



HAL
open science

Imagerie SPR optimisée en résolution pour l'étude et la détection de bactéries

Marine Boulade

► **To cite this version:**

Marine Boulade. Imagerie SPR optimisée en résolution pour l'étude et la détection de bactéries. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes; Université de Sherbrooke (Québec, Canada), 2019. Français. NNT : 2019GREAS004 . tel-02406099

HAL Id: tel-02406099

<https://theses.hal.science/tel-02406099v1>

Submitted on 12 Dec 2019

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**

**préparée dans le cadre d'une cotutelle entre la
Communauté Université Grenoble Alpes et
l'Université de Sherbrooke**

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie
pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : le 6 janvier 2005 – 25 mai 2016

Présentée par

Marine Boulade

Thèse dirigée par **Thierry LIVACHE** et **Paul CHARRETTE**
codirigée par **Loïc LEROY** et **Michaël CANVA**

préparée au sein des **Laboratoires SyMMES (UMR 5819)**
et **LN2 (UMI 3463)**

dans l'**École Doctorale d'Ingénierie pour la Santé, la Cognition et
l'Environnement**
et au **département de Génie Electrique**

Imagerie SPR optimisée en résolution pour l'étude et la détection de bactéries

**Thèse soutenue publiquement le 18 avril 2019,
devant le jury composé de :**

Franz BRUCKERT

Professeur à Grenoble INP, Président du jury

Jan DUBOWSKI

Professeur à l'Université de Sherbrooke, Rapporteur

Marie FRENEA ROBIN

Maitre de conférences à Université Lyon 1, Examinatrice

Thérèse LEBLOIS

Professeure à l'Université de Franche Comté, Rapporteure



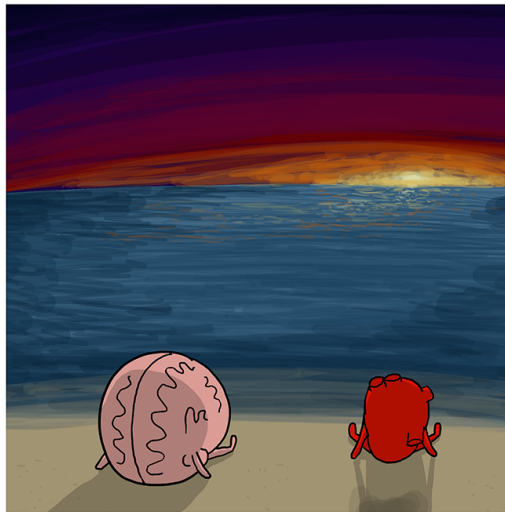
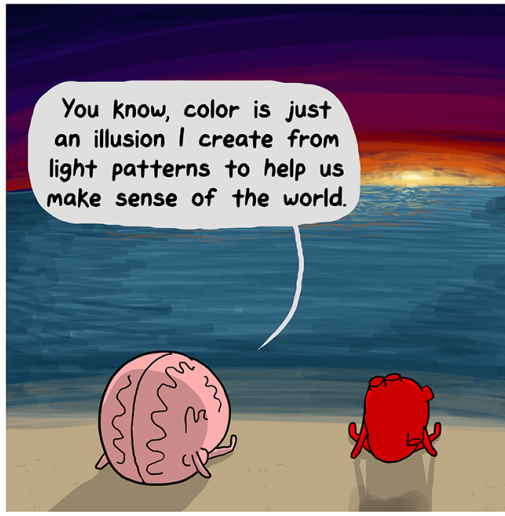
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
Département de génie électrique et de génie informatique

IMAGERIE SPR OPTIMISÉE EN RÉSOLUTION POUR L'ÉTUDE ET LA DÉTECTION DE BACTÉRIES

Thèse de doctorat
Spécialité : génie électrique

Marine Boulade

jury : Franz BRUCKERT
Paul CHARETTE
Jan DUBOWSKI
Marie FRENEA ROBIN
Thérèse LEBLOIS
Thierry LIVACHE



theAwkwardYeti.com

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX	IX
NOTATIONS.....	X
GLOSSAIRE.....	XII
ANTICORPS UTILISES.....	XIII
INTRODUCTION.....	1
1 ETAT DE L'ART ET CONTEXTE	3
1.1 Les bactéries	3
1.1.1 Contexte sanitaire : pourquoi étudier et détecter des bactéries ?	3
1.1.2 La bactérie comme objet d'étude.....	5
1.1.3 Cas particuliers : <i>E.coli</i> ATCC 11775 et <i>Listeria</i>	9
1.2 Méthodes de détection.....	12
1.2.1 Méthode de référence.....	12
1.2.2 Critères d'évaluation des méthodes de détection (et d'identification).....	14
1.2.3 Les biocapteurs.....	18
1.3 Méthodes d'étude du comportement en surface.....	21
1.3.1 Méthodes d'étude en point final.....	22
1.3.2 Méthodes d'études cinétiques	23
2 MISE EN PLACE DE LA SPRI OPTIMISEE EN RESOLUTION POUR L'UTILISATION EN MICROBIOLOGIE	27
2.1 État de l'art de la SPRI en microbiologie.....	27
2.1.1 Qu'est-ce qu'un biocapteur SPR et comment différencier les détecteurs SPR ?	27
2.1.2 Utilisation de la SPR(I) en microbiologie.....	38
2.2 Présentation du montage optique de SPRI à prisme OR couplé à un microscope de type Nomarski	47
2.2.1 Spécificités optiques du montage utilisé.....	47
2.2.2 Présentation du montage optique final	51
2.3 Élaboration d'une cuve compatible avec la croissance bactérienne	55
2.3.1 Prérequis pour la conception de la cuve.....	55
2.3.2 Présentation et performances de la cuve	57
2.4 Microbiologie et chimie.....	59
2.4.1 Choix des anticorps et préparation de la biopuce.....	59
2.4.2 Souches, milieu, protocoles	62

2.5	Traitement de données	63
2.5.1	Reconstruction d'images à partir du balayage du plan image	63
2.5.2	Analyse des images.....	66
3	ANALYSE STATIQUE DES EVENEMENTS BACTERIENS EN SPRI A PRISME OPTIMISE EN RESOLUTION	69
3.1	Présentation des expériences réalisées.....	69
3.2	Comparaison qualitative des images prises selon les deux modalités et évaluation de la qualité de l'image SPRI HR.....	71
3.2.1	Résolution et taille de bactéries	72
3.2.2	Répartition qualitative des bactéries sur un plot	74
3.3	Évaluation des temps de doublement et qualité de la cuve	76
3.3.1	Hypothèses	76
3.3.2	Critères d'évaluation des modèles.....	81
3.3.3	Efficacité de la croissance bactérienne dans la cuve	82
3.4	Détection précoce.....	86
3.5	Relation entre concentration en solution et densité surfacique.....	90
3.5.1	Évaluation de la concentration en solution	90
3.5.2	Comparaison concentration en solution vs densité surfacique.....	91
3.6	Conclusion	92
4	LA SPRI RESOLUE SPATIALEMENT COMME METHODE D'ETUDE DU COMPORTEMENT BACTERIEN	95
4.1	Méthode d'étude : stratégie et instrumentation.....	95
4.1.1	Types d'expériences effectuées	95
4.1.2	Instrumentation	98
4.2	Traitement des données	101
4.2.1	Suivi de trajectoires.....	101
4.2.2	Analyse des données.....	103
4.2.3	Présentation des résultats	106
4.3	Résultats et discussion sur les expériences de suivi de trajectoire d'E. coli ATCC 11775.....	113
4.3.1	Résultats sur les points d'intensité.....	113
4.3.2	Résultats sur les trajectoires.....	119
4.4	Retour sur les expériences avec Listeria	123
4.4.1	Comment obtenir des points d'intensité sur les zones non spécifiques ?	123
4.4.2	Résultats	124
4.5	Résultats sur les peptides anti microbiens (PAM)	127

4.5.1	Les peptides antimicrobiens et la SPRI classique	127
4.5.2	Résultats en SPRI SE.....	130
4.6	Conclusion	135
5	TRAVAUX PROSPECTIFS ET PERSPECTIVES	137
5.1	Travaux prospectifs : étudier l'interaction entre bactéries et surfaces structurées	137
5.1.1	Intérêt de l'étude de surfaces structurées.....	137
5.1.2	Types de structures envisagées	140
5.1.3	Fabrication des structures.....	141
5.2	Perspectives pour améliorer le dispositif en tant que méthode d'étude de l'interaction entre bactéries et surfaces.....	145
5.4	Perspectives pour passer d'un dispositif de laboratoire à l'expérimentation en conditions réelles	147
5.4.1	Se rapprocher du cas réel : travail en milieu complexe et en grand volume 147	
5.4.2	Augmenter le taux de couverture spécifique de la surface	148
5.4.3	Pour aller vers des dispositifs commerciaux.....	148
5.4.4	Association de la SPRI HR avec d'autres techniques pour améliorer le dispositif de détection	150
5.5	Bilan des avancées et des perspectives	151
	CONCLUSION GENERALE	153
	ANNEXES	I
	BIBLIOGRAPHIE.....	III
	LABORATOIRES IMPLIQUES.....	XXXI
	REMERCIEMENTS	XXXII
	RESUME	XXXIII
	ABSTRACT	XXXIII

