [241, 242]. Cette capsule contribue à l'adhésion de *S. aureus* sur les surfaces et le protège de l'opsonophagocytose en empêchant la reconnaissance des antigènes de surface par des anticorps [243]. En revanche, des anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes capsulaires facilitent sa phagocytose, raison pour laquelle ces motifs ont été étudiés dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre *S. aureus* toujours inachevée [243]. Un aperçu des motifs de surface de *S. aureus* est proposé sur la Figure 3-1.

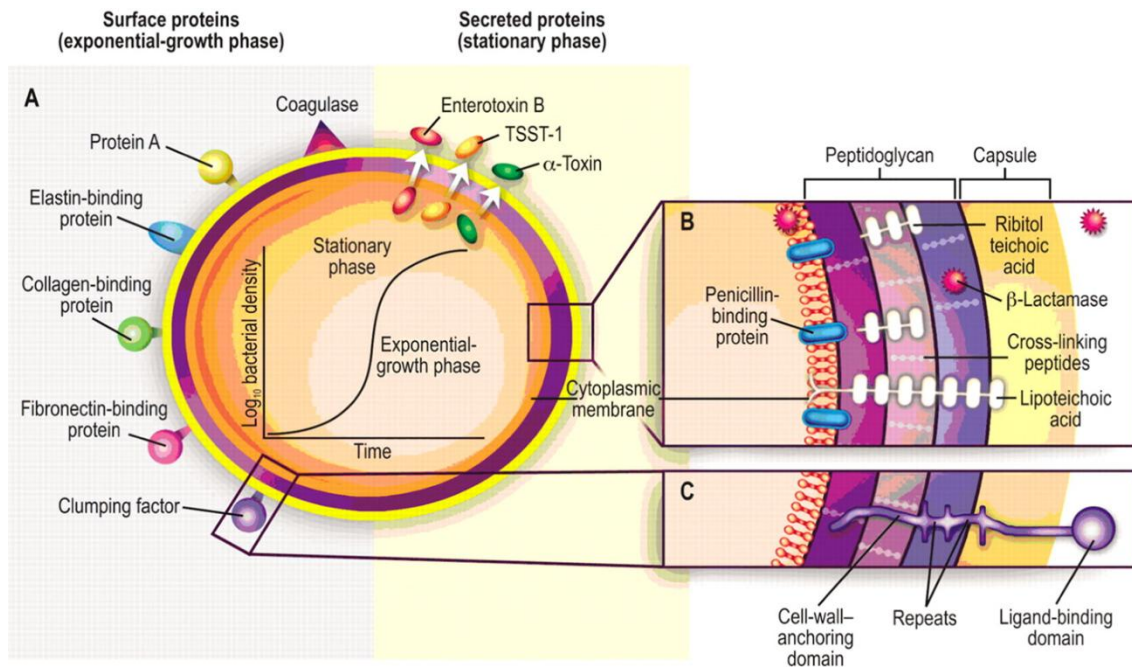


Figure 3-1 : Protéines et autres structures surfaciques de *S. aureus* d'après Gordon *et al.* [244]

Seuls quelques points présentés sur la Figure 3-1 vont être discutés ici. Ils ont été choisis en raison de leurs implications dans l'évitement de la réponse immunitaire de l'hôte, phénomènes qui pourraient également avoir des conséquences pour la détection de *S. aureus* par SPRI, notamment dans le sang.

3.1.1.2 Protéine A

Comme d'autres protéines ancrées dans la paroi de *S. aureus*, la séquence peptidique de la protéine A est constituée en N – ter d'un peptide signal et en C – ter d'une séquence d'adressage constituée du motif LPXTG. Après clivage entre les résidus thréonine et glycine, l'enzyme Sortase A forme un intermédiaire entre la fonction acide carboxylique du peptide et un groupement thiol de son site actif. Une attaque nucléophile des ponts pentaglycine du peptidoglycane forme une liaison covalente entre la protéine A et la paroi de peptidoglycane. En plus de permettre à la protéine A de traverser la membrane cytoplasmique, le peptide signal en C – ter de la protéine A possède un motif particulier, YSIK / GS, partagé avec ClfA et FnBPA qui gouverne sa localisation dans la paroi [245]. Ainsi, au moment de la division bactérienne, les protéines possédant ce motif sont initialement localisées au niveau du septum. La synthèse du peptidoglycane débutant elle aussi à ce niveau, elles sont ensuite distribuées sur toute la surface de la bactérie [245, 246]. Inversement, les protéines ne possédant pas ce motif sont d'abord excrétées au niveau des pôles de la bactérie où elles sont ensuite liées à la surface formant des foyers localisés et discrets. La protéine A a la particularité d'être à la fois ancrée dans la paroi de *S. aureus* et excrétée dans le milieu extracellulaire. Deux mécanismes indépendants assurent cette excrétion. D'une part, l'enzyme LytM permet de relarguer une partie des protéines A fixées à la surface en clivant le peptidoglycane [247]. D'autre part, une partie de la protéine A extracellulaire n'a jamais été ancrée à la surface de *S. aureus*. Cela tient à une particularité non clairement identifiée dans le peptide d'adressage de la protéine A vers la paroi de *S. aureus*. Certaines protéines A échappent à l'action de la Sortase A qui les attacheraient au peptidoglycane. La proportion de protéine A excrétée représente environ 7% de la quantité de protéine A totale [248].

La protéine A est le parfait exemple d'une protéine staphylococcique aux multiples fonctions. Présente chez la plupart des isolats cliniques, le séquençage de son gène est même employé pour le typage de souches [249]. Son excrétion contribue à la survie de *S. aureus* dans le sang comme le montrent les expériences de dénombrement après incubation dans le sang de plusieurs souches de *S. aureus* menées par O'Halloran *et al.* [248]. Après 3h à 37°C dans du sang humain, une population correspondant à 356% de l'inoculum initial est récupérée pour la souche exprimant la protéine A à sa surface et l'excrétant. Cette proportion diminue à 227% pour la souche excrétant une moindre quantité de protéine A et seulement 146% pour la souche ne l'exprimant pas du tout [248]. La protéine A sous ses formes excrétée et membranaire favoriserait l'agrégation de *S. aureus* en milieu liquide. Elle possède 4 ou 5 domaines de liaisons aux IgG, domaines qui adoptent une structure en triple hélices. Ils permettent sa fixation au fragment Fc des IgG. Les anticorps fixés à *S. aureus* par l'intermédiaire de la protéine A ne peuvent alors être reconnus par les cellules du système immunitaire car ils exposent leurs fragments Fab plutôt que Fc vers l'extérieur. *S. aureus* évite ainsi l'élimination par opsonophagocytose en s'entourant d'anticorps fixés par leur fragment Fc. L'activation de la voie classique du complément est aussi inhibée par ce phénomène. La protéine sbi, «*staphylococcal binder of immunoglobulin* » partage avec la protéine A la capacité de se lier aux fragments Fc des IgG. Cette protéine à la fois excrétée et membranaire contribue donc elle aussi à la survie de *S. aureus* dans le sang [250, 251]. D'autre part, la protéine A agit comme un super-antigène pour les lymphocytes B en se liant sur la chaîne V_H3 du fragment Fab de leurs IgM membranaires. Cette liaison s'effectue en dehors du domaine habituel de reconnaissance des déterminants antigéniques [252]. Alors qu'un antigène classique est lié par 0,01 à 0,1% de la population de lymphocytes d'un organisme, la reconnaissance de la protéine A pourrait concerner jusqu'à 30% de cette population, c'est-à-dire tous les lymphocytes dont les IgM possèdent la chaîne V_H3 [253]. Ce faisant, la réponse immunitaire de l'hôte contre d'autres antigènes staphylococciques est faible voire

inexistante [254, 255]. De plus, la plupart des anticorps produits à partir des plasmocytes ne sont pas en mesure de reconnaître la protéine A puisque les lymphocytes B dont ils sont issus n'ont pas d'affinité pour ses épitopes [253]. Une partie de ces lymphocytes B activés sont alors éliminés par apoptose affaiblissant encore davantage la réponse immunitaire de l'hôte [252, 256]. La protéine A perturbe donc la réponse immunitaire adaptative, facilitant ainsi les infections récurrentes. Dans un modèle d'infection chez la souris, un variant de *S. aureus* dont la protéine A est incapable de lier les fragments V_H3 et Fc ne peut empêcher ni son élimination par phagocytose, ni l'induction d'une réponse immunitaire efficace contre ses protéines. Cette souche est également incapable de former des abcès tout comme une autre souche dont la protéine A a été totalement délétée [254]. La neutralisation des activités de la protéine A est donc essentielle pour conférer une réponse immunitaire efficace contre *S. aureus*. Enfin, parmi les autres activités de la protéine A identifiées à ce jour, son interaction avec le récepteur TNFR1 (*Tumor Necrosis Factor*) des cellules épithéliales pulmonaires notamment, induit la sécrétion de cytokines qui favorise l'inflammation et la propagation de l'infection. Dans la circulation sanguine, sa capacité à se lier au facteur de von Willebrand (vWF), favorisent l'adhésion de *S. aureus* aux tissus endommagés. En effet, lors d'une lésion d'un vaisseau sanguin, le facteur de von Willebrand produit par l'organisme permet le recrutement des plaquettes afin d'obstruer la lésion par la formation d'un clou plaquettaire. Cette localisation est notamment mise à profit par *S. aureus* pour coloniser les tissus endommagés [237].

3.1.1.3 Détournement de la cascade de coagulation de l'hôte par les protéines Coa et vWbp de *S. aureus*

La coagulation du sang est un mécanisme de défense permettant à l'organisme d'endiguer rapidement la perte de sang consécutive à l'endommagement d'un vaisseau sanguin. Elle aboutit à la formation de caillots qui empêchent l'hémorragie et évitent en principe la dissémination de bactéries dans l'organisme [257]. La présence de caillots en dehors de ce contexte pouvant aboutir à l'obstruction de vaisseaux sanguins intègres et éventuellement à leur rupture, la coagulation doit être finement régulée. Elle l'est grâce à la cascade de coagulation qui se compose de deux voies (intrinsèque et extrinsèque) constituées d'une succession de réactions qui permettent d'activer séquentiellement les facteurs de la coagulation. Ces deux voies partagent les étapes finales au cours desquelles le facteur X clive la prothrombine en thrombine. Sous l'action de la thrombine, le fibrinogène sanguin, protéine soluble représentant 2 à 3% des protéines plasmatiques, est converti en fibrine, protéine insoluble, composant majoritaire des caillots. Le fibrinogène est une glycoprotéine de 340 kDa formée de trois paires de chaînes peptidiques (α ; β ; γ). La partie N – terminale des chaînes α et β est clivée par la thrombine entraînant la réorganisation des chaînes peptidiques résiduelles pour former la fibrine qui se structure en polymère.

S. aureus sécrète deux protéines capables d'entraîner la coagulation du sang ou du plasma. Il s'agit de la coagulase et de la « protéine liant le facteur de von Willebrand », notées respectivement « Coa » et vWbp pour « *von Willebrand factor binding protein* ». Cette activité de coagulation du sang est quasi ubiquitaire chez *S. aureus* ce qui en fait un critère de distinction avec les autres espèces de staphylocoques. La capacité à coaguler le sang contribue à la pathogénicité de *S. aureus* comme le montre la diminution du nombre d'abcès bactérien et le temps de survie allongé chez des souris infectées par des mutants Δcoa ou $\Delta vWbp$ par rapport à celles infectées par la souche sauvage [258, 259]. La présence de l'une ou l'autre de ces protéines est suffisante pour provoquer la coagulation du sang. Ces deux protéines à l'action similaire contournent l'activation protéolytique de la prothrombine en formant avec elle un complexe actif, la staphylocoagulase, capable de convertir le fibrinogène en fibrine. Le terme de staphylocoagulase désigne indifféremment le complexe formé

entre la prothrombine et Coa ou vWbp. L'association de l'une ou l'autre de ces protéines avec la prothrombine induit un changement conformationnel qui découvre un site actif de liaison au fibrinogène n'existant normalement que sur la thrombine. Les gènes *coa* et *vWbp* partagent le domaine « D1 –D2 » codant pour le motif se liant à la prothrombine. Le gène de la coagulase comprend également de 2 à 8 répétitions en tandem d'une séquence codant pour un peptide de 27 résidus formant le domaine de liaison au fibrinogène (*fibrinogen binding domain*). La staphylocoagulase formée par l'association Coa – prothrombine possède donc plusieurs sites supplémentaires de liaison au fibrinogène.

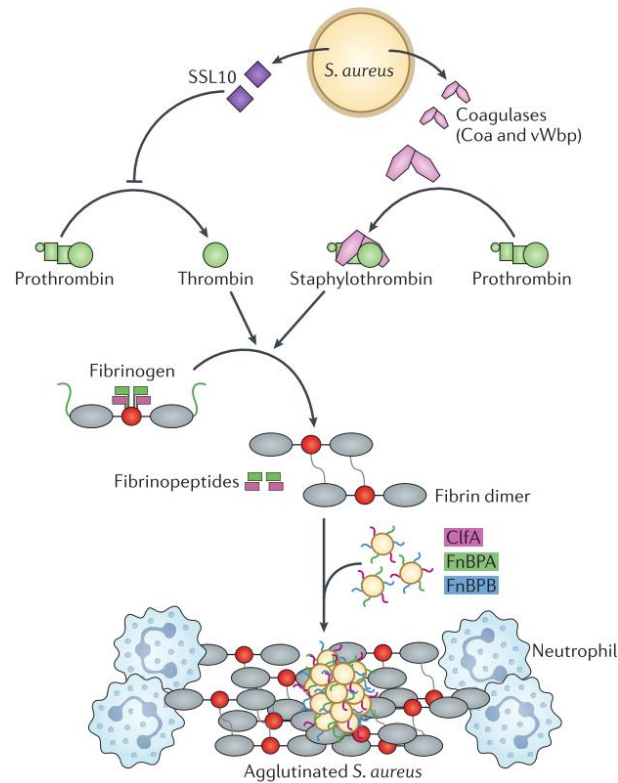


Figure 3-2 : Formation et rôle du complexe staphylocoagulase de *S. aureus* dans la formation d'une pseudo-capsule. Inhibition de la formation de thrombine par l'hôte grâce à la protéine SSL10 d'après Thammavongsa *et al.* [256]

Dans le sang, sous l'action de la staphylocoagulase, une pseudo-capsule de fibrine peut se former autour de *S. aureus* (Figure 3-2). L'activation de la prothrombine est propre à Coa et vWbp. En revanche, d'autres protéines staphylococciques peuvent se lier au fibrinogène et contribuer à la formation de cette pseudo-capsule protectrice autour de la bactérie. C'est le cas du « *clumping factor A*, ClfA », ancré à la surface de la bactérie, il permet de cantonner l'activité de la staphylocoagulase à ce niveau en y piégeant son substrat. ClfA facilite aussi l'adhésion des bactéries sur le fibrinogène déposé sur les épithélia. La protéine excrétée « *Extracellular fibrinogen binding protein*, Efb » joue un rôle similaire. Par sa partie C-ter, elle est capable de reconnaître la protéine C3b, élément de la cascade du complément fixé à la surface des bactéries, et de recruter le fibrinogène par sa partie N-ter [260-262]. La fixation de l'opsonine C3b sur les pathogènes facilite normalement leur identification par les phagocytes, tout comme les anticorps. Cette reconnaissance est empêchée par l'action de la protéine Efb à laquelle est fixé le fibrinogène qui peut ensuite être transformé en fibrine au niveau de la surface de *S. aureus* [263]. Dans le réseau de fibrine ainsi formé, les bactéries se regroupent et forment des abcès où elles sont moins accessibles aux phagocytes [263]. Néanmoins, en périphérie de ces structures, Coa est exposée aux anticorps de

l'hôte qui, s'ils la reconnaissent, peuvent faciliter la phagocytose. De plus, la présence d'anticorps spécifiques perturbe l'activité de la staphylocoagulase, ralentissant ou empêchant la formation de ces micro-caillots protecteurs. La diversité élevée de la séquence génétique du domaine « D1 – D2 » de *coa*, pouvant atteindre 50% entre les souches, est perçue comme une adaptation de *S. aureus* permettant de sélectionner des variants dont la coagulase n'est pas reconnue par les anticorps. C'est en tout cas l'hypothèse avancée par Thomer *et al.* pour expliquer cette importante variabilité dans un domaine aussi essentiel [259]. Elle est étayée par le fait que le taux de survie d'un inoculum de *S. aureus* dans du sang humain dépend de la présence d'anticorps capables de se lier à Coa ou vWbp et que l'injection de ces mêmes anticorps a un effet protecteur contre les bactériémies à *S. aureus* chez la souris [258, 259].

3.1.1.4 Résistance aux antibiotiques, focus sur la méticilline

Etat des lieux

Quelques années après l'introduction de la pénicilline G, près de 50% des isolats cliniques de *S. aureus* étaient devenus résistants à cet antibiotique grâce à la production de β -lactamases. Ces enzymes excrétées clivent la pénicilline la rendant ainsi inactive. Afin de proposer un traitement efficace contre ces souches, la méticilline, une pénicilline semi-synthétique rendue résistante à l'activité des β -lactamases fût employée à partir de 1959. Deux ans seulement après cette introduction, une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline était identifiée parmi 5440 isolats cliniques par des scientifiques britanniques [264]. Au début des années 1980, le rôle de la protéine PBP2a, responsable de la résistance était mis en évidence [265, 266]. Entretemps, ces nouvelles souches de *Staphylococcus aureus* Résistantes à la Méticilline baptisées SARM se sont propagées à travers le monde. Bien que la méticilline ne soit aujourd'hui plus employée en clinique, le terme de SARM désigne toujours les staphylocoques résistants à cet antibiotique et ses successeurs comme la cloxacilline ou l'oxacilline, eux aussi de la famille des β -lactamines. Initialement limitées aux milieux hospitaliers, les infections à SARM sont depuis les années 1990 fréquemment d'origine communautaire [44, 267, 268].

Mécanisme de résistance

Le gène codant pour PBP2a, *mecA*, est localisé sur une partie du génome de *S. aureus* appelée « *staphylococcal cassette chromosome (SCCmec)* ». Cette cassette de taille variable représente 1 à 2% du génome total de *S. aureus*. Au moins huit cassettes distinctes avaient été identifiées en 2010 [269]. Elles diffèrent notamment par les gènes encodés, certaines comportant en plus de *mecA* d'autres gènes de résistance aux antibiotiques. Chez *S. aureus*, l'expression de *mecA* est réprimée en l'absence d'antibiotique [270]. Néanmoins, cette répression est levée chez des clones hautement résistants qui apparaissent dans une population bactérienne à une fréquence de 10^{-7} à 10^{-3} [271]. *SCCmec* est un élément génétique mobile, retrouvé dans d'autres espèces de staphylocoques notamment

S. epidermidis. Chez les isolats cliniques de cette espèce, la proportion de souches résistants à la méticilline est de l'ordre de 75% à 90%, proportion supérieure à celle retrouvée lors d'infections impliquant *S. aureus* [77]. Il est probable que l'acquisition initiale de *SCCmec* par *S. aureus* provienne de staphylocoques à coagulase négative qui constituent un réservoir de gènes de résistance [77, 267, 272].

La synthèse du peptidoglycane, élément essentiel au maintien de l'intégrité de la paroi bactérienne face au choc osmotique et donc à la croissance bactérienne, peut être inhibée par l'action des β -lactamines. Elles agissent sur les « *Penicillin binding protein* », PBP, protéines membranaires

permettant l'élongation du peptidoglycane. *S. aureus* possède quatre PBP différentes, numérotées de 1 à 4, auxquelles vient s'ajouter PBP2a, enzyme de 78 kDa, chez les SARM. Elle leur permet de poursuivre la synthèse du peptidoglycane en présence de β -lactamines. Cela est rendu possible par une affinité moindre de PBP2a pour ces antibiotiques en comparaison des autres PBP et une faible vitesse d'acylation par les antibiotiques [273]. Le peptidoglycane est formé par une chaîne où s'alternent les résidus N-acétyl-glucosamine et acide N-acétylmuramique [274]. L'acide N-acétylmuramique possède une chaîne latérale composée de cinq acides aminés se terminant généralement par deux résidus D-alanine (Figure 3-3). L'activité transpeptidase de certaines classes de PBP permet de relier ces unités pentapeptidiques entre elles, dans une réaction impliquant l'avant dernière D-alanine, renforçant ainsi la structure et la réticulation du peptidoglycane. C'est précisément cette activité qui est inhibée en présence de β -lactamines. Leur structure semblable au motif D-ala-D-ala, substrat naturel des PBP, permet aux β -lactamines de le remplacer et ainsi de bloquer durablement la réaction qu'elles catalysent [270]. Le noyau β -lactame est clivé dans le site actif de l'enzyme et une liaison covalente se forme entre l'antibiotique et un acide aminé du site actif. Ce complexe se dissocie ensuite très lentement ($t_{1/2} = 10$ h rapporté au taux de croissance, $\mu \approx 30$ min) [275]. Devant l'incapacité de poursuivre la synthèse de peptidoglycane en présence d'antibiotique, la croissance de la population bactérienne est stoppée. L'acquisition de PBP2a rétablit cette réaction même en présence d'antibiotiques rendant ainsi les bactéries résistantes aux β -lactamines [270]. D'autres mécanismes de résistance aux antibiotiques non présentés ici existent comme le rejet de l'antibiotique par des pompes à efflux ou des modifications structurales des PBP existantes [275].

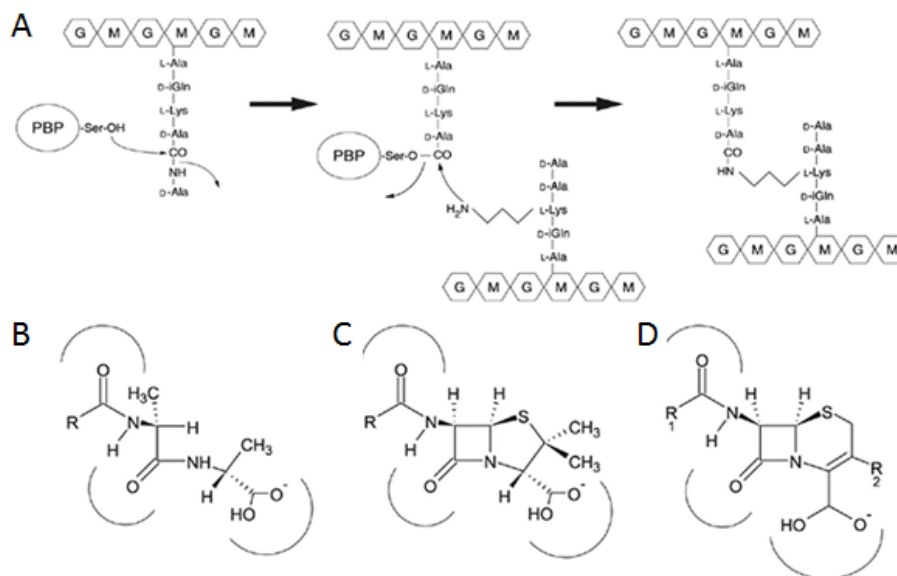


Figure 3-3 : **A.)** Réaction de transpeptidation catalysée par les PBP ; (B, C et D) Mise en évidence de la similarité de structure entre **B.)** les deux résidus D-ala-D-ala et deux β -lactamines, **C.)** la pénicilline et **D.)** la céphalosporine d'après Zapun *et al.* 2008 [270]

L'activité des PBP n'est pas limitée à cette seule réaction de transpeptidation. Elles assurent également une réaction de transglycosylation reliant entre elles les blocs constitués de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétylmuramique (lipide II). Certaines classes de PBP peuvent assurer les deux activités alors que d'autres à l'image de PBP2a n'effectuent qu'une réaction [275]. Les PBP sont situées à l'extérieur de la membrane plasmique sous la couche de peptidoglycane dont elles assurent la synthèse. Chez *S. aureus*, les PBP sont situées au niveau du septum des cellules en division, où commence donc la synthèse du peptidoglycane [276].

3.1.2 Impact de la protéine A sur la détection de *S. aureus* avec une biopuce à anticorps

Un tableau dans la section Matériels & Méthodes (**page 132**) regroupe l'ensemble des anticorps utilisés au cours de ce travail. La Figure 3-4 est représentative de nombreux essais de détection de *S. aureus* en TSB. D'une part, les bactéries interagissent simultanément sur toutes les immunoglobulines G, y compris celles qui ne reconnaissent pas d'antigènes staphylococciques (KLH). D'autre part et cela sera l'objet de la **partie 3.1.3**, des bactéries se déposent à la surface de l'or et sur certains plots (IgY NI et Ppy) de manière non spécifique. Il en résulte des cinétiques d'interactions difficilement interprétables comme celle présentée sur la Figure 3-4. Par comparaison, la détection de *S. Enteritidis* dans ce même milieu est aisée avec une distinction nette entre l'anticorps spécifique (SE3) et les négatifs.

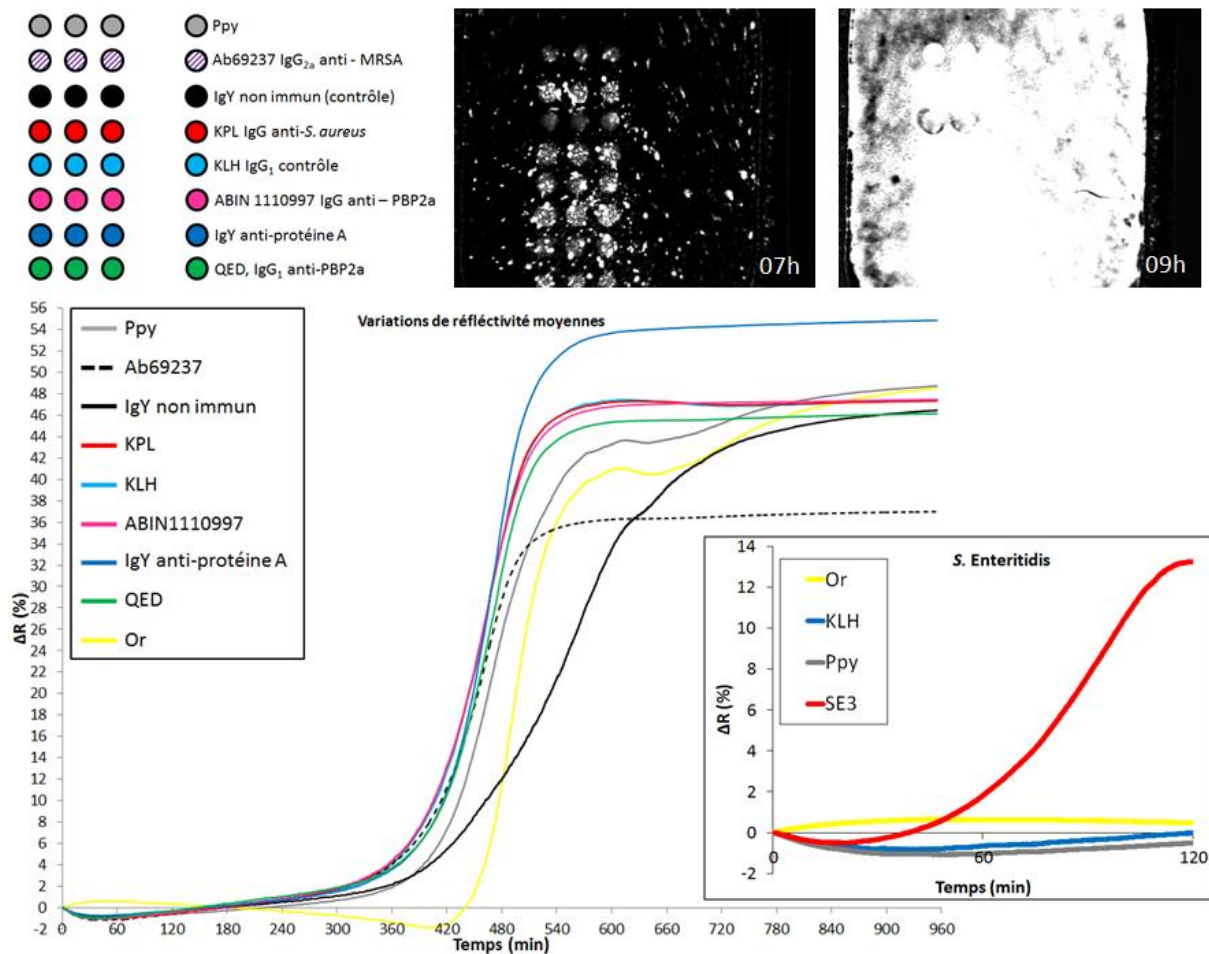


Figure 3-4 : Illustration des effets de la présence de protéine A chez *S. aureus* sur la détection de cette bactérie en TSB par SPRI sur une biopuce à anticorps : Augmentation quasi simultanée de la variation de réflectivité pour l'ensemble des anticorps. Par comparaison, une distinction beaucoup plus nette entre anticorps positif (SE3) et négatif (KLH) est possible avec *S. Enteritidis* dépourvue de protéine A et qui se dépose peu à la surface.

L'affinité de la protéine A pour les anticorps est une propriété bien connue et largement exploitée pour la purification d'immunoglobulines de différents mammifères (Tableau 3-1). L'affinité de la protéine A pour les IgG peut varier d'un facteur 1000 selon l'isotype auquel appartient l'anticorps. Elle est généralement comprise entre 10^6 et 10^9 M^{-1} [277-279].

Tableau 3-1 : Affinité de la protéine A de *S. aureus* pour les anticorps selon l'organisme où ils ont été produits et leur isotype d'après Huse, K *et al.* et Boschetti, E. *et al.* [280, 281].

Espèce hôte d'où proviennent les anticorps	Isotype de l'anticorps	Affinité
Homme	IgG3 ; IgA ; IgM	Faible
	IgG1 ; IgG2 ; IgG4	Forte
Souris	IgM	Nulle
	IgG1	Faible
	IgG2a ; IgG2b ; IgG3	Forte
Rat	IgG2a, IgG2b, IgM	Nulle
	IgG1	Faible
	IgG2c	Forte
Chèvre	IgG1	Faible
	IgG2	Forte
Mouton	IgG1	Faible
	IgG2	Forte
Lapin	IgG	Forte
	IgM	Nulle
Poule	IgY	Nulle

Il paraît alors judicieux de choisir les anticorps déposés sur la biopuce parmi ceux pour lesquels la protéine A a une affinité faible ou nulle excluant d'emblée les anticorps polyclonaux. Cependant ce point est contredit par le fait que l'anticorps anti – KLH employé tout au long de ce travail comme contrôle négatif est une IgG1 de souris pour lequel la protéine A n'a en principe qu'une faible affinité. Pourtant, les interactions entre *S. aureus* et cet anticorps apparaissent par SPRI aussi fortes sinon plus que celles survenant sur d'autres isotypes d'anticorps pour lesquels la protéine a une affinité supérieure. De surcroît, parmi ces anticorps, certains sensés reconnaître des déterminants antigéniques de *S. aureus* ne semblent pas interagir avec la bactérie davantage que l'anticorps anti – KLH. L'évitement des interférences dues à la protéine A par l'emploi d'anticorps pour lesquels elle n'a qu'une faible affinité n'est donc pas une option valable. De plus, le choix des anticorps est également gouverné par leur facilité d'utilisation, les IgM et les IgG3 ayant tendance à être moins solubles que d'autres isotypes et à se dégrader lors d'un stockage prolongé. Enfin, la plupart des anticorps commerciaux sont produits chez la souris, le lapin ou la chèvre restreignant encore un peu plus les possibilités. Plusieurs solutions envisagées au cours de ce travail pour atténuer l'impact de la protéine A sur la détection de *S. aureus* sont présentées dans la **partie 3.2**.

3.1.3 Biofilm et essais de réduction de sa formation

Le terme de biofilm désigne la formation de dépôts bactériens sur une surface solide, généralement à l'interface avec un milieu liquide. Une matrice composée d'exopolysaccharides ainsi que des protéines et de l'ADN de bactéries lysées entourent les bactéries dans le biofilm. Cette organisation extrêmement répandue dans le règne bactérien se rencontre sur des surfaces aussi variées que des canalisations en industrie, des implants en médecine ou le corps humain lui-même dans le cas d'endocardites infectieuses ou d'infections urinaires [282]. Cette structuration de la population bactérienne lui confère une plus grande résistance à des conditions environnementales défavorables comme la présence d'antibiotiques. La formation de biofilm peut être initiée par l'apparition de carences dans le milieu. Les bactéries en suspension, dites planctoniques, adhèrent alors aux surfaces solides. Initialement faiblement attachées à la surface, les bactéries finissent par former des microcolonies qui s'agrègent et forment une structure complexe dans laquelle les conditions

diffèrent grandement du milieu qui l'entoure. Les biofilms bactériens sont l'objet d'importantes recherches portant entre autres sur les mécanismes conduisant à leur formation et des matériaux susceptibles de l'inhiber, du fait de leur implication dans de nombreux domaines. En médecine, les implants médicaux et les cathéters sont susceptibles d'être colonisés par des bactéries qui y forment un biofilm, constituant alors le foyer infectieux primaire de bactériémies notamment. Les staphylocoques sont régulièrement impliqués dans ce type d'infections, bien aidés par leurs protéines de surface et leur présence récurrente sur notre peau [282, 283]. La pathogénicité de *S. epidermidis* a en partie été découverte en raison de sa fréquente implication dans des infections dues aux implants [77].

Comme le montre la Figure 3-5, les interactions avec la surface du prisme ne sont pas identiques selon les bactéries détectées. Alors que pour *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis et *Escherichia coli* O157:H7, les interactions sont cantonnées aux plots d'anticorps spécifiques, *S. aureus* se dépose sur toute la surface y compris hors des plots. Cette quasi-simultanéité dans l'apparition des interactions spécifiques et non spécifiques est ici caractéristique de *S. aureus*. En revanche, en fin d'expérience, lorsque la population bactérienne est à son maximum, la surface est envahie indépendamment de la bactérie présente produisant des images comme celle de la cuve de droite (image « B »), une partie des bactéries présentes dans la cuve finissant par sédimenter sur la surface.

Lors de l'apparition des interactions de *S. aureus* avec les dépôts, ceux constitués d'IgG paraissent être colonisés plus tôt et plus intensément. Cependant, cette impression visuelle est mal retranscrite sur les cinétiques où la moyenne des niveaux de gris au niveau des zones d'intérêts atténue cette différence (Figure 3-4). La réduction de ce phénomène est donc une priorité car il nuit à la qualité et la reproductibilité des signaux mesurés. En effet, d'une expérience à l'autre, la colonisation des zones de la surface paraît être aléatoire.

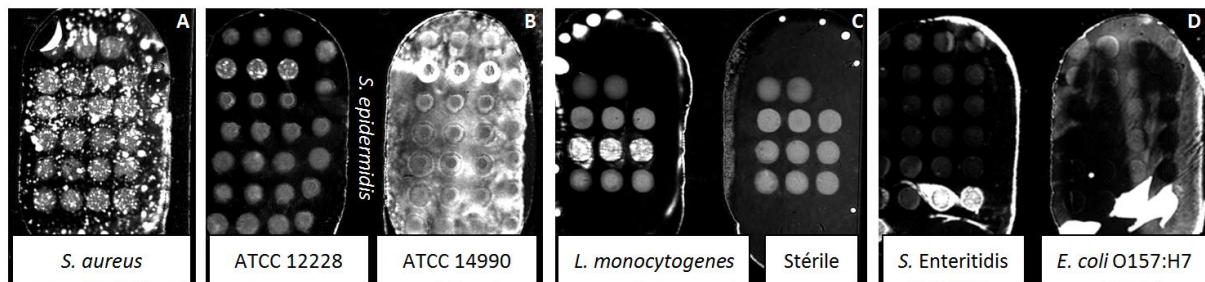


Figure 3-5 : Images différentielles illustrant l'allure des signaux obtenus en SPRI avec A.) *S. aureus*, B.) *S. epidermidis* ATCC12228 et 14990, C.) *L. monocytogenes* et du milieu de culture stérile et D.) *S. Enteritidis* et *E. coli* O157 : H7, toutes cultivées en TSB à 37°C. Sur ces images, excepté *S. aureus* qui se dépose aussi bien sur les plots que sur la surface d'or nue, les interactions des autres bactéries se restreignent au niveau des dépôts contenant l'anticorps les reconnaissant.

Divers traitements de surface ont donc été entrepris afin de limiter l'adhésion de *S. aureus* à la surface d'or. Le dépôt à la surface du prisme d'une solution de PBS + 1% BSA systématiquement pratiqué était insuffisant pour juguler le phénomène. Le remplacement de la solution de BSA par la caséine, protéine abondante dans le lait, n'a pas sensiblement diminué l'adhésion des bactéries à la surface comme le suggèrent pourtant plusieurs travaux [284, 285]. Pour leur étude, Abadian P.N. *et al.* ont employé la SPRI pour évaluer l'efficacité du traitement de la surface d'or par des solutions de BSA (2 mg.mL⁻¹), de caséine (1 mg.mL⁻¹) et d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine). Par rapport à l'or non protégé, le dépôt préalable de caséine réduisait de 60% l'adhésion de *S. aureus*

contre seulement 20% pour la BSA [284]. Au-delà des conclusions non partagées, peut-être en raison des conditions de culture, de l'absence de fonctionnalisation de leur surface et de concentrations des solutions différentes, ces travaux montrent que la visualisation d'un biofilm est possible par SPRI.

L'ajout au milieu de culture de 0,75% de Tween 80, un surfactant non ionique, a permis de ralentir la formation du biofilm. Néanmoins, les résultats les plus probants furent obtenus grâce à la configuration présentée sur la Figure 3-6. À l'origine de cette idée, l'observation des images de la Figure 3-5 fait ressortir que les bactéries mobiles telles que *S. Enteritidis* et *E. coli* O157 :H7 ne se déposent pas à la surface, tout au moins dans les premiers temps où le signal apparaît. Ainsi, l'immobilité de *S. aureus*, dépourvu de flagelle, peut conduire à sa sédimentation et faciliter la formation du biofilm.

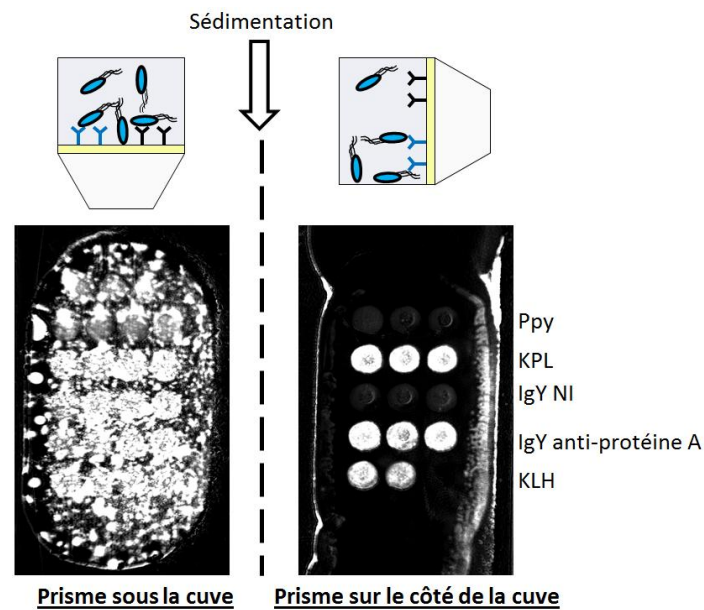


Figure 3-6 : Effet de l'orientation du prisme sur les interactions de *S. aureus* à la surface du prisme (cultures en TSB à 37°C, de gauche à droite, images différentielles à 480 et 390 minutes avec des inocula initiaux de 10^3 et 10^7 UFC.mL⁻¹)

Au lieu d'être placé sous la cuve, le prisme est ainsi placé sur l'un des côtés, configuration qui nécessite simplement une autre géométrie de cuve. Grâce à cela, seules les interactions spécifiques sur les anticorps persistent (image de droite de la Figure 3-6). L'affinité de la protéine A pour le fragment Fc des IgG s'en trouve confirmée comme le montre les interactions intenses sur les plots de l'anticorps KLH. Les contreparties de cette orientation sont une élévation de la limite et donc du temps de détection. En effet, la sédimentation des bactéries sur la surface fonctionnalisée favorise leur interaction avec les anticorps ce qui n'est plus le cas avec le prisme sur le côté de la cuve. Ainsi, la limite basse de détection directe passe de $10^5 - 10^6$ UFC.mL⁻¹ lorsque le prisme est sous la cuve à $10^7 - 10^8$ UFC.mL⁻¹ lorsque le prisme est placé sur le côté de la cuve.

Néanmoins, d'autres bactéries elles aussi immobiles comme *S. epidermidis* ou *L. monocytogenes* à 37°C, n'adhèrent pas à la surface comme le fait *S. aureus*. La souche *S. epidermidis* ATCC 12228 est connue pour ne pas former de biofilm [286]. Cela se vérifie sur la Figure 3-5 (image « B ») où aucun biofilm ne se forme en comparaison de la cuve voisine contenant la souche ATCC14990. Ainsi, ces images SPR attestent de la formation d'un biofilm bien réel par *S. aureus* et non pas seulement de l'incapacité des bactéries à demeurer en suspension. Elles justifient le recours à cette orientation du prisme pour la détection de bactéries connues pour former des biofilms [283].