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Organisation de la classification classique du vivant et positionnement des différents groupes de pathogènes.....	6
Figure 1.2	Critères de caractérisation des colonies bactériennes	6
Figure 1.3	Image en microscopie optique en coloration Gram des deux souches d'intérêt pour de projet	7
Figure 1.4	Schéma de la morphologie de la bactérie <i>E. coli</i>	9
Figure 1.5	Schéma de la morphologie de la bactérie <i>Listeria monocytogenes</i>	10
Figure 1.6	Étapes dans les méthodes standards de tests alimentaires.....	13
Figure 1.7	Cinétique de la croissance bactérienne dans un milieu pur (sans autres bactéries que l'espèce étudiée) non renouvelé	16
Figure 1.8	Principe de fonctionnement d'un biocapteur.....	19
Figure 2.1	Principe de la résonance des plasmons de surface et positionnement de la théorie	28
Figure 2.2	Dépendance des paramètres d'intérêt en fonction de la longueur d'onde pour une interface or/eau :	29
Figure 2.3	Différentes techniques de couplage permettant d'obtenir une résonance de plasmons de surface	31
Figure 2.4	Différents types d'imager SPR à milieu d'indice élevé	33
Figure 2.5	Comparaison des trois types d'imagerie SPR	35
Figure 2.6	Principe de l'interrogation spectrale (a), de l'interrogation angulaire (b) et de l'interrogation en réflectivité (c)	37
Figure 2.7	Principe de fonctionnement d'un système SPR à prisme.....	39
Figure 2.8	Principe de fonctionnement de la détection en SPRI à prisme.....	44
Figure 2.9	Observations d'évènements bactériens uniques par SPRI HR à prisme à $\lambda = 632$ nm avec différents objectifs.....	46
Figure 2.10	Comparaison entre la SPRI à prisme OC et la SPRI à prisme OR pour imager une bactérie	48
Figure 2.11	Comparaisons entre une profondeur de pénétration de 80 nm, une profondeur de pénétration de 150 nm, et une bactérie de 1 μm	49
Figure 2.12	Principe de la microscopie de Nomarski.....	50
Figure 2.13	Schéma de la partie SPRI à prisme OR du montage du CEA Grenoble	51
Figure 2.14	Schéma de la partie microscopie de Nomarski du montage du CEA Grenoble	53
Figure 2.15	Schéma du montage de SPRI HR à prisme de Grenoble	54
Figure 2.16	Photographie du montage optique.....	54
Figure 2.17	Pièces du support existant avec lesquelles doit s'agencer la cuve	56
Figure 2.18	Développement d'une cuve biocompatible chauffante	57
Figure 2.19	Stabilisation de la température dans la cuve	58
Figure 2.20	Fonctionnalisation de la surface d'or par électropolymérisation	60

Figure 2.21	Différentes étapes de reconstruction des images résolues à partir des images séquentielles brutes	64
Figure 2.22	Comparaison entre deux images brutes extrémales prises en scannant le plan image de l'objectif en SPRI HR à prisme et une image reconstruite à partir d'un balayage de 15 images	65
Figure 2.23	Image brute (a.) VS image différentielle (b.) en SPRI HR à prisme	65
Figure 2.24	Dynamiques comparées d'une image reconstruite brute et d'une image différentielle	66
Figure 2.25	Détection d'évènements sur les images reconstituées différentielles de SPRI HR.	67
Figure 3.1	Comparaison de la détection en microscopie de Nomarski et en imagerie SPRI HR à prisme (images différentielles)	71
Figure 3.2	Trois orientations possibles pour l'évaluation de la résolution.....	72
Figure 3.3	Différences de profondeur de champs entre SPRI HR et microscopie de Nomarski	73
Figure 3.4	Inhomogénéités de surface observées sur un même plot d'anticorps LiM16 sur différents types d'image SPRI HR, pour une injection initiale à 10^2UFC.mL^{-1}	74
Figure 3.5	Inhomogénéité de répartition des bactéries sur un plot d'anticorps LiM16 vues en images différentielles :.....	76
Figure 3.6	Situation modélisée : étude de l'évolution du nombre de bactéries dans un volume d'épaisseur D partant de la surface de l'interface	77
Figure 3.7	Différents facteurs possibles responsables de l'augmentation du nombre de bactéries proche de la surface.....	77
Figure 3.8	Définition de Sbact comme la surface d'encombrement induit par l'accroche d'une bactérie	80
Figure 3.9	Comparaisons des résidus obtenus pour les trois modélisations de croissance des données de comptage de bactéries en microscopie de Nomarski.....	82
Figure 3.10	Modélisation de l'évolution du nombre de bactéries observées en microscopie Nomarski	84
Figure 3.11	Comparaisons des résidus obtenus pour les trois modélisations de croissance sur les données de comptage de bactéries en SPRI HR.....	85
Figure 3.12	Détection de deux souches de <i>Listeria</i> par SPRI HR à prisme :	87
Figure 3.13	Évaluation de la concentration en solution	91
Figure 3.14	Densité surfacique de bactéries sur le plot d'anticorps LiM16 en fonction de la concentration évaluée en solution.....	92
Figure 4.1	Fonctionnalisation des biopuces SPRI pour l'observation des trajectoires bactériennes	97
Figure 4.2	Caractérisation des trajectoires d' <i>E. coli</i> en surface grâce aux travaux de Lauga <i>et al.</i>	99
Figure 4.3	Schéma du montage de SPRI de Sherbrooke.....	100
Figure 4.4	De la détection d'évènement à la définition de trajectoire grâce à Trackmate	101
Figure 4.5	Distance maximale que la bactérie est autorisée à parcourir entre deux images .	102
Figure 4.6	Schéma de la procédure de création des trajectoires pour le <i>gap closing</i>	103
Figure 4.7	Définition du paramètre RC maximisant le contraste.....	103

Figure 4.8 Hétérogénéité de la taille des évènements bactériens en fonction de la position sur l'image	105
Figure 4.9 Représentation paramétrique des trajectoires en fonction du rayon de courbure .	107
Figure 4.10 Carte topologique du rayon de courbure d' <i>E. coli</i> en fonction des différentes zones de l'image	108
Figure 4.11 Exemple concret de maximisation de la variance sur un cas très simple.....	109
Figure 4.12 Utilité de l'ACP sur un cas simple.....	110
Figure 4.13 Variance portée par les différentes composantes principales pour les analyses des données :	111
Figure 4.14 Représentation en composante principale des résultats de trajectoires sur <i>E. coli</i>	112
Figure 4.15 Images SPR brutes commentées de deux expériences types de SPRI SE pour l'étude d' <i>E. coli</i>	113
Figure 4.16 Histogrammes des paramètres d'intérêt Rayon (a et b) et Intensité moyennes (c et d) selon la zone fonctionnalisée	114
Figure 4.17 Topologie selon le rayon maximisant le contraste –.....	115
Figure 4.18 Topologie selon l'intensité moyenne du point d'intensité.....	116
Figure 4.19 Analyse en composante principale des données sur les points d'intensité pour une expérience avec <i>E. coli</i>	118
Figure 4.20 Histogramme des vitesses moyennes obtenues pour les deux expériences pour différentes zones fonctionnalisées	120
Figure 4.21 Topologie selon la vitesse moyenne des trajectoires	121
Figure 4.22 Représentation paramétrique des trajectoires en fonction du temps d'arrêt	122
Figure 4.23 Analyse en composante principale des trajectoires.....	122
Figure 4.24 Répartition des trajectoires en fonction du déplacement total et du temps d'arrêt	123
Figure 4.25 Comparaison des aspects d'évènements uniques	124
Figure 4.26 Étude de l'accroche spécifique de <i>Listeria monocytogenes</i> sur des plots spécifiques d'anticorps	126
Figure 4.27 Séquences des peptides anti microbiens fonctionnalisés utilisés	128
Figure 4.28 Cinétique en SPRI commerciale d'une injection de <i>E. coli</i> ATCC 11775 à 97+/-8 UFC.mL ⁻¹ sur plots de peptides antimicrobiens.....	129
Figure 4.29 Images brutes prises en différentes SPRI	130
Figure 4.30 Cinétique d'évolution de l'intensité sur le fond de plot – le temps initial du graphique correspond à quelques secondes après l'injection.....	132
Figure 4.31 Trajectoires paramétriques d' <i>E. coli</i> ATCC 11775 en fonction de la vitesse moyenne sur différents plots de peptides après une injection à 10 ² UFC.mL ⁻¹	134
Figure 5.1 Déplétion et surpopulation localisées à la limite d'un plot observées dans des expériences variées :	138
Figure 5.2 Surpopulation locale en périphérie interne des plots d'anticorps spécifiques due à la diffusion 2D en surface.....	139
Figure 5.3 Structurations de surfaces recherchées	141
Figure 5.4 Principe du procédé de photolithographie	142