3.1.4 Distinction entre *S. aureus* sensible et résistant à la méticilline

3.1.4.1 Techniques courantes

La connaissance du profil de susceptibilité aux antibiotiques d'un microorganisme est une information encore plus pertinente que sa seule identification pour prescrire une antibiothérapie adéquate. Pour *S. aureus*, la résistance aux β -lactamines oriente le traitement vers d'autres familles d'antibiotiques comme les glycopeptides (vancomycine). Cette information cruciale peut être obtenue par les tests phénotypiques permettant d'obtenir une valeur de CMI et les tests dits moléculaires qui se basent sur la détection d'un marqueur de résistance, généralement le gène *mecA* ou la protéine PBP2a [287]. Comme cela a été présenté dans l'introduction bibliographique, ces derniers s'effectuent à partir de bactéries lysées. Le Tableau 3-2 liste les principaux tests disponibles pour l'identification de *S. aureus* et leurs principes de fonctionnement. Certains d'entre eux ont déjà été évoqués en introduction.

Tableau 3-2: Aperçu des tests permettant la détection de la résistance à la méticilline chez *S. aureus*

Nom du test	Principe du test	Fabricant
Tests phénotypiques		
VITEK® - 2 BD Phoenix™	Automates de culture permettant de réaliser simultanément l'identification et l'antibiogramme en milieu liquide. L'inoculation est réalisée à partir de colonies isolées reprises dans une solution saline.	bioMérieux, Marcy l'Etoile, France Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J., Etats-Unis
Etest® ou disques imprégnés	L'antibiotique est imprégné selon un gradient de concentration sur une bandelette de papier. Lorsqu'elle est déposée sur une gélose ensemencée avec des bactéries, l'antibiotique va diffuser dans le milieu et exercer son activité inhibitrice sur les bactéries à partir du seuil de la CMI, lisible sur la bandelette graduée.	bioMérieux, Marcy l'Etoile, France
Milieux chromogéniques (Ex : CHROMagar™ MRSA ; chromID® MRSA ; Spectra™ MRSA)	Milieux de culture sélectifs pour <i>S. aureus</i> et plus spécifiquement pour les SARM, d'une part grâce à la forte concentration en sels du milieu où seule une bactérie halophile comme <i>S. aureus</i> peut se développer et d'autre part la présence d'antibiotiques qui inhibent la croissance des SASM. Une activité enzymatique propre à <i>S. aureus</i> est révélée grâce à un substrat chromogénique colorant les colonies.	(dans l'ordre des noms cités, Becton Dickinson, bioMérieux et ThermoScientific, Remel)
Tests moléculaires		
Alere™ PBP2a culture Colony Test	Test immunochromatographique mettant en évidence la présence de PBP2a à partir de bactéries lysées issues d'une colonie.	Alere, Waltham, Mass., Etats-Unis)
PBP2a test d'agglutination latex	Des particules de latex fonctionnalisées avec un anticorps monoclonal anti - PBP2a sont mises en contact avec des bactéries lysées. En présence de PBP2a, une agglutination visible à l'œil nu se produit.	Oxoid, Basingstoke, Royaume-Uni
PCR en temps réel (Xpert® MRSA / SA Blood culture ; BD GeneOhm StaphSR)	Détection de l'amplification en temps réel de séquences nucléiques spécifiques de <i>S. aureus</i> et du gène <i>mecA</i> et/ou des éléments de la cassette de résistance <i>SCCmec</i> .	(Cepheid, Sunnyvale, CA, Etats - Unis ; Becton Dickinson)
Verigene® Gram-Positive Blood Culture Test [112]	Test multiplexé permettant l'identification de nombreux pathogènes Gram ⁺ et des gènes de résistance aux antibiotiques à partir de l'hémoculture positive. La présence des gènes cibles est détectée puis amplifiée via leurs liaisons à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'ADN complémentaire	(Nanosphere, Northbrook, IL, Etats – Unis)

La rapidité d'obtention d'un résultat est le principal avantage des tests moléculaires par rapport aux méthodes phénotypiques qui nécessitent d'attendre le développement du microorganisme. En revanche, l'obtention de la CMI pour plusieurs antibiotiques par les tests phénotypiques peut s'avérer utile dans le choix de l'antibiothérapie. De plus, la présence ou l'absence de *mecA* ou de PBP2a n'est pas toujours corrélée avec le niveau de résistance aux antibiotiques ce qui constitue l'une des limites des tests moléculaires. En effet, des mutations influençant le niveau de résistance aux β -lactamines ont été identifiées dans plus d'une quinzaine de gènes autres que *mecA* [271].

Mais, le rôle central de PBP2a, véritable marqueur de la résistance aux β -lactamines chez *S. aureus*, en fait une cible prioritaire pour déceler les souches de SARM. Il n'est donc pas surprenant de voir se multiplier les brevets et publications concernant de nouveaux anticorps spécifiquement dirigés contre PBP2a et des méthodes pour les employer [260, 288, 289].

3.1.4.2 Résultats et discussions

De nombreux anticorps reconnaissant prétendument les SARM ou PBP2a sont disponibles commercialement. Mais, il faut prêter une attention particulière à l'antigène utilisé et aux étapes de contre sélection effectuées pour l'obtention de ces anticorps qui ne sont pas toujours rigoureuses et satisfaisantes. Compte tenu de l'information cruciale que représente la détection spécifique des SARM, nous nous devons de tester certains de ces anticorps pour évaluer la faisabilité de la détection directe de PBP2a sur des bactéries entières par SPRI. Pour cela, des expériences de détection simultanée de souches de *S. aureus* sensible et résistante à la méticilline ont été réalisées avec des anticorps anti-PBP2a sur le prisme. Aucune distinction possible n'a pu être constatée, quelles que soient les conditions employées. Confrontés à la liaison de la protéine A aux IgG, l'étude bibliographique a de plus fait apparaître que la localisation de PBP2a sous la couche de peptidoglycane rendait son accès à priori impossible aux anticorps sans lyse bactérienne préalable. Les résultats de ces expériences ne sont donc pas présentés ici car ils sont en tout point identiques avec ceux montrés jusqu'à maintenant. En revanche, l'ajout d'antibiotique dans le milieu (TSB) lorsque les interactions entre les bactéries et les plots d'anticorps commencent à être visibles, conduit bien à une distinction entre souches sensible et résistante comme le montre la Figure 3-7. L'arrêt de la croissance de la souche SASM par l'oxacilline empêche l'apparition d'un signal sur la biopuce révélant ainsi sa sensibilité. Au contraire, la présence d'oxacilline dans les cuves contenant une population de SARM ne stoppe pas son développement ni sa détection. Cette approche montre qu'un antibiogramme sur puce est réalisable à condition de développer le dispositif adéquat permettant d'introduire un antibiotique lors de la phase de croissance.

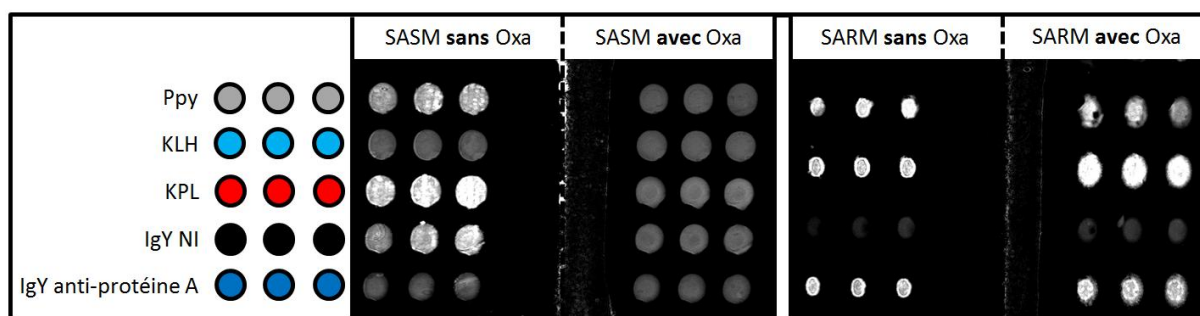


Figure 3-7 : Effets de l'ajout à la pipette de 5 µg.mL⁻¹ d'oxacilline dans les cuves lors de l'apparition des premières interactions sur les anticorps avec *S. aureus* BAA – 1721 (SASM) et BAA – 1720 (SARM).

Malgré la localisation des PBP, sous la couche de peptidoglycane, deux publications décrivent la détection directe sur les bactéries entières de ce marqueur de résistance [290, 291]. Un brevet de Huang *et al.* en 2014 protège également un anticorps (IgG) reconnaissant PBP2a et son utilisation pour différencier deux populations de *S. aureus*, sensible et résistante à la méticilline [292]. Dans la première publication présentant la distinction entre souches sensibles et résistantes à la méticilline à partir de bactéries entières, la présence de *mecA* par PCR est contrôlée chez 250 souches de *S. aureus*. Parmi ces souches, quatre d'entre elles sont sélectionnées, deux résistantes à la pénicilline et possédant PBP2a, une résistante grâce à la présence de β -lactamases mais n'ayant pas PBP2a et une sensible ne possédant aucun des deux mécanismes de résistance. Le niveau d'expression de PBP2a

est cinq fois plus élevé pour l'une des deux souches comme le montre le gel d'immunochromatographie. En SPR, seule l'injection des souches possédant PBP2a entraîne une modification de signal, proportionnelle selon les auteurs à la quantité de PBP2a exprimée sur la membrane. Un très faible signal est observé pour la souche sensible sans qu'aucune explication ne soit avancée. La protéine A n'est jamais mentionnée dans ces travaux alors qu'elle paraît être un élément inévitable à prendre en considération lorsque des anticorps de mammifères sont employés pour la détection de *S. aureus* [290].

Dans les travaux de Bandara *et al.*, un anticorps monoclonal reconnaissant PBP2a est fixé sur une monocouche auto-assemblée déposée à la surface d'une fibre optique. Le profil de sensibilité à la méticilline de toutes les souches testées est vérifié selon les protocoles en vigueur aux Etats-Unis (*Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI*). Le panel de bactéries testées est constitué de plusieurs souches de *S. aureus* (11 SARM / 1 SASM), d'autres espèces de staphylocoques (15 résistantes / 4 sensibles) et également d'autres genres bactériens (7 souches testées). Ces résultats sont ensuite comparés avec ceux obtenus avec le dispositif développé qui mesure l'atténuation de la lumière transmise en présence des différentes bactéries. L'exposition du capteur à toutes les bactéries résistantes à la méticilline (resuspendues en PBS) se traduit par un signal supérieur au seuil fixé par les auteurs et inférieur dans le cas des bactéries sensibles qu'il s'agisse ou non de staphylocoques. Ce seuil correspond à trois fois la valeur de l'écart-type du signal mesuré avec des souches sensibles. Les souches testées proviennent de sources humaines et animales. La limite de détection déterminée par les auteurs est de 10^2 UFC.mL⁻¹ [291]. Là encore, la présence de protéine A chez certaines souches de staphylocoques n'est pas évoquée. Cependant toutes les bactéries testées ne possèdent pas cette protéine ou son équivalent ce qui ne permet donc pas de questionner l'ensemble de leurs résultats.

En dehors des références citées ici, aucun autre document n'a à notre connaissance proclamé la détection de PBP2a sur bactéries entières [290-292]. De même, il y a très peu d'exemples présentant la détection spécifique des SARM non lysés sur un biocapteur. Parmi elle, une autre publication de Tawil *et al.* décrit la détection d'une souche de SARM par SPR à l'aide d'une surface fonctionnalisée par un phage (BP14). Ce phage lytique n'a semble-t-il pas d'affinité pour la souche sensible à la méticilline utilisée dans ces travaux puisque sa croissance n'est pas affectée en présence du phage contrairement à celle de la souche résistante. Néanmoins aucune donnée SPR correspondant à l'injection de la souche sensible à la méticilline n'est présentée, le contrôle négatif étant alors une souche d'*E. coli* [139]. Si la détection de PBP2a par SPR à partir de bactéries lysées n'a pas encore été proposée, celle de *mecA* préalablement amplifié par la technologie LAMP (*loop - mediated isothermal amplification*) a été décrite récemment [293]. La surface fonctionnalisée avec la séquence complémentaire peut être régénérée pour d'autres analyses.

3.2 Neutralisation des effets de la protéine A dans la détection de *S. aureus*

3.2.1 Emploi d'anticorps IgY

3.2.1.1 Introduction

Comme évoqué dans la **partie 3.1.2**, l'affinité de la protéine A pour les anticorps varie selon leurs isotypes et l'hôte où ils ont été produits. Elle peut-être nulle, ce qui est le cas des anticorps d'oiseaux, notés IgY. Cette appellation est utilisée pour désigner de manière plus restrictive les anticorps produits chez la poule. Les IgY partagent avec les IgG de mammifères la structure caractéristique en forme de « Y » composée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les IgY arborent également un fragment constant et deux sites de liaisons à l'antigène. Malgré ces ressemblances

avec les IgG, des différences notables séparent ces deux types d'anticorps. A commencer par la composition des chaînes lourdes et légères, constituées pour les IgY d'un fragment variable et de quatre fragments constants pour la chaîne lourde et d'un fragment variable et un constant pour la chaîne légère. Leur masse molaire de 180 kDa est plus élevée que celle leurs homologues chez les mammifères (150 kDa) [294, 295]. Ces différences structurelles sont telles que le fragment constant des IgY n'est reconnu ni par la protéine A, ni par la protéine G des streptocoques. Cela implique l'emploi d'autres techniques de purification que celles fréquemment employées pour les IgG. Mais c'est notamment cette propriété qui suscite l'intérêt pour les IgY [260, 296]. Yamada. K *et al.* ont développé deux tests, ELISA et immunochromatographique, basés sur des IgY dressés contre PBP2a afin d'éviter les interférences liées à la protéine A dans la détection de la résistance à la méticilline chez *S. aureus*. À partir de lysats bactériens, ils parviennent à détecter ce marqueur de résistance chez une dizaine de souches de SARM parmi lesquels des isolats cliniques. Aucun faux-positif avec des souches sensibles à la méticilline n'est constaté même pour celles exprimant fortement la protéine A [260]. De même, Reddy, P.K. *et al.* ont montré lors d'un test ELISA que la protéine A se fixait davantage sur des IgG que des IgY, utilisés comme anticorps primaires et adsorbés dans un puits. L'emploi d'un IgY dirigé contre l'alpha hémolysine leur permet ainsi de détecter cette toxine par ELISA sans crainte de faux-positifs provoqués par la fixation de la protéine A [296]. Ces travaux bien qu'encore peu nombreux démontrent que les IgY peuvent permettre la détection d'antigènes staphylococciques en s'affranchissant des interférences dues à la protéine A.

La plus grande distance phylogénétique qui sépare l'homme des oiseaux par rapport aux mammifères est un autre argument à l'emploi des IgY pour développer des tests immunologiques. En effet, les ressemblances entre les IgG de différentes espèces de mammifères les exposent à des interférences lorsqu'ils sont employés avec du sérum ou du sang humain [297]. Elles peuvent être liées à la reconnaissance du fragment Fc par C1q ou par des anticorps circulants. Ces anticorps sont susceptibles de provenir d'une précédente exposition à des anticorps étrangers par exemple lors d'une immunothérapie. L'exemple le plus cité est désigné par l'abréviation HAMA pour « *human anti-mouse antibodies* ». La présence du facteur rhumatoïde, une immunoglobuline dirigée contre d'autres immunoglobulines peut aussi être la source d'interférences. Le risque est ainsi limité avec les IgY qui ne sont pas reconnus par ces protéines sériques. Ceci est démontré par les travaux de Vikinge, T *et al.* au cours desquels le dépôt de composés du sérum sur une surface fonctionnalisée avec des IgG de souris ou des IgY a été étudié par SPR [298]. Trois protéines impliquées dans la cascade du complément C1q, C3 et la properdine se déposaient de manière plus importante sur les IgG que les IgY. Les auteurs suggéraient même que la fixation de C1q aux IgG déposés à la surface activerait la cascade du complément. Ils sont ensuite parvenus à détecter la protéine C3 par SPR grâce à un anticorps IgY la reconnaissant alors que la détection avec une IgG était perturbée par les interférences. Ainsi, l'emploi d'IgY pourrait avoir le double avantage de limiter les interférences issues de la protéine A et de l'échantillon sanguin.

Bien qu'initialement excrétés dans la circulation sanguine où persiste une concentration de $1 - 1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, les IgY sont essentiellement retrouvés dans le jaune d'œuf. Leur concentration y est habituellement comprise entre 3 et 7 mg par millilitre soit entre 50 et 100 mg d'anticorps par œuf. L'obtention d'une quantité équivalente d'anticorps polyclonaux chez des mammifères requière plusieurs dizaines de millilitres de sang. Parmi les anticorps présents dans le jaune d'œuf, de 1 à 10% sont généralement spécifiques d'un antigène donné [295]. Les anticorps totaux sont le plus souvent extraits du jaune d'œuf par précipitation mais l'ultrafiltration ou une chromatographie d'affinité avec l'antigène d'intérêt sont possibles. Ces anticorps peuvent se conserver plusieurs mois à 4°C et pour

de plus longues durées à -20°C. Ils se dégradent à des températures supérieures à 70°C et des pH inférieurs à 4 [294, 295]. Bien que plus fragiles que leurs homologues chez les mammifères, ces conditions de stabilité sont parfaitement compatibles avec l'application visée.

3.2.1.2 Résultats expérimentaux

Dans le cadre de ce travail, plusieurs anticorps de poule ont été employés. L'anticorps Ab17473 supposé reconnaître le peptide β -amyloïde est utilisé comme contrôle négatif au même titre que l'anticorps anti-KLH (IgG). Cet anticorps IgY est présent sur la quasi-totalité des prismes employés sous la dénomination « IgY Non Immun, IgY NI ». L'autre anticorps IgY fréquemment employé (Ab19483) est quant à lui dirigé contre la protéine A de *S. aureus*, antigène qu'il est pertinent de cibler pour l'identification de cette bactérie. Cette stratégie est partagée avec certains kits d'agglutinations [95]. Dans ces tests comme Slidex® Staph Plus (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) ou Pastorex™ Staph Plus (BioRad, Marnes la Coquette, France), les fragments constants d'anticorps sont utilisés pour la détection de la protéine A. De manière surprenante, l'offre commerciale pour des anticorps de poule dirigés contre *S. aureus* est limitée aux anticorps anti-protéine A. Certaines entreprises proposent de produire des IgY contre les antigènes d'intérêt. La société Agro-Bio (La Ferté Saint-Aubin, France) a été sollicitée dans le cadre de ce travail. Une immunisation à partir de bactéries entières a été entreprise avec trois souches bactériennes, *S. aureus* BAA – 1720 et BAA – 1721 ainsi que *S. epidermidis* ATCC12228. Chacune des souches a été injectée à deux poules, à quatre reprises, les injections étant espacées dans le temps (J0, J14, J21 et J30). Après la dernière injection, les œufs sont collectés durant cinq jours. Préalablement à l'immunisation, les anticorps des six poules ont été testés par SPR afin de vérifier la naïveté de ces organismes vis-à-vis des bactéries qui allaient leur être injectées. Aucune ne possédait d'anticorps dirigés contre ces bactéries comme le montre les cinétiques des figures 3-8 et 3-10, expériences au cours desquelles les anticorps des poules avant immunisation ont été déposés sur la biopuce.

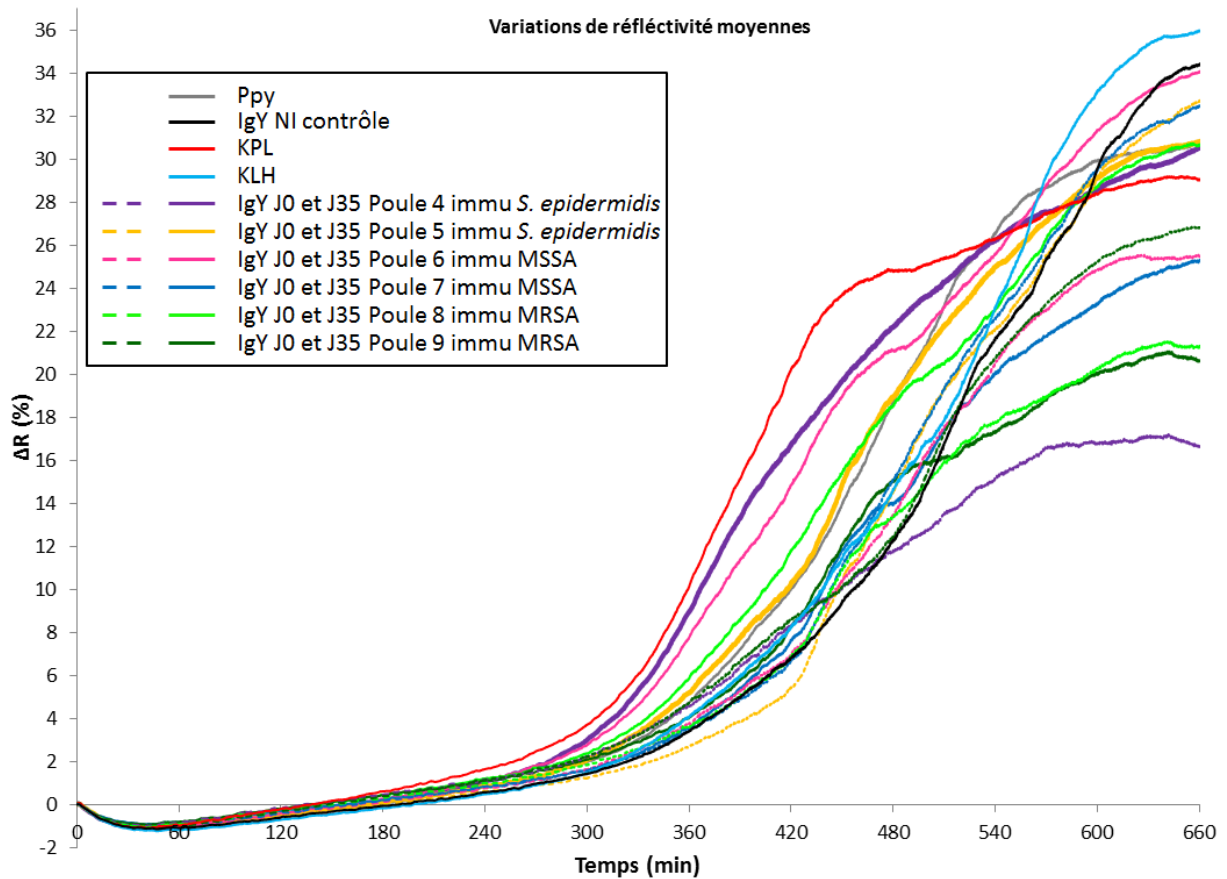


Figure 3-8 : Variations de réflectivité moyennes (3 plots) obtenues lors de la détection de *S. epidermidis* ATCC 12228 avec les anticorps IgY obtenus avant (tracés en pointillés) et après immunisation (tracés en traits pleins) des poules avec les différentes bactéries. L'anticorps KPL (anti - *S. aureus*, en rouge) présente une réactivité croisée avec *S. epidermidis* pour lequel aucun anticorps commercial n'a été trouvé. Les poules 4 et 5 (traits plus épais) ont été immunisées avec *S. epidermidis*. Le prisme est placé sous la cuve.

Par ailleurs, l'absence d'interactions avec les anticorps signal pouvant également signifier qu'ils n'ont pas été gréffés, leur présence sur la surface d'or après dépôt par électropolymérisation a été vérifiée par immunofluorescence. Pour cela, un anticorps de chèvre anti - IgY fourni par la société Agro-Bio a été biotinylé et sa fixation sur les dépôts d'anticorps IgY observée au microscope à fluorescence après ajout de SAPE. La présence des IgY à la surface d'or est confirmée par cette expérience (Figure 3-9). Les protocoles de biotinylation de l'anticorps et de révélation sont présentés dans la partie Matériels & Méthodes (page 138).

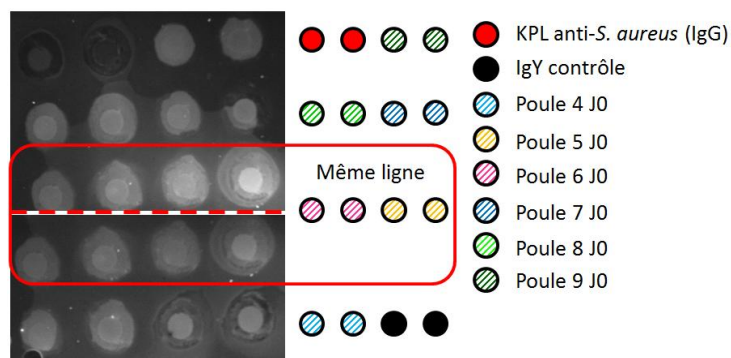


Figure 3-9 : Vérification par immunofluorescence de la fixation des IgY sur la surface d'or à l'aide d'un anticorps de chèvre anti - IgY biotinylé

L'immunisation des poules a bien permis de produire des anticorps dirigés contre les bactéries comme l'illustrent les figures 8 et 10. Les anticorps extraits avant immunisation (J0, traits pointillés) subissent les mêmes interactions que le contrôle négatif IgY NI. Ceux obtenus après immunisation (J35, traits pleins) se distinguent plus ou moins nettement des premiers anticorps. Par exemple sur la Figure 3-8, les anticorps issus de la poule 4 permettent une meilleure détection de *S. epidermidis* que ceux de la poule 5, toutes deux ayant pourtant été immunisées avec cette même bactérie. Cela montre les différences de réponse immunitaire entre les organismes et justifie le choix d'immuniser deux poules avec une même souche. Une réactivité croisée est aussi mise en évidence sur la Figure 3-8. En effet, *S. epidermidis* se fixe au niveau des dépôts constitués des anticorps des poules 6 et 8, respectivement immunisées avec *S. aureus* BAA-1721 et BAA-1720. Cette réactivité croisée était attendue, ces trois bactéries appartenant au même genre et donc partageant des antigènes communs. Elle n'était pas dérangeante à ce stade où il s'agissait plutôt d'identifier un anticorps pour la détection de *S. aureus*.

Lors de tests préliminaires avec *S. aureus* et le prisme sous la cuve, la présence d'anticorps dirigés contre ces bactéries a pu être attestée. Néanmoins, la formation des dépôts caractéristiques de *S. aureus* à la surface du prisme rendaient difficile l'interprétation des résultats (Figure 3-10). L'orientation du prisme présentée dans la **partie 3.1.3** a donc été employée. Là, plus aucune interaction avec les IgY n'a été observée alors qu'elle persiste nettement sur l'ensemble des IgG (image « B »).

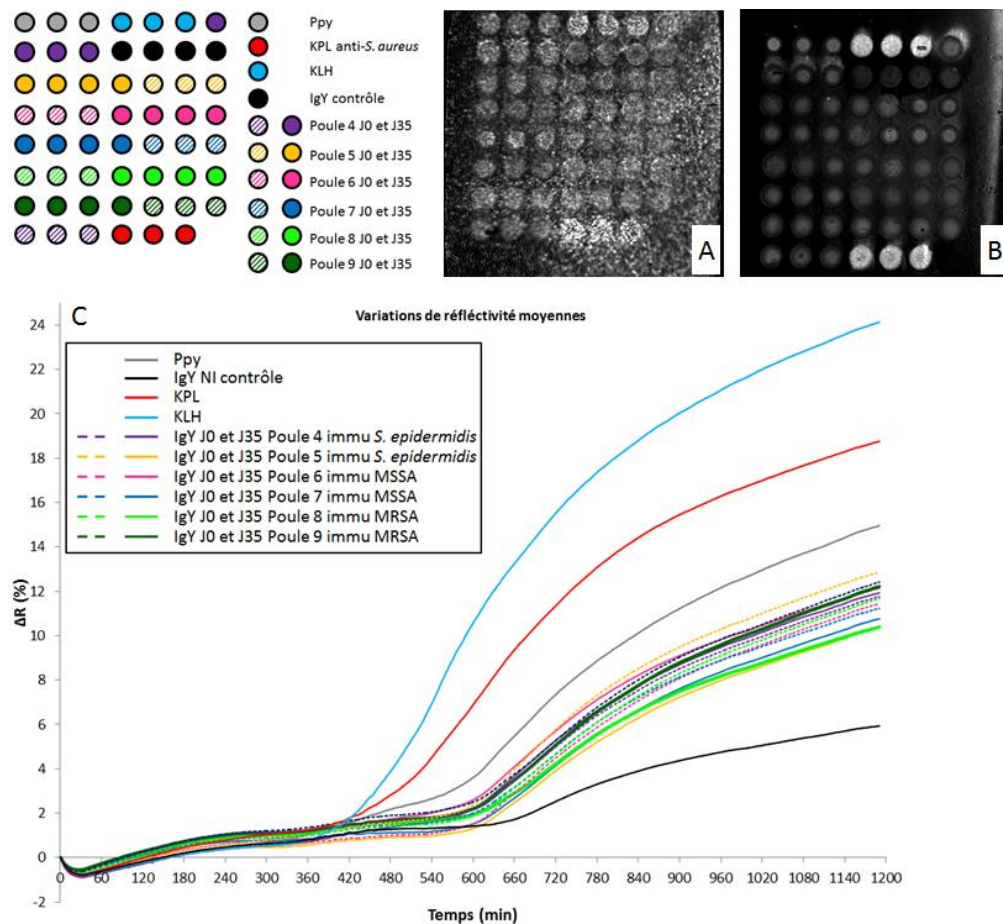


Figure 3-10 : Tests des anticorps IgY avec A.) *S. aureus* BAA-1721 et le prisme sous la cuve. Sur cette image différentielle, des dépôts bactériens plus importants peuvent être distingués au niveau des IgY provenant de poules immunisées (J35, cercles pleins) notamment les poules 4, 6 et 9 ; B.) et C.) *S. aureus* BAA-1720 et le prisme sur le côté de la cuve. Aucune interaction au niveau des anticorps IgY n'est alors visible. *S. aureus* interagit seulement avec les dépôts des IgG KLH et KPL.

L'hypothèse formulée pour expliquer ce phénomène est que la proportion d'anticorps IgY spécifiques par rapport aux anticorps IgY totaux est trop faible pour obtenir un signal clair par SPRi.

3.2.1.3 Validation de l'hypothèse et recherche de solutions

Afin de confirmer l'hypothèse formulée, l'anticorps monoclonal SE3 employé pour la détection de *S. Enteritidis* [174] a été dilué avec l'anticorps de contrôle KLH afin de mimer un mélange polyclonal contenant des anticorps spécifiques et non spécifiques d'un antigène donné. En pratique, SE3 a été dilué avec une solution de l'anticorps KLH dans des proportions allant de 1 anticorps SE3 pour un anticorps KLH à 1 SE3 pour 20 KLH. En parallèle, des dépôts avec l'anticorps SE3 seul aux concentrations auxquelles il est supposé se trouver dans les mélanges ont été effectués. Les interactions de *S. Enteritidis* avec ces dépôts ont ensuite été observées par SPRi. Le résultat de cette expérience est présenté sur la Figure 3-11.

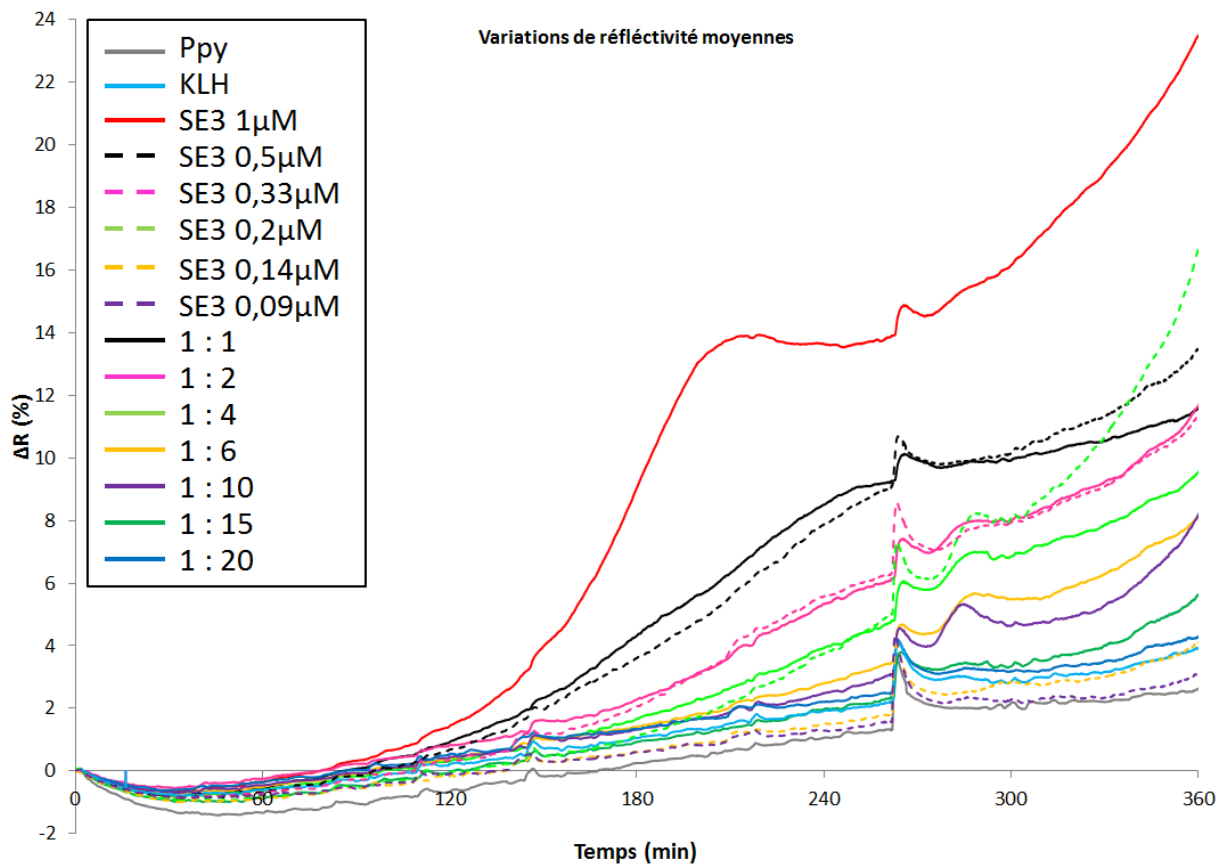


Figure 3-11 : Détection de *S. Enteritidis* avec l'anticorps SE3 déposés purs à partir de solutions à différentes concentrations (traits pleins) et dilué dans des anticorps non spécifiques (KLH) selon différents ratio (pointillés). Les courbes représentent les variations de réflectivité moyenne sur 3 plots.

Comme attendu, la concentration en anticorps spécifiques dans les dépôts influe sur l'intensité des interactions avec les bactéries. À concentration égale en anticorps spécifique dans la solution de dépôt, la présence ou l'absence d'anticorps non spécifiques ne modifie pas les interactions avec les bactéries. Cela se vérifie jusqu'à une concentration en anticorps spécifiques de 0,2 μM , comme l'attestent les courbes aux profils identiques entre SE3 dilués seuls ou avec KLH. Jusqu'à un ratio de 1 anticorps SE3 pour 4 anticorps KLH voire 1 pour 6, une interaction spécifique se distingue du contrôle négatif constitué seulement de l'anticorps KLH. Au-delà de ce ratio et de cette dilution, les interactions deviennent très faibles. D'après cette expérience, le dépôt doit donc être constitué d'au minimum 15 à 20% d'anticorps spécifiques. Or il est admis que les IgY extraits contiennent entre 1 à 10% d'anticorps spécifiques [295], proportion visiblement insuffisante pour permettre de détecter

des bactéries par SPR avec ces anticorps. L'augmentation de la concentration totale en anticorps dans les solutions employées pour les dépôts (et donc dans les dépôts) n'améliore cependant pas la détection. Cela implique que la proportion, et indirectement la concentration des IgY spécifiques dans les dépôts, doit être augmentée.

Plusieurs essais de concentration des IgY spécifiquement dirigés contre les bactéries ont été réalisés sur la base d'un protocole décrit dans une demande de brevet [299]. Celle-ci fait état de la purification d'anticorps polyclonaux obtenus après immunisation d'un animal avec des bactéries entières en employant ces mêmes bactéries. Elles doivent être inactivées et fixées sur un support de chromatographie à l'aide de formaldéhyde. D'après l'un des exemples mentionnés, un tel dispositif doit permettre d'éliminer 80% des anticorps de départ, conservant principalement les anticorps spécifiques. Plusieurs tentatives n'ont pas abouti à des résultats probants arrétant là les expériences avec ces anticorps IgY.

A posteriori, il aurait sans doute été plus judicieux d'immuniser les poules avec des protéines staphylococciques de surface plutôt que des bactéries entières. Bien qu'ayant probablement un potentiel immunogène plus faible que des bactéries entières, il aurait ensuite été possible de fixer ces protéines sur un support de chromatographie pour effectuer la purification des anticorps produits ce qui est difficilement réalisable avec des bactéries entières.

3.2.2 Fragmentation des IgG par digestion enzymatique

La liaison de la protéine A aux anticorps impliquant majoritairement leur fragment constant (Fc), la possibilité de l'éliminer pour ne conserver que le fragment de liaison à l'antigène a été étudiée (Figure 3-12). Ces fragments peuvent être obtenus par digestion enzymatique des anticorps avec des protéases telles que la pepsine, la papaïne ou la trypsine. La pepsine génère d'une part des fragments $F(ab')_2$ comportant les deux sites de liaisons à l'antigène et une petite portion du fragment Fc incluant les ponts disulfure, et d'autre part le reste du fragment Fc segmenté en plusieurs morceaux. Son activité est donc parfaitement adaptée à l'objectif visé. Le protocole de digestion des anticorps est présenté de manière détaillée dans la partie Matériels et Méthodes (page 137). Pour s'assurer de la complète élimination d'éventuels fragments Fc ou d'anticorps non digérés, la solution récupérée à l'issue de la digestion est éluée sur une colonne d'affinité (protéines A/G). La fraction non retenue est en principe constituée seulement des fragments $F(ab')_2$ qui sont ensuite couplés au pyrrole – NHS. Néanmoins, un tel protocole de digestion nécessite plusieurs milligrammes d'anticorps pour être (si besoin) adapté, comme par exemple au niveau du temps d'incubation avec la pepsine. Cette quantité n'ayant pas toujours été disponible, la digestion de certains anticorps n'a pas abouti. De plus, la littérature rapporte des écueils similaires pouvant être liés à des variations dans la composition des anticorps les rendant plus ou moins susceptibles à la digestion [300]. Seules des publications relatant l'emploi de fragments recombinants avec des bactéries ont été trouvées [301, 302]. Elles montrent la capacité de ces fragments fixés sur un support à se lier à des antigènes bactériens dont la protéine A de *S. aureus* [302].

Des fragments $F(ab')_2$ ont tout de même pu être obtenus pour plusieurs anticorps à commencer par certains reconnaissant *L. monocytogenes* (Figure 3-12). Alors que des interactions persistent sur l'anticorps anti – *Listeria* (Ab78729) digéré dans la cuve où *L. monocytogenes* est présente, elles disparaissent totalement avec *S. aureus*. Cela démontre que l'emploi du seul fragment $F(ab')_2$ permet bien d'éliminer les interactions liées à la protéine A tout en conservant l'affinité de l'anticorps pour son antigène. Les interactions entre le fragment et la bactérie paraissent cependant plus faibles que

celles entre l'anticorps entier et la bactérie. Malheureusement lors de cette expérience, l'anticorps anti-*S. aureus* (KPL) digéré semble avoir perdu toute son affinité pour la bactérie. Il fait partie des anticorps pour lesquels la digestion fût problématique.

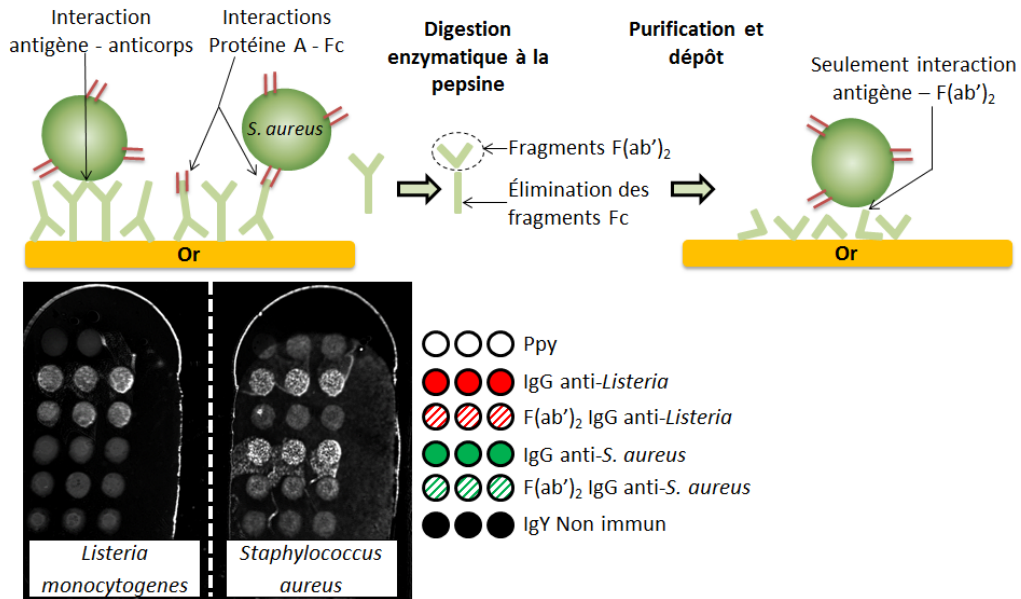


Figure 3-12 : Origine des interactions liées à la protéine A et stratégie de digestion enzymatique des anticorps à la pepsine. Conservation de la spécificité du fragment $F(ab')_2$ de l'anticorps Ab78729 pour *L. monocytogenes*.

Pour compléter les résultats de l'expérience présentée sur la Figure 3-12, des fragments d'anticorps spécifiques de *S. aureus* devaient être obtenus. Sur le même prisme, ont été déposés des anticorps spécifiques (AbD 0300-0084) et non spécifiques (IgG anti-BSA) de *S. aureus*, ainsi que leurs fragments $F(ab')_2$ respectifs obtenus dans des conditions de digestion scrupuleusement identiques (Figure 3-13).

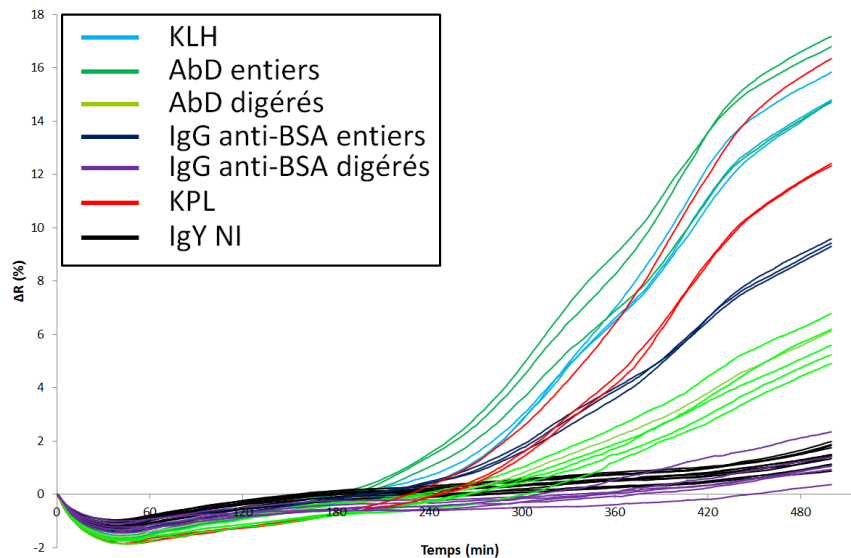


Figure 3-13 : Cinétique SPRi montrant les interactions en milieu TSB entre *S. aureus* BAA-1720 et des anticorps entiers et leurs fragments $F(ab')_2$ obtenus après digestion à la pepsine. L'anticorps AbD reconnaît théoriquement *S. aureus*

A nouveau, la digestion d'un anticorps non spécifique de *S. aureus*, ici l'IgG anti-BSA, aboutit à la disparition totale des interactions dues à la protéine A. En revanche, des interactions sont clairement

visibles sur les six plots du fragment de l'anticorps spécifique (AbD). Elles sont là-encore plus faibles que celles sur l'anticorps entier, sur lequel se cumulent les deux types d'interactions. L'absence totale d'interaction sur le fragment F(ab')₂ de l'IgG anti-BSA démontre que le fragment Fc a bien été totalement éliminé lors de la digestion. Par conséquent, le signal observé sur les dépôts du fragment F(ab')₂ de l'anticorps AbD est bien dû à la spécificité de l'anticorps pour des antigènes staphylococciques.

L'emploi de fragments d'anticorps peut donc permettre de limiter le signal induit par la présence de protéine A chez *S. aureus* en milieu de culture simple. En plus des résultats présentés ici, des fragments F(ab')₂ de l'anticorps KLH ont été fournis par L. Bellanger (CEA Marcoule) et peuvent constituer un contrôle négatif efficace dans ce contexte. Un fragment ScFv recombinant, reconnaissant le *clumping factor* A (ClfA) de *S. aureus* a aussi pu être testé (Réf MOM-18029-S(P), Creative™ Biolabs, Shirley, Etats-Unis). Il permet lui aussi la détection de *S. aureus* en milieu de culture simple en s'affranchissant des effets de la protéine A.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE

La détection précoce de bactéries par SPRI alors qu'elles se multiplient dans le milieu de culture ouvre de nouvelles perspectives. Parmi celles-ci, la détection de pathogènes fréquemment isolés lors d'hémocultures est une application au fort potentiel. La mise au point a été menée avec *S. aureus*, dont l'incidence et la gravité potentielle des infections appellent à une identification aussi rapide que possible. Les remarquables stratégies d'évitement de notre système immunitaire que possèdent *S. aureus* font de sa détection un défi de taille. Cela a pu être illustré ici par la présence de protéine A à la surface de *S. aureus* et la formation de biofilm qui aboutissaient toutes deux à un signal extrêmement bruité et difficilement interprétable. L'orientation latérale du prisme a permis d'éliminer totalement les interactions non spécifiques à la surface du prisme, plus efficacement que toutes les autres tentatives effectuées. Cette configuration conjuguée à un blocage du prisme avec une solution de PBS + 1% BSA durant une vingtaine de minutes avant l'expérience a donc été adoptée pour la majorité des expériences présentées dans la suite de ce travail. Elle se justifiera d'autant plus dans des milieux complexes où la sédimentation sur la surface de constituants sanguins (protéines, cellules) rendrait la visualisation des interactions impossible. Les stratégies d'évitement des interactions provoquées par la protéine A évaluées dans cette partie sont prometteuses bien qu'incomplètes du fait de l'impossibilité d'employer dans la suite de ce travail les anticorps IgY produits. Tout au long de ce travail des anticorps IgY non-immuns et IgY anti – protéine A commerciaux sont utilisés attestant de la spécificité des interactions observées. En l'état, les autres anticorps IgY produits pour les besoins de ce travail ne sont pas utilisables car insuffisamment riches en anticorps spécifiques et difficiles à purifier. Toutefois, de nouveaux IgY spécifiquement dressés contre des protéines de surface de *S. aureus* et donc plus facilement purifiables pourraient être des sondes pertinentes. La digestion enzymatique des IgG permettant d'éliminer le fragment Fc donne aussi des résultats encourageants. L'obtention de fragments est néanmoins laborieuse et nécessite plusieurs milligrammes d'anticorps afin d'affiner le protocole de digestion. L'ensemble des points développés ici pour limiter les interférences liées à *S. aureus* pourraient également s'avérer utiles en présence de protéines sanguines capables d'interagir avec les ligands fixés à la surface. L'employabilité de la SPRI pour la détection de bactéries dans des conditions proches de celles d'une hémoculture fait l'objet du chapitre suivant.

4 Chapitre 4 :

Evaluation des effets matrices du sang et de ses dérivés en milieu d'hémoculture sur la détection de bactéries par SPRi

4.1 Les milieux d'hémoculture et leur employabilité pour la détection directe de bactéries par SPRI

4.1.1 Composition du sang

Avant d'être un échantillon dont l'analyse recèle de précieuses informations concernant l'état de santé d'une personne, le sang est un véritable organe liquide, qui assure des fonctions essentielles à l'organisme à commencer par le transport de solutés vers les organes. Chaque individu possède entre 4,5 et 6 litres de sang dont la composition reflète ses multiples rôles. Il est constitué d'une fraction cellulaire et de plasma qui représentent respectivement 45% et 55% de son volume (Figure 4-1).

Les érythrocytes, de loin les cellules les plus nombreuses dans le sang, assurent le transport du dioxygène fixé à l'hémoglobine vers les organes et les muscles et le retour du dioxyde de carbone vers les poumons. Les nutriments collectés au niveau du système digestif sont transportés vers les organes en s'associant à des protéines sanguines comme les globulines. Inversement, les déchets du métabolisme transitent en direction des reins et du foie afin d'y être éliminés. Enfin, les hormones nécessaires à la communication entre les cellules sont également véhiculées par le sang.

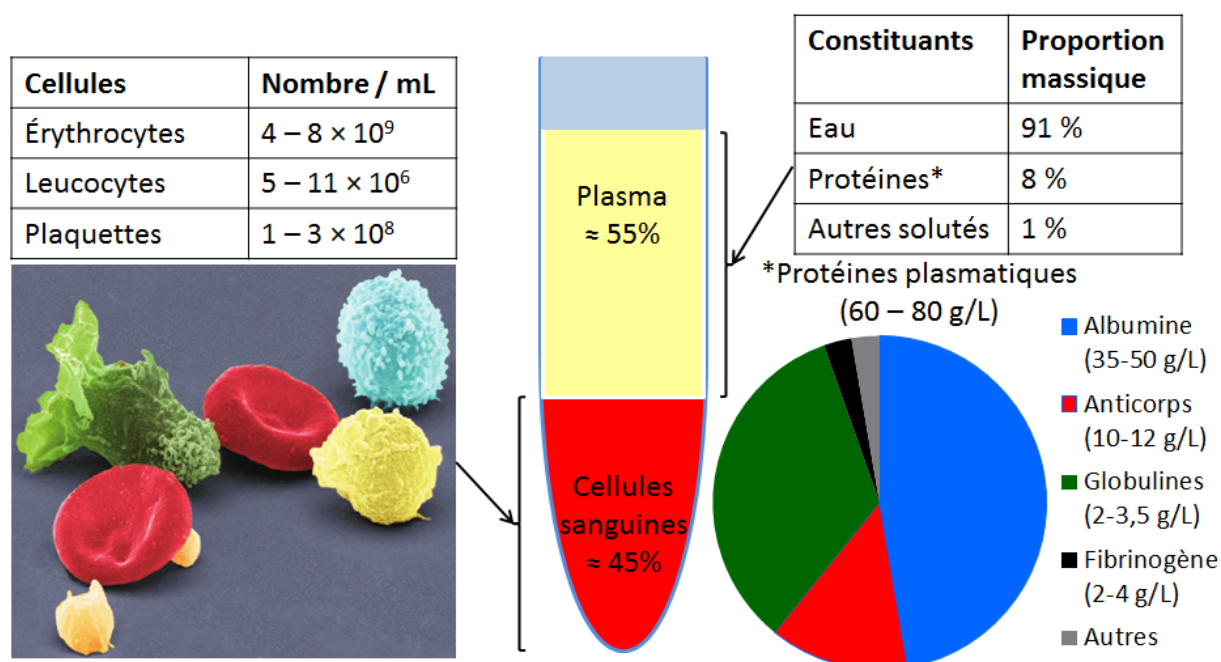


Figure 4-1 : Composition relative du sang, la photographie de différentes cellules sanguines est issue du livre « Biology : A guide to the natural world » [303]. Les couleurs ont été modifiées pour améliorer le contraste. Les cellules de couleur rouge sont les érythrocytes (globules rouges), les plus petits objets jaunes sont les plaquettes. Trois types de leucocytes (globules blancs) sont visibles, un lymphocyte (bleu), un neutrophile (jaune) et un macrophage (vert). Les composés regroupés sous le terme « autres solutés » dans le plasma sont des ions, des nutriments...

La fonction du sang n'est cependant pas limitée à ce rôle de transport puisqu'il contient des protéines (anticorps, protéines du complément) et des cellules (leucocytes) qui assurent la défense de l'organisme contre les pathogènes. Les leucocytes comme les érythrocytes sont produits à partir de cellules souches de la moelle osseuse mais contrairement à ces derniers, ils possèdent un noyau et leur diversité est plus grande. Selon la morphologie des cellules, la population de leucocytes peut se subdiviser en deux, les leucocytes granulaires et agranulaires. Parmi les leucocytes granulaires figurent les neutrophiles et les monocytes, capables de phagocyter des pathogènes. Les neutrophiles représentent à eux seuls 60% des leucocytes. Faisant également partie de ce premier groupe, les

éosinophiles et les basophiles, moins nombreux, contribuent eux aussi à la défense de l'organisme en sécrétant divers composés. Enfin, les leucocytes agranulaires regroupent les monocytes ($\approx 5\%$ des leucocytes) capables de se différencier en macrophages et les lymphocytes ($\approx 30\%$ des leucocytes), cellules sécrétrices d'anticorps qui représentent une part conséquente des protéines sanguines.

Enfin, le sang permet le maintien de l'homéostasie en régulant la température corporelle, la quantité d'eau présente dans le corps et les concentrations de différents solutés. Son pH est maintenu constant à 7,4. Compte tenu de son importance pour l'organisme, les pertes de sang doivent être limitées, notamment lorsqu'elles surviennent à l'occasion de blessures qui représentent aussi une porte d'entrée potentielle pour les pathogènes. C'est le rôle des plaquettes, fragments cellulaires micrométriques, et du fibrinogène (protéine sanguine) tous deux impliqués dans la coagulation sanguine. D'une composition riche et diversifiée, les fonctions assurées par le sang le sont tout autant. Certaines d'entre elles ont nécessairement des implications lors de son analyse, à commencer par l'activité du système immunitaire qui fait du sang un milieu hostile à la présence de bactéries.

4.1.2 Les milieux d'hémoculture : composition et rôles associés

Pour maximiser les chances de mettre en évidence la présence d'un éventuel pathogène, le prélèvement sanguin, d'un volume idéalement compris entre 20 et 30 millilitres, est généralement réparti dans deux bouteilles d'hémoculture aérobie et une bouteille d'hémoculture anaérobie. Cette dernière, incubée en l'absence d'oxygène permet la croissance de microorganismes anaérobies stricts, tels que *Bacillus fragilis*, mais également d'organismes anaérobies facultatifs comme *S. aureus* ou les entérocoques. Ainsi, bien que seulement 4 à 5 % des microorganismes isolés d'hémocultures soient strictement anaérobies, cette condition de culture est justifiée par la proportion non négligeable de bactéries anaérobies facultatives dont la présence est mise en évidence dans ce milieu, parfois même plus rapidement que dans les bouteilles de culture aérobie [31]. L'emploi conjoint de ces deux conditions de culture est donc nécessaire pour la bactériologie clinique [63, 66]. Le respect dans les bouteilles d'hémoculture du ratio entre les volumes de sang et de milieu, compris entre 1 : 5 à 1 : 10 garantit des conditions optimales pour la croissance de microorganismes [58, 59]. En effet, la formulation des milieux permet d'inhiber efficacement l'activité bactéricide de 8 à 10 millilitres de sang, volume qui maximise la probabilité d'effectivement inoculer le milieu avec un éventuel pathogène présent en faible quantité, c'est-à-dire entre 1 et 10 UFC par millilitre de sang. Au-delà de ce ratio, l'activité du complément et des globules blancs est insuffisamment inhibée et peut détruire les quelques bactéries présentes.

Certains milieux, dont ceux utilisés dans ce travail, contiennent des résines sous forme de billes en suspension dont le rôle est d'inhiber l'action d'éventuels antibiotiques présents dans le sang lors du prélèvement. En s'adsorbant sur ces résines sous l'effet d'interactions ioniques ou hydrophobes, l'activité des antibiotiques les plus courants est fortement réduite [304, 305]. Comparés aux milieux dépourvus de résine, ils réduisent le temps de détection et augmentent significativement le nombre d'hémocultures positives avec des microorganismes cliniquement pertinents [62, 306, 307]. Il s'agit pour bioMérieux des milieux BacT/Alert FA Plus et FN plus, respectivement pour la culture en aérobie et anaérobie et des milieux BACTEC Plus Aerobic/F et BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F de Becton Dickinson dont la composition est donnée dans le Tableau 4-1. Les performances de ces milieux et de leurs appareils d'incubation et de lecture respectifs, en terme de temps de détection et du taux de positivité sont globalement similaires [58, 62].

Tableau 4-1 : Composition du milieu d'hémoculture BACTEC Plus Aerobic/F et du TSB

BACTEC Plus Aerobic/F		*Bouillon digéré Soja – Caséine autre appellation de TSB	
Eau ultrapure	30mL		
Ingrédients	% (w / v)	Ingrédients	g.L ⁻¹
Bouillon digéré Soja – Caséine*	3,0	Digestion pancréatique de caséine	17
Extrait de levure	0,25	Semoule de soja digérée	3
Acides aminés	0,05	Chlorure de sodium	5
Sucre	0,2	Glucose	2,5
Polyanéthole sulfonate de sodium (SPS)	0,05	Hydrogénophosphate de dipotassium	2,5
Vitamines	0,025	pH final à 25°C 7,3 ± 0,2	
Antioxydants / Agents réducteurs	0,005		
Résine adsorbante non ionique	13,4		
Résine échangeuse de cations	0,9		

La base du milieu d'hémoculture est donc constituée de TSB, raison pour laquelle ce milieu a été employé en parallèle tout au long de ce travail. La composition du milieu BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F moins fréquemment utilisé n'est pas présentée dans le Tableau 4-1. La base nutritive est similaire au milieu aérobie mais elle est supplémentée avec des composés sensés faciliter la croissance de microorganismes anaérobies et seulement 0,035% de polyanéthole sulfonate de sodium (SPS) dont le rôle va être discuté dans la partie suivante.

4.1.2.1 L'anticoagulant polyanéthol sulfonate de sodium (SPS) dans les milieux d'hémoculture

Le SPS est le seul anticoagulant dont la présence est aujourd'hui admise lorsqu'un prélèvement sanguin est réalisé en vue d'une hémoculture [58]. Il entre dans la formulation des milieux d'hémoculture à hauteur de 0,025% à 0,05%. Ce composé thermostable résiste à des pH acides et basiques. D'après les travaux de Pien *et al.* le transfert du sang dans des tubes contenant du SPS (0,35% SPS dans une solution de 0,85% NaCl) avant l'inoculation des flasques d'hémoculture n'engendre pas de différence que ce soit au niveau du temps de détection ou du nombre d'hémocultures positives [308]. En France, les prélèvements pour les hémocultures sont effectués directement dans les bouteilles d'hémoculture évitant cette étape intermédiaire. Dans le cadre de cette thèse, ces résultats valident la stratégie d'approvisionnement du sang auprès de l'EFS dans des tubes contenant du SPS puis directement dans les bouteilles d'hémoculture suite à des problèmes d'approvisionnement. Analogue de l'héparine, l'activité anticoagulante de ce détergent polyanionique (Figure 4-1) est due à l'activation de l'antithrombine III, protéine inhibitrice de la cascade de coagulation [309, 310]. Il induirait également la précipitation du fibrinogène nécessaire à la coagulation [311].

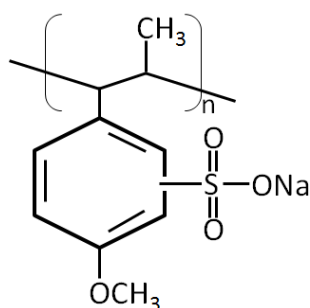


Figure 4-2 : Formule chimique du polyanéthol sulfonate de sodium (SPS)

A ses propriétés anticoagulantes, s'ajoute une inhibition de l'activité bactéricide du sang, déjà rapportée dans des travaux antérieurs à la seconde guerre mondiale [312]. La plupart des publications à ce sujet remontent cependant aux années 1970 – 1980 au cours desquelles le SPS a fini par s'imposer comme l'anticoagulant le plus adapté aux hémocultures [311-315]. En plus de son activité anticoagulante, ses apports pour la croissance des microorganismes dans le sang sont multiples. Ils se traduisent par un nombre d'hémocultures positives supérieur et une détection plus rapide qu'en son absence. Il permet la survie prolongée de bactéries dans du sang humain [314]. Ses propriétés sont dues à l'activité inhibitrice qu'il exerce sur la phagocytose des bactéries grâce à la neutralisation de l'activité du complément et à l'aggrégation d'une partie des anticorps [311]. La précipitation des anticorps demeure néanmoins partielle. La présence du SPS favorise la croissance de la plupart des microorganismes à l'exception notable de *Neisseria meningitidis* [313, 316]. La concentration de 0,05% de SPS a été définie telle que l'activité anticoagulante soit suffisante tout en ne perturbant pas la croissance de *N. meningitidis* [312]. Cette concentration serait même quatre fois supérieure à la quantité minimale requise pour assurer l'effet anticoagulant sur une durée permettant la croissance des microorganismes. En plus de ses effets sur la phagocytose, le SPS inhibe également l'action de certains antibiotiques comme les aminoglycosides [317]. Son action sur cette classe de molécules dotées de résidus cationiques est due à sa nature polyanionique. Il inhibe également l'activité de certaines pénicillines sur les staphylocoques [318].

4.1.2.2 Activité du SPS sur le complément

Bien que les effets bénéfiques du SPS et donc son utilisation soient communément admis, ses modes d'action sont encore pour certains mal compris. C'est notamment le cas pour l'effet du SPS sur les voies du complément. Étant mentionnées à plusieurs reprises dans ce manuscrit, il semble important d'expliquer succinctement le fonctionnement de ces voies. Le système du complément est un ensemble de protéines circulantes, plus d'une vingtaine sont dénombrées, qui forment une cascade de signalisation scindée en trois voies. Elles jouent un rôle essentiel dans la défense de l'organisme contre les pathogènes [319]. Le système du complément est impliqué aussi bien dans l'immunité innée, lorsque ses voies sont directement activées par la liaison d'une de ses protéines aux pathogènes, que dans l'immunité acquise en raison de la reconnaissance des complexes immuns formés par les anticorps.

Les protéines alors activées ont une activité protéolytique qui en s'exerçant sur d'autres protéines de la voie forment une cascade de signalisation. Le composant central est une protéine plasmatique appelée C3. Le fragment principal de cette protéine, C3b, se fixe de manière covalente aux pathogènes. La présence de C3b à la surface des microbes favorise la liaison des phagocytes qui possèdent des récepteurs pour C3b à leur surface. Cette cascade attire également d'autres cellules immunitaires comme les leucocytes (dont les lymphocytes) au niveau du foyer infectieux engendrant l'inflammation. Toutes aboutissent à la formation du complexe d'attaque membranaire principalement actif contre les bactéries Gram⁻ qui permet leur lyse [319]. Un schéma simplifié des voies du complément est présenté sur la Figure 4-3. De par son implication dans la défense de l'organisme, l'évolution a fait émerger chez les pathogènes des stratégies pour se substituer au complément [239, 320, 321]. Par ailleurs, son rôle ne se limite pas à la seule défense contre les pathogènes [228].

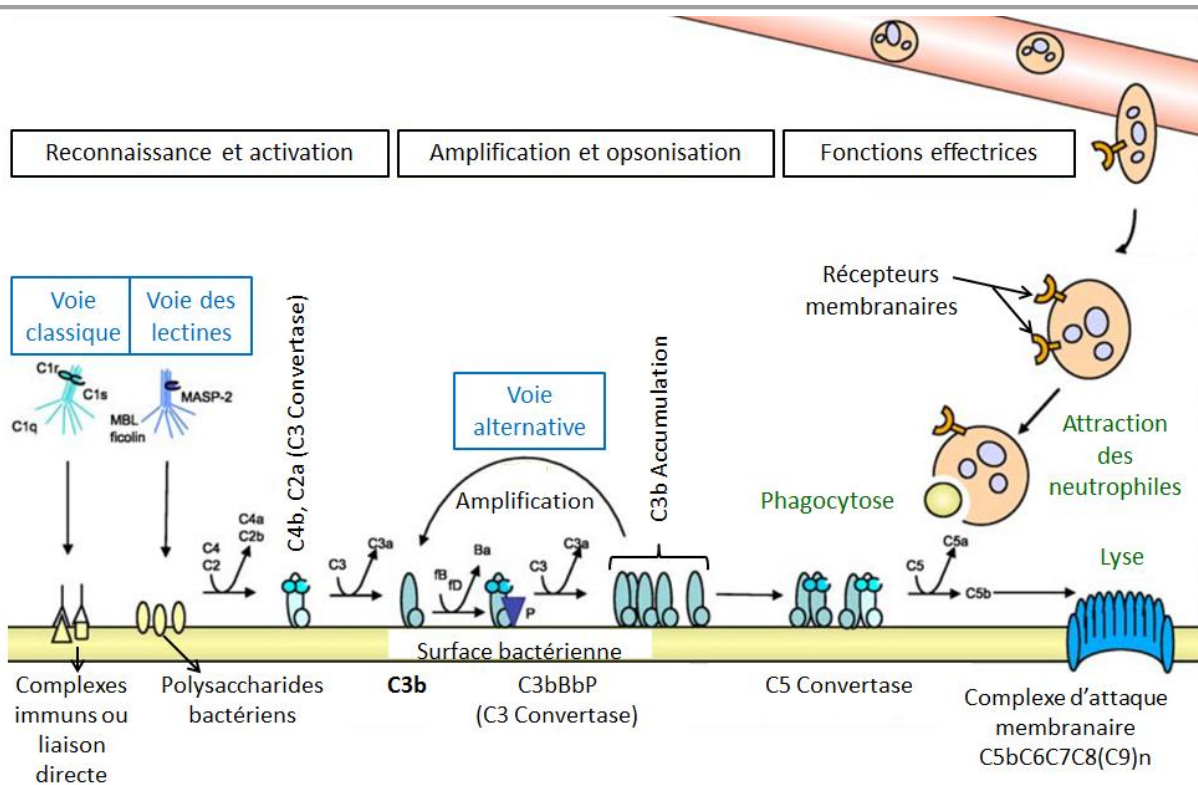


Figure 4-3 : Les 3 voies du complément d'après Laarman, *et al.* [239]. Toutes convergent vers la formation de C3b produite par le complexe C3 convertase. La **voie classique** est initiée par la fixation de la protéine C1q soit directement à la surface des pathogènes soit par l'intermédiaire de la portion Fc d'anticorps formant un complexe immunitaire à la surface des pathogènes. C1q recrute alors les protéines C1s et C1r et forme avec elles un complexe [C1q-(C1s)₂-(C1r)₂]. C1s clive alors les protéines C4 et C2 qui forment ensemble le complexe C3 convertase C4bC2a aboutissant finalement à la production de C3b qui peut alors accentuer l'activation de la **voie alternative**. Elle est déclenchée par la présence dans le sang de molécules étrangères à l'organisme (comme le LPS, lipides, protéines...) auxquelles se fixe C3b. C3 est hydrolysée en C3b de manière continue à un faible niveau, mais non-fixée C3b est instable ce qui permet la régulation de la voie en l'absence de pathogènes. Les facteurs B et D sont ensuite recrutés pour former le complexe C3 convertase, C3bBbP lui-même stabilisé par la properdine, une protéine plasmatique. La **voie des lectines** est activée par la reconnaissance de carbohydrates à la surface des bactéries (par les « Mannoses Binding Lectins » (MBL) ou les Ficolines). Ces protéines circulent dans le sérum associées à d'autres protéines (MASPs pour « MBL-associated serine proteases ») qui clivent alors C2 et C4.

Macroscopiquement, l'ajout de SPS (0,05% ou 0,025%) dans du sérum entraîne la précipitation immédiate de certains de ses composés, troublant ainsi la solution. Ce phénomène ne s'observe pas avec une solution de sérum inactivé à 56°C ce qui suggère l'interaction du SPS avec des composants thermolabiles comme les protéines du complément. L'implication de la protéine C3 est notamment évoquée [315]. Les travaux récents de Palarasah *et al.* au cours desquels les trois voies du complément ont été activées séparément avec des activateurs connus (IgG agrégées, venin de serpent...) en présence ou non de SPS montrent que l'inhibition du complément par cet anticoagulant n'est pas provoquée par une sur-consommation rapide des protéines de la cascade [322]. Pour le vérifier, du sérum humain est incubé pendant 60 min avec ou sans les activateurs puis la concentration de la protéine C3, sensée augmenter si la voie est activée, est mesurée. Alors qu'avec les activateurs du complément, la concentration de la protéine C3 est devenue nettement supérieure au contrôle, constitué de sérum seul, elle reste identique avec le SPS. Les voies classique et alternative du complément sont inhibées par 0,4 mg.mL⁻¹ de SPS alors que la voie des lectines n'est affectée qu'à partir d'une concentration de 0,7 mg.mL⁻¹. Ainsi, dans les milieux d'hémoculture

contenant 0,05% (0,5 mg.mL⁻¹), seules les voies classique et alternative sont totalement inhibées alors que la voie des lectines demeure partiellement active. L'augmentation de la concentration en ions Ca²⁺ et Mg²⁺ en présence de SPS ne restaure pas le bon fonctionnement de ces deux voies ce qui indique que le SPS n'a pas de pouvoir chélateur sur ces cations. Le mécanisme précis par lequel le SPS parvient à inhiber les voies du complément n'est pas précisé. Il est vraisemblablement lié à sa nature polyanionique puisque d'autres composés similaires ont les mêmes effets sur le complément [323]. Ces polyions sont notamment capables de se lier avec C1q bien qu'ils possèdent une constante de dissociation plus faible (de l'ordre de 10⁴ M) qu'un complexe immun (10⁸ M) [324].

4.2 Compatibilité de la présence de sang et de sérum pour la détection et l'identification de bactéries en cours de culture par SPRI

Le choix de *S. Enteritidis* comme modèle expérimental se justifie principalement par la possession de l'anticorps SE3, hautement affin et spécifique pour cette bactérie. Pour la même raison, ce couple « bactérie-anticorps » a été utilisé pour l'étude par SPR de la toxicité de nanoparticules sur les bactéries dans le cadre d'une collaboration [325]. Essentiellement à l'origine d'infections alimentaires, l'OMS estime à plusieurs dizaines de millions le nombre de cas annuels dans le monde entraînant environ cent mille décès⁹. Bien que peu fréquentes dans les populations occidentales, les bactériémies impliquant des salmonelles se rencontrent chez les personnes immunodéprimées notamment porteuses du VIH [326] mais également en Afrique où ce genre bactérien est même l'une des premières causes de cette infection, notamment le sérovar Typhimurium [327]. Sa détection dans le sang est donc pertinente bien que peu fréquente dans les pays occidentaux. La détection de *S. aureus* demeure cependant l'un des objectifs principaux de ce travail, les expériences avec *S. Enteritidis* et d'autres bactéries ayant longtemps permis de tester les hypothèses formulées au fur et à mesure de la progression.

Pour constituer une étape intermédiaire entre la détection de bactéries dans le milieu de culture simple et un milieu contenant du sang, du sérum a d'abord été employé comme matrice modèle. Il est préparé à partir de sang total en laissant se dérouler la cascade de coagulation puis en récupérant après centrifugation la partie supérieure du tube. Le sérum est à distinguer du plasma, préparé à partir de sang total prélevé dans un tube contenant un anticoagulant puis centrifugé. Ce dernier contient encore les protéines de la cascade de coagulation dont le fibrinogène, alors qu'elles ont été consommées dans le sérum. Ces deux milieux ne contiennent plus de cellules sanguines. Tel que préparé et conservé, les voies du complément demeurent actives dans le sérum utilisé [328]. Dans ce travail, le sérum et le sang total ont été préférés au plasma par crainte que l'anticoagulant, différent de celui utilisé pour l'hémoculture, n'affecte la croissance des microorganismes.

4.2.1 Faisabilité de la détection de *S. Enteritidis* en sérum et milieu d'hémoculture

Avant toute chose, il faut s'assurer que ni le milieu, ni la présence de sérum n'empêchent la détection de bactéries par SPRI sur une biopuce à anticorps, sans quoi les expériences en sang total seraient fortement compromises. Les résultats de ces expériences sont présentés sur plusieurs figures tout au long de cette partie. Comme le montre la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** (page Erreur ! Signet non défini.), il est possible de détecter spécifiquement *S. Enteritidis* dans le

⁹ Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Centre des médias : Infections à *Salmonella* (non typhiques) Aide-mémoire N°139. Août 2013 [en ligne]. Consulté le 06 juin 2016.
Disponible sur : <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/fr/>>

milieu d'hémoculture seul aussi bien que dans le TSB. L'ajout de sérum à raison de 1 volume de sérum pour 5 de TSB n'altère en rien cette possibilité (Figure 4-4).

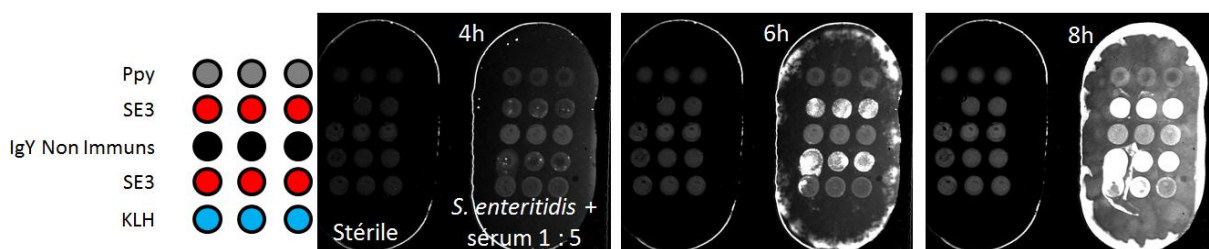


Figure 4-4 : Détection de *S. Enteritidis*, initialement 1290 ± 24 UFC.mL⁻¹, en présence de sérum dans du TSB et cuve stérile (TSB et sérum). Les dépôts « KLH » et « IgY non immuns » sont des contrôles négatifs.

La Figure 4-6 prouve également que la combinaison du milieu d'hémoculture et du sérum permet la détection spécifique de cette bactérie par l'anticorps SE3 malgré la présence de signaux assimilables à des faux-positifs sur certains anticorps. Ce point précis est l'objet de la **partie Erreur ! Source du envoi introuvable..** Aucun de ces milieux ne pose donc de problèmes susceptibles d'empêcher la détection de cette bactérie.

4.2.2 Compatibilité avec le sang total

L'expérience présentée sur la Figure 4-5 a pour but d'illustrer l'effet matrice associé au sérum et au sang dilués dans le milieu d'hémoculture à raison de 1 volume d'échantillon pour 10 de milieu conformément au ratio préconisé. Dans les deux cuves le milieu est donc stérile. Il est également important de rappeler ici que le prisme est placé sur le côté de la cuve, préservant la surface de la biopuce de la sédimentation des constituants sanguins. Pourtant, contrairement au sérum où l'adhésion non spécifique de constituants du milieu à la surface est quasi inexistante, elle est importante et rapide en sang total (Figure 4-5). Cependant, tous les plots, constitués de polypyrrole seul ou avec des anticorps, sont épargnés par ces dépôts qui n'évoluent ensuite plus au cours du temps. La relative préservation des plots d'anticorps vis-à-vis de ces dépôts implique que les interactions spécifiques entre les anticorps et les bactéries qui interviennent plusieurs heures après le début de l'acquisition demeurent mesurables.

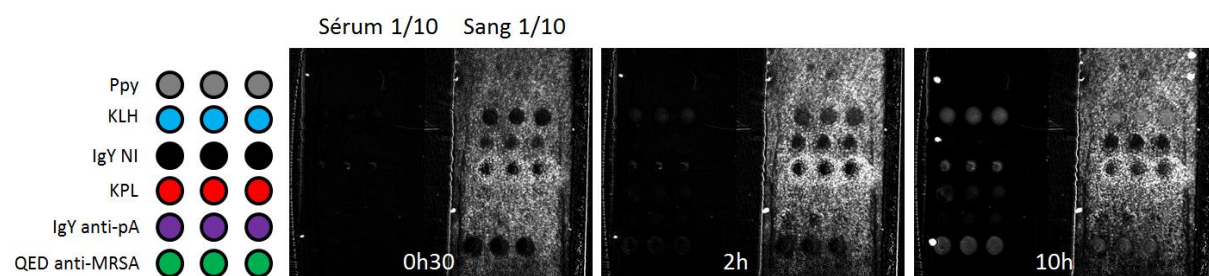


Figure 4-5 : Interactions à la surface du prisme dans le milieu Bactec Aérobie contenant du sérum ou du sang dilué (ratio 1 : 10).

L'épaisseur et la nature des dépôts de polypyrrole sont vraisemblablement l'une des explications possibles de cette propriété essentielle. En effet, la détection dans le sang de bactéries avec des anticorps thiolés qui forment des dépôts moins épais que les anticorps pyrrolés s'est révélée impossible car l'intégralité de la surface était rapidement recouverte.

Afin d'essayer de limiter le bruit de fond observé en dehors des plots, un blocage de la surface avec du PEG thiolé de 2 kDa a été évalué. Pour ce faire, la surface d'un prisme a été nettoyée au plasma

puis laissée au repos 24h à température ambiante avant que les anticorps n'y soient greffés par électropolymérisation. Puis 150 μ L d'une solution à 1 mM de PEG-SH ont été déposés sur la surface ensuite recouverte d'une lamelle couvre-objet pour assurer l'étalement de la solution. Après 1h30 d'incubation à température ambiante, la surface a été rincée avec du PBS puis le prisme a été employé pour une expérience de détection dans le sang. Deux expériences successives avec des anticorps pyrrolés et thiolés ont été menées. Ce pré-traitement de la surface n'a eu aucun effet sur l'adhésion de constituants sanguins sur la surface (données non présentées). Le suivi d'interactions étant toujours possible avec des anticorps pyrrolés, le seul traitement de surface systématiquement effectué a donc été le dépôt d'une solution de PBS + 1% BSA vingt minutes avant le début de l'expérience.

Les interactions entre les constituants sanguins et les surfaces ont été étudiées lors des recherches pour identifier des matériaux biocompatibles pour la médecine [329]. Il en ressort que l'albumine puis le fibrinogène sont parmi les premières protéines sanguines à adhérer aux surfaces, puis elles sont peu à peu remplacées par des protéines moins mobiles mais ayant davantage d'affinité pour la surface. Cette succession de protéines plasmatiques sur les surfaces solides a été décrite en 1980 par Vroman, L *et al.* et a depuis été baptisée « effet Vroman » [330]. L'adhésion de protéines se produit dans les premières secondes après que la surface ait été mise en contact avec le sang. Elle permet ensuite l'adhésion des plaquettes au fibrinogène et des macrophages aux IgG de l'échantillon déposés à la surface [331]. L'activation du complément sur certaines surfaces a également été rapportée [329].

4.2.3 Effets du stockage des puces à anticorps et de la présence d'un système tampon sur les interférences.

La plupart du temps, après dépôt des anticorps, le prisme est conservé quelques jours en PBS à 4°C. Mais, à l'occasion d'une expérience en milieu d'hémoculture (contenant donc du SPS) et sérum au cours de laquelle le prisme a été utilisé immédiatement après que les anticorps y aient été déposés, une atténuation des interférences a été remarquée. Cette observation corrobore les données bibliographiques indiquant que le point isoélectrique des anticorps est modifié lors de leur stockage en PBS [332]. Parallèlement à cela, l'ajout de sels de phosphate, à une concentration effective dans le milieu de 50 mM Na_2HPO_4 et 22 mM KH_2PO_4 , pour sur-tamponner le milieu d'hémoculture et ainsi limiter les variations de pH au cours du temps a été testé. Ces milieux sont en effet faiblement tamponnés.

Pour étudier l'influence de ces deux paramètres, que sont le vieillissement du prisme et l'ajout de sels de phosphate pour tamponner le milieu, deux prismes ont été réalisés simultanément. L'un d'eux a été utilisé immédiatement alors que l'autre a été stocké pendant 14 jours en PBS à 4°C. Deux cuves ne différant que par la présence ou non de sels de phosphate ont été inoculées en parallèle avec

S. Enteritidis. Les solutions étaient constituées de 809 μ L de la dilution 10^{-5} effectuée dans le milieu d'hémoculture, 91 μ L de sérum et soit 100 μ L de tampon phosphate (10X) stérile soit 100 μ L d'eau distillée stérile. Les résultats de ces expériences sont présentés sur la Figure 4-6.

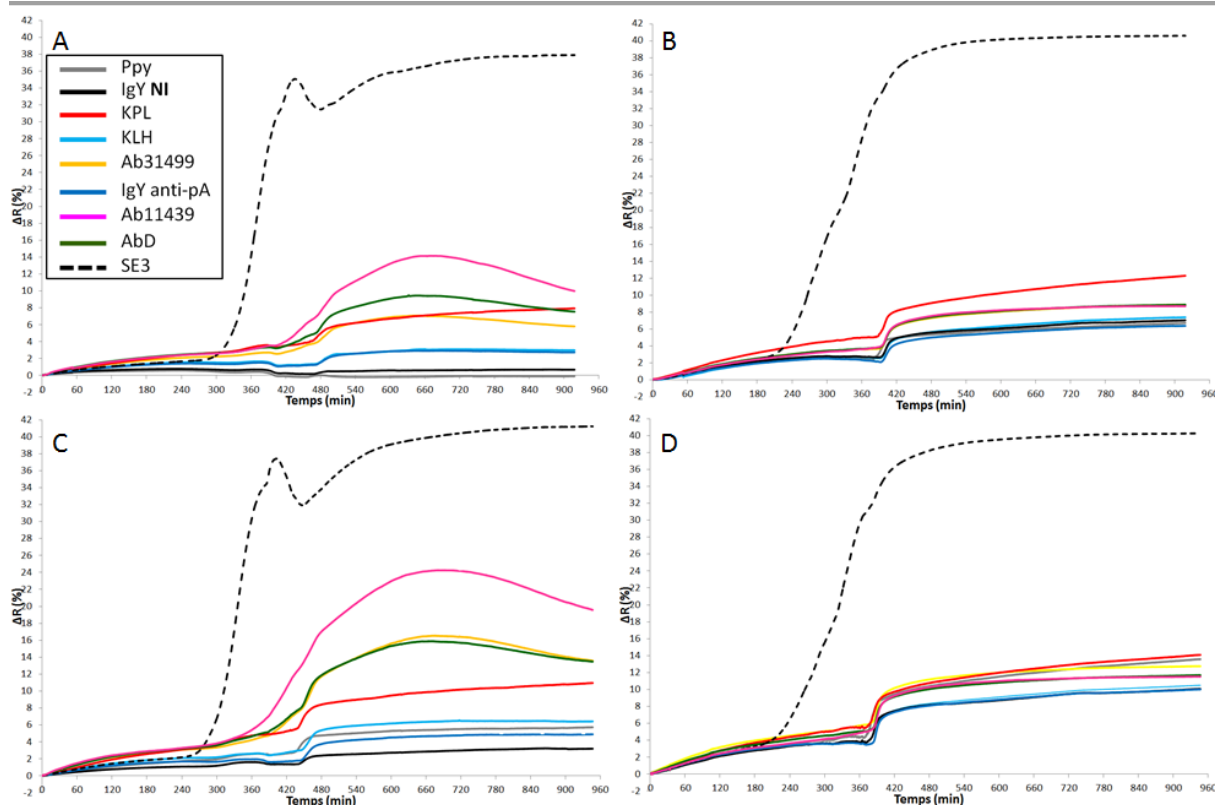


Figure 4-6 : Réduction des interférences lors de la détection de *S. Enteritidis* en milieu d'hémoculture aérobie et sérum (ratio 1 : 10) par ajout de sels de phosphate (50 mM Na_2HPO_4 et 22 mM KH_2PO_4) et emploi immédiat du prisme après le dépôt des anticorps. Légende commune aux 4 graphiques. A.) Prisme utilisé immédiatement après le dépôt des anticorps, milieu d'hémoculture non tamponné. B.) Même prisme que le graphique « A » mais avec présence de sels phosphates dans le milieu. C.) Prisme utilisé après un stockage de 14 jours en PBS à 4°C, milieu d'hémoculture non tamponné. D.) Même prisme que le graphique « C » avec présence de sels phosphates dans le milieu.