Figure 5.5	Image prise au microscope 50X de la lame d'or structurée.....	143
Figure 5.6	Principe de la déprotection laser	143
Figure 5.7	Fonctionnalisation structurée d'anticorps anti <i>E. coli</i> par déprotection laser	144
Figure 5.8	Déprotection laser de PEG 2000, adsorption d'anticorps spécifique et adhésion structurée d' <i>E. coli</i>	145
Figure 5.9	Compromis sur la détection d'évènement : détection d'hétérogénéité	149

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Impact économique et en termes de population des toxi-infections alimentaires collectives	4
Tableau 1.2	Caractéristiques générales de l'espèce <i>E. coli</i>	10
Tableau 1.3	Caractéristiques générales de l'espèce <i>Listeria monocytogenes</i>	11
Tableau 2.1	Performances comparées des différentes imageries SPR d'intérêt	35
Tableau 2.2	Performances comparées des différents types d'interrogation.....	38
Tableau 2.3	Avantages et inconvénients des trois techniques de fonctionnalisation de surfaces utilisées	62
Tableau 3.1	Récapitulatif des différentes expériences effectuées en détection de <i>Listeria</i>	69
Tableau 3.2	Récapitulatif de différents temps de doublement mesurés en microscopie de Nomarski pour les différentes modélisations.....	83
Tableau 3.3	Récapitulatif de différents temps de doublement mesurés en imagerie SPR OR pour les différentes modélisations	86
Tableau 3.4	Délais de détection comparés pour différentes souches de <i>Listeria</i> pour différentes concentrations initiales selon les deux techniques de SPRI	88
Tableau 4.1	Définition des différents paramètres d'intérêt pour l'analyse des points d'intensité observés en SPRI SE.....	104
Tableau 4.2	Définition des différents paramètres d'intérêt pour l'analyse de trajectoires bactériennes observées en SPRI SE	106
Tableau 5.1	Bilan des perspectives en fonction des avancées principales obtenues dans le projet	151

NOTATIONS

Lorsque les acronymes anglais sont plus connus que leurs équivalents français, nous avons choisi d'utiliser l'acronyme anglais. Dans ce cas, la signification en anglais de l'acronyme est fournie en italique pour expliquer la signification de celui-ci.

Abréviation	Signification
Ac	Anticorps
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	Microscopie à force atomique – <i>Atomic Force Microscopy</i>
Ag	Antigène
ATCC	Centre américain de ressources biologiques - <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate
CCM	Culture-Capture-Mesure
CMOS	Semiconducteur d'oxyde de métal complémentaire - <i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>
CP	Composante Principale
DEL	Diode ElectroLuminescente
DIC	(Microscopie) de contraste interférentiel différentiel – <i>Differential Interference Contrast (microscopy)</i>
FAO	Organisation des Nation Unies pour l'alimentation et l'agriculture - <i>Food and Agriculture Organization</i>
HR	Haute Résolution
InVS	Institut de veille sanitaire (organisme français)
ISO	Organisation internationale pour la standardisation - <i>International Organization for Standardization</i>
LRSP	Plasmon de surface longue distance - <i>Long Range Surface Plasmon</i>
MEM	Microsystèmes électromécaniques – <i>MicroElectroMechanical systems</i>
MP	MegaPixels
OC	Optimisé en Champ
OMS	Organisation mondiale pour la Santé

OR	Optimisé en Résolution
PAM	Peptide AntiMicrobien
PBS	solution tampon phosphate – <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne – <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	PolyEster
PEG	Polyéthylène glycol
PID	Proportionnel Intégral Dérivateur
QCM	microbalance à quartz – <i>Quartz Crystal Microbalance</i>
RMS	moyenne quadratique – <i>Root Mean Square</i>
SAW	Onde acoustique de Surface – <i>Surface Acoustic Wave</i>
SE	Sur-Echantillonné
SEF	Microscopie de fluorescence amplifiée en surface - <i>Surface Enhanced Fluorescence</i>
SPR	Résonance des plasmons de surface – <i>Surface plasmon Resonance</i>
SPRI	Imagerie par résonance des plasmons de surface - <i>Surface plasmon Resonance Imaging</i>
TE	Transverse Électrique
TM	Transverse Magnétique
UFC	Unité bactérienne Formant une Colonie

L'utilisation de la notation « M » pour mol.L⁻¹ a été utilisée dans tout ce manuscrit.

GLOSSAIRE

Dans ce manuscrit, certains termes peuvent prêter à confusion. Par soucis de clarté, voici une liste des termes importants avec leur définition tels qu'ils sont utilisés dans ce manuscrit, afin de lever toute ambiguïté dans la suite. En cas de doute, le lecteur pourra donc consulter ce résumé. Les termes seront dans tous les cas explicités plus en détails dans le déroulement du manuscrit.

Imagerie SPR classique

Technique d'imagerie SPR quelconque n'utilisant pas un prisme optimisé en résolution.

Imagerie SPR à prisme OC

Technique d'imagerie SPR commerciale utilisant un prisme optimisé pour obtenir une résolution homogène sur l'image, mais par conséquent limité en résolution. Fourni par l'entreprise Horiba Jobin Yvon [1]. Pour plus de détails, se référer à la partie 2.1.1.c.

Imagerie SPR à prisme OR / Imagerie SPR HR

Technique développée par L. Laplatine au laboratoire SyMMES du CEA Grenoble [2] reposant sur :

- l'utilisation d'un prisme optimisé pour fournir une bonne résolution,
- l'utilisation d'un objectif de grossissement supérieur à 10 pour former l'image sur la caméra,
- la reconstruction du plan image par balayage avec la caméra et traitement d'image.

Pour plus de détail, se référer à la partie 2.1.1 c pour une explication théorique plus développée, ou à la partie 2.2 pour une présentation technique du montage.

Imagerie SPRI SE

Technique d'imagerie SPR à prisme utilisant un objectif de grossissement supérieur ou égal à 10, permettant ainsi une limitation de la résolution par les aberrations optiques et non par l'échantillonnage en pixel de l'image. « SE » se réfère à sur-échantillonnage. Les prismes utilisés dans cette technique peuvent varier. Cette technique est utilisée et expliquée dans le chapitre 4 (4.1.2).

Plot

Zone sur la surface de la biopuce qui est chimiquement fonctionnalisée par un type de sonde. Si la biopuce a été fonctionnalisée sur différentes zones par différents anticorps, ou même par plusieurs fois le même anticorps, il y a donc plusieurs plots sur la biopuce. A ne pas confondre avec « un point d'intensité » qui est le signal de variation d'intensité produit par l'accroche d'une bactérie individuelle en surface.

Point d'intensité

Signal de variation d'intensité induit par l'accroche ou/et l'approche d'une bactérie individuelle en surface du biocapteur.

Bactéries motiles

En général, l'adjectif « motile » est utilisé pour désigner les bactéries effectuant un mouvement actif grâce à leur flagelle. La motilité est dans ce sens utilisé en opposition à la mobilité, qui est un terme plus général et qui inclue également la diffusion brownienne passive.

ANTICORPS UTILISES

Ce tableau résume les différents anticorps utilisés avec la notation utilisée tout au long du manuscrit.

Abréviation	Description	Origine
LiM14	anticorps spécifique de <i>Listeria monocytogenes</i>	Prestodiag
LiM16	anticorps spécifique de <i>Listeria monocytogenes</i>	Prestodiag
Lis12	anticorps spécifique de plusieurs espèces de <i>Listeria</i> mais pas de <i>Listeria monocytogenes</i> , utilisé ici comme anticorps spécifique de <i>Listeria innocua</i>	Prestodiag
Ac (anti) E.coli	anticorps spécifique d' <i>E. coli</i> ATCC 11775	Abcam, ref.31499
KLH	anticorps dirigé contre des antigènes non bactérien, utilisé ici comme contrôle	CEA Marcoule

Tableau A Résumé des différents anticorps utilisés

INTRODUCTION

Dans les pays industrialisés, la sécurité sanitaire est une problématique majeure tant les enjeux humains[3] et économiques [4] qu'elle représente sont importants. La contamination par un pathogène bactérien est la principale source d'infection nosocomiale [5] et la seconde cause d'infections d'origine alimentaire [6]. Dans ce contexte, **il est essentiel de développer des outils d'études du comportement bactérien et des méthodes de détection de pathogènes à la fois rapides et efficaces.**

L'essor des biocapteurs ces dernières décennies a permis le développement de techniques faciles d'utilisation et fiables. Parmi ces dernières, l'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRI) est couramment utilisée. Cette méthode repose sur les propriétés des plasmons de surfaces, qui sont des ondes propagatives de surface situées à une interface entre un milieu diélectrique et un métal. La détection se fait en temps réel et sans marquage, ce qui est un avantage en comparaison à d'autres techniques telles que la fluorescence.

L'utilisation de la SPR en imagerie (SPRI) permet d'obtenir un champ relativement large (~1cm), ce qui permet la détection simultanément de différents phénomènes en surface. Des traitements spécifiques localisés de la surface d'étude, on parle de « plots » spécifiques, permettent d'étudier simultanément l'interaction de différentes espèces bactériennes avec celles-ci. L'analyse de l'accroche préférentielle de certaines souches à certaines cibles spécifiques déposées en surface permet également de réaliser une détection efficace en parallèle de plusieurs souches, et sur une surface unique. Lorsqu'un nombre suffisant de bactéries est accroché sur une surface, les modifications locales d'indice optique deviennent détectables en imagerie SPR.

Dans la mesure où les plasmons de surface sont un phénomène confiné en surface, la technique est sensible à des variations physiques (modification de l'indice de réfraction) uniquement dans un voisinage étroit de quelques dizaines de nanomètres de la surface de métal[7]. Cette caractéristique est, dans notre cas, essentielle : comme le phénomène est en surface, il n'est pas sensible aux constituants de la solution en volume, et la détection par SPR est ainsi potentiellement compatible avec les milieux complexes, tels que les échantillons alimentaires ou médicaux.

Des systèmes d'imagerie et de détection basés sur la SPR sont commercialisés à l'heure actuelle, à la fois pour la recherche [1] et pour les tests de détection dans l'industrie agroalimentaire [8]. Cependant, ceux-ci présentent une résolution spatiale supérieure à 10 μ m, et ne prennent donc pas en compte la nature particulière des bactéries qui sont des objets ayant une taille de l'ordre du micromètre. La détection est réalisée simplement au travers de la variation d'intensité globale, et un comptage d'objet individuel n'est pas possible.

En parallèle, des systèmes d'imagerie SPR optimisés en résolution ont été développés et ont montré leur pertinence dans l'analyse de cellules eucaryotes de plusieurs dizaines de microns [9]–[11]. Cependant, ce type de système est encore peu utilisé dans l'étude et la détection de pathogènes de tailles micrométriques.

Afin d'accéder à un comptage d'objets bactériens, **l'objectif de ce projet a donc été de mettre au point un système d'imagerie SPR optimisé en résolution pour les applications en microbiologie.** Les questions auxquelles notre projet a tenté d'apporter des réponses sont les suivantes :

- quelles sont les caractéristiques nécessaires d'un système d'imagerie SPR optimisé en résolution adapté pour la microbiologie ?
- Comment un tel système peut-il être mis en place ?
- Comment l'imagerie SPR optimisée en résolution peut-elle améliorer les délais de détection de pathogènes ?
- Quelles informations sur le comportement bactérien proche des surfaces peuvent être obtenues grâce à cette technique ?

Ces questionnements vont structurer ce manuscrit. Après avoir défini le contexte du projet dans un premier chapitre, nous allons nous focaliser sur l'imagerie SPR et présenter le système que nous avons développé (chapitre 2). Les deux chapitres suivants vont nous permettre de présenter les apports de la SPR optimisée en résolution à la fois dans la détection de pathogènes (chapitre 3) et dans le domaine de l'étude du comportement bactérien à proximité des surfaces (chapitre 4). La réalisation de ce projet a créé de nombreuses perspectives intéressantes pour la poursuite du projet, et nous parlerons donc des perspectives les plus prometteuses dans un dernier chapitre.

1 ETAT DE L'ART ET CONTEXTE

1.1 Les bactéries

1.1.1 Contexte sanitaire : pourquoi étudier et détecter des bactéries ?

Les bactéries ont colonisé la quasi-totalité des niches écologiques [12], aussi bien les milieux marins [13], que les sols [14], ou encore les surfaces créées par l'homme tels que les plastiques [15]. Ces microorganismes y sont présents en très grande abondance : la densité bactérienne dans les sols est en effet évaluée à plusieurs dizaines de millions de cellules par cm^3 d'échantillon [16].

L'homme est lui-même une niche écologique pour les bactéries, qui se développent sur la peau, dans les muqueuses, ainsi que dans le tube digestif. La présence de ces bactéries peut être neutre pour l'organisme, mais elle est souvent avantageuse. Elles ont notamment un rôle essentiel dans la digestion, dans la production de certaines vitamines [17],[18], ou dans la protection des dents contre les caries. Le corps humain héberge entre 10^{12} et 10^{14} bactéries, soit 2 à 10 fois plus que le nombre de cellules qui le constituent, pour un poids estimé de 2 kilos [19]. On parle de microbiote bactérien.

Indépendamment de cette cohabitation involontaire mais bénéfique, l'homme utilise depuis plusieurs milliers d'années les bienfaits des bactéries dans l'élaboration de certaines préparations culinaires. En effet, la fermentation lactique, sur laquelle reposent l'action du levain dans le pain et la fabrication du fromage, est effectuée par des bactéries.

a. Contamination de milieux normalement stériles et maladies nosocomiales

Cependant certaines colonisations bactériennes peuvent s'avérer délétères.

La présence de microorganismes dans des milieux normalement stériles (urine, sang) est néfaste et peut provoquer une réponse inflammatoire (infections urinaires, sepsis). Ce type de contamination survient généralement suite à des opérations invasives sur le patient, tels que la pose de sondes urinaires ou de cathéters [20], et est la cause majoritaire de maladies nosocomiales [21].

D'après une enquête de l'institut national de veille sanitaire (InVS) datant de 2012, un patient sur 20 (5%) contracte une infection dans l'établissement hospitalier où il est soigné [22]. Cela représente 750 000 infections par an, qui seraient la cause directe de 4000 décès annuels en France. Les principaux microorganismes responsables sont trois bactéries : *Staphylococcus aureus* (le staphylocoque doré), *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces bactéries se trouvent naturellement sur la peau ou les muqueuses humaines, mais leur capacité à coloniser les fluides humains et leur potentielle résistance aux antibiotiques en fait des pathogènes opportunistes redoutables.

La propension des bactéries à coloniser toute surface est également problématique pour les implants médicaux permanents (implants dentaires, prothèses), où les infections bactériennes sur ces surfaces normalement non souillées sont en cause dans au moins 20% des cas de ré-opérations [23]–[25].

b. Toxi-infections alimentaires

D'autre part, certaines souches sont intrinsèquement dangereuses pour l'homme. La contamination par un pathogène bactérien est la principale cause d'infections d'origine alimentaire [6]. On parle de toxi-infection alimentaire (TIA). Ce nom est utilisé car la pathogénicité des organismes est souvent due à une toxine sécrétée par ceux-ci.

Les quatre principaux pathogènes bactériens en cause sont les salmonelles (genre *Salmonella*), *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* et *Escherichia coli* O157 :H7.

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), où au moins deux cas de contamination sont avérés, sont suivies nationalement par les instituts de veille sanitaire. Des données statistiques sur le nombre de TIAC et leur impact économique par pays peut donc être établi. Une synthèse de quelques données référencées est présentée dans le Tableau 1.1.

Pays	Cout annuel estimé	Nombre de cas estimé par an		Nombre de pathogènes pris en compte	Source
		Valeur brute	% de la population		
Angleterre	2 milliards \$	1,7 million	3,1%	NC	[26]
Australie	0,9-2 milliards \$	274 000	1,1%	4 principaux	[27]
Canada	1,1 milliard \$	1 million	2,7%	NC	[28]
États-Unis	6,9 milliards \$	5,5 millions	1,7%	5 principaux	[6], [28]
Nouvelle Zélande	169 millions \$	120 000	2,5%	6 principaux	[29]

Tableau 1.1 Impact économique et en termes de population des toxi-infections alimentaires collectives
– NC : non communiqué [6], [26]–[29]

Devant cet impact majeur autant sur le plan humain qu'économique, la mise en place de mesures de sécurité alimentaire est indispensable.

c. Normes sanitaires pour la détection de pathogènes

La prise en compte du risque sanitaire que représentent les TIAC a conduit à mettre en place des règles de sécurité alimentaire. L'organisation du commerce international a ainsi établi le Codex Alimentarius, ou «Code alimentaire» écrit conjointement par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dans les années 1960.