En comparant les graphiques « A » et « C » de la Figure 4-6, il ressort qu'en milieu non tamponné, les interférences sont plus marquées lorsque le prisme a été stocké par rapport à son utilisation immédiate après le dépôt des anticorps. La présence de sels de phosphate atténue fortement ce phénomène même s'il faut noter sur le graphique « D » que les anticorps se scindent en deux populations distinctes dans lesquelles se retrouvent d'un côté les anticorps les plus sujets aux interférences et de l'autre ceux qui ne le sont pas. Ce résultat confirme l'influence du stockage du prisme que l'ajout du tampon n'annule pas totalement. Or, la plupart des expériences réalisées jusqu'à celles-ci l'ont été dans les conditions les plus défavorables illustrées ici par le graphique « C » c'est-à-dire sans système tampon et avec des prismes stockés quelques jours en PBS. Les expériences qui ont suivi ces résultats, notamment celles en présence de sang présentées ci-après, ont été effectuées dans les conditions « optimales » déterminées ici. Une solution concentrée (10X) de sels phosphates est donc ajoutée au milieu d'hémoculture ou au TSB pour obtenir une concentration finale de 50 mM Na_2HPO_4 et 22 mM KH_2PO_4 assurant ainsi un maintien prolongé du pH autour de 7. Le stockage des prismes en PBS n'est plus pratiqué, ces derniers étant désormais utilisés immédiatement après le dépôt des anticorps.

4.3 Interférences biologiques liées à l'analyte bactérien : *S. aureus*

4.3.1 Empêchement de la détection de *S. aureus* par les anticorps circulants

La détection de *S. aureus* en TSB seul sur une biopuce à anticorps est donc possible en dépit de la présence de protéine A. Et comme cela a été présenté dans la partie 4.2, la détection de *S. Enteritidis*

s'effectue sans mal dans le milieu d'hémoculture en présence ou non de sérum. Mais qu'en est-il pour la détection de *S. aureus* dans les mêmes conditions ?

Pour le déterminer, du sérum a tout d'abord été dilué dans du TSB au ratio 1 : 10, milieu dans lequel la détection de *S. aureus* par SPRI a été testée. Dans cette condition, aucune interaction n'est visible sur les plots d'anticorps (Image « A ») (Figure 4-7). Même lorsque le prisme est placé sous la cuve, le biofilm caractéristique de *S. aureus* présenté dans le chapitre 3 ne se développe pas. A la place, des complexes vraisemblablement formés par les bactéries et des constituants du sérum semblent se déposer de manière aléatoire aussi bien sur la surface que sur les plots sans aucune spécificité. Sur l'image « B » les IgY non immuns comme les plots de polypyrrole sont tout autant sinon plus affectés par ces dépôts que ne le sont les plots d'IgG ou d'IgY anti – protéine A. L'hypothèse de l'implication des anticorps circulants du sérum dans cette inhibition de la détection de *S. aureus* a été avancée.

Pour la confirmer, des anticorps KLH ont été ajoutés dans le TSB à une concentration de 1 mg.mL^{-1} , valeur voisine de la concentration en anticorps circulants obtenue lors de la dilution du sérum dans le milieu. De cette manière, seul l'effet des anticorps en solution sur la détection de *S. aureus* est étudié. La présence des anticorps KLH en solution aboutit comme avec du sérum total à la non-détection de *S. aureus* que le prisme soit sous la cuve (image non présentée) ou sur le côté de la cuve (Image « C »). Cela confirme l'hypothèse selon laquelle, les anticorps circulants en se fixant à la surface de *S. aureus* par l'intermédiaire de la protéine A, empêchent la reconnaissance de la bactérie par les anticorps destinés à sa détection. Des effets semblables à ceux observés ici, telle que l'inhibition de la formation de biofilm en microplaques par *S. aureus* en présence de sérum ou d'IgG purifiés spécifiques ou non de la protéine A a été rapportée [333]. La fixation des anticorps sur la paroi de *S. aureus* par leurs portions Fab ou Fc aboutirait au masquage de la protéine A qui ne peut alors plus jouer son rôle dans la formation de biofilm [333]. Le fait que les anticorps KLH (IgG de souris) seuls en solution suffisent à reproduire ce résultat va dans ce sens. Cette inhibition est dose-dépendante ce que confirme l'expérience présentée sur l'image « D » puisque les interactions de *S. aureus* avec les plots d'anticorps redeviennent possibles pour un ratio sérum / milieu de 1 : 100. Les dénombrements effectués à l'issue des expériences révèlent la présence d'au minimum 10^8 UFC.mL^{-1} même dans les cuves paraissant stériles car ne permettant pas l'observation d'un signal révélant la présence d'une bactérie. La densité bactérienne dans les cuves voisines, positives, était-elle généralement plus proche de 10^9 UFC.mL^{-1} . Cette différence d'un facteur 10 est à elle seule insuffisante pour expliquer la non-détection en présence de sérum ou d'IgG non spécifiques à 1 mg.mL^{-1} car la densité bactérienne atteinte permet de détecter un signal.

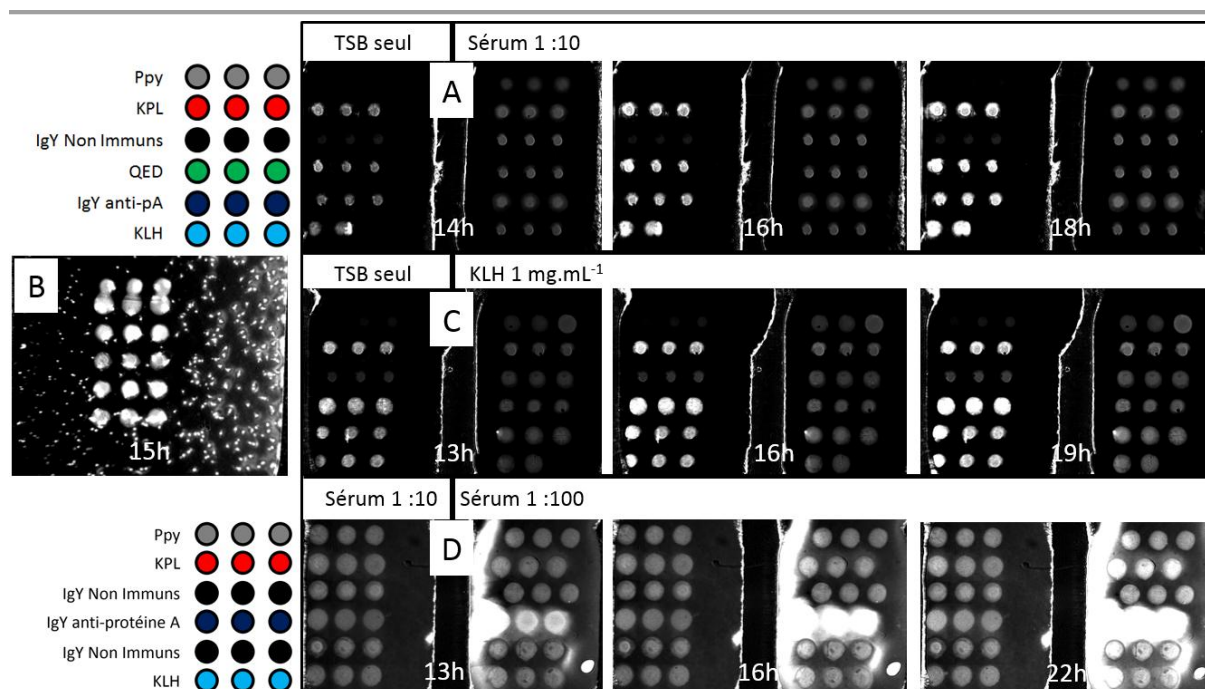


Figure 4-7 : Mise en évidence du rôle des anticorps circulants du sérum dans l'empêchement de la détection de *S. aureus* en TSB. Toutes les cuves (A, B, C, D) sont inoculées avec environ 1000 UFC.mL⁻¹ de *S. aureus* BAA – 1720. **A.)** TSB seul ou avec sérum 1 : 10. **B.)** TSB + sérum 1 : 10 prise sous la cuve. **C.)** TSB seul ou supplémenté avec 1 mg.mL⁻¹ d'anticorps KLH dans le milieu. **D.)** TSB + sérum 1 : 10 ou 1 : 100.

La présence d'anticorps non spécifiques dans le milieu pour lesquels la protéine A a une faible affinité, comme KLH qui est un IgG1 de souris, est donc suffisante pour empêcher la détection de *S. aureus* sur une biopuce à anticorps. Cependant, dans du sérum complet, d'autres classes d'anticorps sont présentes et de plus, l'inhibition de la détection peut tout aussi bien être due à la présence d'anticorps spécifiques de *S. aureus* [334]. En effet, le seuil de détection d'antigènes staphylococciques par dosage radio-immunologique « en sandwich » est considérablement augmenté dans du sérum de lapin immunisé par ces mêmes antigènes par rapport à du sérum de lapin naïf. Il augmente également lorsque ces antigènes, obtenus par lyse totale des bactéries, sont dilués dans du sérum humain indiquant que des anticorps spécifiques présents dans l'échantillon masquent les antigènes aux anticorps utilisés pour les détecter [334]. Et, la présence durable d'anticorps circulants reconnaissant des protéines staphylococciques a été rapportée chez des individus sains [335-337] ou souffrant d'infections à *S. aureus* [338, 339]. Le maintien de ces anticorps dans la circulation sanguine en l'absence d'infections récentes s'explique par la persistance pendant plusieurs mois voire années des plasmocytes, cellules mémoires sécrétrices d'anticorps, produits lors d'une rencontre de l'organisme avec la bactérie. Or, comme révélé dans l'introduction près des deux tiers de la population sont colonisés temporairement ou définitivement par *S. aureus*, offrant de multiples occasions de produire des anticorps. Chez les individus sains, une corrélation entre le portage nasal et le taux d'anticorps reconnaissant des antigènes staphylococciques est observé [335, 336]. Il ressort de ces études que des anticorps dirigés contre des antigènes staphylococciques sont retrouvés dans le sang de la plupart des individus avec d'importantes variations des taux d'anticorps. La proportion d'anticorps reconnaissant des antigènes staphylococciques varierait entre 0,1 à 3% des anticorps totaux chez des individus sains [336]. L'existence d'anticorps dressés contre un grand nombre d'antigènes incluant des toxines, des protéines de surface et excrétées, le peptidoglycane et les acides lipotéichoïques a été répertoriée [340]. L'un des objectifs de ces études est d'identifier des antigènes contre lesquels la présence

d'anticorps pourrait conférer une protection lors d'infections impliquant *S. aureus* dans l'espoir de développer un vaccin contre cette bactérie [341, 342]. Il en ressort donc que la présence d'anticorps spécifiques de *S. aureus* est courante dans le sérum humain. Or, il semblerait qu'en sérum ces anticorps se fixent préférentiellement par leur portion Fab plutôt que Fc malgré la présence de protéine A [343, 344]. Les travaux de Nordenfelt *et al.* concernent principalement *Streptococcus pyogenes*, qui comme *S. aureus*, est fréquemment retrouvée chez des porteurs sains mais est aussi à l'origine d'infections. Ce streptocoque possède également des protéines liant les IgG, dénommées protéines M, supposées le protéger de l'opsonisation en fixant les anticorps par leur partie Fc. Ce mécanisme de défense ne serait efficace que dans la « niche écologique » de *S. pyogenes* qu'est la salive. Dans le sang en revanche, la plupart des anticorps fixés à la bactérie, dont le nombre est estimé à 10^6 , le sont par leur partie Fab et sont donc spécifiques des antigènes de surface incluant la protéine M. L'hypothèse est que l'affinité des anticorps spécifiques pour leurs antigènes étant supérieure à celle de la protéine M pour la partie Fc, les anticorps spécifiques finissent par se fixer à leurs antigènes remplaçant ceux fixés par leur partie Fc. [344]. Les auteurs suggèrent l'existence d'un mécanisme équivalent avec la protéine A de *S. aureus*. En cherchant à identifier les antigènes accessibles aux anticorps à la surface de *S. aureus*, Hansenová Maňásková, *et al.* parviennent à une conclusion similaire. Les auteurs observent la fixation des anticorps sériques spécifiques d'antigènes staphylococciques à la surface d'une souche sauvage et d'un mutant dépourvu de protéine A. Qu'elle soit présente ou non, la proportion d'anticorps du sérum se fixant spécifiquement à des antigènes staphylococciques à la surface de la bactérie est identique [343].

En présence de sang, les anticorps à la surface du prisme destinés à la détection de *S. aureus* entrent donc en compétition non seulement avec la multitude d'anticorps non spécifiques susceptibles de se fixer à la bactérie par l'intermédiaire de la protéine A, mais aussi avec des anticorps spécifiques susceptibles de reconnaître les mêmes motifs que les anticorps employés pour la détection. La partie suivante présente certaines expériences réalisées pour mieux comprendre ce qui interfère avec la détection de *S. aureus* et tenter de la rétablir.

4.3.2 Etudes des interférences liées à la matrice

4.3.2.1 Tentatives de détection de *S. aureus* dans le milieu d'hémoculture en présence ou non de sérum

En présence de sérum et de SPS, les interférences de type « faux-positif » ont été sensiblement diminuées par l'ajout du tampon phosphate et l'emploi immédiat de la biopuce après le dépôt des anticorps. Elles peuvent néanmoins survenir de façon plus tardive et moins intense. La première chose à noter est qu'en présence de SPS dans le milieu, *S. aureus* n'est plus détecté (Figure 4-8). Ceci est visible dans les cuves de gauche des images « A » et « B » et sur celle de droite de l'image « C ». La croissance bactérienne dans ces cuves est pourtant attestée par des dénombrements. Même à la plus petite concentration de SPS testée, soit 0,006%, aucune interaction entre *S. aureus* et les anticorps n'est visible. Au contraire, les cuves de droite sur les images « A » et « B » évoquent une détection spécifique de *S. aureus* dans le milieu d'hémoculture en présence de sérum. Ce sont en réalité des interférences de type « faux positif », ces expériences ayant été réalisées avant l'amélioration des conditions. Il n'a pas été possible de détecter spécifiquement *S. aureus* en présence de SPS, que ce soit dans le milieu d'hémoculture seul ou en TSB + 0,05% SPS. Pour cette raison, la plupart des expériences présentées ici ont été réalisées en TSB.

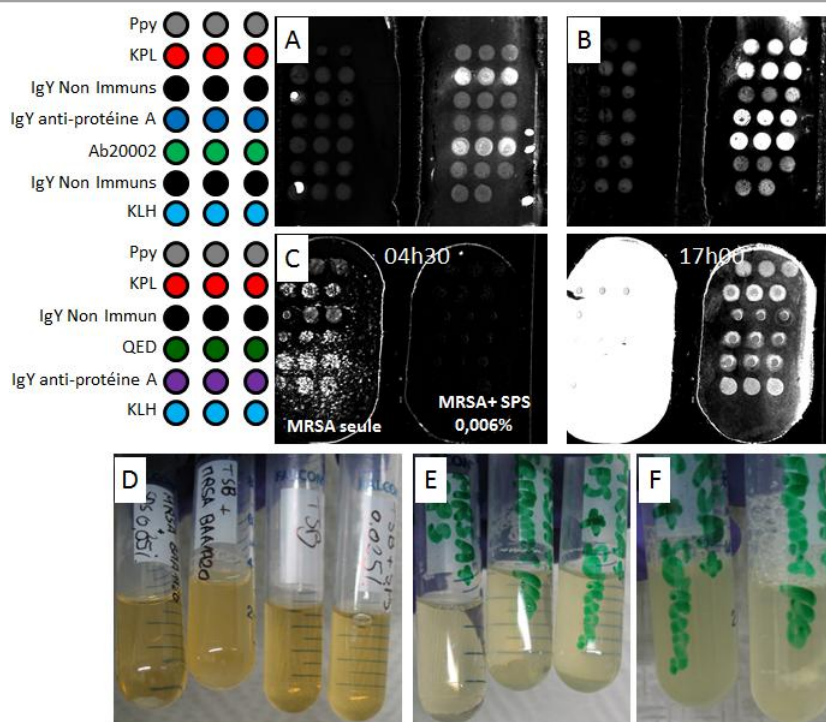


Figure 4-8 : Non détection de *S. aureus* en présence de SPS dans le milieu. **A.)** Milieu d'hémoculture aérobie, cuve de gauche sans sérum (2×10^9 UFC.mL⁻¹), cuve de droite sérum ratio 1 : 10 ($2,4 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹). **B.)** Milieu d'hémoculture anaérobie, même répartition que précédemment avec respectivement $5,2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ et 2×10^9 UFC.mL⁻¹ en fin d'expérience. **Note :** L'aspect positif des anticorps reconnaissant *S. aureus* est en fait un artefact lié au SPS et au sérum comme décrit auparavant. **C.)** En absence de sérum, influence de la plus petite concentration de SPS préconisée (0,006%), le prisme est ici sous la cuve et le nombre de bactéries à la fin de l'expérience est identique dans les 2 cuves (1×10^9 UFC.mL⁻¹). **D.)** Croissance de *S. aureus* en tubes. De gauche à droite, MRSA en TSB + SPS 0,025%, MRSA en TSB seul, TSB seul et TSB + SPS 0,025%. En présence de SPS (0,025%) les bactéries sédimentent davantage au fond du tube qu'avec seulement du TSB où le milieu reste trouble. Le SPS et le TSB sans les bactéries ne produisent pas cet effet. **E.)** Croissance de *S. aureus* en tubes en TSB avant passage des tubes au vortex. De gauche à droite, MRSA + SPS 0,05%, MRSA + Sérum 1 : 10 et MRSA + SPS 0,05% et sérum 1 : 10. **F.)** Mêmes échantillons que l'image « E » après passage des tubes au vortex, de gauche à droite MRSA + SPS 0,05% et sérum 1 : 10 et MRSA + Sérum 1 : 10. Dans ce dernier tube, la présence d'un amas filamenteux blanc impossible à remettre en suspension est visible.

Lors des cultures en tubes, quelle que soit la concentration de SPS (de 0,006% à 0,05%), *S. aureus* se dépose au fond des tubes laissant le reste du milieu totalement limpide, et ce, en dépit de l'agitation continue à 150 rpm. Sans SPS, les cultures de *S. aureus* en TSB présentent une turbidité importante et seul un faible dépôt est visible au fond des tubes. Les dénombrements effectués à l'issue d'une nuit d'incubation pour un inoculum initial identique lors de ces cultures de *S. aureus* en tubes (150 rpm ; 37°C), révèlent les densités bactériennes suivantes :

10^8 UFC.mL⁻¹ en :

- TSB + SPS (0,05%)
- TSB + sérum 1 :10
- Milieu d'hémoculture seul équivalent au TSB + SPS (0,05%)

10^9 UFC.mL⁻¹ en :

- TSB seul

10^{10} voire 10^{11} UFC.mL⁻¹

- TSB + SPS (0,05%) + Sérum 1 :10
- Milieu d'hémoculture + sérum 1 :10.

Des densités bactériennes finales plus élevées sont obtenues en présence combinée de SPS et de sérum qu'en présence d'un seul de ces deux éléments dans le milieu. Ces résultats confirment donc le rôle inhibiteur du SPS sur l'activité bactéricide du sérum. Avec cette action neutralisée par l'anticoagulant, le sérum constitue alors un apport nutritif supplémentaire pour les bactéries. Les résultats semblent aussi indiquer une légère inhibition de croissance en présence de SPS seul. La présence de sérum ne change rien à la sédimentation accentuée des bactéries avec le SPS comme le montre l'image « F » de la Figure 4-8. Un phénomène similaire a été rapporté dans les travaux de Wecke *et al.*, où le SPS, à une concentration supérieure à 10 µg.mL⁻¹ provoque une sorte d'agrégation de la souche de *S. aureus* étudiée, rendant imprécis les dénombrements sur boîtes [345]. Cette information peut expliquer pourquoi la densité bactérienne a été évaluée ici comme étant plus faible en présence de SPS seul dans le milieu. D'après les auteurs, cette agrégation résulterait de l'absence de séparation des bactéries après leur division du fait de l'inhibition de l'activité des autolysines, enzymes qui en digérant la paroi permettent la séparation des bactéries. Les auteurs montrent que l'activité de digestion du peptidoglycane par la lysostaphine est inhibée par le SPS durablement fixé à la paroi puisque toujours présent après que les bactéries aient été centrifugées et remises en suspension dans un milieu dépourvu de SPS. L'hypothèse émise par les auteurs est que le SPS, en se fixant directement à la paroi, bloque l'action de ces enzymes (lysostaphine et autolysine). L'inhibition par le SPS de la lyse enzymatique de *S. aureus* [346, 347] mais également de la formation de biofilm ont été confirmées par la suite [347]. Le mécanisme exact de ces inhibitions par le SPS demeure mal identifié. Il n'est pas exclu que son interaction directe avec des enzymes riches en résidus cationiques comme l'autolysine, et impliquées dans la séparation des bactéries, les empêche de catalyser leurs réactions [348]. Mais, il est tout aussi possible que le SPS perturbe la reconnaissance du substrat de ces enzymes en se fixant à la surface des bactéries, notamment sur des résidus chargés positivement comme peuvent l'être localement les acides téichoïques [348-350]. La présence de ces charges positives à la surface des bactéries Gram⁺, dont la charge nette est négative, fait partie des mécanismes par lesquels elles se protègent de certains antibiotiques et peptides antimicrobiens cationiques [350]. Il a également été montré que le SPS empêchait la reconnaissance de la partie Fc des anticorps par les streptocoques de groupe A. Les auteurs supposent que cette inhibition est liée à une liaison réversible du SPS à proximité du site de liaison des anticorps [351]. L'effet du SPS sur la liaison de la protéine A de *S. aureus* à la partie Fc des IgG n'a en revanche pas été testée mais il n'est pas déraisonnable de supposer qu'un phénomène similaire peut se produire. Ces travaux confirment que la présence de SPS n'est pas neutre pour *S. aureus* et peuvent en partie expliquer les observations effectuées.

Le Tableau 4-2 récapitule les essais réalisés afin de mieux caractériser les interactions de *S. aureus* avec les constituants sanguins susceptibles de perturber la détection. Après chaque expérience, le contenu des cuves est étalé sur des géloses afin de contrôler la croissance des bactéries, information particulièrement importante en l'absence de signal SPR.

Tableau 4-2 : Tableau récapitulatif des conditions testées pour la détection de *S. aureus*

Milieux \ Additifs	Possibilité de détection spécifique et présence d'interférences		Aucun	Sérum 1 : 10	Sérum 1 : 100	Sérum appauvri en IgG (1 : 10)	Sérum décomplémenté (1 : 10), 30 min 56°C	IgG non spécifiques (KLH) 1 mg.mL ⁻¹	IgY non spécifiques 1 mg.mL ⁻¹	IgY immuns 1 mg.mL ⁻¹	BSA 6 g.L ⁻¹
	Détection spécifique possible	Oui / Non									
TSB seul	Détection spécifique possible	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Oui
		Non									
	Faux – positif // Interférences		Rien (protéine A)	Faux - négatif	Rien	Rien	Faux - négatif	Faux - négatif	Rien	Rien	Rien
	Faux – négatif										
TSB + SPS 0,05%	Détection spécifique possible	Oui	Non	Non		Non		Non			
		Non									
	Faux – positif // Interférences		Faux - négatif	Faux – positif	Non testé	Faux - négatif	Non testé	Faibles interférences	Non testé	Non testé	
	Faux – négatif										
Milieu d'hémoculture	Détection spécifique possible	Oui	Non	Non			Non				
		Non									
	Faux – positif // Interférences		Faux - négatif	Faux – positif	Non testé	Non testé	Interférences exacerbées				
	Faux – négatif										

La présence d'albumine sérique bovine à 6 g.L^{-1} n'empêche pas la détection de *S. aureus*, pas plus que l'ajout de 1 mg.mL^{-1} d'anticorps IgY (en partie) spécifiques ou non de *S. aureus*. Ces anticorps produits à notre demande sont ceux employés dans le chapitre 3. Indirectement ces deux conditions avec les IgY confirment la faible quantité d'anticorps spécifiques parmi le mélange obtenu après immunisation des poules puisque leur présence n'inhibe pas la détection.

L'inactivation du complément permet d'améliorer la sensibilité de détection d'antigènes staphylococciques par un test radio-immunologique en sandwich en empêchant l'attachement des protéines du complément aux antigènes mais probablement aussi sur l'anticorps primaire fixé au fond des tubes [352]. L'effet de ce traitement sur la détection de *S. aureus* par SPRI sur une biopuce à anticorps a donc été évalué. En TSB, la détection de *S. aureus* reste impossible dans du sérum décomplémenté (chauffé à 56°C pendant 30 min). En revanche, les dénombrements effectués après l'expérience sont révélateurs. La densité bactérienne atteinte dans la cuve contenant le sérum décomplémenté est supérieure à $10^{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ contre seulement 10^8 UFC.mL^{-1} en présence de sérum total. Ce résultat confirme indirectement deux points. D'une part, les anticorps circulants épargnés par le chauffage à 56°C pendant 30 min, continuent d'inhiber la reconnaissance de *S. aureus* par les anticorps déposés à la surface du prisme alors que le nombre de bactéries dépasse nettement le seuil de détection. D'autre part, en présence conjuguée de sérum et de SPS, les densités bactériennes atteintes sont aussi du même ordre de grandeur qu'avec le sérum décomplémenté dans le TSB. L'activité bactéricide du complément dans le sérum total est donc confirmée tout comme son inhibition par le SPS. Enfin, la présence de SPS avec le sérum décomplémenté accroît les interférences de type faux-positifs lors de la détection par SPRI (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

4.3.2.2 Essai d'élimination des IgG du sérum

Devant le rôle essentiel que paraissent jouer les anticorps du sérum dans l'absence de détection de *S. aureus*, des solutions pour lever cette inhibition ont été recherchées. Les complexes immuns qui masquent les antigènes staphylococciques peuvent être dissociés par le chauffage du sérum à 90°C pendant 15 min [353]. La dénaturation des anticorps permet de retrouver une limite de détection équivalente à du tampon lors du dosage radio immunologique en sandwich. Un tel traitement n'est pas concevable en pratique mais confirme l'intérêt d'appauvrir le sérum en anticorps. L'une des solutions envisagées consiste à passer le sérum sur une colonne destinée à la purification des anticorps. Ce sont les mêmes colonnes que celles utilisées après le clivage enzymatique des IgG. D'après les données du fournisseur, chaque colonne peut fixer jusqu'à 1,4 mg d'anticorps. Pour les besoins de l'expérience environ $100 \mu\text{L}$ de sérum par cuve suffisent. Dans l'exemple présenté ci-après, $110 \mu\text{L}$ ont été utilisés soit 1,3 mg d'anticorps pour une concentration sérique d'anticorps considérée à 12 mg.mL^{-1} . La capacité de fixation de la colonne n'est donc pas dépassée d'autant plus que deux passages successifs sur des colonnes régénérées sont effectués. La concentration protéique totale de l'échantillon est divisée par un facteur 3,5 (Tableau 4-3) après ces deux passages. Les anticorps ne sont donc pas les seules protéines éliminées lors de ce traitement comme le montre la quantité importante de protéines éluées lors des rinçages avec le tampon.

Tableau 4-3 : Estimation des quantités de protéines retenues et éluées lors du passage du sérum sur les colonnes. L'éluat direct correspond à la fraction non retenue sur la colonne. Le terme « $\Sigma_{R1 \rightarrow 3}$ » représente la fraction protéique totale éluée lors des rinçages en PBS. Le terme « $\Sigma_{E1 \rightarrow 3}$ » correspond à la fraction protéique éluée lors du choc acide, en principe majoritairement constituée d'anticorps. La colonne « protéines fixées » correspond à la quantité de protéines retenue sur la colonne. Elle est obtenue en soustrayant la masse de protéines dans l'éluat direct à celle de l'échantillon avant son passage.

	Échantillons	Protéines (mg)	Protéines fixées (mg)
	Sérum brut	5,5	
1^{er} passage	Eluat direct	2,42	3,07
	$\Sigma_{R1 \rightarrow 3}$	2,03	
	$\Sigma_{E1 \rightarrow 3}$	0,91	
	$\Sigma_{R1 \rightarrow 3} + \Sigma_{E1 \rightarrow 3}$	2,94	
2^{ème} passage	Eluat direct	1,57	1,25
	$\Sigma_{R1 \rightarrow 3}$	0,95	
	$\Sigma_{E1 \rightarrow 3}$	0,13	
	$\Sigma_{R1 \rightarrow 3} + \Sigma_{E1 \rightarrow 3}$	1,07	

Compte tenu des approximations faites sur les volumes, les bilans protéiques sont cohérents et peu d'anticorps sont retenus sur la colonne lors du deuxième passage indiquant que la plupart ont été éliminés dès le premier. De plus, la masse totale de protéines obtenues lors des chocs acides (1,04 mg) est proche de la quantité d'anticorps attendue dans ce volume ce qui confirme l'élimination de la plupart des anticorps du sérum initial. Le deuxième éluat direct fortement appauvri en anticorps est alors utilisé comme l'aurait été du sérum complet pour une expérience de détection de *S. aureus* par SPRI (Figure 4-9). Le milieu employé est le TSB auquel a ou non été ajouté 0,05% de SPS.

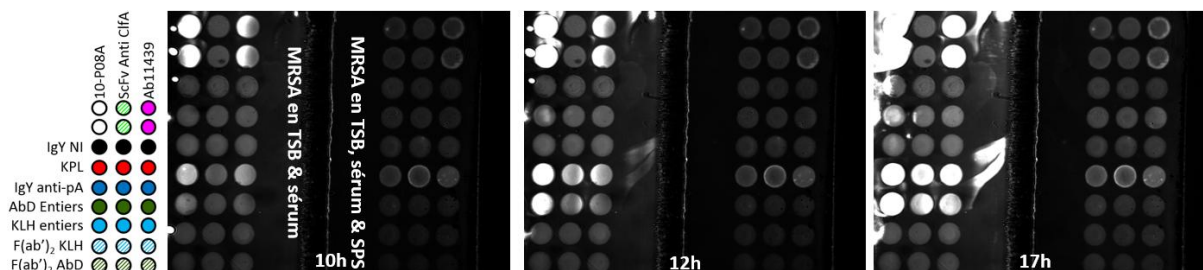


Figure 4-9 : Détection de MRSA en TSB surtamponné $\pm$ 0,05% SPS et sérum passé à 2 reprises sur les colonnes protéine A/G.

Dans ces conditions, reproduites à trois reprises, les interactions spécifiques de *S. aureus* avec la plupart des IgG fixées sur le prisme sont rétablies en TSB. Avec le SPS, sans doute pour les raisons précédemment présentées, aucun signal net n'est distingué. Il est donc possible de rétablir la détection en éliminant les IgG confirmant leur rôle majeur comme inhibiteurs de la détection. Il est bien entendu exclu de traiter dix millilitres d'échantillon sanguin d'une telle manière. Tout d'abord car la quantité de résine nécessaire à la capture des anticorps serait très importante et donc couteuse. Mais surtout car toute manipulation de l'échantillon préalable à sa mise en culture pourrait aboutir tout aussi bien à la perte des quelques bactéries présentes dans le cas d'une bactériémie avérée qu'à l'introduction d'un contaminant. Néanmoins, s'il était possible de trouver un additif au milieu capable de piéger les IgG comme les résines le font pour les antibiotiques, la détection de *S. aureus* serait alors facilitée. L'ajout de protéine A directement au milieu et la

préincubation du sérum avec *S. aureus* préalablement inactivé ont été testés en ce sens. Sur la base des valeurs présentées dans le Tableau 4-4, environ 100 μL de sérum ont été préincubés avec le même volume d'une suspension de bactéries inactivées contenant l'équivalent de 10^9 UFC.mL⁻¹. Après une heure d'incubation, le tube a été centrifugé et le surnageant collecté. Les bactéries inactivées qui se trouvent alors au fond du tube ont potentiellement entraîné avec elles les anticorps de l'échantillon. Le sérum étant environ dilué par deux lors de cette étape, le volume mélangé aux bactéries pour l'expérience de détection par SPRI est doublé. Des bactéries inactivées par la chaleur et le formaldéhyde ont été testées mais cet essai n'a pas permis de rétablir la détection de *S. aureus*.

Tableau 4-4 : Estimations du nombre d'anticorps présents dans le sérum et susceptibles de se fixer à la surface des bactéries.

Concentration IgG dans le sang (mg.mL ⁻¹)	10 – 12	Références ou calcul effectué
Masse d'IgG dans 10 mL de sang (m_{IgG})	120 (en supposant 12 mg.mL ⁻¹)	
Nombre d'IgG dans 10 mL (N_{IgG})	$4,8 \times 10^{17}$	$NA \times m_{\text{IgG}} / MM_{\text{IgG}}$
Proportion d'IgG spécifiques de <i>S. aureus</i>	0,1 – 3% (fixé arbitrairement à 1% par la suite)	[336]
Nombre d'IgG spécifiques de <i>S. aureus</i>	$4,8 \times 10^{15}$	$N_{\text{IgG}} \times 1/100$
Nombre d'anticorps entourant une bactérie dans le plasma	$5 \times 10^5 - 10^6$	[344]
Nombre de bactéries nécessaires à la fixation de l'ensemble des anticorps	$4,8 \times 10^{11}$	$N_{\text{IgG}} / 10^6$
Nombre de protéine A nécessaires (2 à 4 IgG par protéine A)	$1,2 \times 10^{17}$	$N_{\text{IgG}} / 4$
Protéine A nécessaire	2×10^{-7} mol ou 0,83 mg	$m_{\text{pA}} = MM_{\text{pA}} \times N_{\text{pA}} / NA$

De même, une solution de protéine A a été ajoutée directement dans la cuve en présence de sérum en considérant deux IgG fixés par molécule de protéine A. L'objectif étant de piéger les anticorps avec la protéine A en solution pour les empêcher de se fixer à la surface des bactéries. Là encore cet essai n'est pas concluant. Seul le passage du sérum sur des colonnes de chromatographie d'affinité a donc permis d'éliminer suffisamment d'anticorps pour rétablir la détection de *S. aureus* en TSB. Ce résultat confirme que les anticorps circulants sont responsables de cette non-détection.

4.3.2.3 Autres freins potentiels à la détection de *S. aureus* et pistes de réflexions

La présence des anticorps circulants et des protéines du complément ne doit pas faire oublier que d'autres mécanismes propres à *S. aureus* peuvent aussi aboutir à sa non détection dans le sang. Tout d'abord, sur l'image « F » de la Figure 4-8 (page 108), il est possible de distinguer dans le tube le plus à droite, contenant du TSB et du sérum, un amas filamenteux non remis en suspension malgré le passage du tube au vortex. Il est probable que cet amas soit le commencement d'un coagulum formé avec le fibrinogène résiduel dans le sérum. Il n'est pas observé en présence de SPS qui entraîne la précipitation du fibrinogène. L'inhibition du test de recherche de l'activité coagulase par le SPS à 0,05% a bien été rapporté [354]. Cependant, il n'est pas totalement exclu qu'une partie de ce coagulum puisse se former lors des hémocultures. La staphylocoagulase reste en effet active en présence de molécules comme l'héparine, analogue du SPS, dont l'activité anticoagulante cible la thrombine, contournée par la staphylocoagulase [355]. Il n'est donc pas déraisonnable de penser que certains des staphylocoques présents peuvent se trouver enveloppés dans une capsule de fibrine comme décrit lors du chapitre 3 (**partie 3.1.1.3, page 74**) empêchant ainsi leur reconnaissance par les anticorps fixés sur le prisme. Au minimum, cette condition observée en tube a du se reproduire dans

les cuves lors des expériences avec du TSB et du sérum seul et ainsi contribuer à la non-détection de *S. aureus*. Néanmoins dans cette structure, la coagulase expose son domaine de liaison au fibrinogène, appelé « domaine R » qui est hautement conservé. Comme évoqué, la présence d'anticorps le reconnaissant a un effet protecteur *in vivo* sur les bactériémies à *S. aureus* chez la souris ce qui prouve son accessibilité [259]. De tels anticorps pourraient être pertinents pour permettre la détection de *S. aureus*. Pour localiser *in vivo* la présence de *S. aureus* dans un modèle d'endocardite chez la souris, une molécule de prothrombine associée à un marqueur fluorescent a été utilisée par Panizzi *et al.* Elle s'associe avec les coagulases de la bactérie permettant ainsi d'identifier le foyer infectieux par imagerie [356]. L'emploi d'autres sondes que les anticorps qui cibleraient l'activité spécifique d'une bactérie donnée est donc une autre possibilité à envisager.

Les problèmes de sensibilité rencontrés par le passé par certains tests d'agglutination pour l'identification de *S. aureus* auraient tout aussi bien pu se rencontrer ici. Initialement, la liaison des particules aux bactéries était basée sur la présence de protéine A et de la coagulase membranaire (*Clumping factor*), deux protéines très largement conservées chez *S. aureus*. Cependant, de faux-négatifs sont apparus, en particulier avec des SARM [357]. Ces résultats sont dûs à la présence d'une capsule polysaccharidique à la surface de la bactérie qui masque les protéines [358]. Les tests intègrent depuis des anticorps spécifiquement dirigés contre des motifs de ces capsules polysaccharidiques [358]. La plupart des isolats cliniques sont en effet représentés par seulement trois type de polysaccharides capsulaires 5, 8 et 336 [241-243]. De tels anticorps, notamment développés à l'institut Pasteur [359], ne sont pas disponibles commercialement, raisons pour laquelle ils n'ont pu être testés. Ils sont notamment utilisés dans les tests Staphaurex Plus et Staphytest Plus [95]. Ils ne résoudraient pas la problématique des anticorps circulants mais présenteraient plus de garanties que ceux utilisés. De plus, une sonde unique ne permettra vraisemblablement pas la détection de l'ensemble des souches de *S. aureus*, passé maître dans l'art d'éviter la réponse immunitaire de l'hôte et par la même occasion les moyens employés ici pour sa détection.

4.4 La détection de bactéries par SPRi en conditions proches d'une hémoculture est-elle possible ?

Devant l'impossibilité de parvenir à la détection spécifique de *S. aureus* dans le milieu d'hémoculture en présence d'échantillon sanguin, il a paru nécessaire de développer ce volet du travail avec une autre bactérie, en l'occurrence *S. Enteritidis*. Contrairement à *S. aureus*, sa détection dans le milieu d'hémoculture en présence ou non de sérum est possible ce qui permet de poursuivre les investigations avec du sang complet. L'objectif est de se placer au plus près des conditions d'une hémoculture en termes de volume analysé et de contamination initiale de l'échantillon.

4.4.1 Détection de *S. Enteritidis* en petits volumes réactionnels (< 1 mL) dans du sang humain dilué dans le milieu d'hémoculture et analyse du signal

L'objectif des expériences dont les résultats sont présentés sur la Figure 4-10 est de tester la détection d'inocula initiaux de plus en plus faibles dans un milieu identique à celui d'une hémoculture. Le sang humain frais a donc été dilué au ratio 1 : 5 dans le milieu aérobie et ce mélange a ensuite été contaminé (ou non) avec une suspension de *S. Enteritidis*. Seul le volume total de 800 µL effectivement mis en culture n'est pas conforme avec la réalité d'une hémoculture. Les conditions optimisées, discutées dans la **partie 4.2.3 (page 103)** ont été employées tout au long de ces expériences, à savoir que le prisme est utilisé immédiatement après le dépôt des anticorps et que le tampon phosphate est ajouté au milieu.

Comparée à la cuve stérile (sur le graphique « A »), la présence des bactéries est associée à une augmentation brutale des interactions avec les plots d'anticorps. Ce phénomène intervient d'autant plus tardivement que l'inoculum est petit. A cela s'ajoute les interactions de constituants du milieu préférentiellement avec certains anticorps, indépendamment de la présence de bactéries comme le montre l'observation du graphique correspondant à la cuve stérile. Les solutions mises en œuvre dans le sérum pour atténuer ces interférences n'ont donc pas la même efficacité dans le sang complet mais le signal spécifique reste identifiable. Ainsi, sur les graphiques « B à D », une augmentation exponentielle du signal mesuré sur les plots de l'anticorps SE3, spécifique de *S. Enteritidis*, est visible. Par ailleurs, comme rapporté par Bouguelia *et al.* avec ce même système, un décalage du temps de détection est noté avec la diminution de l'inoculum [174]. Néanmoins, alors que sur le graphique « B », le signal correspondant à SE3 augmente plus tôt que ceux des autres espèces, tous les signaux ont tendance à être regroupés sur les graphiques « C » et « D ». L'allure des courbes permet tout de même la distinction de ces deux populations d'anticorps. En effet, le signal mesuré sur l'anticorps SE3 se rapproche davantage d'une fonction exponentielle que les autres espèces. Une analyse plus fine de ce critère est proposée ci-dessous.