Il s'agit d'un recueil de normes, de codes d'usages, de directives et autres recommandations concernant divers aspects de la sécurité des denrées alimentaires, qu'on retrouve au sein de la famille ISO 22000 (International Organization for Standardization).

Pour la majorité des contrôles de recherche, la réglementation requiert l'absence de bactéries pathogènes dans 25 g de matrice alimentaire. Afin de pouvoir analyser un échantillon liquide, l'échantillon est généralement dilué au dixième afin de suspendre ses constituants dans un milieu nutritif et de permettre la croissance des bactéries. La méthode d'analyse doit donc pouvoir détecter la présence d'une bactérie spécifique, capable de se multiplier, dans 250 mL. Il ne s'agit donc pas seulement de détecter une bactérie quelconque, mais également d'être capable de l'identifier.

1.1.2 La bactérie comme objet d'étude

Pour comprendre la difficulté de l'identification et de la détection de bactéries à faible concentration, il faut au préalable définir les caractéristiques de notre objet d'étude.

Dans cette section, nous allons donc nous attacher à définir succinctement ce qu'est une bactérie, puis nous présenterons les spécificités de deux cas particuliers qui vont être utilisés dans le projet : *Listeria* et *E. coli*.

a. Classification des bactéries

La caractérisation et la classification des bactéries s'organisent typiquement en différentes catégories et sous catégories, qui forment ce que l'on appelle l'organisation classique du vivant.

Dans ce cadre, les bactéries sont définies comme l'ensemble des procaryotes unicellulaires sans histone, et forment le règne bactérien (Figure 1.1), et, bien qu'il existe des exceptions [30], ces organismes ont en général une taille de l'ordre du micromètre. À partir de cette définition, il existe une extrême variété entre les bactéries aussi bien en termes de morphologies que sur le plan des milieux de vie.

Dans la classification classique du vivant, Figure 1.1, il est important de s'intéresser au positionnement des différents ensembles de bactéries pathogènes. En effet, selon les microorganismes considérés, les groupes ne sont pas du même niveau du point de vue de cette classification.

Ainsi, le genre entier *Campylobacter* est considéré comme pathogène (sauf une espèce) [31]. Dans le genre *Listeria*, seule l'espèce *Listeria monocytogenes* est actuellement considérée comme un pathogène humain [32], [33]. Enfin, dans le genre *Escherichia*, toute l'espèce *Escherichia coli* n'est pas pathogène. Seules quelques variétés le sont : par exemple *E. coli* O157:H7, *E. coli* O26:H11, *E. coli* O103:H2, *E. coli* O145:H28, ou *E. coli* O111:H8 sont responsables de pathologies de dérèglement du système digestif (colites hémorragiques, lésions des parois du tube digestif, etc.) ou des infections des muqueuses non digestives (infections urinaires, méningites) [34].

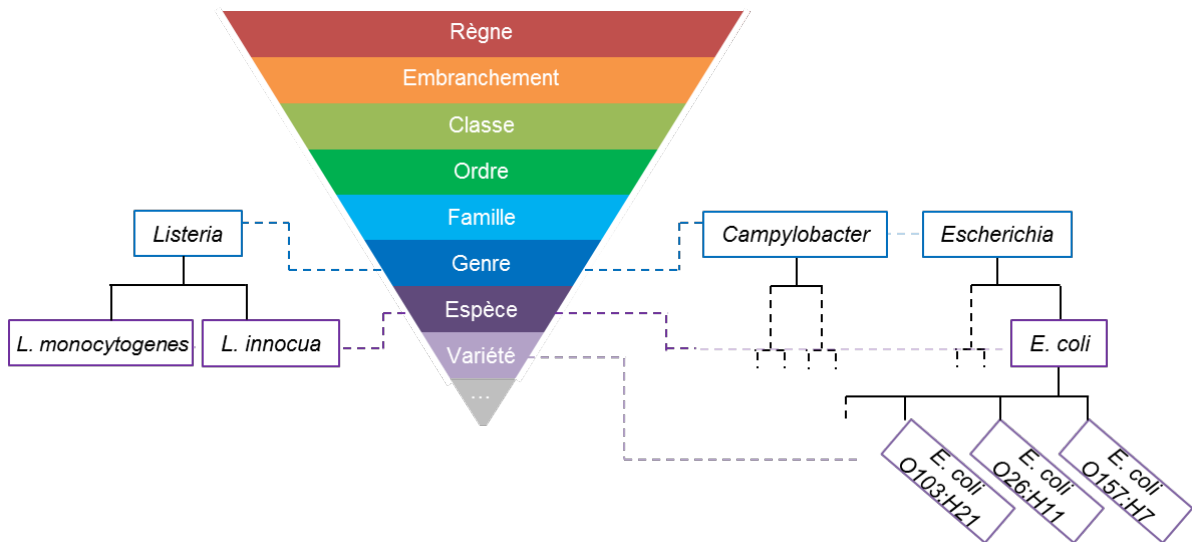


Figure 1.1 Organisation de la classification classique du vivant et positionnement des différents groupes de pathogènes

Le raisonnement sur la classification classique des bactéries met en lumière la difficulté de définir un niveau de spécificité adéquat pour identifier les bactéries pathogènes. Il semble donc plus pertinent de se focaliser sur les paramètres permettant de caractériser les bactéries, dans l'optique de mettre en place des outils de détection et de caractérisation.

b. Caractérisation des bactéries

Une bactérie peut être caractérisée suivant différents critères.

Historiquement, la première méthode utilisée consiste à observer l'aspect de colonies bactériennes après croissance sur boîte de Pétri. Une solution contenant des bactéries à caractériser est déposée sur un milieu nutritif gélosé, et les bactéries capables de croître dans ce milieu vont former des colonies. On parle d'unité formant des colonies (UFC). Le manuel de bactériologie systématique de Bergey [35] fait office de référence pour

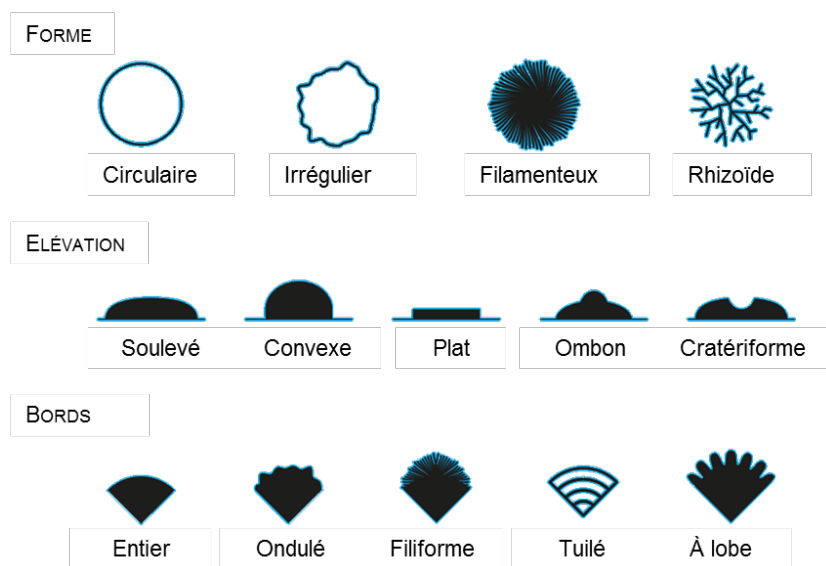


Figure 1.2 Critères de caractérisation des colonies bactériennes

l'étude de l'aspect des colonies et fournit la description de la morphologie des colonies d'une grande partie des espèces bactériennes identifiées aujourd'hui. Des exemples de critères de caractérisation des colonies bactériennes sont fournis en Figure 1.2.

L'utilisation de milieux de cultures spécifiques chromogènes peut permettre d'identifier plus précisément des groupes bactériens selon leur capacité à métaboliser différents composants. On peut par exemple citer les géloses Mac Conkey [36] qui permettent de séparer les bactéries selon leur capacité à métaboliser le lactose. Il existe également des milieux spécifiques contenant des antibiotiques particuliers permettant de mettre en évidence une résistance aux antibiotiques.