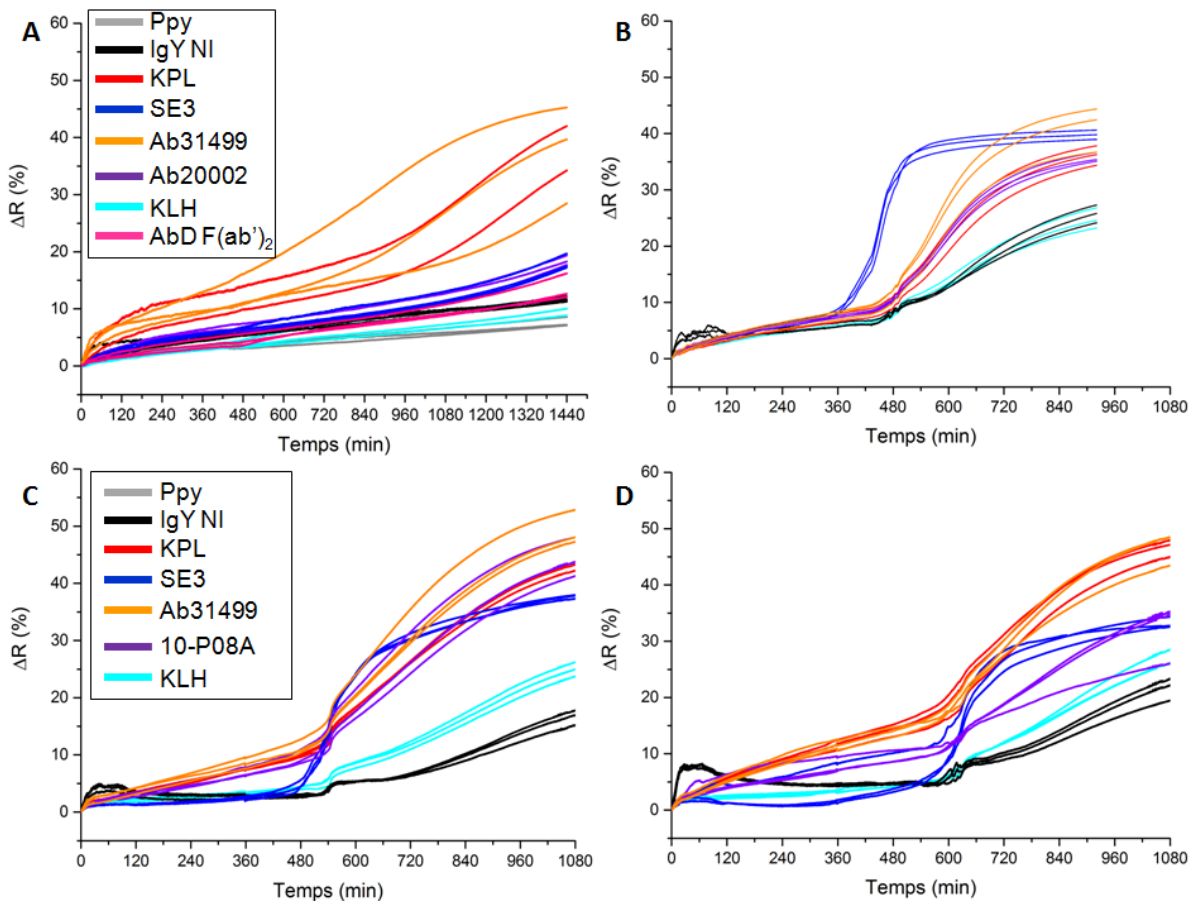
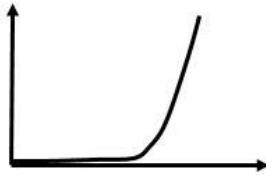
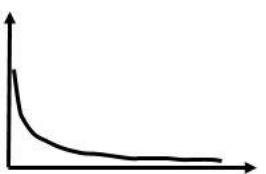
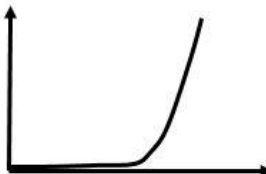


Figure 4-10 : Détection de différentes concentrations initiales de *S. Enteritidis* en milieu d'hémoculture et sang humain ratio 1 : 5. **A.**) Cuve stérile **B.**) $124 \pm 16 \text{ UFC.mL}^{-1}$ **C.**) $14 \pm 6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ **D.**) $1,4 \pm 0,6 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Les densités bactériennes sont ici exprimées par rapport au volume total de milieu, il faut les multiplier par un facteur 6 pour exprimer cette densité par rapport au volume de sang.

L'enjeu de l'analyse du signal est double. Elle doit permettre de distinguer clairement et le plus tôt possible les signaux correspondants aux interactions spécifiques entre une bactérie et un anticorps par rapport aux signaux non spécifiques. Sont considérés comme non spécifiques, des interactions entre les anticorps et des constituants du milieu autres que les bactéries ou entre les bactéries et des

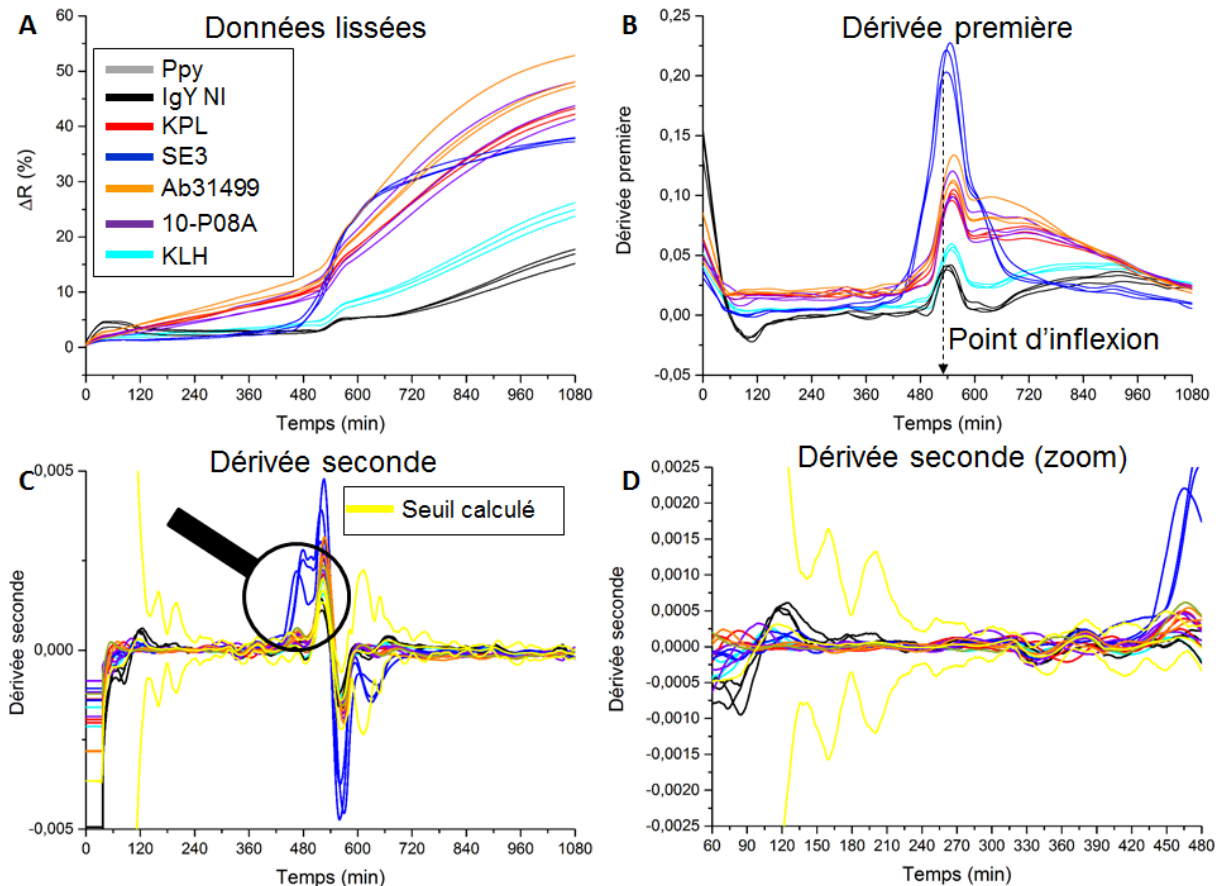
anticorps non dressés contre elles. Certains des signaux non spécifiques apparaissent dès les premiers instants de l'expérience alors que d'autres surviennent plus tardivement parfois presque simultanément avec ceux en théorie spécifiques comme cela vient d'être présenté. La cinétique d'adsorption de protéines sur une surface se traduit par une augmentation relativement constante du signal avant d'atteindre la saturation [360]. L'allure s'apparente davantage à celle d'une courbe logarithmique qu'exponentielle. Au contraire, lorsque le seuil de détection est dépassé, la population bactérienne se trouve généralement en phase exponentielle de croissance. Le nombre d'interactions se produisant au niveau des anticorps spécifiques devrait donc augmenter de manière similaire jusqu'à la saturation des anticorps ou du dispositif de mesure. Si ces estimations se vérifient, le calcul des dérivées premières et secondes du signal devrait permettre de différencier les deux populations de signaux. En effet, alors qu'une fonction logarithmique est caractérisée par une dérivée seconde négative qui tend à s'annuler, la fonction exponentielle demeure positive. Cela revient à dire que la dérivée seconde de l'exponentielle et des signaux qui s'y rapportent est concave ($f''(t) > 0$) comme le montre le Tableau 4-5. Cette démarche a été proposée par Olivier Gal (CEA / DRT / LIST / DM2I) lors d'une collaboration portant sur l'analyse des signaux obtenus.

Tableau 4-5 : Formules générales des dérivées premières et secondes de fonctions strictement logarithmique et exponentielle satisfaisant à $t = 0$, $f(t) = 0$

	Signal non spécifique (type logarithmique)	Signal spécifique (type exponentiel)
Signal	$f(t) = A \cdot \log(1 + \alpha t)$ 	$f(t) = A \cdot [\exp(\alpha t) - 1]$ 
Dérivée première	$f'(t) = \frac{\alpha A}{1 + \alpha t}$ 	$f'(t) = \alpha A \cdot \exp(\alpha t)$ 
Dérivée seconde	$f''(t) = -\frac{\alpha^2 A}{(1 + \alpha t)^2}$ 	$f''(t) = \alpha^2 A \cdot \exp(\alpha t)$ 

En pratique, après avoir lissé les données et calculé les dérivées, des graphiques comme ceux présentés sur les figures 3-8 et 3-9 sont obtenus. Le point d'inflexion de la dérivée première a parfois été utilisé pour déterminer le temps de détection [143]. Sur la Figure 4-11, les points d'inflexion des dérivées premières de toutes les espèces déposées se situent autour de 520 à 540 minutes. Ce critère n'est donc pas ici suffisamment discriminant pour identifier l'anticorps SE3 par rapport aux autres anticorps dans ce signal bruité. Néanmoins, le fait que la dérivée première des signaux de l'anticorps SE3 atteigne une valeur plus élevée que celle des autres anticorps confirme des cinétiques d'interaction différentes. Le signal mesuré pour l'anticorps SE3 varie donc plus fortement que les autres au cours du temps bien que tous les signaux paraissent augmenter simultanément.

Au contraire, au niveau de la dérivée seconde, une différence marquée est visible entre SE3 et les autres espèces. Le seuil de positivité matérialisé par les tracés jaunes sur les graphiques de la dérivée seconde correspond à la moyenne des plots de contrôle (KLH et IgY Non Immun) à laquelle a été ajouté ou retiré cinq fois l'écart type de ces signaux. Ce seuil, choisi arbitrairement, permet de s'assurer de l'existence d'une différence significative entre le signal des contrôles négatifs et celui des autres espèces. Dans cet exemple, ce seuil de positivité permet de détecter un signal positif dès 435 minutes sur l'anticorps SE3, alors que ce n'est guère possible avant 480 min sur les données brutes voire même davantage au niveau du point d'inflexion de la dérivée première. Il est également intéressant de constater qu'après la détection spécifique des bactéries, certains anticorps (Ab31499) dépassent également le seuil de détection. Cela suggère l'implication des bactéries dans ces interactions tardives et montre bien que même les signaux non spécifiques n'ont pas une allure purement logarithmique.



L'analyse d'une cuve stérile par le même principe montre qu'aucune variation exponentielle du signal n'est décelée, prouvant l'absence de croissance dans le milieu et validant cette approche pour l'analyse du signal.

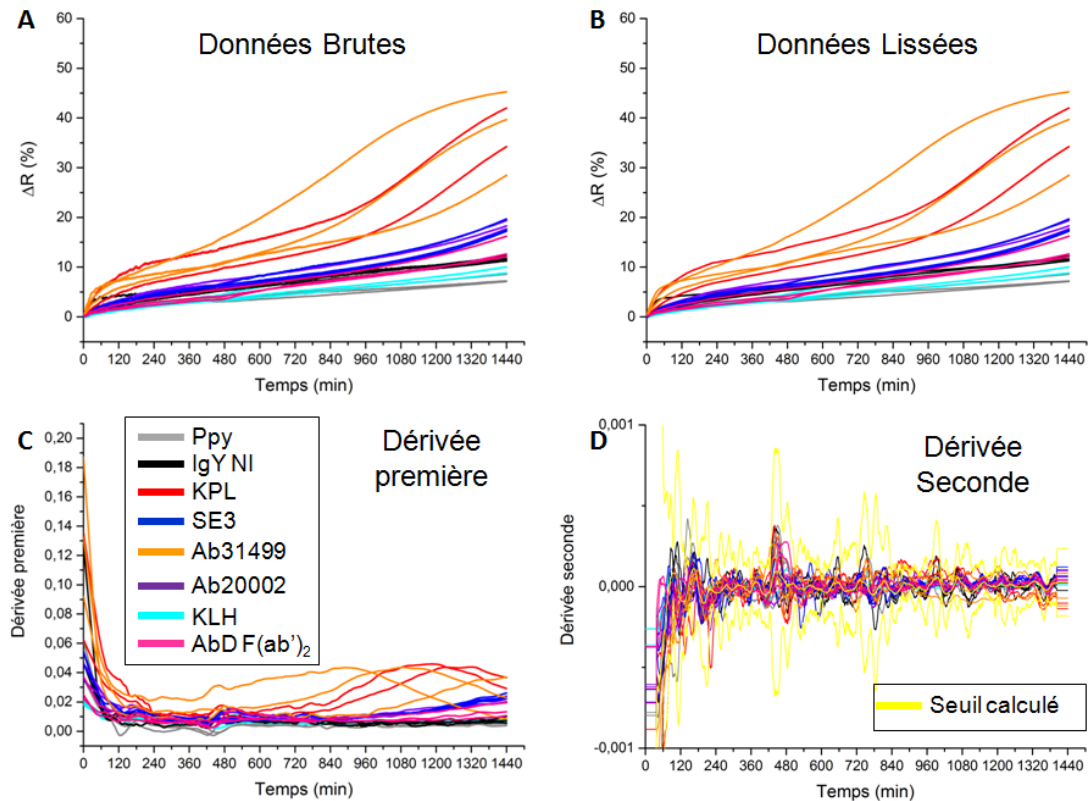


Figure 4-12 : Post-traitement du signal appliqué à la cuve stérile. **A.)** Données brutes. **B.)** Données lissées. **C.)** Dérivées premières. **D.)** Dérivées secondes montrant qu'à aucun moment un signal exponentiel n'est détecté dans la cuve et qu'aucun des plots d'anticorps ne dépasse le seuil calculé à partir des anticorps de contrôle (KLH et IgY Non Immun)

L'analyse des signaux obtenus par cette méthode permet donc de discriminer précocement un signal positif d'un négatif. Ces calculs ont été effectués ici après l'expérience mais il est tout à fait possible de les intégrer en cours d'acquisition. Mais si cette démarche facilite la distinction des signaux, encore faut-il qu'elle existe effectivement ce qui est bien le cas ici. Avec cette approche, *S. Enteritidis* est spécifiquement identifiée en une dizaine d'heures à partir d'une densité bactérienne initiale de $1,4 \pm 0,6$ UFC.mL⁻¹ dans du sang humain dilué dans le milieu d'hémoculture.

4.4.2 Preuve de concept en conditions proches d'une hémoculture

Telles qu'elles ont été réalisées, les expériences en petits volumes démontrent déjà la compatibilité de la méthode « Culture – Capture – Mesure » pour la détection de bactéries dans un échantillon de composition équivalente à une hémoculture. Il reste à se rapprocher encore des volumes réels pour valider la faisabilité de cette approche. Le dispositif expérimental utilisé pour cette expérience est présenté sur la Figure 4-13.

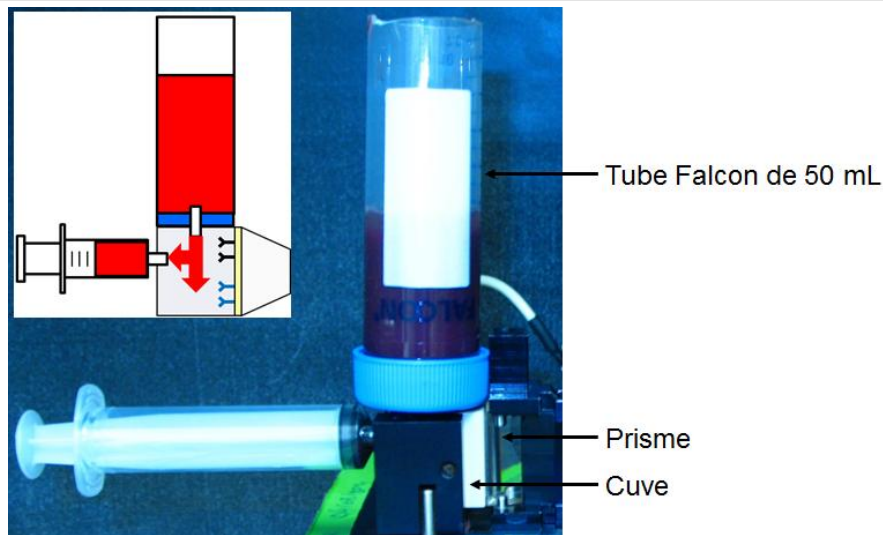


Figure 4-13 : Dispositif expérimental employé pour les expériences de détection en grand volume. La cuve présente un orifice sommital permettant d'y connecter un contenant de grand volume, ici le tube Falcon de 50 mL, et un orifice latéral sur lequel une seringue peut-être fixée. Une fois ces trois éléments réunis et le prisme en place, l'étanchéité du dispositif permet par aspiration – refoulement de la seringue d'homogénéiser le contenu du tube et de remplir la cuve. L'acquisition des données débute après cette étape.

Dans un premier temps, la compatibilité de ce dispositif « grand volume » avec la détection de *S. Enteritidis* a été testée avec un inoculum initial conséquent comme présenté sur le graphique « A » de la Figure 4-14. La contamination initiale a ensuite été progressivement diminuée.

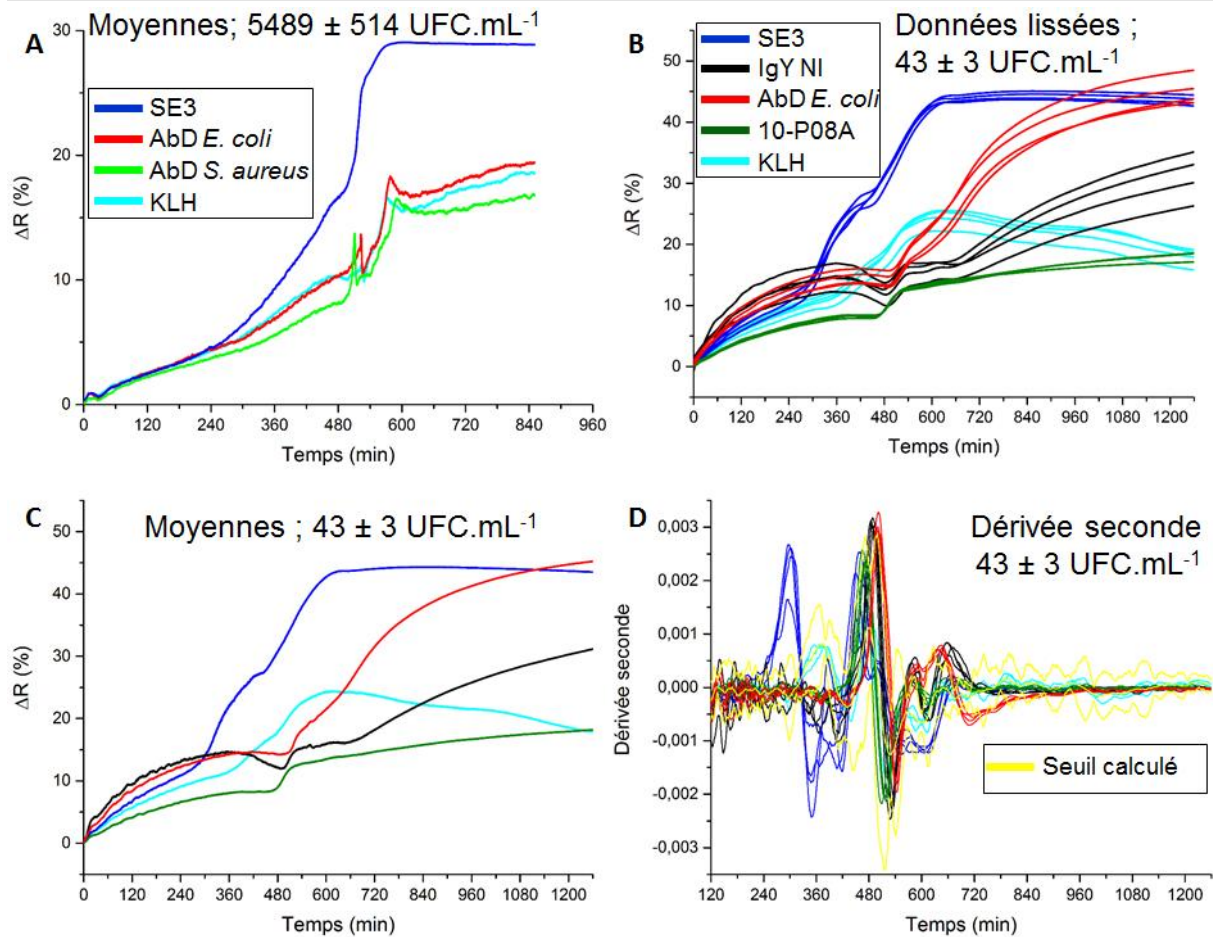
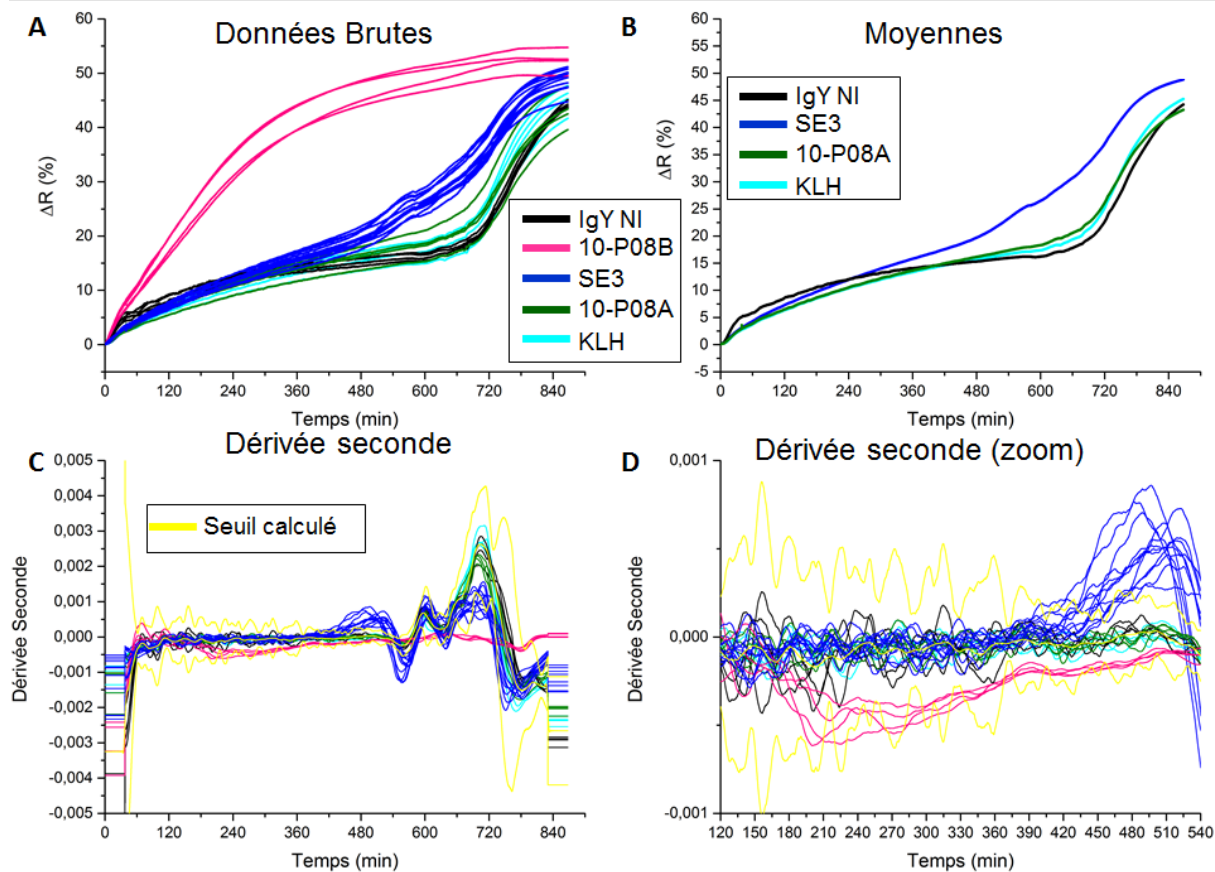


Figure 4-14 : Détection de *S. Enteritidis* en milieu d'hémoculture et sang humain dilué au ratio (1 : 5) dans un volume final d'environ 30 mL. **A.**) Moyennes des variations de réflectivité obtenues en présence initialement de $5489 \pm 514 \text{ UFC.mL}^{-1}$ de *S. Enteritidis*. **B.**) Données lissées enregistrées lors de la détection d'un inoculum initial de $43 \pm 3 \text{ UFC.mL}^{-1}$. **C.**) Moyennes des variations de réflectivité obtenues avec initialement $43 \pm 3 \text{ UFC.mL}^{-1}$. **D.**) Dérivées secondes.

Pour les deux niveaux de contamination initiale présentés sur la Figure 4-14, la présence de la bactérie est spécifiquement détectée grâce aux interactions spécifiques avec l'anticorps SE3. L'analyse du signal par le calcul des dérivées secondes n'est présentée que pour la plus faible des deux car la différence entre anticorps positifs et négatifs est déjà bien marquée sans cela. Cette observation est transposable aux expériences en petit volume avec des niveaux de contamination équivalents.

La détection spécifique de *S. Enteritidis* dans 30 millilitres de milieu d'hémoculture et sang humain dilué est donc réalisable. L'objectif de l'expérience présentée sur la Figure 4-15 est donc d'abaisser autant que possible la contamination initiale pour se rapprocher de conditions réalistes. Pour cette expérience comme pour les précédentes en petits volumes, des dilutions en cascade d'une culture bactérienne sont effectuées dans le milieu d'hémoculture aérobie. Certaines sont étalées pour connaître le nombre exact de bactéries. Un faible volume ($180 \mu\text{L}$) de l'une de ces dilutions (ici la 10^{-8}) est utilisé pour inoculer le mélange de milieu et de sang pour un volume final de 32 millilitres. Au préalable, deux fois $100 \mu\text{L}$ de ce mélange sont étalés sur des géloses afin d'en contrôler la stérilité.



L'observation des données brutes suffit là encore à confirmer la détection spécifique de *S. Enteritidis* dans ces conditions. Comme précédemment, le calcul de la dérivée seconde dégage nettement l'anticorps SE3 des autres espèces. Les signaux correspondants à l'anticorps 10-P08B a été présenté volontairement sur les graphiques pour illustrer les phénomènes d'interférences qui perdurent malgré tout. Ils n'empêchent cependant pas la détection spécifique de *S. Enteritidis* dans des conditions proches d'une hémoculture que ce soit en termes de volume de milieu ou de densité bactérienne initiale, voisine d'une bactérie par millilitre de sang. Cette expérience valide donc la faisabilité de l'approche. Les essais préalables avec une contamination initiale plus élevée démontrent la robustesse du dispositif.

4.4.3 Exemple de la détection en sérum et sang de deux souches d'*E. coli*, O157 : H7 et ATCC11775

L'objectif des deux expériences présentées ci-dessous est de tester la détection en sérum (Figure 4-16) puis sang (Figure 4-17) d'un autre modèle bactérien dans les conditions optimales décrites dans la partie précédente. La première expérience réalisée avec les souches O157 :H7 et ATCC 11775 dans le milieu d'hémoculture en présence de sérum met en évidence deux choses. D'une part, peu d'interférences non spécifiques y sont visibles. Les conditions optimisées permettent, au moins en sérum, d'atténuer fortement ce phénomène. Cette expérience illustre aussi l'absolue nécessité de disposer d'anticorps ayant une bonne affinité pour la bactérie recherchée pour parvenir à sa détection. Ici les anticorps Ab31499 et AbD *E. coli* (AbD 4329 -2906) reconnaissent *E. coli* O157 :H7 de manière satisfaisante mais pas *E. coli* ATCC11775 même 30h après le début de l'acquisition.

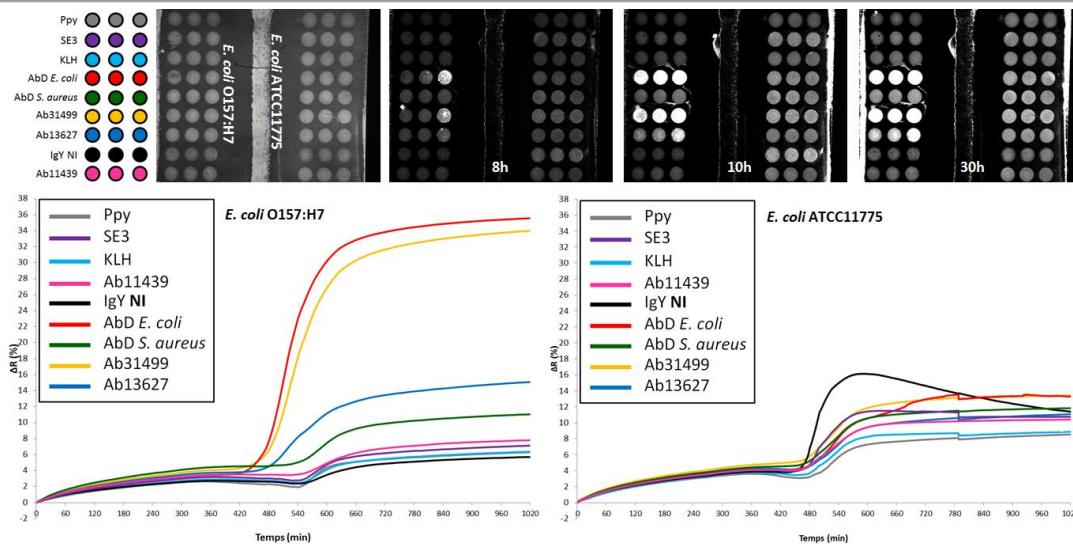


Figure 4-16 : Images différentielles et graphiques (variation de réflectivité moyennes) enregistrées lors de la détection d'*E. coli* O157:H7 et *E. coli* ATCC11775 en milieu d'hémoculture aérobie et sérum (ratio 1 : 10). Inocula initiaux respectivement de 76 ± 10 et 150 ± 1 UFC.mL⁻¹.

D'autres souches d'*E. coli* isolées de bactériémies ou d'infections urinaires ont été acquises auprès de l'institut Pasteur. Malheureusement, les anticorps testés n'ont pas permis leur reconnaissance spécifique. Il existe en effet commercialement un grand nombre d'anticorps contre des souches d'*E. coli* à l'origine d'intoxications alimentaires. Le sérotype de ces souches est bien caractérisé ce qui facilite le choix des anticorps. Ce n'est absolument pas le cas pour les souches retrouvées pour d'autres types d'infections et les anticorps testés étaient donc un mélange polyclonal destiné à reconnaître de multiples sérotypes.

C'est donc avec *E. coli* O157:H7 qu'une expérience de détection en petit volume en milieu d'hémoculture et sang total a été menée (Figure 4-17). Les deux anticorps interagissent nettement avec la bactérie permettant sa détection.

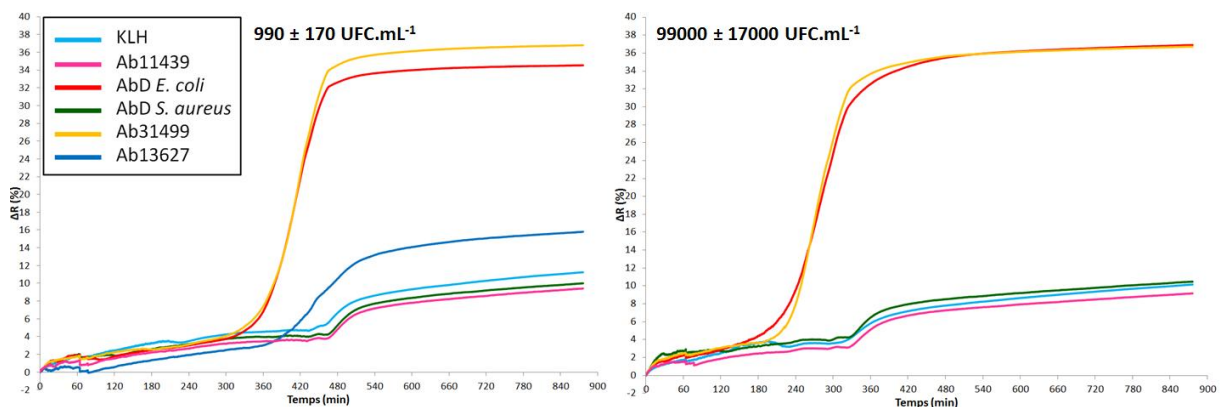


Figure 4-17 : Détection en milieu d'hémoculture aérobie et sang dilué (ratio 1 : 10) d'*E. coli* O157:H7 avec des inocula initiaux différents.

Ce résultat obtenu avec une autre bactérie que *S. Enteritidis* montre que la méthode peut être étendue à d'autres pathogènes.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE

La richesse protéique et cellulaire du sang lui permet d'assurer une multitude de fonctions pour l'organisme et notamment de le protéger contre les pathogènes. La survie des microorganismes dans le sang est rendue difficile par la présence des anticorps et des protéines du complément qui favorisent leur phagocytose. Le sang est donc dilué dans des milieux nutritifs spécialement formulés pour permettre le développement des bactéries qui en sont issues. La combinaison de ces deux éléments

génère d'importantes interférences au niveau de certains anticorps déposés sur une biopuce.

L'emploi immédiat de la biopuce après le greffage des anticorps associé à l'ajout d'un système tampon dans le milieu permet de réduire ce phénomène.

Malgré cela, la détection de *S. aureus*, plus fréquemment associé à des bactériémies que *S. Enteritidis* et *E. coli* O157 : H7, reste compliquée en présence de sérum ou de sang. Les anticorps circulants présents en grand nombre dans le sang se fixent à la surface de la bactérie de manière certaine par la protéine A comme l'ont démontrées les expériences avec les anticorps KLH en solution, mais sans doute aussi par la reconnaissance spécifiques d'autres antigènes de surface. La plupart des individus possèdent en effet des anticorps dirigés contre des antigènes staphylococciques alors même qu'ils ne souffrent d'aucune infection. La coexistence avec *S. aureus* et la mémoire immunitaire de notre organisme en sont les raisons. Les anticorps fixés à la surface du prisme sont donc en compétition avec la multitude d'anticorps de l'échantillon pour l'accès aux antigènes bactériens. A ce phénomène, s'ajoute la présence d'autres adhésines appartenant à la famille des MSCRAMM, comme le facteur de coagulation ou la protéine liant le fibrinogène, présentes au niveau de la membrane bactérienne, qui peuvent y attirer des protéines plasmatiques, liaisons susceptibles de perturber la reconnaissance par les anticorps. Ainsi, la formation probable d'un coagulum et la présence chez certaines souches d'une capsule polysaccharidique peuvent limiter l'accès aux antigènes membranaires. Le succès de la détection de *S. aureus* dans les milieux d'hémoculture en présence de sang passe donc par un moyen de neutraliser les anticorps du sérum sans risquer de détruire les bactéries. A cela s'ajoute la nécessité de multiplier les sondes immobilisées pour s'assurer de la détection du plus grand nombre de souches possibles et éventuellement des complexes qu'elles peuvent former avec des constituants du milieu.

Naanmoins, pour d'autres bactéries comme *S. Enteritidis* et *E. coli* O157 : H7, si les anticorps sont épargnés par les interférences comme c'est le cas pour SE3, la détection spécifique de la bactérie ciblée est réalisable. Il a ainsi été possible de détecter spécifiquement la présence de moins de 1 UFC.mL⁻¹ de *S. Enteritidis* dans un volume total de 32 mL respectant le ratio entre le sang et le milieu d'hémoculture. Ainsi, ni la présence de sang, ni le faible inoculum initial ne sont rédhibitoires comme l'a montré l'expérience dans le dispositif « grand volume ». Une analyse du signal basée sur la dérivée seconde, réalisable en temps réel, permet même de détecter plus tôt et plus nettement les interactions spécifiques sur un anticorps.

5 Conclusions et Perspectives

Initialement développée pour la recherche de pathogènes dans des matrices alimentaires, la possibilité d'identifier sans marquage des bactéries au cours de leur multiplication dans un échantillon dilué dans un milieu de culture peut aussi avoir un intérêt en bactériologie clinique. En effet, cette première étape permettant le développement d'un pathogène éventuel ressemble en bien des points à la définition d'une hémoculture. A ceci près que le sang est un milieu normalement stérile, où la présence d'un microorganisme quel qu'il soit peut représenter une urgence vitale, contrairement à certains aliments qui contiennent une flore endogène non pathogène parfois très abondante (lait cru). La stratégie de détection de pathogènes bactériens, cibles de ce travail, repose sur la détection d'interactions spécifiques entre les bactéries et des ligands déposés sur la surface d'or d'un prisme de verre grâce à l'imagerie par Résonance Plasmonique de Surface (SPRi). L'ensemble ainsi constitué forme un biocapteur, dispositif dont les applications potentielles pour le diagnostic ne cessent d'augmenter.

Tout l'enjeu de ce travail est donc de déterminer si la transposition d'apparence simple de cette méthode à la détection de pathogènes comme *Staphylococcus aureus* dans un échantillon sanguin est possible. Toutefois, la raison d'être de l'hémoculture tient dans la faible contamination du sang, le plus souvent comprise entre 1 à 10 UFC.mL⁻¹. Or, aucune des méthodes d'identification actuelles n'est encore suffisamment sensible pour détecter avec certitude un seuil aussi bas. Cela implique la nécessaire mise en culture de plusieurs millilitres de sang, dilués dans des milieux spécialement formulés pour permettre la croissance de bactéries en présence d'éléments bactéricides issus de l'échantillon sanguin. L'identification des bactéries débute seulement à l'issue de l'hémoculture et aucune méthode qui permettrait une identification au cours de cette phase n'a jusqu'à présent été décrite. C'est donc dans ces conditions que l'employabilité du dispositif devait être démontrée.

Composants essentiels d'un biocapteur, les ligands employés pour la détection des bactéries conditionnent sa sensibilité et sa spécificité. Différents ligands ayant un spectre de reconnaissance théorique plus ou moins larges ont ainsi été testés. Mais, peu d'interactions entre les bactéries et les aptamères sélectionnés à partir de la bibliographie ont été observées en milieu de culture simple. De plus, la liaison de *S. aureus* avec une séquence n'ayant à priori aucune spécificité pour les bactéries pose question quant à la nature exacte des interactions. Parmi les ligands à large spectre dont la présence sur la biopuce aurait permis de déceler la présence anormale d'une bactérie dans l'échantillon, ni ApoH et C1q n'ont eu les performances escomptées. Par ailleurs, les modifications des propriétés optiques du milieu provoquées par la croissance des bactéries, suffisent généralement à déceler la contamination de l'échantillon. Seule C1q interagit avec *S. aureus* mais son emploi dans le sang est rendu impossible par les interférences importantes avec des constituants du milieu. Ainsi, parmi les ligands testés dans ce travail, aucun n'est susceptible de remplacer les anticorps finalement retenus pour ce travail. Leur emploi n'est pourtant pas dénué de problèmes à résoudre comme l'ont montré les résultats obtenus par la suite.

A elle seule, la détection spécifique de *S. aureus* s'est avérée être un défi de taille dans des milieux de cultures « simples », même en l'absence de sang. Tout d'abord, la formation importante de biofilm par cette bactérie affecte significativement la détection, mais elle a été efficacement résolue par l'orientation verticale du prisme empêchant sa sédimentation sur la surface. Cette disposition de la biopuce est aussi préférable dans des matrices complexes comme le sang dont les différents constituants peuvent se déposer à la surface sensible du biocapteur.

Puis, il a fallu faire face aux effets prévisibles de la protéine A. Sa présence sur la paroi de *S. aureus* est à l'origine d'interactions avec l'ensemble des immunoglobulines G présentes sur la biopuce,

qu'elles soient ou non spécifiques de *S. aureus*. Bien que la liaison de la protéine A au fragment Fc de la plupart des IgG soit bien propre à *S. aureus*, il est impossible de s'en satisfaire pour la détection spécifique de cette bactérie. En effet, d'autres bactéries dont certaines sont fréquemment isolées de patients bactériémiques comme les streptocoques, possèdent elles aussi des protéines capables de se lier au fragment constant des IgG. Il deviendrait alors impossible de discerner ces différentes bactéries sur la seule base des interactions avec les fragments constants des anticorps greffées sur la biopuce. Deux stratégies ont donc été étudiées pour rétablir une détection uniquement basée sur les interactions entre les bactéries et le site de liaison à l'antigène des anticorps. La première consistait à employer des anticorps de poule (IgY) pour lesquels la protéine A n'a aucune affinité. La proportion d'anticorps spécifiques dans le mélange d'anticorps polyclonal produit par des poules immunisées avec *S. aureus* est malheureusement trop faible pour permettre la détection de cette bactérie par SPRI. Pourtant, l'emploi d'anticorps IgY non immuns a confirmé la totale disparition des interactions avec la protéine A dont la présence a pu être spécifiquement détectée par un IgY commercial la reconnaissant. La seconde option retenue visait à débarrasser les IgG de leur fragment constant par lequel se lie la protéine A. Elle aussi permet d'éliminer les effets de la protéine A en préservant la spécificité des anticorps. Toutes deux sont donc validées pour la détection de *S. aureus* en milieu de culture simple. Elles sont vraisemblablement adaptables à la détection de ce pathogène dans des matrices complexes autres que le sang, en agrolimentaire comme en médecine.

Cependant, ces développements n'ont pas suffi à détecter *S. aureus* en présence de sérum, où de nouvelles difficultés sont apparues. Elles sont là encore liées aux remarquables propriétés de *S. aureus*, qui lui permettent de coloniser son hôte et lui confèrent sa pathogénicité. Dans l'optique de sa détection, ses attributs se traduisent par la disparition des interactions spécifiques entre *S. aureus* et les ligands disposés à la surface du capteur. L'implication certaine des anticorps circulants dans le camouflage des antigènes bactériens surfaciques a été prouvée. D'une part, en montrant que la présence de 1 mg.mL^{-1} d'IgG non spécifiques en solution dans le milieu de culture suffit à empêcher la détection de *S. aureus* sur une biopuce à anticorps par SPRI. D'autre part, en rétablissant sa détection dans du sérum duquel ont été éliminés les anticorps circulants par une chromatographie d'affinité. Différents moyens pour piéger ces anticorps directement dans le milieu sans avoir recours à un prétraitement de l'échantillon ont été testés sans résultats. L'implication d'autres constituants sanguins comme le fibrinogène dans l'empêchement de la détection est également discuté.

Parallèlement aux travaux sur la détection de *S. aureus* sur une biopuce à anticorps, un second modèle expérimental, *S. Enteritidis*, a été choisi pour poursuivre les développements dans le sang. D'abord conjointes, les expériences avec ces deux bactéries ont permis de mettre en évidence en présence d'un échantillon sanguin des interférences de type « faux-positifs »

[REDACTED]

Des expériences non présentées ici avec des peptides antimicrobiens cationiques renforcent encore cette conclusion.

Néanmoins, l'anticorps spécifique de *S. Enteritidis* est peu affecté par ces interactions. Elles ont de plus été limitées par l'ajout de sels de phosphate pour surtamponner le milieu ainsi que par l'emploi

immédiat des biopuces après le dépôt des anticorps. Le développement des expériences de détection dans le sang a finalement abouti à la détection d'environ une bactérie par millilitre de sang dans un volume final voisin de 30 millilitres en moins de huit heures. Ces résultats démontrent la faisabilité de cette approche pour l'identification spécifique d'une bactérie dans des conditions similaires à celles d'une hémoculture que ce soit au niveau de la contamination ou du volume étudié. La détection d'*E. coli* O157 : H7 en plus petits volumes a aussi été montrée, illustrant l'extension possible de la détection à d'autres bactéries pathogènes.

Une analyse du signal basée sur le calcul de la dérivée seconde est proposée. Elle permet d'accentuer la différenciation entre les interactions non spécifiques liées à la matrice des interactions spécifiques entre une bactérie et son anticorps. La détection du signal positif peut également être plus précoce grâce à ce traitement. Toutefois, les deux exemples concluants de détection dans le sang manquent de représentativité dans le cadre du diagnostic des bactériémies puisqu'il s'agit de pathogènes alimentaires.

Ceci peut en partie s'expliquer par l'une des difficultés soulevées par ce travail, qui est la nécessité de disposer de ligands hautement spécifiques et affins pour les cibles visées. Ces ligands devront aussi être choisis avec un point isoélectrique leur conférant dans le milieu une charge nette plutôt négative afin qu'ils soient préservés par les interférences [REDACTED]. Le recours à des anticorps commerciaux peut-être limitant à plusieurs titres. D'une part, les anticorps désirés peuvent tout simplement ne pas être disponibles, comme par exemple ceux reconnaissant la capsule polysaccharidique de *S. aureus*. D'autre part, les contrôles généralement effectués pour vérifier la spécificité et l'affinité de certains anticorps sont clairement insuffisants. Ceci est particulièrement vrai pour les anticorps destinés à la détection de *S. aureus* dont les documentations techniques occultent parfois totalement l'existence de la protéine A engendrant la reconnaissance non spécifique de tous les IgG. Pour cette bactérie le développement d'anticorps IgY paraît être la stratégie la mieux adaptée. En effet, ces anticorps sont moins susceptibles que les IgG aux interférences dans le milieu d'hémoculture. De plus, la protéine A est tout de même susceptible d'interagir dans une moindre mesure avec le fragment Fab de certains IgG, en dehors du site de liaison à l'antigène, sur la chaîne V_H3, lui conférant ses propriétés de super-antigène. Mais, pour amoindrir les effets de la liaison de la protéine A au fragment constant des IgG destinées à la détection des bactéries, une autre stratégie de greffage aurait pu être envisagée. Elle consiste à fonctionnaliser la surface avec de la protéine A à laquelle seraient ensuite venus se fixer les anticorps spécifiques des différentes bactéries. De cette manière, l'accessibilité des fragments constants pour la protéine A présente à la surface de *S. aureus* serait en principe diminuée.

Toutefois, la qualité des ligands n'est pas seule en cause dans la difficulté à détecter *S. aureus* en présence d'un échantillon sanguin. L'interaction d'une ou de plusieurs protéines présentes à la surface de la bactérie (adhésines) avec des constituants sanguins la rend indétectable avec des sondes spécifiques des motifs de surface. Or, cette capacité à interagir avec les protéines de l'hôte qui contribue à la pathogénicité de *S. aureus* ne lui est sans doute pas réservée. D'autres bactéries possèdent des adhésines, elles aussi susceptibles d'empêcher leur détection dans les échantillons sanguins. Le fait d'avoir pu détecter dans le sang deux pathogènes alimentaires, qui sont davantage adaptés au tractus intestinal qu'à la circulation sanguine n'est peut-être pas un hasard. La question est donc de savoir si la détection dans le sang d'un autre pathogène fréquemment isolé de patients bactériémiques, comme les souches d'*Escherichia coli* précédemment évoquées, est possible en disposant d'une sonde fiable. Dit autrement, au-delà des interférences de types faux positifs qui

peuvent être maîtrisées, dans quelle mesure les interactions des constituants sanguins avec des pathogènes adaptés à ces milieux peuvent elles perturber leur détection par affinité avec des ligands ?

En l'état, il est difficile d'apporter une réponse tranchée mais l'exemple de *S. aureus* démontre que des moyens doivent être mis en oeuvre pour neutraliser des constituants sanguins, en l'occurrence les anticorps circulants, pour rétablir la possibilité de détecter les bactéries. Seule une identification précise et précoce des principaux pathogènes à l'origine des bactériémies apporterait une réelle plus-value par rapport aux techniques actuelles. Les dispositions prises pour lever l'inhibition de la détection par les constituants sanguins ne devront ni risquer d'introduire des contaminants, ni compromettre la viabilité des quelques bactéries initialement présentes. A cette condition, le temps nécessaire à l'identification devra être comparé avec les procédures classiques présentées en introduction. Et, comme le soulignent Sin *et al.* dans leur revue, idéalement, cette comparaison devrait être faite avec des échantillons provenant de patients suspectés d'être atteint d'une infection [136]. Car, si elle est avérée, la composition de l'échantillon peut sensiblement varier par rapport à celle d'un patient sain dont le prélèvement aura été artificiellement contaminé.

La possibilité de détection multiplexe par SP_{Ri} serait vraisemblablement fort utile y compris pour la détection d'une seule et même espèce car il est peu probable qu'un seul ligand permette de détecter toutes les souches d'une bactérie donnée. D'autres ligands potentiels pourraient être testés à la lumière des informations apportées par ce travail. L'emploi de phages entiers pour la détection de *S. aureus* par SP_{Ri} [139, 140] n'a pas été testée au cours de ce travail. A ceci, plusieurs raisons à commencer par la difficulté à se procurer des phages et à en obtenir suffisamment pour fonctionnaliser la surface. De plus, leur taille dépassant souvent plusieurs dizaines de nanomètres, seule une petite partie de la bactérie interagissant avec eux entre dans le champ évanescent et contribue donc au signal mesuré par SP_{Ri}. L'emploi de protéines phagiques impliquées dans la reconnaissance des bactéries hôtes paraît être plus adapté pour l'application visée. Mais, plutôt que de cibler directement les motifs présents à la surface des bactéries, la possibilité de détecter les bactéries dans les complexes qu'elles sont susceptibles de former avec des constituants sanguins mérite d'être étudiée. Dans ce cas, il faudrait être capable de différencier les interactions dues aux constituants seuls qui sont toujours présents de celles dues aux complexes. Mais pour rester pertinente, cette démarche devra tout de même permettre une identification plus précise que la seule détection d'une présence bactérienne.

Enfin, la possibilité de coupler l'identification précoce avec la réalisation de l'antibiogramme apporterait une importante plus-value par rapport aux protocoles actuels. Elle permettrait en effet d'ajuster au plus tôt l'antibiothérapie. Si la détection directe de marqueurs de résistance sur des bactéries entières ne semble pas toujours réalisable, il est possible d'imaginer que dès la détection d'une présence bactérienne, une partie de l'échantillon soit dirigé vers un autre compartiment de la biopuce. Les bactéries pourraient alors y être lysées pour détecter un marqueur de résistance ou mises en présence d'antibiotiques pour voir si leur croissance se poursuit ou non. L'une des difficultés inhérente à cet éventuel test de sensibilité à un antibiotique lors de l'hémoculture est qu'il faudrait attendre le développement de la population bactérienne pour qu'il soit significatif. Réalisé trop tôt, le résultat serait peu significatif en raison du faible nombre de bactéries. La présence de composés susceptibles d'interférer avec l'action des antibiotiques est également à prendre en considération.

6 Matériels et Méthodes

6.1 Matériel expérimental

6.1.1 Appareillages et matériels réutilisables

- Poste de sûreté microbiologique (Thermo Scientific, Etats-Unis)
- Congélateur -80°C pour la conservation du souchier
- Congélateur -20°C et réfrigérateur (2-8°C) pour la conservation des échantillons
- Distributeur d'eau ultrapure (18,2 MΩ.cm), ELGA PURELAB flex (Veolia Water, France)
- Autoclave Systec DB-23 (Systec, Allemagne)
- Plasma Femto (Diener Electronic, Allemagne)
- Spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Etats-Unis)
- Centrifugeuse Sigma (Bioblock Scientific)
- Centrifugeuse de paillasse modèle Espresso (Thermo Scientific, Etats-Unis)
- Étuve (Mettler, Allemagne) contenant l'imageur SPRI
- Étuve agitée « IKA KS 4000i Control » (IKA, Allemagne) pour les précultures bactériennes (37°C)
- Étuve (BINDER, Allemagne) pour l'incubation des boîtes de pétri (37°C)
- Bain-marie
- Robot de dépôt électrochimique Polypotter développé au laboratoire
- Robot sciFLEXARRAYER (Sciencen, Allemagne)
- Imageur SPRI-Lab+™ (Horiba Scientific-GenOptics, France) opérant à une longueur d'onde de 810 nm
- Pousse seringue Cavro (Tecan, USA)
- Dégazeur (Altech, France)
- Tubing en peek 1/16" × 0,030 × 5 pieds (Cluzeau Info Labo, France)
- Cuves en peek usinées au laboratoire

6.1.2 Consommables

- Prismes de verre recouverts d'une double couche métallique : titane 5 nm et or 45 nm (Horiba Scientific GenOptics, France)
- Lames de verre recouvertes d'or (Schott, Yverdon, Suisse)
- Colonnes de filtration par exclusion de taille Vivaspine 500, seuil de coupure 30 kDa et 100 kDa (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Allemagne)
- Tubes de culture à fond rond, 14 mL (VWR, Etats-Unis)
- Tubes Eppendorfs (0,5 à 2 mL) (Eppendorf, Allemagne)
- Tubes Falcon 15 mL et 50 mL (VWR, Etats-Unis)
- Boîtes de pétri stériles (Greiner Bio One, Allemagne)
- Seringues (différents volumes, Terumo, ThermoFisher Scientific, France)
- Filtres seringues stériles 0,2 µm, acétate de cellulose (VWR, Etats-Unis)
- Tubes de prélèvements sanguins BD Falcon (référence 366404, VAC TB ST YELLOW 3,32 mL) contenant l'anticoagulant SPS (0,68 mL d'une solution à 0,35% SPS) (Expotech USA, Etats-Unis)
- Tubes de prélèvement BD Vacutainer® Secs (N° catalogue 369032) pour la préparation du sérum (Becton Dickinson, France)
- Pepsine immobilisée 20343 (ThermoFisher Scientific, France)

- Colonne fonctionnalisées protéine A / G pour la purification d'anticorps. NAb™ Spin Columns, 0,2 mL. Référence 89954 (ThermoFisher Scientific, France).
- Colonne illustra NAP-5 (SEPHADEX G-25 ; GE Healthcare, Royaume-Uni)

6.2 Réactifs

- Pyrrole (Interchim, P0574 / 04639D Montluçon, France)
- Pyrrole acide undécanoïque sulfo-N-Hydroxysuccinimide (Py-NHS), synthétisé au laboratoire d'après Grosjean *et al.* [186].
- Formaldéhyde 36,5-38% dans l'eau (F8775, Sigma-Aldrich, France)
- Ethanol 70% et 96%
- Biotine-NHS
- Conjugué R-phycoérythrine streptavidine (SAPE) (ThermoFischer Scientific S866).

6.2.1 Milieux de culture et leurs constituants

- Tryptic Soy Broth, TSB, (référence 22092, Sigma-Aldrich, France)
- Milieux contenus dans les flacons d'hémoculture BD BACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials et BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials, (Becton Dickinson, France)
- Gélose Trypcase soja, TSA, (référence 41466, bioMérieux, France)
- Polyanethole sulfonate de sodium, SPS (référence P8824, Sigma Aldrich)

6.2.2 Tampons et autres solutions

- Tampon phosphate salin, (*Phosphate Buffer Saline*, PBS), (Sigma-Aldrich, France)
- Tampon d'électropolymérisation, FDZ, tampon aqueux composé de 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl et 10% glycérol, pH 6,8 préparé au laboratoire.
- Tampon de digestion, acétate de sodium 20 mM, pH 4,5.
- Tampon d'élution 0,1 M glycine, pH 3
- Tampon phosphate ajouté au milieu de culture pour le surtamponner : 0,05 M NaH₂PO₄ et 0,022 M KH₂PO₄. Une solution de ces sels dix fois concentrée est préparée puis autoclavée.
- Bouillon tryptone sel, (référence AEB111499, bioMérieux, France)

6.2.3 Protéines (hors anticorps)

- Albumine Bovine Sérique, (*Bovine Serum Albumine*) BSA, (référence A7906, Sigma-Aldrich, France)
- Apolipoprotéine H, ApoH (ApoH-Technologies, Montpellier, France)
- C1q, provenant de l'équipe « Protéines de l'immunité innée à l'interface hôte-pathogène » dirigée par N. Thielens, Institut de Biologie Structurale, Grenoble. Masse molaire : 460 kDa.

6.2.4 Anticorps

Tableau 6-1 : Liste des anticorps employés au cours de cette thèse et antigènes en principe reconnus par ces anticorps.

Référence de l'anticorps	Hôte	Clonalité et isotype (si monoclonaux)	Cible	Provenance
Anticorps utilisés comme contrôles négatifs				
KLH	Souris	Monoclonal, IgG ₁	Protéine « <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> » ¹⁰ .	L. Bellanger, CEA Marcoule
Ab17473	Poule	Polyclonal	Bêta-amyloïde	Abcam, (Cambridge, Royaume-Uni)
Anticorps utilisés pour la reconnaissance de <i>S. aureus</i>				
Ab19483	Poule	Polyclonal	Protéine A	Abcam
01 – 90 – 05 (KPL)	Chèvre	Polyclonal	<i>S. aureus</i>	Kirkegaard & Perry Laboratories (Gaithersburg, États-Unis)
0300-0084	Lapin	Polyclonal	<i>S. aureus</i>	AbD Serotec (BioRad, Kidlington, Royaume-Uni)
Ab19483	Poule	Polyclonal	Protéine A	Abcam
Ab20002	Souris	Monoclonal, IgG ₃	<i>S. aureus</i>	Abcam
15715	Souris	Monoclonal, IgG ₁	PBP2a	QED Biosciences (San Diego, États-Unis)
Ab62742	Souris	Monoclonal, IgG _{2a}	<i>S. aureus</i> résistant à la méticilline	Abcam
Ab69237	Souris	Monoclonal, IgG _{2a}	<i>S. aureus</i> résistant à la méticilline	Abcam
10-P08A	Souris	Monoclonal, IgG1	PBP2a	Interchim (Montluçon, France)
10-P08B	Souris	Monoclonal, IgG1	PBP2a	Interchim
ABIN 1110997	Lapin	Polyclonal	PBP2a	Anticorps en ligne
Anticorps utilisés pour la reconnaissance de <i>S. enterica</i> Sérovar Enteritidis				
SE103	Souris	Monoclonal, IgG1	<i>Salmonella</i> Enteritidis	H. Volland, CEA Saclay
Anticorps utilisés pour la reconnaissance d'<i>E. coli</i> ATCC11775				
Ab13627	Chèvre	Polyclonal	<i>E. coli</i> multiples sérotypes O et K	Abcam
Ab31499	Lapin	Polyclonal	<i>E. coli</i> multiples sérotypes O et K	Abcam
4329-4906	Lapin	Polyclonal	<i>E. coli</i> multiples sérotypes O et K	AbD Serotec
Autres anticorps				
Ab11439	Souris	Monoclonal, IgG1	<i>L. monocytogenes</i>	Abcam
B1520	Lapin	Polyclonaux	BSA	Sigma
Ac PIG180	Chèvre	Polyclonal	IgY	Agro-Bio (La Ferté Saint-Aubin)
MCA2603	Souris	Monoclonal, IgG1	C1q	AbD Serotec
Inconnu, produit non commercial		IgG	ApoH	ApoH Technologies

¹⁰ La protéine KLH provient de l'hémolymphe d'un mollusque marin (*Megathura crenulata*). Elle est fréquemment utilisée comme protéine porteuse de petites molécules faiblement immunogènes pour la production d'anticorps.

En plus de ces anticorps commerciaux, la production d'anticorps de poule reconnaissant les bactéries *S. epidermidis* ATCC 12228 ainsi que *S. aureus* BAA-1720 et BAA-1721 a été réalisée à notre demande par la société Agro-Bio.

6.2.5 Oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été synthétisés par la société Eurogentec¹¹ (Liège, Belgique). Tous comportent une amine primaire en 5' afin de permettre leur couplage ultérieur à un groupement thiol ou pyrrole – NHS nécessaire pour la fixation de ces molécules à la surface du prisme. En 3', une base inversée est ajoutée afin de protéger les oligonucléotides d'une digestion par les exonucléases présentes dans le milieu.

Tableau 6-2 : Séquences des oligonucléotides mentionnés dans ce manuscrit

Nom	Séquence (5'-3')	Longueur (nt)	Référence
Aptamères pour <i>S. aureus</i>			
SA17	CCCCCAGTCCGTCCTCCAGCCTCACACC	30	[195]
SA61	CTCCAACCGCTCCACCCTGCCTCCGCCTC		
SA31	TCCCACGATCTCATTAGTCTGTGGATAAGCGTGGGACGTCTATGA	45	[200]
SA43	TCGGCACGTTCTCAGTAGCGCTCGCTGGTCATCCCACAGCTACGT		
Aptamères pour <i>E. coli</i> O157 :H7			
A1	CCGGACGCTTATGCCTTGCCATCTACAGAGCAGGTGTGACGG	42	[215]
Aptamères pour <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium			
STYP3	GAGTTAATCAATACAAGGCGGGAACATCCTTGCGGGTGC	39	[211]
33	TATGGCGGCGTCACCCGACGGGGACTTGACATTATGACAG	40	[361]
Aptamères pour <i>S. enterica</i> serovar Enteritidis			
SE-3	TCGGCAACAAGGTCACCCGGAGAAGATCGGTGGTCAAACGCATA GGTAGTCCAGAAGCC	60	[212]
Aptamères employés comme contrôles négatifs			
Zip7	TGCGATCGCAGCGGTAACCTGAAC	24	Notre Laboratoire
Zip9	GACCATCGTGCGGGTAGGTAGACC	24	
Zip9c	Biotine –GGTCTACCTACCCGCACGATGGTC	24	

6.3 Bactéries

- *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline, BAA-1721 provenant de l'équipe de M. Maurin et S. Boisset, CHU Grenoble
- *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, BAA-1720 provenant de l'équipe de M. Maurin et S. Boisset, CHU Grenoble
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 achetée à l'ATCC (Etats-Unis)
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC14990 achetée à l'ATCC (Etats-Unis)
- *Escherichia coli* ATCC 11775 achetée à l'ATCC (Etats-Unis)
- *Escherichia coli* O157 :H7 CIP105917 (Institut Pasteur)
- *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérovar Enteritidis, notée S. Enteritidis collaboration ISHA (France)
- *Listeria monocytogenes* (ISHA 4.51)

¹¹Eurogentec, Custom Oligonucleotides [en ligne] [consulté le 17 mai 2016].

Disponible sur : < <http://www.eurogentec.com/products/custom-oligonucleotides.html> >

6.4 Protocoles expérimentaux

6.4.1 Conservation des bactéries

Chaque souche bactérienne est conservée durablement sous forme d'aliqots dans un milieu de congélation à -80°C . A partir de ce souchier, les bactéries sont étalées à l'aide d'une anse d'inoculation sur une gélose TSA qui est incubée 24h à 37°C . Cette boîte, conservée à 4°C pendant 3 semaines maximum est utilisée comme stock de travail. Passé ce délai, une colonie est prélevée avec une anse et étalée sur une nouvelle gélose. Ce repiquage est réalisé à deux reprises au maximum après quoi un nouveau stock de travail est constitué à partir du souchier.

6.4.2 Culture bactérienne

Une colonie bactérienne est prélevée sur le stock de travail avec une anse d'inoculation. Les bactéries sont ensuite resuspendues dans un tube de culture contenant quatre millilitres de milieu, généralement du TSB. Plusieurs dilutions successives à partir de ce premier tube sont effectuées afin de réduire la taille de l'inoculum initial. De cette manière, après incubation, les bactéries présentes dans les derniers tubes peuvent encore se trouver en phase exponentielle de croissance plutôt qu'en phase stationnaire. Ces tubes sont donc incubés à 37°C sous agitation (150 rpm) sur la journée ou la nuit pour permettre la croissance bactérienne. Simultanément, la stérilité du milieu de culture est contrôlée en plaçant dans l'étuve un tube rempli avec du milieu seul qui doit rester limpide.

6.4.3 Préparation de l'inoculum pour les expériences SPR

Après l'incubation des bactéries, des dilutions en cascade de la culture sont effectuées. Généralement six à sept dilutions successives d'un facteur dix sont nécessaires pour atteindre les densités bactériennes d'inocula employées au cours de ce travail. L'étalement sur gélose TSA à l'aide d'un rateau stérile de cent microlitres des trois dernières dilutions (10^{-5} - 10^{-6} et 10^{-7} , parfois réduit à deux) permet le dénombrement des colonies après une nuit d'incubation des géloses à 37°C . Chaque étalement d'une dilution est effectué en trois exemplaires. Pour estimer la densité bactérienne dans la culture mère et en déduire celle présente dans les cuves au début de l'expérience, les dénombrements contenant entre trente et trois cent colonies sont privilégiés conformément aux préconisations admises à ce sujet. Ce dénombrement systématique permet de connaître la taille exacte de l'inoculum mais également de contrôler l'homogénéité des colonies et donc l'absence de contamination. Pour la plupart des souches utilisées, la densité bactérienne à l'issue de la culture en milieu liquide est d'environ 10^9 UFC.mL $^{-1}$.

Pour effectuer les dilutions, des tubes de tryptone sel sont utilisés sauf pour deux d'entre elles, effectuées dans le milieu de culture souhaité pour le suivi de la croissance bactérienne par SPR. Il s'agit du tube qui précède celui utilisé pour l'inoculum et l'inoculum lui-même. Suivant le nombre de bactéries souhaité dans l'inoculum, la position de ces deux tubes dans la cascade de dilution varie. Lors des expériences avec du sérum ou du sang, ces échantillons biologiques sont directement ajoutés à l'inoculum dans un rapport allant d'un volume d'échantillon biologique pour cinq à dix volumes de milieu.

La suspension bactérienne servant d'inoculum est finalement placée dans les cuves maintenues à la surface du prisme au niveau du banc SPRi (Figure 6-1).

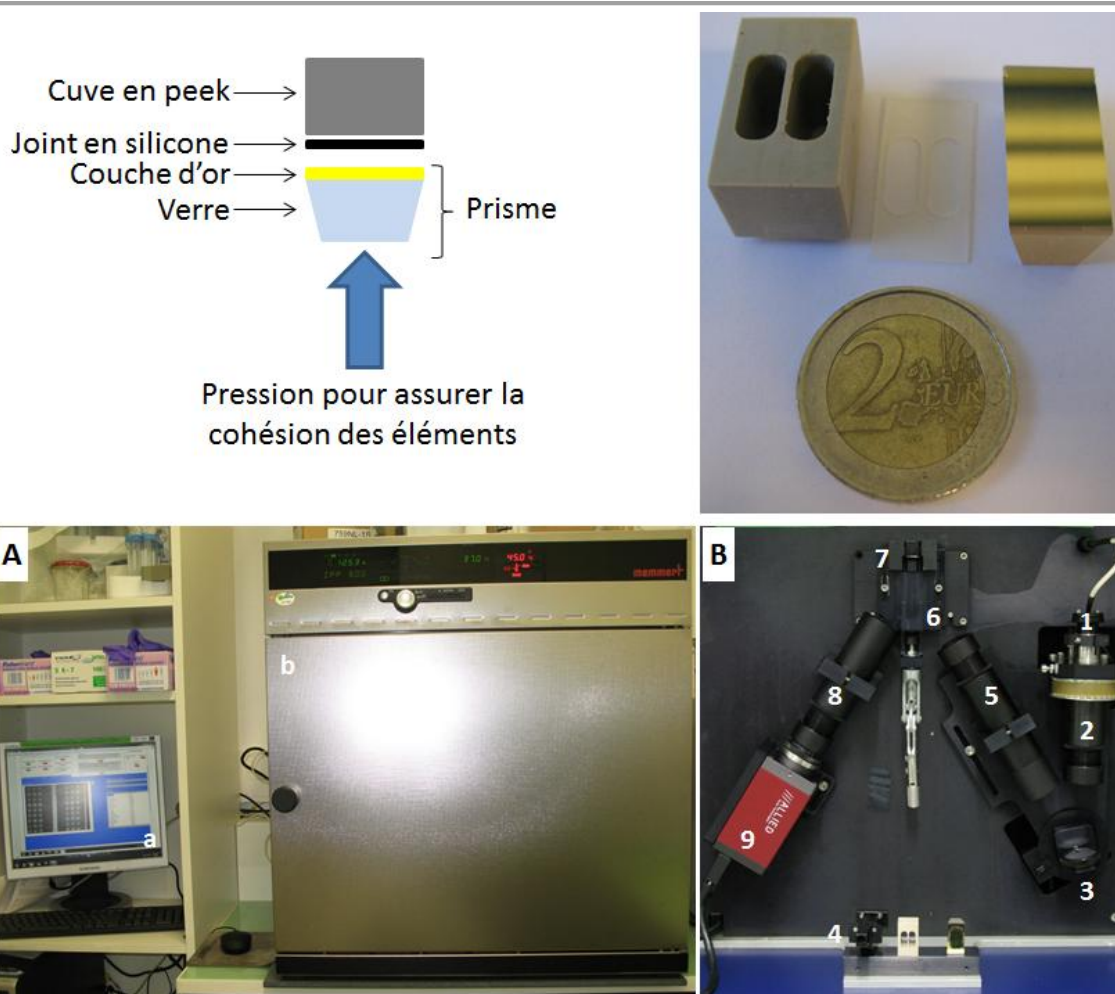


Figure 6-1 : Schéma et photographie de l'ensemble prisme – joint – cuve à l'aide duquel ont été effectuées les expériences. La cuve en photographie n'est qu'un exemple parmi d'autres des géométries utilisées. Dispositif expérimental pour la SPRI composé de : **A)** **a.** Ordinateur permettant le suivi de la SPRI, **b.** étuve avec régulation de la température à 37°C. **B)** **Banc SPRI** constitué de : **1.** LED, **2.** Polariseur, **3.** Miroir pivotant, **4.** Portoir du prisme, cuve et prisme, **5.** Et **8.** Lentilles, **6.** Emplacement du prisme, **7.** Emplacement de la cuve, **9.** Caméra CCD.

6.4.4 Obtention des échantillons sanguins et préparation de sérum

Les échantillons sanguins utilisés au cours de ce travail ont été fournis par l'Établissement Français du Sang (EFS) de Grenoble dans le cadre d'une convention de cession signée entre l'EFS et le CEA. La libération des échantillons par l'EFS est conditionnée par l'absence d'anticorps contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti – VIH1 et VIH2) et de l'hépatite C ainsi que celle d'antigènes de l'hépatite B, contrôlés lors de la qualification biologique des dons. En pratique, un délai de deux jours nécessaires à la réalisation de ces tests sépare le prélèvement de l'échantillon par l'EFS et sa récupération par notre laboratoire. Pendant ce temps, l'échantillon est conservé à 4°C.

Pour les expériences en sang total, les prélèvements ont été effectués soit dans les tubes de prélèvement contenant l'anticoagulant SPS soit directement dans les flasques d'hémoculture. Le sérum est préparé à partir du sang total prélevé sur les tubes secs de la façon suivante : **1.)** Les tubes sont laissés à la verticale pendant 45 à 60 min à température ambiante afin de permettre au coagulum de sédimenter. **2.)** Ils sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 1300 g toujours à température ambiante, avec une décélération lente. Le surnageant formé qui représente entre le tiers et la moitié du tube est constitué du sérum. Après le prélèvement de cette fraction, elle peut

être (si nécessaire) soumise à une nouvelle étape de centrifugation. Le sérum est ensuite réparti dans différents contenants placés à -80°C avant son utilisation.

6.4.5 Protocole de couplage au pyrrole – NHS des anticorps et autres protéines

Ce protocole a déjà été mis en œuvre au cours de la thèse de S. Bouguelia, préparée au laboratoire CREAB et soutenue en 2012. Il comporte deux étapes de rinçage des protéines dans leur tampon de conservation (PBS ou plus rarement HEPES) et une étape d'incubation (couplage) des protéines avec le pyrrole – NHS. La première étape de rinçage a pour but d'éliminer l'azide de sodium (NaN_3), agent antibactérien généralement ajouté aux solutions d'anticorps pour leur conservation. Les colonnes Vivaspinn utilisées pour cela sont choisies telles que le seuil de coupure soit au moins trois fois inférieur à la masse molaire de la protéine que l'on cherche à purifier conformément aux recommandations du fournisseur. En pratique, des colonnes avec un seuil de coupure de 30 kDa ont été utilisées avec les anticorps (IgG et IgY) et 100 kDa pour C1q.

Un premier rinçage des colonnes est effectué avec 200 μL de PBS élués au cours d'une centrifugation de 15 min à 4°C à une vitesse de 15000 g. Puis 200 μL de l'échantillon protéique à une concentration d'environ 0,5 mg.mL^{-1} sont déposés sur les colonnes et élués par centrifugation. Deux rinçages successifs avec 200 μL de PBS sont ensuite effectués. Les protéines retenues au fond du tube et sur la membrane sont récupérées délicatement avec 100 μL de PBS déposés au sommet de la membrane puis collectés. Cette étape est répétée avec 100 μL supplémentaires. La concentration protéique des échantillons est alors mesurée (par densité optique dans l'UV). Ainsi, le ratio des concentrations (Py-NHS / Protéines) peut être maintenu réellement constant entre les différents anticorps et les couplages successifs. Il suffit pour cela d'ajuster la quantité de Py-NHS en fonction de la concentration protéique mesurée. Pour les anticorps, ce ratio molaire initial (RMI) est de dix. La solution mère de Py-NHS à 4 mM est conservée à -20°C dans du DMSO. Une solution fille de Py-NHS à 200 μM dans du PBS est préparée (12,5 μL de la $S_{\text{mère}}$ dans 237,5 μL de PBS). Par exemple, si la concentration de la solution d'IgG est de 0,5 mg.mL^{-1} soit 3,3 μM pour un volume d'environ 200 μL ($2 \times 100 \mu\text{L}$), 34 μL de la solution fille de Py-NHS sont ajoutés et le volume est complété avec 166 μL de PBS. Les concentrations d'IgG et de Py-NHS sont donc respectivement de 1,7 μM et 17 μM soit un RMI de 10. Ce mélange est incubé à 4°C pendant 24 h à l'abri de la lumière.

Les étapes de rinçage qui suivent ont pour but d'éliminer le Py-NHS n'ayant pas réagi avec les fonctions amines des protéines. Pour ce faire, une nouvelle colonne est rincée comme auparavant, puis l'échantillon est élué en deux fois (dépôt de 200 μL) et rincé comme lors de l'étape précédente. Les protéines retenues sont cette fois récupérées avec deux fois 40 μL de tampon d'électropolymérisation (FDZ). La concentration protéique est alors remesurée et des aliquots sont réalisés de telle sorte que le volume contenu dans les tubes permette la préparation de 15 μL d'une solution à une concentration d'anticorps de 1 μM . Ces échantillons sont conservés à -20°C avant leur utilisation pour les dépôts sur prisme.

6.4.6 Procédure de dépôt des anticorps sur le prisme

La surface du prisme est débarrassée d'éventuelles poussières par un flux d'argon suivi par l'écoulement d'eau ultrapure puis d'éthanol 96% et à nouveau d'eau à la surface finalement séchée sous flux d'argon. Le prisme est ensuite mis en place pour le dépôt.

En parallèle, les anticorps préalablement liés au pyrrole et aliquotés sont sortis du congélateur. A cette solution sont ajoutés 3 μL d'une solution de pyrroles libres à 100 mM, de manière à atteindre

une concentration finale de 20 mM, et la quantité *ad hoc* de tampon d'électropolymérisation pour atteindre un volume final de 15 μ L.

Les anticorps et autres protéines sont ensuite déposés sur les prismes par électropolymérisation du pyrrole d'après la méthode décrite par Grosjean *et al.* [186]. Ainsi, le cône de dépôt est constitué d'un cône de pipette (0,5 – 10 μ L) dans lequel a été inséré un fil de platine servant de contre-électrode. L'électrode de travail est formée par la surface d'or du prisme. Les déplacements du cône à la surface du prisme dans les 3 dimensions de l'espace sont gérés à travers une interface informatique. La gestion de l'électropolymérisation est faite grâce au logiciel EC-Lab.

Le cône de dépôt est rempli avec 5 μ L de la solution d'anticorps à déposer puis déplacé jusqu'à l'emplacement désiré. Lorsque le cône est descendu vers la surface d'or, le liquide présent à l'extrémité du cône entre en contact avec la surface. Une différence de potentiel électrique de 2,4 V durant 100 ms est alors appliquée entraînant l'électropolymérisation du pyrrole et avec elle la fixation des anticorps sur la biopuce. Ainsi, dans la cuve employée au cours de cette thèse, dans chaque chambre, 8 à 9 lignes et 3 colonnes de plots pouvaient être effectuées.

Le prisme ainsi préparé peut être utilisé immédiatement pour une expérience en SPRi ou conservé plusieurs semaines à 4°C dans du PBS. Une étape de blocage de la surface avec une solution de PBS + 1% BSA est réalisée systématiquement avant chaque expérience. Pour cela, 1 mL de cette solution fraîchement préparée est placé sur la surface et laissé pendant 20 min. Le prisme est ensuite rincé en faisant s'écouler plusieurs millilitres de PBS à sa surface.

6.4.7 Protocole de digestion des anticorps par la pepsine

Les étapes suivies sont globalement celles données dans le protocole fourni avec la pepsine immobilisée.

- Rinçage de la pepsine immobilisée : Resuspendre 0,25 mL de pepsine immobilisée dans 4 mL de tampon de digestion, centrifuger 5 min à 1000 g puis éliminer le surnageant. Répéter cette étape et suspendre la pepsine dans 0,5 mL.
- Rinçage des anticorps dans les colonnes Vivaspin comme décrit précédemment pour le couplage. Essayer autant que possible de concentrer les anticorps pour s'approcher de 10 mg.mL⁻¹, concentration préconisée pour l'emploi de la pepsine.
- Ajuster la quantité de pepsine à ajouter aux anticorps en fonction de la quantité obtenue à la fin de l'étape précédente. Le protocole du fournisseur préconise 0,25 mL de pepsine immobilisée pour 10 mg d'anticorps.
- Incubation 4 h à 37°C sous agitation.
- Arrêt de la digestion par retrait de la pepsine. Centrifugation 5 min à 1000 g et collecte du surnageant.

Plusieurs étapes supplémentaires ont ensuite été ajoutées afin de collecter uniquement les fragments F(ab')₂.

- Élimination des fragments Fc et concentration des fragments F(ab')₂ sur les colonnes Vivaspin 50 kDa.

Les fragments Fc coupés en plusieurs morceaux sont alors élués. Le rétentat contient alors les fragments F(ab')₂ et d'éventuels anticorps non digérés. Afin de conserver seulement les fragments, le

rétenant obtenu est ensuite déposé sur des colonnes protéine A/G (NAb™ Spin Columns, 0,2 mL). Là encore le protocole suivi est celui du fournisseur.

- Équilibration et rinçage de la colonne avec le tampon d'élution (PBS).
- Dépôt du rétenant précédemment obtenu et homogénéisation du contenu de la colonne par retournement de la colonne pendant 10 min.
- Centrifugation 1 min, 5000 g et collecte de l'éluat contenant en principe uniquement les fragments $F(ab')_2$. Mesure de la concentration protéique et couplage au pyrrole en vue de l'emploi en SPRI.

6.4.8 Protocole de biotinylation des anticorps et révélation par immunofluorescence

Couplage

- Rincer l'anticorps à coupler comme pour le protocole de couplage au pyrrole en remplaçant le PBS par un tampon carbonate (100 mM, pH 8,4).
- Dissoudre 10 mg de biotine-NHS dans 1 mL de DMSO anhydre.
- Mélanger les solutions de biotine-NHS et d'anticorps à raison de 80 – 100 µg de biotine-NHS par milligramme d'anticorps.
- Incuber à température ambiante pendant 4h sous agitation et à l'abri de la lumière.
- Rincer à nouveau l'anticorps biotinylé avec cette fois un tampon dit de conservation composé de 10 mM Tris, 150 mM NaCl et 0,1% $NaNO_3$, pH 8,2. Conserver au réfrigérateur.

Révélation

- Diluer les anticorps biotinylés (au 1/1000^{ème} ici) dans du PBS.
- Placer sur les dépôts à caractériser la solution diluée d'anticorps biotinylés et incuber 30 min à température ambiante. Rincer ensuite la surface en y faisant s'écouler plusieurs millilitres de PBS. En général des lames de verre dorées sont utilisées plutôt qu'un prisme.
- Déposer ensuite la solution de SAPE 5% pour un temps de contact de 10 min à l'obscurité et à température ambiante. Rincer à nouveau au PBS.
- Recouvrir la surface d'une lamelle couvre-objet et observer au microscope à fluorescence avec le filtre phycoérythrine.

6.4.9 Protocoles de fonctionnalisation et de dépôt des aptamères

Les aptamères sont couplés au thiol-NHS (11-mercapto-undécane-1NHS) afin de permettre leur fixation sur l'or. Pour ce faire, 4 nanomoles d'oligonucléotides sont mises en présence d'un excès de thiol-NHS (ratio 80-1) dans du PBS pendant 60 min à température ambiante. La réaction est arrêtée par le passage des aptamères sur les colonnes NAP. A l'issue de cette étape, la concentration des oligonucléotides en solution dans l'eau distillée est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm, le coefficient d'extinction molaire propre à chaque oligonucléotide étant communiqué par Eurogentec. Ces solutions sont lyophilisées pour conservation.