Ces méthodes sur mesure peuvent être très sélectives. Par exemple le milieu ChromID® *E. coli* O157:H7 est commercialisé pour l'identification d'une des souches pathogènes d'*E. coli* à la variété près [37]. Cependant, elles nécessitent une croissance des souches d'en moyenne 24h.

Une autre caractérisation est possible par la morphologie des bactéries individuelles à l'aide d'un microscope. La technique la plus communément utilisée repose sur l'utilisation de la coloration de Gram [38], mettant en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Les microorganismes sont alors visibles en microscopie optique et leur forme peut être identifiée. Cette technique permet donc de savoir si les bactéries ont une membrane dotée d'une simple paroi contenant une grande quantité de peptidoglycanes (catégorie gram positif) ou une membrane moins riche en peptidoglycanes mais pourvue d'une membrane extérieure (gram négatif). Un exemple d'observations au microscope de *Listeria monocytogenes* et d'*E. coli* est donné en Figure 1.3.

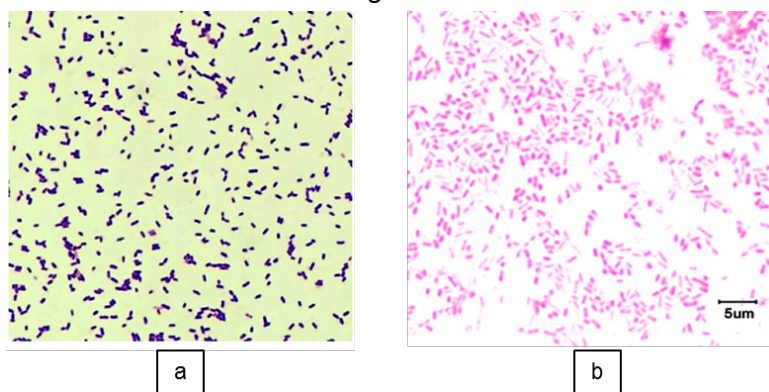


Figure 1.3 Image en microscopie optique en coloration Gram des deux souches d'intérêt pour le projet
a. *Listeria monocytogenes*, gram positif
b. *E. coli*, gram négatif

Cette méthode est relativement rapide et peu coûteuse, mais donne peu de spécificité sur les cellules observées.

Pour aller plus loin dans l'analyse, il est nécessaire d'étudier les caractéristiques moléculaires des bactéries. Pour cela deux possibilités sont utilisées : les molécules de surface ou l'ADN.

Les protéines et lipides de surface sont en contact direct avec l'environnement extérieur. Ils constituent des antigènes spécifiques utilisés pour caractériser les bactéries étudiées. On parle de sérotype ou de sérovar.

Il existe différentes catégories d'antigènes suivant la structure bactérienne sur laquelle ils sont situés. Les lipopolysaccharides de la couche externe des bactéries à gram négatif portent les antigènes de type O [39]. Si elle est motile et possède des flagelles, une bactérie possède des antigènes H, spécifiques des flagelles[40]. Ce sérogroupage est aujourd'hui utilisé pour définir les variétés bactériennes. C'est pour cette raison que nous avons parlé de l'espèce E. coli O157 : H7 précédemment.

Le développement de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et les progrès effectués dans le domaine pour diminuer les coûts de séquençage permet aujourd'hui de connaître le génome des bactéries étudiées, ce qui constitue le dernier niveau de caractérisation possible.

Aujourd'hui, le séquençage est utilisé pour étudier les proximités séquentielles et le phénomène de recombinaison génétique entre différentes souches bactériennes, l'encodage de différentes propriétés bactériennes [41], ou encore l'origine de la pathogénicité de certaines souches [42].

Ainsi, selon les applications visées, différents niveaux d'identifications sont possibles : pour tester une propriété particulière, les géloses spécifiques ou le test Gram peuvent être utilisés. Ce sont les solutions les moins coûteuses. Pour des tests plus précis d'identification, le sérogroupage et la PCR permettent respectivement d'identifier les variétés à l'antigène ou à la base azotée près.

c. Classement selon la dangerosité pour l'homme

Un autre type de classement est à prendre en compte lors de la manipulation de souches bactériennes.

Celui-ci n'est pas réalisé par rapport aux caractéristiques morphologiques ou antigéniques des bactéries, mais s'effectue selon l'effet qu'ont les microorganismes sur l'homme. Elle permet de déterminer les précautions à prendre lors de la manipulation des agents biologiques.

Cette classification des agents biologiques a été introduite dans le code du travail français par l'article R. 4421-3 et se fonde sur un arrêté de 1994. Nous fournissons ci-dessous un extrait important dans notre cas :

« 1° Le groupe 1 comprend les agents biologiques non susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme ;

2° Le groupe 2 comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs. Leur propagation dans la

collectivité est peu probable et il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficaces [...]»

article R. 4421-3 du code du travail [43]

Des banques de souches bactériennes existent, et fournissent leur propre classification en groupe, en général conformes aux groupes énoncés dans le code du travail. Par exemple, pour le centre de ressource biologique ATCC (American Type Culture Collection), à chaque souche est assigné un niveau de biosécurité (BSL, biosafety level) stipulant les précautions d'utilisation adaptées.

L'utilisation de souches de niveau 2, par exemple, requière entre autres que toute manipulation des souches s'effectue sous hotte ventilée, que les appareils en contacts avec les agents infectieux soient désinfectés avant d'être nettoyés, et que tout renversement des microorganismes soit immédiatement décontaminé.

1.1.3 Cas particuliers : *E.coli* ATCC 11775 et *Listeria*

Nous avons vu dans la partie précédente les différentes manières de catégoriser des bactéries. Nous allons maintenant présenter les deux souches bactériennes utilisées dans le projet.

a. *E.coli* (ATCC 11775)

L'espèce *E.coli* est une bactérie à anaérobiose facultative en forme de bacille se trouvant naturellement dans l'estomac des mammifères. Elle est motile grâce à des flagelles de plusieurs micromètres de long répartis tout autour de son corps. Elle possède également des pilis, des organites fins de quelques nanomètres et d'une longueur de l'ordre du micromètre. Un schéma représentatif de la bactérie est fourni en Figure 1.5.

Les souches non pathogènes de cette espèce sont extrêmement utilisées en

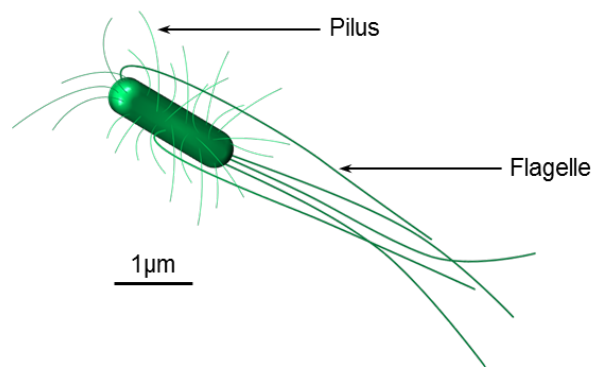


Figure 1.4 Schéma de la morphologie de la bactérie *E. coli*

laboratoire car elles sont faciles à cultiver et ont une croissance rapide en milieu de culture, définie par un temps de doublement de 20 à 30 min [44].

La souche *E. coli* ATCC 11775 est une souche obtenue d'un échantillon urinaire. Son sérovar est O1:K1:H7. Elle était classée dans le groupe 1 jusqu'en 2016, mais suite à

un rapport datant octobre 2016 montrant son implication dans un cas d'infection, elle a été reclassée dans le groupe 2 [45].

Cet exemple nous montre un autre point important dans l'évaluation des paramètres de détection : les classifications des pathogènes évoluent régulièrement. Cela ajoute une difficulté supplémentaire dans l'élaboration des outils de détection et d'identification.

Nous présentons dans le Tableau 1.2 certaines caractéristiques générales concernant l'espèce étudiée.

				Conditions de croissance optimales	
forme	taille	Motilité	Temps de doublement optimal	Température	pH
Bâtonnet	0,5-4 μm x 0,5 μm	oui	~ 20 min	40°C	~7

Tableau 1.2 Caractéristiques générales de l'espèce *E. coli*

b. *Listeria (monocytogenes et innocua)*

Le genre *Listeria* appartient à la famille des *Listeriaceae*, et comprend à ce jour 17 espèces [33], parmi lesquelles *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua*. Les bactéries appartenant à ce genre sont des bacilles gram positif.

Listeria monocytogenes n'exprime des flagelles qu'à faible température (à 30°C il y a expression de flagelles mais plus à 37°C [46]). Lorsqu'ils sont exprimés, ses flagelles sont répartis sur toute la surface de la bactérie et sont au nombre de 4 ou 5 [46]. Une représentation schématique de la morphologie de *Listeria* est présentée en Figure 1.5.

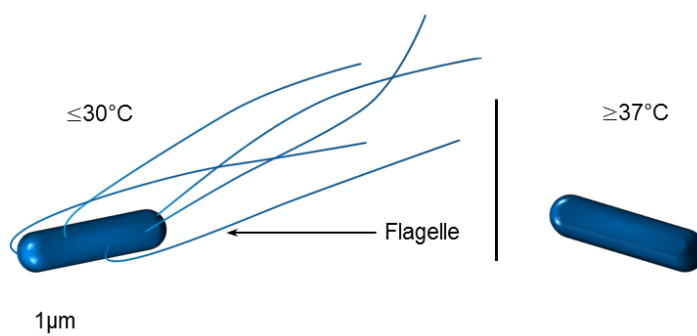


Figure 1.5 Schéma de la morphologie de la bactérie *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un pathogène du groupe 2 présent dans la nature. Il a été isolé principalement sur des animaux d'élevage tels que les bovins, les moutons, les chèvres et les volailles, mais également dans les fruits de mer et les poissons [47].

Ce pathogène est la cause de la listériose, une infection particulièrement dangereuse pour les populations fragiles. Chez les sujets âgés et les personnes

immunodéprimées, les méningites et les bactériémies sont les expressions les plus communes d'une contamination. Chez les femmes enceintes, une fièvre isolée est fréquente et la contamination peut passer pour un rhume. Cependant, la bactérie peut être transmise au fœtus et l'épisode peut ainsi être suivi d'un avortement spontané, voire d'une méningite ou d'une bactériémie chez le nouveau-né dans les premières semaines de vie.

La dangerosité de *Listeria* est renforcée par sa capacité à résister à des conditions environnementales extrêmes, tels qu'une concentration en sel élevée (10% NaCl), une large gamme de pH (de 4.5 à 9.0) et une gamme de températures très large. Son aptitude à se développer entre -1°C et +45°C augmente fortement les risques de contaminations des produits laitiers, viandes, et autres produits de la mer conservés en atmosphères réfrigérées. À des températures proches de zéro, la plupart des bactéries ne peuvent plus se multiplier ce qui laisse la possibilité à *Listeria monocytogenes* de se multiplier sans compétition [42].

Il a été établi que les doses moyennes à l'origine des complications sont de 4.10^{11} cellules [32].

Un récapitulatif des données caractéristiques sur l'espèce *Listeria monocytogenes* est donné dans le Tableau 1.3.

				Conditions de croissance optimales	
forme	taille	Motilité	Temps de doublement optimal	Température	pH
Bâtonnet	0,5-2µm x 0,5µm	Oui < 30°C	~ 40 min	30-37°C	~7

Tableau 1.3 Caractéristiques générales de l'espèce *Listeria monocytogenes*

Les caractéristiques de *Listeria innocua* sont identiques à celles des *Listeria monocytogenes*, à cela près que la motilité de *Listeria innocua* a été démontrée jusqu'à des températures d'au moins 37°C [48]. La proximité génétique entre les espèces *L. monocytogenes* et *L. innocua* est telle que la comparaison génomique entre les deux organismes est étudiée pour comprendre les origines de la pathogénicité de *L. monocytogenes*.

Nous avons donc vu dans cette partie que différents niveaux de caractérisations des bactéries existent, reposant sur différents paramètres d'identification. Les techniques de détection des pathogènes reposent justement sur l'étude d'un de ces trois paramètres : l'analyse des colonies sur gélose spécifique, la reconnaissance d'antigènes spécifiques, ou le séquençage de l'ADN. Ces considérations vont donc nous permettre de comprendre les différentes méthodes de détection et d'en saisir les limitations.

1.2 Méthodes de détection

Le domaine des techniques de détection est extrêmement riche. Les méthodes commerciales sont nombreuses [49], et les recherches pour le développement de nouvelles techniques le sont encore plus [50]–[52]. Une revue exhaustive de toutes les techniques est impossible, mais il est pertinent de présenter les méthodes de référence en détection, et de discuter des critères importants à prendre en compte dans la conception et l'évaluation des méthodes de détection.

1.2.1 Méthode de référence

a. Diagnostic médical

La détection et l'identification de bactéries pour le diagnostic médical porte principalement sur l'analyse de sang et d'urine prélevés sur des patients présentant les symptômes d'une possible infection bactérienne. Le protocole pour établir un diagnostic dans les deux cas est assez similaire.

Tout d'abord, une analyse en microscopie permet de quantifier la concentration en leucocytes dans le fluide, et la présence ou non de microorganismes. Dans les urines, un taux supérieur à 10^3 leucocytes par millilitre [53], [54], et dans le sang, une concentration supérieure à 10^4 leucocytes par millilitre sont des signes sérieux d'infection.

Suite à un taux de leucocytes élevé dans un des fluides, consolidé par l'observation de microorganismes au microscope, un traitement antibiotique à large spectre peut être directement administré sur le patient. Dans le cas des infections urinaires par exemple, *E. coli* est responsable dans 75% des cas [55].

Cependant, en l'absence d'identification précise du pathogène, ce traitement peut se révéler inefficace. L'observation au microscope peut permettre de déterminer des critères très généraux comme la forme ou le gram, mais la concentration en bactéries dans l'échantillon peut être trop faible pour faire ce genre d'étude.

Des cultures de sang (ou hémoculture) ou d'urine sont donc réalisées afin de détecter puis d'identifier le germe présent, ou/et pour déterminer l'antibiotique adapté. Ces techniques permettent de détecter une contamination à des concentrations très basses, inférieures à une bactérie capable de se multiplier par millilitre.

b. Méthode de référence en milieu alimentaire

Les méthodes de référence pour les principaux pathogènes alimentaires sont des méthodes approuvées par les organismes de certifications (exemple : organisme AFNOR en France). Le protocole général de ces méthodes est résumé en Figure 1.6. Les détails varient en fonction des pathogènes testés, mais les étapes sont communes.

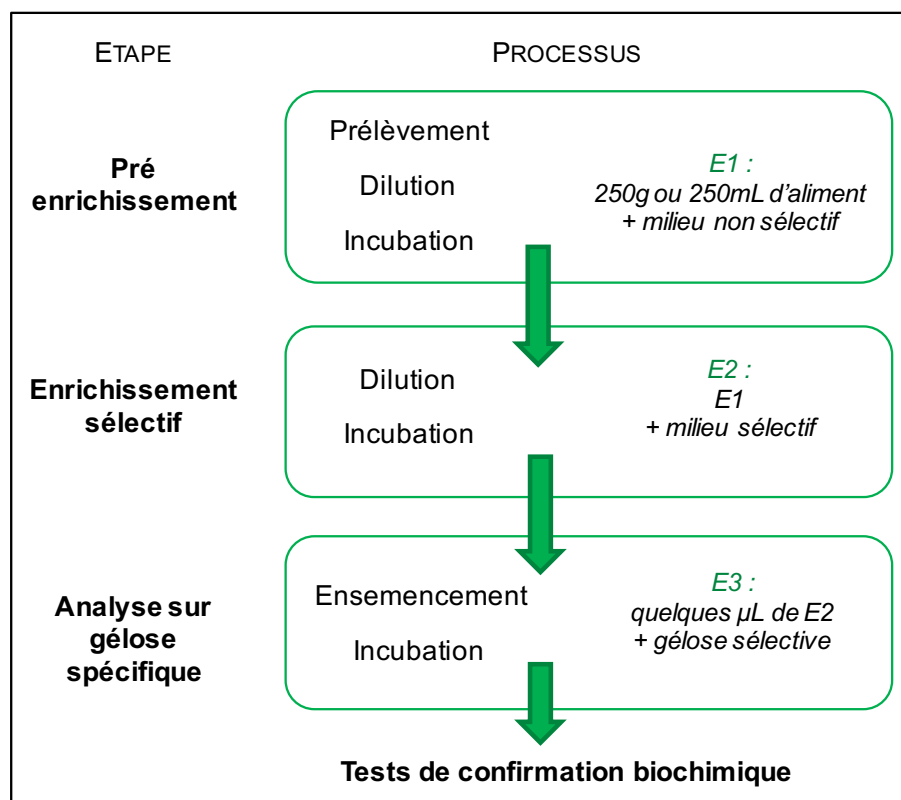


Figure 1.6 Étapes dans les méthodes standards de tests alimentaires

Le premier enrichissement en milieu non spécifique, d'une durée typique de 24h permet de déstresser les bactéries et de les revivifier afin d'initier la croissance bactérienne. En effet, les échantillons alimentaires sont denses et classiquement conservés en milieu réfrigérés et sont ainsi loin de présenter des conditions optimales de croissance. Cette phase de pré-enrichissement est donc indispensable.