Avant le dépôt, les prismes sont nettoyés au plasma (pression de 0,6 mbar, 75% oxygène, 25% Argon puissance de 40 W pendant 3 min) et laissés au repos pendant 24 h pour permettre à la surface d'or de retrouver une certaine stabilité. La fonctionnalisation des prismes peut alors débuter. Des gouttes de 4 nL des solutions de greffage contenant les aptamères (à 10 et 20 µM) sont projetées sur la surface d'or à l'aide du robot de dépôt sciFLEXARRAYER. Les aptamères s'organisent alors en monocouche auto-assemblée au sein des plots. Les prismes sont laissés 60 min dans l'enceinte

humide (80-85% d'humidité) de la chambre de dépôt, puis placés une nuit sous hotte à température ambiante pour permettre le séchage des dépôts. Enfin, afin d'optimiser l'organisation des aptamères à la surface et limiter l'adsorption non spécifique de molécules à la surface, 50 μ L d'une solution de thiols – PEG de 2 kDa est déposée sur la surface pendant 1h30. Pour finir, cette dernière est rincée à l'eau ultrapure puis séchée sous flux d'argon pour une conservation des biopuces à 4°C. Par la suite, les biopuces sont employées dans des conditions semblables à celles fonctionnalisées avec des anticorps.

6.4.10 Inactivation des bactéries

A plusieurs reprises au cours de ce travail notamment pour l'immunisation des poules, il a été nécessaire d'inactiver des bactéries. Pour cela, deux protocoles d'inactivation, chimique et thermique ont été suivis. Tous deux sont précédés d'une préculture des bactéries en TSB, dans un volume fonction de la quantité souhaitée de bactéries inactivées. A la fin de la préculture, les suspensions bactériennes sont centrifugées (5 min, 5000 rpm), le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans du PBS stérile. Des étalements de cette solution sont effectués afin d'estimer la densité bactérienne.

Dans le cas de l'inactivation thermique, le tube contenant les bactéries est alors immergé dans un bain-marie à 95°C pendant 1h à l'issue de laquelle il est retiré et plongé dans de la glace pendant 15 min. La suspension bactérienne inactivée est alors centrifugée et le culot resuspendu en PBS.

Dans le cas de l'inactivation chimique, le volume de formaldéhyde nécessaire à l'obtention d'une concentration finale de 0,5% est ajouté à la suspension bactérienne. S'en suit une incubation de 2 h à température ambiante sous agitation à l'issue de laquelle trois rinçages successifs (cycle centrifugation – élimination du surnageant – reprise du culot en PBS) sont effectués afin d'éliminer toute trace de formaldéhyde.

Pour contrôler l'efficacité de l'inactivation quel que soit le protocole suivi, des contrôles de stérilité sont effectués. D'une part, 100 μ L de la suspension bactérienne inactivée sont étalés en triplicata sur une gélose TSA ensuite incubée à 37°C. D'autre part, 100 μ L de la suspension bactérienne inactivée servent à inoculer deux tubes de culture contenant 4 mL de TSB stérile, incubés à 37°C sous agitation. L'absence de croissance dans ces deux conditions est contrôlée visuellement à 3 et 6 jours, délai au-delà duquel l'inactivation est considérée comme réussie si aucune croissance n'a été observée.

Bibliographie

1. Didelot, X., A.S. Walker, T.E. Peto, D.W. Crook, D.J. Wilson, *Within-host evolution of bacterial pathogens*. Nat Rev Micro, 2016. **14**(3): p. 150-162.
2. Modi, S.R., J.J. Collins, D.A. Relman, *Antibiotics and the gut microbiota*. The Journal of Clinical Investigation, 2014. **124**(10): p. 4212-4218.
3. Ubeda, C., Y. Taur, R.R. Jenq, M.J. Equinda, T. Son, M. Samstein, et al. , *Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans*. The Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(12): p. 4332-4341.
4. Poolman, J.T. et M. Wacker, *Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field*. Journal of Infectious Diseases, 2016. **213**(1): p. 6-13.
5. Weinstein, M.P., M.L. Towns, S.M. Quartey, S. Mirrett, L.G. Reimer, G. Parmigiani, et al. , *The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults*. Clin Infect Dis, 1997. **24**(4): p. 584-602.
6. Bourneton, O., T. Mutel, D. Heranney, C. Hernandez, T. Lavigne, J. Waller, et al. , *Incidence des bactériémies et fongémies aux hôpitaux universitaires de Strasbourg de 2005 à 2007*. Pathologie Biologie, 2010. **58**(1): p. 29-34.
7. Wenzel, R.P., *Health Care–Associated Infections: Major Issues in the Early Years of the 21st Century*. Clinical Infectious Diseases, 2007. **45**(Supplement 1): p. S85-S88.
8. Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S.M. Tallent, H. Seifert, R.P. Wenzel, M.B. Edmond, *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(3): p. 309-17.
9. Anderson, D.J., R.W. Moehring, R. Sloane, K.E. Schmader, D.J. Weber, V.G. Fowler, Jr., et al. , *Bloodstream infections in community hospitals in the 21st century: a multicenter cohort study*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91713.
10. Ammerlaan, H., H. Seifert, S. Harbarth, C. Brun-Buisson, A. Torres, M. Antonelli, et al. , *Adequacy of Antimicrobial Treatment and Outcome of Staphylococcus aureus Bacteremia in 9 Western European Countries*. Clinical Infectious Diseases, 2009. **49**(7): p. 997-1005.
11. Jensen, U.S., J.D. Knudsen, S. Wehberg, D.B. Gregson, K.B. Laupland, *Risk factors for recurrence and death after bacteraemia: a population-based study*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(8): p. 1148-54.
12. Bassetti, M., E.M. Trecarichi, A. Mesini, T. Spanu, D.R. Giacobbe, M. Rossi, et al. , *Risk factors and mortality of healthcare-associated and community-acquired Staphylococcus aureus bacteraemia*. Clinical Microbiology and Infection, 2012. **18**(9): p. 862-869.
13. Uslan, D.Z., S.J. Crane, J.M. Steckelberg, et al., *Age- and sex-associated trends in bloodstream infection: A population-based study in olmsted county, minnesota*. Archives of Internal Medicine, 2007. **167**(8): p. 834-839.
14. Wilson, J., S. Elgohari, D.M. Livermore, B. Cookson, A. Johnson, T. Lamagni, et al. , *Trends among pathogens reported as causing bacteraemia in England, 2004-2008*. Clinical Microbiology and Infection, 2011. **17**(3): p. 451-458.
15. Retamar, P., M.D. Lopez-Prieto, C. Natera, M. de Cueto, E. Nuno, M. Herrero, et al. , *Reappraisal of the outcome of healthcare-associated and community-acquired bacteremia: a prospective cohort study*. BMC Infect Dis, 2013. **13**: p. 344.
16. Laupland, K.B., *Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(6): p. 492-500.
17. Goto, M. et M.N. Al-Hasan, *Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe*. Clinical Microbiology and Infection, 2013. **19**(6): p. 501-509.
18. Bearman, G.M. et R.P. Wenzel, *Bacteremias: a leading cause of death*. Archives of Medical Research 2005. **36**(6): p. 646-59.

19. Rittirsch, D., M.A. Flierl, P.A. Ward, *Harmful molecular mechanisms in sepsis*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 776-87.
20. Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, et al. , *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. CHEST Journal, 1992. **101**(6): p. 1644-1655.
21. R. Phillip Dellinger, Mitchell M. Levy, Andrew Rhodes, Djillali Annane, Herwig Gerlach, Steven M. Opal, et al. , *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012*. Critical Care Medicine, 2013.
22. Martin, G.S., *Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes*. Expert review of anti-infective therapy, 2012. **10**(6): p. 701-706.
23. Quenot, J.P., A. Pavon, I. Fournel, S.D. Barbar, R. Bruyère, *Septic shock in adult in France: 20 years of epidemiological data*. Réanimation, 2015. **24**(3): p. 303-309.
24. Vincent, J.L., Y. Sakr, C.L. Sprung, V.M. Ranieri, K. Reinhart, H. Gerlach, et al. , *Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study*. Crit Care Med, 2006. **34**(2): p. 344-53.
25. Leibovici, L., *Long-term consequences of severe infections*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(6): p. 510-2.
26. Dalager-Pedersen, M., K. Koch, R.W. Thomsen, H.C. Schonheyder, H. Nielsen, *The effect of community-acquired bacteraemia on return to workforce, risk of sick leave, permanent disability pension and death: a Danish population-based cohort study*. BMJ Open, 2014. **4**(1): p. e004208.
27. Timsit, J.F., J.F. Soubirou, G. Voiriot, S. Chemam, M. Neuville, B. Mourvillier, et al. , *Treatment of bloodstream infections in ICUs*. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 489.
28. Tabah, A., D. Koulenti, K. Laupland, B. Misset, J. Valles, F. Bruzzi de Carvalho, et al. , *Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study*. Intensive Care Med, 2012. **38**(12): p. 1930-45.
29. Ferrer, R., I. Martin-Loeches, G. Phillips, T.M. Osborn, S. Townsend, R.P. Dellinger, et al. , *Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program*. Crit Care Med, 2014. **42**(8): p. 1749-55.
30. Kumar, A., P. Ellis, Y. Arabi, D. Roberts, B. Light, J.E. Parrillo, et al. , *Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock*. Chest, 2009. **136**(5): p. 1237-48.
31. Cockerill, F.R., 3rd, J.G. Hughes, E.A. Vetter, R.A. Mueller, A.L. Weaver, D.M. Ilstrup, et al. , *Analysis of 281,797 consecutive blood cultures performed over an eight-year period: trends in microorganisms isolated and the value of anaerobic culture of blood*. Clin Infect Dis, 1997. **24**(3): p. 403-18.
32. Raisin. Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin) - Surveillance des bactériémies nosocomiales en France - Réseau BN-Raisin - Résultats 2004. Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire, 2008, 36 p. Disponible sur : www.invs.sante.fr. 2008 Consulté le 15/11/2013].
33. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report : Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm: ECDC, 2015. p. 28.
34. de Kraker, M.E.A., V. Jarlier, J.C.M. Monen, O.E. Heuer, N. van de Sande, H. Grundmann, *The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System*. Clinical Microbiology and Infection, 2013. **19**(9): p. 860-868.
35. Laupland, K.B. et D.L. Church, *Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(4): p. 647-64.
36. Arnaud, I., H. Blanchard, V. Jarlier. *Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin - Résultats 2011. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire. 2013; Disponible sur : <http://www.invs.sante.fr/Publications-et->*

- [outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2013/Surveillance-des-bacteries-multiresistantes-dans-les-etablissements-de-sante-en-France](#). 2013.
37. Cosgrove, S., *The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs*. Clinical Infectious Diseases, 2006. **42**: p. S83-S89.
 38. Organization, W.H., *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*, 2014. p. 257.
 39. van Hal, S.J., S.O. Jensen, V.L. Vaska, B.A. Espedido, D.L. Paterson, I.B. Gosbell, *Predictors of Mortality in Staphylococcus aureus Bacteremia*. Clinical Microbiology Reviews, 2012. **25**(2): p. 362-386.
 40. Wertheim, H.F.L., D.C. Melles, M.C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H.A. Verbrugh, *et al.* , *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. The Lancet Infectious Diseases, 2005. **5**(12): p. 751-762.
 41. Thomer, L., O. Schneewind, D. Missiakas, *Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections*. Annu Rev Pathol, 2016.
 42. Le Moing, V., F. Alla, T. Doco-Lecompte, F. Delahaye, L. Piroth, C. Chirouze, *et al.* , *Staphylococcus aureus Bloodstream Infection and Endocarditis - A Prospective Cohort Study*. PLoS ONE, 2015. **10**(5): p. e0127385.
 43. Tong, S.Y.C., J.S. Davis, E. Eichenberger, T.L. Holland, V.G. Fowler, *Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management*. Clinical Microbiology Reviews, 2015. **28**(3): p. 603-661.
 44. Klein, E.Y., L. Sun, D.L. Smith, R. Laxminarayan, *The Changing Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in the United States: A National Observational Study*. American Journal of Epidemiology, 2013. **177**(7): p. 666-674.
 45. Wertheim, H.F., M.C. Vos, A. Ott, A. van Belkum, A. Voss, J.A. Kluytmans, *et al.* , *Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers*. Lancet, 2004. **364**(9435): p. 703-5.
 46. von Eiff, C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, G. Peters, *Nasal Carriage as a Source of Staphylococcus aureus Bacteremia*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(1): p. 11-16.
 47. Marshall, C. *et al.* McBryde, *The role of Staphylococcus aureus carriage in the pathogenesis of bloodstream infection*. BMC Research Notes, 2014. **7**(1): p. 428.
 48. Verhoeven, P.O., J. Gagnaire, E. Botelho-Nevers, F. Grattard, A. Carricajo, F. Lucht, *et al.* , *Detection and clinical relevance of Staphylococcus aureus nasal carriage: an update*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2014. **12**(1): p. 75-89.
 49. Lawes, T., B. Edwards, J.M. López-Lozano, I. Gould, *Trends in Staphylococcus aureus bacteraemia and impacts of infection control practices including universal MRSA admission screening in a hospital in Scotland, 2006-2010: Retrospective cohort study and time-series intervention analysis*. BMJ Open, 2012. **2**(3).
 50. Tacconelli, E., G. De Angelis, C. de Waure, M.A. Cataldo, G.L. Torre, R. Cauda, *Rapid screening tests for methicillin-resistant Staphylococcus aureus at hospital admission: systematic review and meta-analysis*. The Lancet Infectious Diseases, 2009. **9**(9): p. 546-554.
 51. McKinnell, J.A., S.M. Bartsch, B.Y. Lee, S.S. Huang, L.G. Miller, *Cost-benefit analysis from the hospital perspective of universal active screening followed by contact precautions for methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriers*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2015. **36**(1): p. 2-13.
 52. Cosgrove, S.E., G. Sakoulas, E.N. Perencevich, M.J. Schwaber, A.W. Karchmer, Y. Carmeli, *Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia: A meta-analysis*. Clinical Infectious Diseases, 2003. **36**(1): p. 53-59.
 53. Wang, F.-D., Y.-Y. Chen, T.-L. Chen, C.-Y. Liu, *Risk factors and mortality in patients with nosocomial Staphylococcus aureus bacteremia*. American Journal of Infection Control, 2008. **36**(2): p. 118-122.

54. Kim, S.H., W.B. Park, C.S. Lee, C.I. Kang, J.W. Bang, H.B. Kim, *et al.*, *Outcome of inappropriate empirical antibiotic therapy in patients with Staphylococcus aureus bacteraemia: analytical strategy using propensity scores*. Clin Microbiol Infect, 2006. **12**(1): p. 13-21.
55. Yaw, L.K., J.O. Robinson, K.M. Ho, *A comparison of long-term outcomes after meticillin-resistant and meticillin-sensitive Staphylococcus aureus bacteraemia: an observational cohort study*. The Lancet Infectious Diseases, 2014. **14**(10): p. 967-975.
56. Wong, D., T. Wong, M. Romney, V. Leung, *Comparison of outcomes in patients with methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) bacteremia who are treated with β -lactam vs vancomycin empiric therapy: a retrospective cohort study*. BMC Infectious Diseases, 2016. **16**: p. 224.
57. Holland, T.L., C. Arnold, V.G. Fowler, Jr., *Clinical management of Staphylococcus aureus bacteremia: a review*. JAMA, 2014. **312**(13): p. 1330-41.
58. CLSI, *Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline*. CLSI document M47-A. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2007.
59. Reimer, L.G., M.L. Wilson, M.P. Weinstein, *Update on detection of bacteremia and fungemia*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 444-65.
60. Lamy, B., S. Dargere, M.C. Arendrup, J.J. Parienti, P. Tattevin, *How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art*. Frontiers in Microbiology, 2016. **7**.
61. Søgaaard, M., M. Nørgaard, L. Pedersen, H.T. Sørensen, H.C. Schønheyder, *Blood culture status and mortality among patients with suspected community-acquired bacteremia: a population-based cohort study*. BMC Infectious Diseases, 2011. **11**(1): p. 1-9.
62. Kirn, T.J. et M.P. Weinstein, *Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(6): p. 513-20.
63. Patel, R., E.A. Vetter, W.S. Harmsen, C.D. Schleck, H.J. Fadel, F.R. Cockerill, 3rd, *Optimized pathogen detection with 30- compared to 20-milliliter blood culture draws*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(12): p. 4047-51.
64. Vitrat-Hincky, V., P. Francois, J. Labarere, C. Recule, J.P. Stahl, P. Pavese, *Appropriateness of blood culture testing parameters in routine practice. Results from a cross-sectional study*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **30**(4): p. 533-9.
65. Riedel, S. et K.C. Carroll, *Blood cultures: key elements for best practices and future directions*. Journal of Infection and Chemotherapy, 2010. **16**(5): p. 301-316.
66. Lee, A., S. Mirrett, L.B. Reller, M.P. Weinstein, *Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed?* J Clin Microbiol, 2007. **45**(11): p. 3546-8.
67. Pohlman, J.K., B.A. Kirkley, K.A. Easley, B.A. Basille, J.A. Washington, *Controlled clinical evaluation of BACTEC Plus Aerobic/F and BacT/Alert Aerobic FAN bottles for detection of bloodstream infections*. Journal of Clinical Microbiology, 1995. **33**(11): p. 2856-2858.
68. Ruiz-Giardín, J.M., R.M. Martín-Díaz, J. Jaqueti-Aroca, I. Garcia-Arata, J.V. San Martín-López, M. Sáiz-Sánchez Buitrago, *Diagnosis of bacteraemia and growth times*. International Journal of Infectious Diseases, 2015. **41**: p. 6-10.
69. Warhurst, G., S. Maddi, G. Dunn, M. Ghrew, P. Chadwick, P. Alexander, *et al.*, *Diagnostic accuracy of SeptiFast multi-pathogen real-time PCR in the setting of suspected healthcare-associated bloodstream infection*. Intensive Care Med, 2015. **41**(1): p. 86-93.
70. Mirrett, S., K.E. Hanson, L.B. Reller, *Controlled clinical comparison of VersaTREK and BacT/ALERT blood culture systems*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(2): p. 299-302.
71. Hardy, D.J., B.B. Hulbert, P.C. Migneault, *Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures*. Journal of Clinical Microbiology, 1992. **30**(10): p. 2743-2745.
72. Pierrakos, C. et J.-L. Vincent, *Sepsis biomarkers: a review*. Critical Care, 2010. **14**(1): p. 1-18.
73. Faix, J.D., *Biomarkers of sepsis*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2013. **50**(1): p. 23-36.
74. Wacker, C., A. Prkno, F.M. Brunkhorst, P. Schlattmann, *Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2013. **13**(5): p. 426-35.

75. Hall, K.K. et J.A. Lyman, *Updated Review of Blood Culture Contamination*. Clinical Microbiology Reviews, 2006. **19**(4): p. 788-802.
76. Dawson, S., *Blood culture contaminants*. Journal of Hospital Infection, 2014. **87**(1): p. 1-10.
77. Otto, M., *Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(8): p. 555-67.
78. Cockerill, F.R., 3rd, J.W. Wilson, E.A. Vetter, K.M. Goodman, C.A. Torgerson, W.S. Harmsen, et al. , *Optimal testing parameters for blood cultures*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(12): p. 1724-30.
79. Wang, M.-C., W.-H. Lin, J.-J. Yan, H.-Y. Fang, T.-H. Kuo, C.-C. Tseng, et al. , *Early identification of microorganisms in blood culture prior to the detection of a positive signal in the BACTEC FX system using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2015. **48**(4): p. 419-424.
80. Opota, O., A. Croxatto, G. Prod'homme, G. Greub, *Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art*. Clin Microbiol Infect, 2015.
81. Buchan, B.W. et N.A. Ledeboer, *Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory*. Clinical Microbiology Reviews, 2014. **27**(4): p. 783-822.
82. Skvarc, M., D. Stubljär, P. Rogina, A.J. Kaasch, *Non-culture-based methods to diagnose bloodstream infection: Does it work?* Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2013. **3**(2): p. 97-104.
83. Stefani, S., *Diagnostic techniques in bloodstream infections: where are we going?* Int J Antimicrob Agents, 2009. **34** Suppl 4: p. S9-12.
84. Sadava, D., D.M. Hillis, H.C. Heller, M.R. Berenbaum, *The evolution of diversity. Chapitre 26 :Bacteria and Archaea: The Prokariotic Domains*, in *Life : the science of biology*. 2011, Sinauer Associates: Etats-Unis. p. 536-559.
85. Perry, J.D. et A.M. Freydiere, *The application of chromogenic media in clinical microbiology*. J Appl Microbiol, 2007. **103**(6): p. 2046-55.
86. Snyder, J.W., G.K. Munier, C.L. Johnson, *Direct comparison of the BD phoenix system with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae and nonfermentative gram-negative organisms*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(7): p. 2327-33.
87. Brisse, S., S. Stefani, J. Verhoef, A. Van Belkum, P. Vandamme, W. Goessens, *Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the Burkholderia cepacia complex*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(5): p. 1743-8.
88. Carroll, K.C., A.P. Borek, C. Burger, B. Glanz, H. Bhally, S. Henciak, et al. , *Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and enterococci*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(6): p. 2072-7.
89. Pincus, D.H., *Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system.*, in *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, M.J. Miller, Editor. 2006, Parenteral Drug Association: Bethesda, MD
90. Winstanley, T. et P. Courvalin, *Expert systems in clinical microbiology*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(3): p. 515-56.
91. Beuving, J., C.F. van der Donk, C.F. Linssen, P.F. Wolffs, A. Verbon, *Evaluation of direct inoculation of the BD PHOENIX system from positive BACTEC blood cultures for both Gram-positive cocci and Gram-negative rods*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 156.
92. Gherardi, G., S. Angeletti, M. Panitti, A. Pompilio, G. Di Bonaventura, F. Crea, et al. , *Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011. **72**(1): p. 20-31.
93. Jorgensen, J.H. et M.J. Ferraro, *Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(11): p. 1749-55.
94. Jehl, F., *Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2016. V1.0 Février.*, 2016, Société Française de Microbiologie. p. 117.
95. Weist, K., A.-K. Cimbal, C. Lecke, G. Kampf, H. Rüden, R.-P. Vonberg, *Evaluation of six agglutination tests for Staphylococcus aureus identification depending upon local prevalence*

- of *meticillin-resistant S. aureus (MRSA)*. *Journal of Medical Microbiology*, 2006. **55**(3): p. 283-290.
96. Clark, A.E., E.J. Kaleta, A. Arora, D.M. Wolk, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013. **26**(3): p. 547-603.
 97. Croxatto, A., G. Prod'hom, G. Greub, *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. *FEMS Microbiol Rev*, 2012. **36**(2): p. 380-407.
 98. Rodriguez-Sanchez, B., M. Marin, C. Sanchez-Carrillo, E. Cercenado, A. Ruiz, M. Rodriguez-Creixems, et al. , *Improvement of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of difficult-to-identify bacteria and its impact in the workflow of a clinical microbiology laboratory*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014.
 99. Stevenson, L.G., S.K. Drake, P.R. Murray, *Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010. **48**(2): p. 444-447.
 100. Morgenthaler, N.G. et M. Kostrzewa, *Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit*. *Int J Microbiol*, 2015. **2015**: p. 827416.
 101. Ferreira, L., F. Sanchez-Juanes, I. Porras-Guerra, M.I. Garcia-Garcia, J.E. Garcia-Sanchez, J.M. Gonzalez-Buitrago, et al. , *Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Clin Microbiol Infect*, 2011. **17**(4): p. 546-51.
 102. Gray, T.J., L. Thomas, T. Olma, J.R. Iredell, S.C.A. Chen, *Rapid identification of Gram-negative organisms from blood culture bottles using a modified extraction method and MALDI-TOF mass spectrometry*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013. **77**(2): p. 110-112.
 103. Prod'hom, G., A. Bizzini, C. Durussel, J. Bille, G. Greub, *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets*. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(4): p. 1481-3.
 104. Rodriguez-Sanchez, B., C. Sanchez-Carrillo, A. Ruiz, M. Marin, E. Cercenado, M. Rodriguez-Creixems, et al. , *Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Clin Microbiol Infect*, 2014. **20**(7): p. 0421-7.
 105. Clerc, O., G. Prod'hom, C. Vagne, A. Bizzini, T. Calandra, G. Greub, *Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study*. *Clinical Infectious Diseases*, 2013. **56**(8): p. 1101-7.
 106. Idelevich, E.A., I. Schüle, B. Grünastel, J. Wüllenweber, G. Peters, K. Becker, *Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014. **20**(10): p. 1001-1006.
 107. Kohlmann, R., A. Hoffmann, G. Geis, S. Gatermann, *MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2015. **305**(4–5): p. 469-479.
 108. Charretier, Y., O. Dauwalder, C. Franceschi, E. Degout-Charmette, G. Zambardi, T. Cecchini, et al. , *Rapid Bacterial Identification, Resistance, Virulence and Type Profiling using Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 13944.
 109. Hrabak, J., E. Chudackova, R. Walkova, *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis*. *Clin Microbiol Rev*, 2013. **26**(1): p. 103-14.
 110. Harris, D.M. et D.J. Hata, *Rapid identification of bacteria and candida using pna-fish from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2013. **12**: p. 2-2.

111. Makristathis, A., S. Riss, A.M. Hirschl, *A novel FISH test for rapid pathogen identification in positive blood cultures*. Clin Microbiol Infect, 2014.
112. Wojewoda, C.M., L. Sercia, M. Navas, M. Tuohy, D. Wilson, G.S. Hall, *et al.* , *Evaluation of the Verigene Gram-Positive Blood Culture Nucleic Acid Test for Rapid Detection of Bacteria and Resistance Determinants*. Journal of Clinical Microbiology, 2013. **51**(7): p. 2072-2076.
113. Buchan, B.W., S. Allen, C.A. Burnham, E. McElvania TeKippe, T. Davis, M. Levi, *et al.* , *Comparison of the next-generation Xpert MRSA/SA BC assay and the GeneOhm StaphSR assay to routine culture for identification of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus in positive-blood-culture broths*. Journal of Clinical Microbiology, 2015. **53**(3): p. 804-9.
114. Altun, O., M. Almuhayawi, M. Ullberg, V. Ozenci, *Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(12): p. 4130-6.
115. Loonen, A.J., M.P. Bos, B. van Meerbergen, S. Neerken, A. Catsburg, I. Dobbelaer, *et al.* , *Comparison of pathogen DNA isolation methods from large volumes of whole blood to improve molecular diagnosis of bloodstream infections*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72349.
116. Chang, S.S., W.H. Hsieh, T.S. Liu, S.H. Lee, C.H. Wang, H.C. Chou, *et al.* , *Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis - a systemic review and meta-analysis*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62323.
117. Warhurst, G., G. Dunn, P. Chadwick, B. Blackwood, D. McAuley, G.D. Perkins, *et al.* , *Rapid detection of health-care-associated bloodstream infection in critical care using multipathogen real-time polymerase chain reaction technology: a diagnostic accuracy study and systematic review*. Health Technol Assess, 2015. **19**(35): p. 1-142.
118. Opota, O., K. Jaton, G. Greub, *Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood*. Clin Microbiol Infect, 2015. **21**(4): p. 323-31.
119. Dubourg, G. et D. Raoult, *Emerging methodologies for pathogen identification in positive blood culture testing*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2016. **16**(1): p. 97-111.
120. Kothari, A., M. Morgan, D.A. Haake, *Emerging Technologies for Rapid Identification of Bloodstream Pathogens*. Clinical Infectious Diseases, 2014. **59**(2): p. 272-278.
121. Schreiber, J., A. Nierhaus, S.A. Braune, G. de Heer, S. Kluge, *Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients*. Med Klin Intensivmed Notfmed, 2013. **108**(4): p. 311-8.
122. Clerc, O., G. Prod'homme, L. Senn, K. Jaton, G. Zanetti, T. Calandra, *et al.* , *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based rapid diagnosis of Staphylococcus aureus bacteraemia*. Clinical Microbiology and Infection, 2014. **20**(4): p. 355-360.
123. Ecker, D.J., R. Sampath, C. Massire, L.B. Blyn, T.A. Hall, M.W. Eshoo, *et al.* , *Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(7): p. 553-8.
124. Jordana-Lluch, E., M. Gimenez, M.D. Quesada, V. Ausina, E. Martro, *Improving the Diagnosis of Bloodstream Infections: PCR Coupled with Mass Spectrometry*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 501214.
125. Machen, A., T. Drake, Y.F. Wang, *Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87870.
126. Idelevich, E.A., B. Grünastel, G. Peters, K. Becker, *Direct blood culturing on solid medium outperforms an automated continuously monitored broth-based blood culture system in terms of time to identification and susceptibility testing*. New Microbes and New Infections, 2016. **10**: p. 19-24.
127. Perez, K.K., R.J. Olsen, W.L. Musick, P.L. Cernoch, J.R. Davis, L.E. Peterson, *et al.* , *Integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia*. Journal of Infection, 2014. **69**(3): p. 216-225.

128. Banerjee, R., C.B. Teng, S.A. Cunningham, S.M. Ihde, J.M. Steckelberg, J.P. Moriarty, *et al.* , *Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction-Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing*. Clin Infect Dis, 2015. **61**(7): p. 1071-80.
129. Bauer, K.A., K.K. Perez, G.N. Forrest, D.A. Goff, *Review of Rapid Diagnostic Tests Used by Antimicrobial Stewardship Programs*. Clinical Infectious Diseases, 2014. **59**(suppl 3): p. S134-S145.
130. Martinez, R.M., E.R. Bauerle, F.C. Fang, S.M. Butler-Wu, *Evaluation of Three Rapid Diagnostic Methods for Direct Identification of Microorganisms in Positive Blood Cultures*. Journal of Clinical Microbiology, 2014. **52**(7): p. 2521-2529.
131. Lazcka, O., F.J.D. Campo, F.X. Muñoz, *Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(7): p. 1205-1217.
132. Ahmed, A., J.V. Rushworth, N.A. Hirst, P.A. Millner, *Biosensors for whole-cell bacterial detection*. Clinical Microbiology Reviews, 2014. **27**(3): p. 631-46.
133. Wang, Y., Z. Ye, Y. Ying, *New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria*. Sensors (Basel, Switzerland), 2012. **12**(3): p. 3449-3471.
134. Liu, Y., Q. Liu, S. Chen, F. Cheng, H. Wang, W. Peng, *Surface Plasmon Resonance Biosensor Based on Smart Phone Platforms*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 12864.
135. Tokel, O., U.H. Yildiz, F. Inci, N.G. Durmus, O.O. Ekiz, B. Turker, *et al.* , *Portable microfluidic integrated plasmonic platform for pathogen detection*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9152.
136. Sin, M.L.Y., K.E. Mach, P.K. Wong, J.C. Liao, *Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases*. Expert review of molecular diagnostics, 2014. **14**(2): p. 225-244.
137. Yoo, S.M. et S.Y. Lee, *Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms*. Trends in Biotechnology, 2016. **34**(1): p. 7-25.
138. Singh, A., D. Arutyunov, C.M. Szymanski, S. Evoy, *Bacteriophage based probes for pathogen detection*. Analyst, 2012. **137**(15): p. 3405-21.
139. Tawil, N., E. Sacher, R. Mandeville, M. Meunier, *Surface plasmon resonance detection of E. coli and methicillin-resistant S. aureus using bacteriophages*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **37**(1): p. 24-9.
140. Balasubramanian, S., I.B. Sorokulova, V.J. Vodyanoy, A.L. Simonian, *Lytic phage as a specific and selective probe for detection of Staphylococcus aureus--A surface plasmon resonance spectroscopic study*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(6): p. 948-55.
141. Gamella, M., S. Campuzano, C. Parrado, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Microorganisms recognition and quantification by lectin adsorptive affinity impedance*. Talanta, 2009. **78**(4-5): p. 1303-1309.
142. Payne, M.J., S. Campbell, R.A. Patchett, R.G. Kroll, *The use of immobilized lectins in the separation of Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria and Salmonella spp. from pure cultures and foods*. J Appl Bacteriol, 1992. **73**(1): p. 41-52.
143. Bulard, E., A. Bouchet-Spinelli, P. Chaud, A. Roget, R. Calemczuk, S. Fort, *et al.* , *Carbohydrates as New Probes for the Identification of Closely Related Escherichia coli Strains Using Surface Plasmon Resonance Imaging*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(3): p. 1804-1811.
144. Templier, V., A. Roux, Y. Roupioz, T. Livache, *Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016.
145. Torun, O., I. Hakki Boyaci, E. Temur, U. Tamer, *Comparison of sensing strategies in SPR biosensor for rapid and sensitive enumeration of bacteria*. Biosens Bioelectron, 2012. **37**(1): p. 53-60.
146. Gervais, L., M. Gel, B. Allain, M. Tolba, L. Brovko, M. Zourob, *et al.* , *Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007. **125**(2): p. 615-621.
147. Kulagina, N.V., M.E. Lassman, F.S. Ligler, C.R. Taitt, *Antimicrobial Peptides for Detection of Bacteria in Biosensor Assays*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(19): p. 6504-6508.
148. Tajima, N., M. Takai, K. Ishihara, *Significance of antibody orientation unraveled: well-oriented antibodies recorded high binding affinity*. Anal Chem, 2011. **83**(6): p. 1969-76.

149. Trilling, A.K., J. Beekwilder, H. Zuilhof, *Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview*. Analyst, 2013. **138**(6): p. 1619-27.
150. Wiseman, M.E. et C.W. Frank, *Antibody adsorption and orientation on hydrophobic surfaces*. Langmuir, 2012. **28**(3): p. 1765-74.
151. Squires, T.M., R.J. Messinger, S.R. Manalis, *Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors*. Nature Biotechnology, 2008. **26**(4): p. 417-426.
152. Huang, C.J., W. Knoll, A. Sessitsch, J. Dostalek, *SPR bacterial pathogen biosensor: The importance of fluidic conditions and probing depth*. Talanta, 2014. **122**: p. 166-171.
153. Abeyrathne, C.D., D.H. Huynh, T.W. McIntire, T.C. Nguyen, B. Nasr, D. Zantomio, et al. , *Lab on a chip sensor for rapid detection and antibiotic resistance determination of Staphylococcus aureus*. Analyst, 2016.
154. Zelada-Guillen, G.A., J.L. Sebastian-Avila, P. Blondeau, J. Riu, F.X. Rius, *Label-free detection of Staphylococcus aureus in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **31**(1): p. 226-32.
155. Burghardt, E.L., K.S. Flenker, K.C. Clark, J. Miguel, D. Ince, P. Winokur, et al. , *Rapid, Culture-Free Detection of Staphylococcus aureus Bacteremia*. PLoS ONE, 2016. **11**(6): p. e0157234.
156. Bisceglia, E., M. Cubizolles, C.I. Trainito, J. Berthier, C. Pudda, O. Français, et al. , *A generic and label free method based on dielectrophoresis for the continuous separation of microorganism from whole blood samples*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **212**(0): p. 335-343.
157. Cheng, I.F., H.C. Chang, T.Y. Chen, C. Hu, F.I. Yang, *Rapid (<5min) Identification of Pathogen in Human Blood by Electrokinetics Concentration and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. , in Sci. Rep.2013.
158. Liu, T.-Y., K.-T. Tsai, H.-H. Wang, Y. Chen, Y.-H. Chen, Y.-C. Chao, et al. , *Functionalized arrays of Raman-enhancing nanoparticles for capture and culture-free analysis of bacteria in human blood*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 538.
159. Boardman, A.K., J. Campbell, H. Wirz, A. Sharon, A.F. Sauer-Budge, *Rapid Microbial Sample Preparation from Blood Using a Novel Concentration Device*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0116837.
160. Davey, P.G. et C. Marwick, *Appropriate vs. inappropriate antimicrobial therapy*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14 Suppl 3**: p. 15-21.
161. Paul, M., G. Kariv, E. Goldberg, M. Raskin, H. Shaked, R. Hazzan, et al. , *Importance of appropriate empirical antibiotic therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteraemia*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(12): p. 2658-65.
162. Wood, R.W., XLII. *On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum*. Philosophical Magazine Series 6, 1902. **4**(21): p. 396-402.
163. Otto, A., *Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection*. Zeitschrift für Physik, 1968. **216**(4): p. 398-410.
164. Kretschmann, E. et H. Raether, *Notizen: radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light*. Zeitschrift für Naturforschung A, 1968. **23**(12): p. 2135-2136.
165. Homola, J., *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(3): p. 528-39.
166. Tudos, A.J. et R.B.M. Schasfoort, *Chapter 1 Introduction to Surface Plasmon Resonance*, in Handbook of Surface Plasmon Resonance. 2008, The Royal Society of Chemistry. p. 1-14.
167. Kooyman, R.P.H., *Chapter 2 Physics of Surface Plasmon Resonance*, in Handbook of Surface Plasmon Resonance. 2008, The Royal Society of Chemistry. p. 15-34.
168. Schasfoort, R.B.M. et A. McWhirter, *Chapter 3 SPR Instrumentation*, in Handbook of Surface Plasmon Resonance. 2008, The Royal Society of Chemistry. p. 35-80.
169. Kodoyianni, V., *Label-free analysis of biomolecular interactions using SPR imaging*. BioTechniques, 2011. **50**(1): p. 32-40.
170. Caucheteur, C., *Plasmons de surface : principes physiques et applications*. Techniques de l'ingénieur États de la matière, 2014. **base documentaire : TIB109DUO**(ref. article : af3565).

171. Lecaruyer, P. et M. Canva, *Biopuces dynamiques et imagerie en mode de plasmon de surface*. Techniques de l'ingénieur Nanotechnologies et biotechnologies pour la santé, 2008. **base documentaire : TIB608DUO**(ref. article : r6718).
172. Guedon, P., T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan, *et al.*, *Characterization and Optimization of a Real-Time, Parallel, Label-Free, Polypyrrole-Based DNA Sensor by Surface Plasmon Resonance Imaging*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(24): p. 6003-6009.
173. Homola, J., *Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species*. Chem Rev, 2008. **108**(2): p. 462-93.
174. Bouguelia, S., Y. Roupioz, S. Slimani, L. Mondani, M.G. Casabona, C. Durmort, *et al.*, *On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria*. Lab on a Chip, 2013. **13**(20): p. 4024-32.
175. Mondani, L., Y. Roupioz, S. Delannoy, P. Fach, T. Livache, *Simultaneous enrichment and optical detection of low levels of stressed Escherichia coli O157:H7 in food matrices*. Journal of Applied Microbiology 2014. **117**(2): p. 537-46.
176. Byrne, B., E. Stack, N. Gilmartin, R. O'Kennedy, *Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins*. Sensors (Basel), 2009. **9**(6): p. 4407-45.
177. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, in *Chapitre 24 : The Adaptive Immune system - Section : B Cells and Antibodies*. 2002, Garland Science: New York. p. 1363-1422.
178. Fridy, P.C., Y. Li, S. Keegan, M.K. Thompson, I. Nudelman, J.F. Scheid, *et al.*, *A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires*. Nat Meth, 2014. **11**(12): p. 1253-1260.
179. Clackson, T., H.R. Hoogenboom, A.D. Griffiths, G. Winter, *Making antibody fragments using phage display libraries*. Nature, 1991. **352**(6336): p. 624-8.
180. Pande, J., M.M. Szewczyk, A.K. Grover, *Phage display: Concept, innovations, applications and future*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(6): p. 849-858.
181. Petrenko, V.A., *Landscape Phage as a Molecular Recognition Interface for Detection Devices*. Microelectronics J, 2008. **39**(2): p. 202-207.
182. Hammers, C.M. et J.R. Stanley, *Antibody Phage Display: Technique and Applications*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(2): p. e17.
183. Nanduri, V., A.K. Bhunia, S.-I. Tu, G.C. Paoli, J.D. Brewster, *SPR biosensor for the detection of L. monocytogenes using phage-displayed antibody*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **23**(2): p. 248-252.
184. Livache, T., A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, R. Téoule, *Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group*. Nucleic Acids Research, 1994. **22**(15): p. 2915-2921.
185. Levy, Y., T. Livache, A. Roget, *Procede de fixation d'une proteine sur un polymere a base de pyrrole et son utilisation pour la fabrication d'un capteur*, 2004, Google Patents.
186. Grosjean, L., B. Cherif, E. Mercey, A. Roget, Y. Levy, P.N. Marche, *et al.*, *A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process*. Anal Biochem, 2005. **347**(2): p. 193-200.
187. Dudak, F.C. et I.H. Boyaci, *Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon resonance (SPR) biosensors*. Biotechnol J, 2009. **4**(7): p. 1003-11.
188. Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme*. Cell, 1983. **35**(3): p. 849-857.
189. Schlosser, K. et Y. Li, *Biologically Inspired Synthetic Enzymes Made from DNA*. Chemistry & Biology, 2009. **16**(3): p. 311-322.
190. Silverman, S.K., *Deoxyribozymes: Selection Design and Serendipity in the Development of DNA Catalysts*. Accounts of Chemical Research, 2009. **42**(10): p. 1521-1531.
191. Ellington, A.D. et J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
192. Tuerk, C. et L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science, 1990. **249**(4968): p. 505-10.

193. Torres-Chavolla, E. et E.C. Alocilja, *Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens*. Biosens Bioelectron, 2009. **24**(11): p. 3175-82.
194. Davydova, A., M. Vorobjeva, D. Pyshnyi, S. Altman, V. Vlassov, A. Venyaminova, *Aptamers against pathogenic microorganisms*. Critical Reviews in Microbiology, 2015: p. 1-19.
195. Chang, Y.C., C.Y. Yang, R.L. Sun, Y.F. Cheng, W.C. Kao, P.C. Yang, *Rapid single cell detection of Staphylococcus aureus by aptamer-conjugated gold nanoparticles*. Scientific Reports, 2013. **3**: p. 1863.
196. Gamper, H.B., M.W. Reed, T. Cox, J.S. Virosco, A.D. Adams, A.A. Gall, et al. , *Facile preparation of nuclease resistant 3' modified oligodeoxynucleotides*. Nucleic Acids Research, 1993. **21**(1): p. 145-150.
197. Shaw, J.P., K. Kent, J. Bird, J. Fishback, B. Froehler, *Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(4): p. 747-50.
198. Bunka, D.H.J. et P.G. Stockley, *Aptamers come of age – at last*. Nature Reviews Microbiology, 2006. **4**(8): p. 588-596.
199. Hong, K.L. et L.J. Sooter, *Single-Stranded DNA Aptamers against Pathogens and Toxins: Identification and Biosensing Applications*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 31.
200. Cao, X., S. Li, L. Chen, H. Ding, H. Xu, Y. Huang, et al. , *Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Research, 2009. **37**(14): p. 4621-4628.
201. Wu, S., N. Duan, Z. Shi, C. Fang, Z. Wang, *Simultaneous Aptasensor for Multiplex Pathogenic Bacteria Detection Based on Multicolor Upconversion Nanoparticles Labels*. Anal Chem, 2014. **86**: p. 3100-3107.
202. Duan, N., S. Wu, C. Zhu, X. Ma, Z. Wang, Y. Yu, et al. , *Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus*. Analytica Chimica Acta, 2012. **723**(0): p. 1-6.
203. Wang, J., X. Wu, C. Wang, N. Shao, P. Dong, R. Xiao, et al. , *Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Detection of Staphylococcus aureus Based on Aptamer Recognition*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015. **7**(37): p. 20919-20929.
204. dos Santos, S.R., C. Rodrigues Correa, A.L. Branco de Barros, R. Serakides, S.O. Fernandes, V.N. Cardoso, et al. , *Identification of Staphylococcus aureus infection by aptamers directly radiolabeled with technetium - 99m*. Nucl Med Biol, 2015. **42**(3): p. 292-8.
205. Zuo, P., X. Li, D.C. Dominguez, B.C. Ye, *A PDMS/paper/glass hybrid microfluidic biochip integrated with aptamer-functionalized graphene oxide nano-biosensors for one-step multiplexed pathogen detection*. Lab Chip, 2013. **13**(19): p. 3921-8.
206. Abbaspour, A., F. Norouz-Sarvestani, A. Noori, N. Soltani, *Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of Staphylococcus aureus*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **68**(0): p. 149-155.
207. Kurt, H., M. Yüce, B. Hussain, H. Budak, *Dual-excitation upconverting nanoparticle and quantum dot aptasensor for multiplexed food pathogen detection*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **81**: p. 280-286.
208. Moon, J., G. Kim, S.B. Park, J. Lim, C. Mo, *Comparison of Whole-Cell SELEX Methods for the Identification of Staphylococcus aureus-Specific DNA Aptamers*. Sensors (Basel), 2015. **15**(4): p. 8884-97.
209. Stoltenburg, R., T. Schubert, B. Strehlitz, *In vitro Selection and Interaction Studies of a DNA Aptamer Targeting Protein A*. PLoS ONE, 2015. **10**(7): p. e0134403.
210. Turek, D., D. Van Simaeys, J. Johnson, I. Ocsoy, W. Tan, *Molecular recognition of live cells using DNA aptamers*. World J Transl Med, 2013. **2**(3): p. 67-74.
211. Labib, M., A.S. Zamay, O.S. Kolovskaya, I.T. Reshetneva, G.S. Zamay, R.J. Kibbee, et al. , *Aptamer-Based Viability Impedimetric Sensor for Bacteria*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(21): p. 8966-8969.

212. Kolovskaya, O.S., A.G. Savitskaya, T.N. Zmay, I.T. Reshetneva, G.S. Zmay, E.N. Erkaev, *et al.* , *Development of Bacteriostatic DNA Aptamers for Salmonella*. Journal of Medicinal Chemistry, 2013. **56**(4): p. 1564-1572.
213. Daniel, C., *Aptamer biochip : Exploration of an alternative detection technique*, 2013, Université de Grenoble. p. 161.
214. Melaine, F., *Biopuce à aptamères : application à la détection de petites molécules par imagerie de résonance plasmonique de surface*, 2014, Université de Grenoble. p. 169.
215. Wu, W.H., M. Li, Y. Wang, H.X. Ouyang, L. Wang, C.X. Li, *et al.* , *Aptasensors for rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium*. Nanoscale Res Lett, 2012. **7**(1): p. 658.
216. Izano, E.A., M.A. Amarante, W.B. Kher, J.B. Kaplan, *Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(2): p. 470-6.
217. Cheng, D., M. Yu, F. Fu, W. Han, G. Li, J. Xie, *et al.* , *A Dual Recognition Strategy for Specific and Sensitive Detection of Bacteria Using Aptamer-Coated Magnetic Beads and Antibiotic-Capped Gold Nanoclusters*. Analytical Chemistry, 2015.
218. Yoo, S.M., D.K. Kim, S.Y. Lee, *Aptamer-functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species*. Talanta, 2015. **132**: p. 112-7.
219. Ağar, Ç., P.G. de Groot, M. Mörgelin, S.D.D.C. Monk, G. van Os, J.H.M. Levels, *et al.* , *β 2-Glycoprotein I: a novel component of innate immunity*. Blood, 2011. **117**(25): p. 6939-6947.
220. De Groot, P.G. et J.C.M. Meijers, *β 2-Glycoprotein I: evolution, structure and function*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011. **9**(7): p. 1275-1284.
221. Gries, A., R. Prassl, S. Fukuoka, M. Rössle, Y. Kaonis, L. Heinbockel, *et al.* , *Biophysical analysis of the interaction of the serum protein human β 2GPI with bacterial lipopolysaccharide*. FEBS Open Bio, 2014. **4**: p. 432-440.
222. Nilsson, M., S. Wasyluk, M. Mörgelin, A.I. Olin, J.C.M. Meijers, R.H.W.M. Derksen, *et al.* , *The antibacterial activity of peptides derived from human beta-2 glycoprotein I is inhibited by protein H and M1 protein from Streptococcus pyogenes*. Molecular Microbiology, 2008. **67**(3): p. 482-492.
223. Zhang, L., K. Jacobsson, K. Ström, M. Lindberg, L. Frykberg, *Staphylococcus aureus expresses a cell surface protein that binds both IgG and β 2-glycoprotein I*. Microbiology, 1999. **145**(1): p. 177-183.
224. Stefan, I., G. Dubois, S. Tigrett, E. Lucarz, F. Veas, *Apolipoprotein H, an acute phase protein, a performing tool for ultra-sensitive detection and isolation of microorganisms from different origins*, in *Acute phase proteins as early non-specific biomarkers of human and veterinary diseases*, F. Veas, Editor. 2011, Intech: Rijeka. p. 21-42.
225. Stefan, I., *Procédé de détection et/ou de quantification et/ou d'identification in vitro de bactéries dans un matériau biologique*, 2009, Google Patents.
226. Barrick, J.E., D.S. Yu, S.H. Yoon, H. Jeong, T.K. Oh, D. Schneider, *et al.* , *Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with Escherichia coli*. Nature, 2009. **461**(7268): p. 1243-1247.
227. Kouser, L., S.P. Madhukaran, A. Shastri, A. Saraon, J. Ferluga, M. Al-Mozaini, *et al.* , *Emerging and novel functions of complement protein C1q*. Frontiers in Immunology, 2015. **6**.
228. Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang, J.D. Lambris, *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 785-797.
229. Clas, F., G. Schmidt, M. Loos, *The Role of the Classical Pathway for the Bactericidal Effect of Normal Sera Against Gram-Negative Bacteria*, in *Bacteria and Complement*, M. Loos, Editor. 1985, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 19-72.
230. Albertí, S., G. Marqués, S. Hernández-Allés, X. Rubires, J.M. Tomás, F. Vivanco, *et al.* , *Interaction between complement subcomponent C1q and the Klebsiella pneumoniae porin OmpK36*. Infection and Immunity, 1996. **64**(11): p. 4719-4725.

231. Mintz, C.S., P.I. Arnold, W. Johnson, D.R. Schultz, *Antibody-independent binding of complement component C1q by Legionella pneumophila*. Infect Immun, 1995. **63**(12): p. 4939-43.
232. Butko, P., A. Nicholson-Weller, M.R. Wessels, *Role of Complement Component C1q in the IgG-Independent Opsonophagocytosis of Group B Streptococcus*. The Journal of Immunology, 1999. **163**(5): p. 2761-2768.
233. Agarwal, V., J. Ahl, K. Riesbeck, A.M. Blom, *An Alternative Role of C1q in Bacterial Infections: Facilitating Streptococcus pneumoniae Adherence and Invasion of Host Cells*. The Journal of Immunology, 2013. **191**(8): p. 4235-4245.
234. Bally, I., S. Ancelet, C. Moriscot, F. Gonnet, A. Mantovani, R. Daniel, et al. , *Expression of recombinant human complement C1q allows identification of the C1r/C1s-binding sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8650-5.
235. Garlatti, V., A. Chouquet, T. Lunardi, R. Vives, H. Paidassi, H. Lortat-Jacob, et al. , *Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparan sulfate through neighboring sites of its recognition domain*. J Immunol, 2010. **185**(2): p. 808-12.
236. Vassal-Stermann, E., M. Lacroix, E. Gout, E. Laffly, C.M. Pedersen, L. Martin, et al. , *Human L-ficolin recognizes phosphocholine moieties of pneumococcal teichoic acid*. J Immunol, 2014. **193**(11): p. 5699-708.
237. Foster, T.J., J.A. Geoghegan, V.K. Ganesh, M. Hook, *Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(1): p. 49-62.
238. Kang, M., Y.-P. Ko, X. Liang, C.L. Ross, Q. Liu, B.E. Murray, et al. , *Collagen-binding Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule (MSCRAMM) of Gram-positive Bacteria Inhibit Complement Activation via the Classical Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(28): p. 20520-20531.
239. Laarman, A., F. Milder, J. van Strijp, S. Rooijakkers, *Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications*. Journal of Molecular Medicine, 2010. **88**(2): p. 115-120.
240. Subramanian A. , J. Irudayaraj, R. Thomas, *Mono and dithiol surfaces on surface plasmon resonance biosensors for detection of Staphylococcus aureus*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005. **114**(1): p. 192-198.
241. Verdier, I., G. Durand, M. Bes, K.L. Taylor, G. Lina, F. Vandenesch, et al. , *Identification of the Capsular Polysaccharides in Staphylococcus aureus Clinical Isolates by PCR and Agglutination Tests*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(3): p. 725-729.
242. von Eiff, C., K.L. Taylor, A. Mellmann, A.I. Fattom, A.W. Friedrich, G. Peters, et al. , *Distribution of capsular and surface polysaccharide serotypes of Staphylococcus aureus*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007. **58**(3): p. 297-302.
243. O'Riordan, K. et J.C. Lee, *Staphylococcus aureus Capsular Polysaccharides*. Clinical Microbiology Reviews, 2004. **17**(1): p. 218-234.
244. Gordon, R.J. et F.D. Lowy, *Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2008. **46**(Suppl 5): p. S350-S359.
245. DeDent, A., T. Bae, D.M. Missiakas, O. Schneewind, *Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of Staphylococcus aureus*. EMBO J, 2008. **27**(20): p. 2656-68.
246. DeDent, A.C., M. McAdow, O. Schneewind, *Distribution of protein A on the surface of Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2007. **189**(12): p. 4473-84.
247. Becker, S., M.B. Frankel, O. Schneewind, D. Missiakas, *Release of protein A from the cell wall of Staphylococcus aureus*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(4): p. 1574-1579.
248. O'Halloran, D.P., K. Wynne, J.A. Geoghegan, *Protein A is released into the Staphylococcus aureus culture supernatant with an unprocessed sorting signal*. Infect Immun, 2015. **83**(4): p. 1598-609.

249. Votintseva, A.A., R. Fung, R.R. Miller, K. Knox, H. Godwin, D.H. Wyllie, *et al.*, *Prevalence of Staphylococcus aureus protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire*. BMC Microbiology, 2014. **14**(1): p. 1-11.
250. Atkins, K.L., J.D. Burman, E.S. Chamberlain, J.E. Cooper, B. Poutrel, S. Bagby, *et al.*, *S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation*. Mol Immunol, 2008. **45**(6): p. 1600-11.
251. Smith, E.J., L. Visai, S.W. Kerrigan, P. Speziale, T.J. Foster, *The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 2011. **79**(9): p. 3801-9.
252. Silverman, G.J. et C.S. Goodyear, *Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 465-475.
253. Pauli, N.T., H.K. Kim, F. Falugi, M. Huang, J. Dulac, C. Henry Dunand, *et al.*, *Staphylococcus aureus infection induces protein A-mediated immune evasion in humans*. J Exp Med, 2014. **211**(12): p. 2331-9.
254. Falugi, F., H.K. Kim, D.M. Missiakas, O. Schneewind, *Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by Staphylococcus aureus*. MBio, 2013. **4**(5): p. e00575-13.
255. Kim, H.K., F. Falugi, L. Thomer, D.M. Missiakas, O. Schneewind, *Protein A suppresses immune responses during Staphylococcus aureus bloodstream infection in guinea pigs*. MBio, 2015. **6**(1).
256. Thammavongsa, V., H.K. Kim, D. Missiakas, O. Schneewind, *Staphylococcal manipulation of host immune responses*. Nat Rev Micro, 2015. **13**(9): p. 529-543.
257. McAdow, M., D.M. Missiakas, O. Schneewind, *Staphylococcus aureus secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections*. J Innate Immun, 2012. **4**(2): p. 141-8.
258. Cheng, A.G., M. McAdow, H.K. Kim, T. Bae, D.M. Missiakas, O. Schneewind, *Contribution of Coagulases towards Staphylococcus aureus Disease and Protective Immunity*. PLoS Pathogens, 2010. **6**(8): p. e1001036.
259. Thomer, L., C. Emolo, V. Thammavongsa, H.K. Kim, M.E. McAdow, W. Yu, *et al.*, *Antibodies against a secreted product of Staphylococcus aureus trigger phagocytic killing*. The Journal of Experimental Medicine, 2016. **213**(3): p. 293-301.
260. Yamada, K., J. Wanchun, T. Ohkura, A. Murai, R. Hayakawa, K. Kinoshita, *et al.*, *Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using a specific anti-PBP2a chicken IgY antibody*. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2013. **66**(2): p. 103-8.
261. Ko, Y.P., A. Kuipers, C.M. Freitag, I. Jongerius, E. Medina, W.J. van Rooijen, *et al.*, *Phagocytosis escape by a Staphylococcus aureus protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface*. PLoS Pathog, 2013. **9**(12): p. e1003816.
262. Ko, Y.P., M. Kang, V.K. Ganesh, D. Ravirajan, B. Li, M. Hook, *Coagulase and Efb of Staphylococcus aureus Have a Common Fibrinogen Binding Motif*. MBio, 2016. **7**(1).
263. Cheng, A.G., A.C. DeDent, O. Schneewind, D. Missiakas, *A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation*. Trends in Microbiology, 2011. **19**(5): p. 225-232.
264. Jevons, M.P., *"Celbenin" - resistant Staphylococci*. BMJ, 1961. **1**(5219): p. 124-125.
265. Reynolds, P.E. et D.F.J. Brown, *Penicillin-binding proteins of β -lactam-resistant strains of Staphylococcus aureus: Effect of growth conditions*. FEBS Letters, 1985. **192**(1): p. 28-32.
266. Hartman, B. et A. Tomasz, *Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1981. **19**(5): p. 726-735.
267. Deresinski, S., *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: An Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey*. Clinical Infectious Diseases, 2005. **40**(4): p. 562-573.
268. Kleven, R., M.A. Morrison, J. Nadle, *et al.*, *Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States*. JAMA, 2007. **298**(15): p. 1763-1771.
269. Dumitrescu, O., O. Dauwalder, S. Boisset, M.E. Reverdy, A. Tristan, F. Vandenesch, *[Staphylococcus aureus resistance to antibiotics: key points in 2010]*. Med Sci (Paris), 2010. **26**(11): p. 943-9.
270. Zapun, A., C. Contreras-Martel, T. Vernet, *Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 361-85.

271. Berger-Bächli, B. et S. Rohrer, *Factors influencing methicillin resistance in staphylococci*. Archives of Microbiology, 2002. **178**(3): p. 165-171.
272. Otto, M., *Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection*. BioEssays, 2013. **35**(1): p. 4-11.
273. Fishovitz, J., J.A. Hermoso, M. Chang, S. Mobashery, *Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. IUBMB Life, 2014. **66**(8): p. 572-7.
274. Sauvage, E., F. Kerff, M. Terrak, J.A. Ayala, P. Charlier, *The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis*. FEMS Microbiology Reviews, 2008. **32**(2): p. 234-258.
275. Macheboeuf, P., C. Contreras-Martel, V. Job, O. Dideberg, A. Dessen, *Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes*. FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(5): p. 673-91.
276. Zapun, A., T. Vernet, M.G. Pinho, *The different shapes of cocci*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 345-60.
277. Akerström, B. et L. Björck, *A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(22): p. 10240-10247.
278. Lindmark, R., K. Thorén-Tolling, J. Sjöquist, *Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera*. Journal of Immunological Methods, 1983. **62**(1): p. 1-13.
279. Ljungberg, U.K., B. Jansson, U. Niss, R. Nilsson, B.E. Sandberg, B. Nilsson, *The interaction between different domains of staphylococcal protein A and human polyclonal IgG, IgA, IgM and F(ab')₂: separation of affinity from specificity*. Mol Immunol, 1993. **30**(14): p. 1279-85.
280. Huse, K., H.-J. Böhme, G.H. Scholz, *Purification of antibodies by affinity chromatography*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2002. **51**(3): p. 217-231.
281. Boschetti, E. et A. Jungbauer, *Chapter 15: Separation of antibodies by liquid chromatography*, in *Separation Science and Technology : Handbook of bioseparations*, A. Satinder, Editor. 2000, Academic Press. p. 535-632.
282. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, P. Stoodley, *Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases*. Nat Rev Micro, 2004. **2**(2): p. 95-108.
283. Otto, M., *Staphylococcal Biofilms*. Current topics in microbiology and immunology, 2008. **322**: p. 207-228.
284. Abadian, P.N. et E.D. Goluch, *Surface plasmon resonance imaging (SPRi) for multiplexed evaluation of bacterial adhesion onto surface coatings*. Analytical Methods, 2015. **7**(1): p. 115-122.
285. Barnes, L.M., M.F. Lo, M.R. Adams, A.H. Chamberlain, *Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(10): p. 4543-8.
286. Zhang, Y.Q., S.X. Ren, H.L. Li, Y.X. Wang, G. Fu, J. Yang, et al. , *Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming Staphylococcus epidermidis strain (ATCC 12228)*. Mol Microbiol, 2003. **49**(6): p. 1577-93.
287. Palavecino, E.L., *Rapid methods for detection of MRSA in clinical specimens*. Methods Mol Biol, 2014. **1085**: p. 71-83.
288. Song, H.G., S.S. Yoon, H.J. Kim, G.Y. Jee, M.H. Shin, Y.R. Moon, *Detection method for methicillin resistant Staphylococcus aureus*, 2013, Google Patents.
289. Huang, R.P. et Y. Zhang, *Monoclonal antibody against pbp2a derived from mrsa with dual binding activities*, 2013, Google Patents.
290. Tawil, N., F. Mouawad, S. Levesque, E. Sacher, R. Mandeville, M. Meunier, *The differential detection of methicillin-resistant, methicillin-susceptible and borderline oxacillin-resistant Staphylococcus aureus by surface plasmon resonance*. Biosens Bioelectron, 2013. **49**: p. 334-40.
291. Bandara, A.B., Z. Zuo, S. Ramachandran, A. Ritter, J.R. Heflin, T.J. Inzana, *Detection of methicillin-resistant staphylococci by biosensor assay consisting of nanoscale films on optical fiber long-period gratings*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **70**(0): p. 433-440.

292. Huang, R.P. et Y. Zhang, *Monoclonal antibodies against PBP2A derived from MRSA and methods of use*, 2014, Google Patents.
293. Nawattanapaiboon, K., W. Kiatpathomchai, P. Santanirand, A. Vongsakulyanon, R. Amarit, A. Somboonkaew, et al. , *SPR-DNA array for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in combination with loop-mediated isothermal amplification*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **74**: p. 335-340.
294. Dias da Silva, W. et D.V. Tambourgi, *IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2010. **135**(3-4): p. 173-180.
295. Schade, R., E.G. Calzado, R. Sarmiento, P.A. Chacana, J. Porankiewicz-Asplund, R.H. Terzolo, *Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine*. ATLA, 2005. **33**: p. 1-26.
296. Reddy, P.K., A. Shekar, J.J. Kingston, M.H. Sripathy, H. Batra, *Evaluation of IgY capture ELISA for sensitive detection of Alpha hemolysin of Staphylococcus aureus without staphylococcal protein A interference*. Journal of Immunological Methods, 2013. **391**(1-2): p. 31-38.
297. Tate, J. et G. Ward, *Interferences in immunoassay*. Clin Biochem Rev, 2004. **25**(2): p. 105-20.
298. Vikinge, T.P., A. Askendal, B. Liedberg, T. Lindahl, P. Tengvall, *Immobilized chicken antibodies improve the detection of serum antigens with surface plasmon resonance (SPR)*. Biosensors and Bioelectronics, 1998. **13**(12): p. 1257-1262.
299. Dryga, S.A., R. Nadeau, D. Standridge, *Affinity medium using fixed whole cells*, 2014, Google Patents.
300. Gauci, P.J. et M.R. Alderton, *Pepsin digestion of antibodies to produce functional antigen-binding fragments (Fab) : a scientific fantasy ?* Technical report (Defence Science and Technology Organisation (Australia)) ; DSTO-TR-1189., ed. M.R. Alderton. 2001, Melbourne, Vic: DSTO Aeronautical and Maritime Research Laboratory.
301. Molloy, P., L. Brydon, A.J. Porter, W.J. Harris, *Separation and concentration of bacteria with immobilized antibody fragments*. Journal of Applied Bacteriology, 1995. **78**(4): p. 359-365.
302. Ryan, S., A.J. Kell, H. van Faassen, L.-L. Tay, B. Simard, R. MacKenzie, et al. , *Single-Domain Antibody-Nanoparticles: Promising Architectures for Increased Staphylococcus aureus Detection Specificity and Sensitivity*. Bioconjugate Chemistry, 2009. **20**(10): p. 1966-1974.
303. Krogh, D., *Transport and Exchange 1 : Blood and Breath*, in *Biology : A guide to the natural world*, Pearson, Editor. 2014. p. 577.
304. Spaargaren, J., C.P.A. van Boven, G.P. Voorn, *Effectiveness of Resins in Neutralizing Antibiotic Activities in Bactec Plus Aerobic/F Culture Medium*. Journal of Clinical Microbiology, 1998. **36**(12): p. 3731-3733.
305. Flayhart, D., A.P. Borek, T. Wakefield, J. Dick, K.C. Carroll, *Comparison of BACTEC PLUS Blood Culture Media to BacT/Alert FA Blood Culture Media for Detection of Bacterial Pathogens in Samples Containing Therapeutic Levels of Antibiotics*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(3): p. 816-821.
306. Lee, D.H., S.C. Kim, I.G. Bae, E.H. Koh, S. Kim, *Clinical evaluation of BacT/Alert FA plus and FN plus bottles compared with standard bottles*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(12): p. 4150-5.
307. Kirn, T.J., S. Mirrett, L.B. Reller, M.P. Weinstein, *Controlled Clinical Comparison of BacT/Alert FA Plus and FN Plus Blood Culture Media with BacT/Alert FA and FN Blood Culture Media*. Journal of Clinical Microbiology, 2014. **52**(3): p. 839-843.
308. Pien, B.C., S. Mirrett, B.R. Crews, L.B. Reller, C.W. Woods, *Controlled Clinical Comparison of BacT/ALERT Standard Aerobic and Standard Anaerobic Blood Culture Bottles Inoculated Directly or after Transport in Sodium Polyanethol Sulfonate Tubes*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(4): p. 1357-1359.
309. Walker, F.J. et C.T. Esmon, *The molecular mechanisms of heparin action. III. The anticoagulant properties of sodium polyanetholesulfonate*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1978. **83**(4): p. 1339-1346.

310. Kindness, G., F.B. Williamson, W.F. Long, *Effect of polyanetholesulphonic acid and xylan sulphate on antithrombin III activity*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1979. **88**(3): p. 1062-1068.
311. Traub, W.H. et B.L. Lowrance, *Anticomplementary, anticoagulatory, and serum-protein precipitating activity of sodium polyanetholsulfonate*. Appl Microbiol, 1970. **20**(3): p. 465-8.
312. Von Haebler, T. et A.A. Miles, *The action of sodium polyanethol sulphonate ("liquoid") on blood cultures*. The Journal of Pathology and Bacteriology, 1938. **46**(2): p. 245-252.
313. Eng, J., *Effect of sodium polyanethol sulfonate in blood cultures*. Journal of Clinical Microbiology, 1975. **1**(2): p. 119-123.
314. Belding, M.E. et S.J. Klebanoff, *Effect of sodium polyanetholsulfonate on antimicrobial systems in blood*. Appl Microbiol, 1972. **24**(5): p. 691-8.
315. Lowrance, B.L. et W.H. Traub, *Inactivation of the Bactericidal Activity of Human Serum by Liquoid (Sodium Polyanetholsulfonate)*. Applied Microbiology, 1969. **17**(6): p. 839-842.
316. Rintala, L. et H.M. Pollock, *Effects of two blood culture anticoagulants on growth of Neisseria meningitidis*. Journal of Clinical Microbiology, 1978. **7**(4): p. 332-336.
317. Krogstad, D.J., P.R. Murray, G.G. Granich, A.C. Niles, J.H. Ladenson, J.E. Davis, *Sodium polyanethol sulfonate inactivation of aminoglycosides*. Antimicrob Agents Chemother, 1981. **20**(2): p. 272-4.
318. Wecke, J., E. Kwa, M. Lahav, I. Ginsburg, P. Giesbrecht, *Suppression of penicillin-induced bacteriolysis of staphylococci by some anticoagulants*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1987. **20**(1): p. 47-55.
319. Berends, E.T.M., A. Kuipers, M.M. Ravesloot, R.T. Urbanus, S.H.M. Rooijakkers, *Bacteria under stress by complement and coagulation*. FEMS Microbiology Reviews, 2014. **38**(6): p. 1146-1171.
320. Lambris, J.D., D. Ricklin, B.V. Geisbrecht, *Complement evasion by human pathogens*. Nat Rev Micro, 2008. **6**(2): p. 132-142.
321. Rooijakkers, S.H.M. et J.A.G. van Strijp, *Bacterial complement evasion*. Molecular Immunology, 2007. **44**(1-3): p. 23-32.
322. Palarasah, Y., M.O. Skjoedt, L. Vitved, T.E. Andersen, K. Skjoedt, C. Koch, *Sodium polyanethole sulfonate as an inhibitor of activation of complement function in blood culture systems*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(3): p. 908-14.
323. Weiler, J.M. et R.J. Lindhardt, *Comparison of the activity of polyanions and polycations on the classical and alternative pathways of complement*. Immunopharmacology, 1989. **17**(2): p. 65-72.
324. Hughes-Jones, N.C. et B. Gardner, *The reaction between the complement subcomponent C1q, IgG complexes and polyionic molecules*. Immunology, 1978. **34**(3): p. 459-63.
325. Malleuvre, F., V. Templier, R. Mathey, L. Leroy, Y. Roupioz, T.F. Fernandes, et al., *Real-time toxicity testing of silver nanoparticles to Salmonella Enteritidis using surface plasmon resonance imaging: A proof of concept*. NanoImpact, 2016. **1**: p. 55-59.
326. Huson, M.A., S.M. Stolp, T. van der Poll, M.P. Grobusch, *Community-acquired bacterial bloodstream infections in HIV-infected patients: a systematic review*. Clin Infect Dis, 2014. **58**(1): p. 79-92.
327. Reddy, E.A., A.V. Shaw, J.A. Crump, *Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet infectious diseases, 2010. **10**(6): p. 417-432.
328. O'Shaughnessy, C.M., A.F. Cunningham, C.A. MacLennan, *The Stability of Complement-Mediated Bactericidal Activity in Human Serum against Salmonella*. PLoS ONE, 2012. **7**(11): p. e49147.
329. Anderson, J.M., A. Rodriguez, D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. Seminars in immunology, 2008. **20**(2): p. 86-100.
330. Vroman, L., A.L. Adams, G.C. Fischer, P.C. Munoz, *Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces*. Blood, 1980. **55**(1): p. 156-9.
331. Vroman, L., *When Blood Is Touched*. Materials, 2009. **2**(4).

332. Perkins, M., R. Theiler, S. Lunte, M. Jeschke, *Determination of the origin of charge heterogeneity in a murine monoclonal antibody*. Pharm Res, 2000. **17**(9): p. 1110-7.
333. Merino, N., A. Toledo-Arana, M. Vergara-Irigaray, J. Valle, C. Solano, E. Calvo, *et al.* , *Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2009. **191**(3): p. 832-43.
334. Wheat, L.J., R.B. Kohler, Z. Tabbarah, A. White, *Circulating staphylococcal antigen in humans and immune rabbits with endocarditis due to Staphylococcus aureus: inhibition of detection by preexisting antibodies*. J Infect Dis, 1979. **140**(1): p. 54-61.
335. Colque-Navarro, P., G. Jacobsson, R. Andersson, J.I. Flock, R. Mollby, *Levels of Antibody against 11 Staphylococcus aureus Antigens in a Healthy Population*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(7): p. 1117-23.
336. Dryla, A., S. Prustomersky, D. Gelbmann, M. Hanner, E. Bettinger, B. Kocsis, *et al.* , *Comparison of antibody repertoires against Staphylococcus aureus in healthy individuals and in acutely infected patients*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(3): p. 387-98.
337. Kloppt, P., M. Selle, C. Kohler, S. Stentzel, S. Fuchs, V. Liebscher, *et al.* , *Microarray based identification of human antibodies against Staphylococcus aureus antigens*. Proteomics Clin Appl, 2015.
338. Colque-Navarro, P., *Serum antibodies against Staphylococcus aureus antigens in healthy individuals and patients with invasive infections*, in *Departement of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC)2010*, Karolinska Institutet, Stockholm: Karolinska Institutet, Stockholm. p. 64.
339. den Reijer, P.M., N. Lemmens-den Toom, S. Kant, S.V. Snijders, H. Boelens, M. Tavakol, *et al.* , *Characterization of the Humoral Immune Response during Staphylococcus aureus Bacteremia and Global Gene Expression by Staphylococcus aureus in Human Blood*. PLoS ONE, 2013. **8**(1): p. e53391.
340. Holtfreter, S., J. Kolata, B.M. Bröker, *Towards the immune proteome of Staphylococcus aureus – The anti-S. aureus antibody response*. International Journal of Medical Microbiology, 2010. **300**(2–3): p. 176-192.
341. Kim, H.K., H.-Y. Kim, O. Schneewind, D. Missiakas, *Identifying protective antigens of Staphylococcus aureus, a pathogen that suppresses host immune responses*. The FASEB Journal, 2011. **25**(10): p. 3605-3612.
342. Pier, G.B., *Will there ever be a universal Staphylococcus aureus vaccine?* Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2013. **9**(9): p. 1865-1876.
343. Hansenová Maňásková, S., F.J. Bikker, E.C.I. Veerman, A. van Belkum, W.J.B. van Wamel, *Rapid detection and semi-quantification of IgG-accessible Staphylococcus aureus surface-associated antigens using a multiplex competitive Luminex assay*. Journal of Immunological Methods, 2013. **397**(1–2): p. 18-27.
344. Nordenfelt, P., S. Waldemarson, A. Linder, M. Mörgelin, C. Karlsson, J. Malmström, *et al.* , *Antibody orientation at bacterial surfaces is related to invasive infection*. Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**(13): p. 2367-2381.
345. Wecke, J., M. Lahav, I. Ginsburg, E. Kwa, P. Giesbrecht, *Inhibition of wall autolysis of staphylococci by sodium polyanethole sulfonate "liquoid"*. Archives of Microbiology, 1986. **144**(2): p. 110-115.
346. Yabu, K. *et al.* S. Kaneda, *Salt-induced cell lysis of Staphylococcus aureus*. Current Microbiology, 1995. **30**(5): p. 299-303.
347. Houston, P., S.E. Rowe, C. Pozzi, E.M. Waters, J.P. O'Gara, *Essential Role for the Major Autolysin in the Fibronectin-Binding Protein-Mediated Staphylococcus aureus Biofilm Phenotype*. Infection and Immunity, 2011. **79**(3): p. 1153-1165.
348. Brown, S., J.P. Santa Maria, S. Walker, *Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria*. Annual review of microbiology, 2013. **67**: p. 10.1146/annurev-micro-092412-155620.
349. Neuhaus, F.C. *et al.* J. Baddiley, *A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of d-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003. **67**(4): p. 686-723.

-
350. Weidenmaier, C. et A. Peschel, *Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions*. Nat Rev Micro, 2008. **6**(4): p. 276-287.
351. Ginsburg, I., P. Christensen, I. Eliasson, C. Schalén, *Cationic polyelectrolytes, liquid and leukocyte extract modulate the binding of IgG to group A streptococcal Fc-Receptors*. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology, 1982. **90B**(1-6): p. 161-168.
352. Tabbarah, Z.A., R.B. Kohler, L.W. Joseph, J.A. Griep, A. White, *Inhibitory Effect of Heat-Labile Serum Factors on Detection of Staphylococcal, Pseudomonas, and Hepatitis B Surface Antigens by Solid-Phase Radioimmunoassay*. Journal of Infectious Diseases, 1979. **140**(5): p. 822-825.
353. Tabbarah, Z.A., L.J. Wheat, R.B. Kohler, A. White, *Thermodissociation of staphylococcal immune complexes and detection of staphylococcal antigen in serum from patients with Staphylococcus aureus bacteremia*. J Clin Microbiol, 1980. **11**(6): p. 703-709.
354. Varetas, K., C. Mukerjee, P.C. Taylor, *Anticoagulant Carryover May Influence Clot Formation in Direct Tube Coagulase Tests from Blood Cultures*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(9): p. 4613-4615.
355. Vanassche, T., J. Verhaegen, W.E. Peetermans, M.F. Hoylaerts, P. Verhamme, *Dabigatran Inhibits Staphylococcus aureus Coagulase Activity*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. **48**(11): p. 4248-4250.
356. Panizzi, P., M. Nahrendorf, J.-L. Figueiredo, J. Panizzi, B. Marinelli, Y. Iwamoto, et al. , *In vivo detection of Staphylococcus aureus endocarditis by targeting pathogen-specific prothrombin activation*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1142-1146.
357. Ruane, P.J., M.A. Morgan, D.M. Citron, M.E. Mulligan, *Failure of rapid agglutination methods to detect oxacillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 1986. **24**(3): p. 490-492.
358. Brown, D.F., D.I. Edwards, P.M. Hawkey, D. Morrison, G.L. Ridgway, K.J. Towner, et al. , *Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(6): p. 1000-18.
359. Boutonnier, A., F. Nato, A. Bouvet, L. Lebrun, A. Audurier, J.C. Mazie, et al. , *Direct testing of blood culture for detection of the serotype 5 and 8 capsular polysaccharides of Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 1989. **27**(5): p. 989-993.
360. Rabe, M., D. Verdes, S. Seeger, *Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces*. Advances in Colloid and Interface Science, 2011. **162**(1-2): p. 87-106.
361. Joshi, R., H. Janagama, H.P. Dwivedi, T.M.A. Senthil Kumar, L.-A. Jaykus, J. Schefers, et al. , *Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars*. Molecular and Cellular Probes, 2009. **23**(1): p. 20-28.
-

Résumé

La présence de bactéries dans le sang, un milieu normalement stérile, peut avoir des conséquences graves voire fatales pour l'organisme atteint. Afin de diagnostiquer au plus tôt cette infection, appelée bactériémie, et ainsi administrer le traitement adéquat, il est nécessaire d'identifier les microorganismes isolés à partir du sang. Mais, la nature complexe de ce fluide biologique, associée à la faible charge bactérienne, parfois inférieure à 1 UFC par millilitre de sang ont des conséquences sur les méthodes pouvant être utilisées pour l'identification des bactéries. La plupart d'entre elles ont donc recours à une première étape, l'hémoculture, au cours de laquelle les microorganismes présents dans le prélèvement sanguin de volume important (20-30 mL) vont se multiplier. Leur croissance est facilitée par la dilution du sang dans des milieux de culture dédiés à cette étape particulière. C'est seulement ensuite que l'identification peut débiter. Elle nécessite encore entre 2 et 48 heures et parfois plus, selon les moyens à disposition et les microorganismes impliqués. Réduire considérablement le temps nécessaire à l'identification aurait pourtant des retombées bénéfiques à l'échelle du patient mais aussi plus globalement en réduisant les coûts associés à cette infection et en limitant la pression de sélection exercée par l'emploi d'antibiotiques à large spectre.

Au cours de ce travail, l'évaluation d'une stratégie basée sur l'identification des bactéries lors de leur multiplication dans le milieu d'hémoculture est donc proposée. Elle repose sur l'observation en temps réel et sans marquage par Résonance Plasmonique de Surface par imagerie (SPRi) des interactions entre les bactéries et des ligands déposés à la surface d'un capteur. Dans un premier temps, des ligands alternatifs aux anticorps parmi lesquels figurent les aptamères, des protéines de l'immunité innée sont testés. Suite à cette étude, les anticorps ont été retenus pour poursuivre ce travail. Leur emploi n'est cependant pas dénué de difficultés lorsqu'il s'agit de détecter spécifiquement *Staphylococcus aureus*, choisi comme l'un des modèles expérimentaux. En effet, la présence de protéine A chez cette bactérie est à l'origine d'interférences sur les immunoglobulines. Différentes stratégies pour s'affranchir de ces effets ont été évaluées, comme le clivage enzymatique des anticorps ou l'emploi d'anticorps de poule pour lesquels la protéine A n'a pas d'affinité. Ces essais aboutissent à des résultats encourageants en milieu de culture simple. L'ajout de sérum humain au milieu a soulevé de nouveaux problèmes pour la détection de cette bactérie. Les résultats montrent qu'en interagissant avec des constituants de l'échantillon sanguin, dont les anticorps, *S. aureus* devient indétectable par une biopuce à anticorps. Une discussion des moyens possibles pour lever cette inhibition est ensuite proposée. Des expériences de détection d'une autre bactérie, *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis pour laquelle nous disposons d'un anticorps hautement affin et spécifique ont alors été entreprises afin de conclure sur l'employabilité du dispositif dans des conditions proches d'une hémoculture. Des interférences affectant différenciellement les anticorps selon leur point isoélectrique ont ainsi été mises en évidence et l'implication de l'anticoagulant (polyanéthole sulfonate de sodium, SPS) présent dans les milieux d'hémoculture a été démontrée. La résolution partielle de ce problème a finalement permis la détection de 1 UFC.mL⁻¹ de sang dans 32 mL au total démontrant ainsi la possibilité de détecter spécifiquement une bactérie dans des conditions proches d'une hémoculture.

Mots clés : imagerie par Résonance Plasmonique de Surface (SPRi) ; ligands ; bactériémie ; identification rapide ; sang ; *S. aureus* et *S. Enteritidis*.

Abstract

The presence of bacteria in the blood, a normally sterile environment, can cause dramatic consequences for an organism. In order to diagnose this infection, called bacteremia, the identification of the microorganism present in blood must be performed. Furthermore, proper diagnosis enables the administration of a suitable antibiotic therapy. Blood complexity as well as the low bacterial load, usually lower than 1 CFU.mL⁻¹, make the diagnosis of this infection quite challenging. Indeed, most identification methods begin only after the blood culture turns positive due to their insufficient sensitivity. For this they require incubation of a large blood sample volume (20 – 30 mL) in specific culture media that allows bacterial growth above their detection limit. Therefore, it increases considerably the time of diagnosis, which usually takes between 2 and 48 hours and sometimes even more time after blood culture positivity depending on the method and the microorganism present in blood. A reduction of the time required for identification would have a positive impact for both the patient and the healthcare systems by reducing selective pressure on resistant bacteria and hospitalization costs by giving proper treatment faster.

In this work, the evaluation of a new strategy based on the identification of bacteria during their multiplication in the blood culture is presented. This method is based on Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) which enables real time and label-free measurements of interactions occurring between bacteria and specific probes. Alternative ligands like aptamers and innate immune proteins have been tested. Following this study antibodies have been chosen as the major specific probes in this work. Nonetheless, the presence of the staphylococcal protein A leads to false-positive results in all immunoglobulin G (IgG). Enzymatic cleavage to remove the constant fragment of antibody where protein A interacts and the use of chicken antibodies (IgY) for which protein A has no affinity have been evaluated. Both methods allow to get rid of protein A interactions in pure culture media. But the presence of human serum in the media results in the total loss of signal. Our results show that interactions between blood components and staphylococcal proteins exposed at the bacterial surface, including the interactions between protein A and circulating antibodies, are responsible for this phenomenon. Solutions to alleviate this inhibition are discussed and tested. Detection experiments of another bacterial model, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in blood culture media are presented. The crucial role played by the anticoagulant Sodium Polyanethole Sulfonate in non-specific interactions on antibodies is demonstrated. These interactions leading to a total loss of specificity for some antibodies are influenced by the isoelectric point (pI) of the probes which interact with this anionic compound and then attract blood components. After the partial resolution of this issue, we show the feasibility of detecting less than one bacteria per blood milliliter in a total volume of 32 milliliters, conditions close to real blood culture.

Keys words : Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) ; probes ; rapid identification ; blood ; *S. aureus* and *S. Enteritidis* ; low bacterial load.