Une étape d'enrichissement (ou enrichissement secondaire), d'une durée de 24h à 48h en général, fournit ensuite un milieu sélectif qui limite la croissance de la flore endogène, naturellement présente dans les aliments testés. En parallèle, le milieu spécifique permet une croissance efficace des bactéries recherchées.

La recherche des bactéries cibles peut ensuite être réalisée par étalement d'un certain volume de la solution issue de l'enrichissement sur une gélose spécifique. Ces milieux peuvent être sélectifs, en termes d'exigences nutritives ou de présence d'antibiotiques, ou encore selon la température à laquelle ils sont placés. Ils peuvent en plus être chromogènes et fournir une coloration de colonies caractéristique des

métabolismes possédés par les bactéries. Les unités ayant formé des colonies (UFC) sont alors comptées et la dose bactérienne initiale peut être évaluée.

La présence des pathogènes caractéristiques est alors validée par des tests physiologiques et biochimiques (tests de gram, voie d'utilisation du glucose, matériel enzymatique, etc.).

Ces techniques standards sont hautement spécifiques et efficaces puisqu'elles permettent de détecter la présence d'un unique individu pathogène dans un échantillon de 250 mL, mais elles nécessitent des délais importants : la méthode standard pour la détection de *L. monocytogenes* peut nécessiter jusqu'à 7 jours [56].

1.2.2 Critères d'évaluation des méthodes de détection (et d'identification)

Pour évaluer une méthode de détection, qu'elles soient commercialisées ou en développement, plusieurs questions doivent être posées : Quelle est l'utilisation visée ? La méthode est-elle couteuse ? Quel est le délai nécessaire à la détection ? À quel point la méthode est-elle complexe à mettre en place en routine ? L'échantillon que l'on souhaite utiliser peut-il être utilisé en l'état ou doit-il être traité, et si oui combien d'étapes sont nécessaires ? Quels types d'échantillons peut-on analyser avec cette technique ?

Le raisonnement que nous présentons dans cette section est particulièrement adapté pour les cas de détection en matrice alimentaire, mais il peut aussi trouver une résonance dans les cas de diagnostic médical.

a. Quel niveau de spécificité est nécessaire ?

Le degré de spécificité n'est pas le même pour tous les types d'applications visées.

Les analyses basées sur la bioluminescence de l'ATP (adénosine tri-phosphate), sont des techniques redoutablement efficaces pour vérifier la stérilité d'une solution [57]. Elles fournissent une sensibilité allant jusqu'à 10^3 bactéries pas litre [58], sans enrichissement. Ce type d'analyse n'a aucune spécificité quant à la nature des objets vivants détectés, mais est parfaitement adapté aux études de qualité de l'eau dans les installations industrielles par exemple, ou dans les tests de stérilité du lait pasteurisé [57].

Dans le diagnostic des infections, comme nous l'avons vu plus haut, il n'est pas forcément nécessaire d'identifier le pathogène présent au sérovar près. Il est plus pertinent, par exemple, d'identifier l'antibiotique adapté au traitement. Dans ce cas d'application, ce n'est donc pas une caractérisation, mais une caractéristique particulière qui est recherchée.

En revanche, dans les échantillons alimentaires, le milieu testé est a priori riche en bactéries non pathogènes qui ne sont pas ciblées. Dans ce cas une spécificité élevée est donc obligatoire. Les méthodes de détection qui se veulent applicables à l'alimentaire ne doivent donc pas uniquement prouver leur capacité à détecter une souche pathogène particulière, mais elles doivent aussi montrer leur absence de réactivité pour des souches

non pathogènes. Plus l'absence de réactivité est validée pour des souches génétiquement proches des souches ciblées, plus le système est spécifique.

Les techniques basées sur la PCR ciblant des applications alimentaires utilisent ainsi classiquement des amorces spécifiques de certaines séquences caractéristiques du génome de certaines bactéries, et permettent par exemple de différencier *L. monocytogenes* de *L. innocua* [59]. Il en va de même pour les techniques qui reposent sur la reconnaissance de certains antigènes par des anticorps spécifiques, qui veillent à valider la spécificité de leurs anticorps avec des souches similaires : les deux souches de *Listeria* que nous avons déjà citées [60], ou la différenciation de la sous espèce *Salmonella enterica enterica* parmi d'autres *Salmonella enterica* [61].

Il est donc important d'évaluer les spécificités nécessaires, et d'adapter les tests aux applications recherchées.

b. Limite de détection et enjeu de la croissance bactérienne

Les performances des méthodes de détection sont régulièrement fournies en termes de concentration limite de détection, correspondant à la concentration minimale pouvant être détectée par la technique. Dans le cadre des tests alimentaires, la véritable problématique est cependant de savoir quel délai est nécessaire pour détecter une bactérie présente dans un échantillon de 250 mL (voir paragraphe 1.1.1 c).

À partir d'un échantillon à une concentration de 4 bactéries par L, il est donc nécessaire d'enrichir le milieu pour atteindre la concentration limite de détection car il n'existe aucune technologie possédant un seuil de détection aussi bas.

Les bactéries se multiplient majoritairement par fission binaire : le matériel génétique se duplique, la bactérie grandit, puis se divise en deux cellules filles identiques. Le temps moyen nécessaire pour doubler ainsi une population est appelé temps de doublement.

Dans un cas simple où la bactérie étudiée est la seule souche présente dans une solution nutritive non renouvelée, la cinétique de croissance est divisée en quatre phases, représentées sur la Figure 1.7.

La cinétique débute par une phase de latence (partie A en bleu pointillé), qui correspond à une période de croissance nulle. La cellule synthétise les enzymes nécessaires à l'utilisation des substrats présents dans le milieu afin d'assurer sa multiplication. Ce temps dépend à la fois de l'environnement de la bactérie et de son état physiologique. Cet état physiologique est dû aux conditions de conservation de la bactérie avant son injection dans le milieu nutritif. Cette phase n'est pas toujours présente : en effet, si les souches sont reprises dans des conditions identiques à celles dans lesquelles elles étaient, les bactéries n'ont pas besoin d'adaptation pour entrer en division.

On observe ensuite une phase de croissance exponentielle (Figure 1.7 B, en vert) qui correspond à une phase où les bactéries se divisent périodiquement et efficacement.

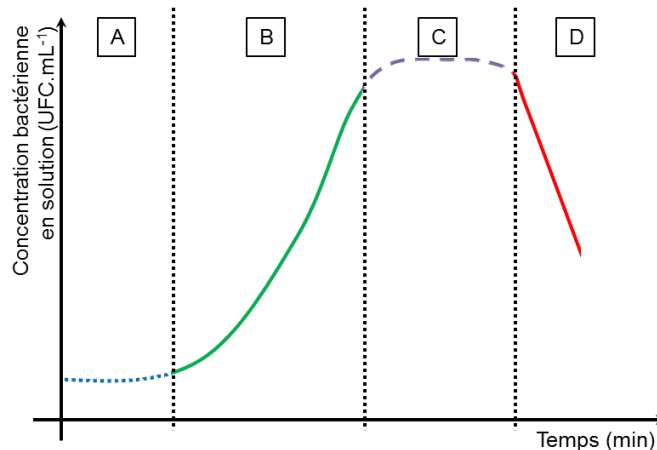


Figure 1.7 Cinétique de la croissance bactérienne dans un milieu pur (sans autres bactéries que l'espèce étudiée) non renouvelé

- A : phase de latence**
- B : Croissance exponentielle**
- C : phase stationnaire**
- D : phase de déclin**

Cette phase est suivie par une phase stationnaire (Figure 1.7 C, en gris pointillé). La croissance apparaît alors nulle car la lyse cellulaire est équivalente au taux de croissance puisque le milieu s'est appauvri en nutriments.

Pour finir, s'en suit la phase de déclin (Figure 1.7 D, en rouge), où la population bactérienne décroît car le manque de ressources nutritives et l'accumulation de métabolites toxiques entraînent plus de morts cellulaires que de croissances.

Pour la détection, la phase d'enrichissement est réalisée au préalable, de manière à atteindre la concentration limite de détection pendant la phase de croissance exponentielle, et la détection est ensuite exécutée sur l'échantillon enrichi. Cela permet de rendre possible la détection à partir d'un échantillon trop peu concentré. Cependant, cela augmente considérablement le temps de détection, qui est décompté à partir du début de la prise en charge de l'échantillon, avant enrichissement.

La prise en compte de ce temps d'enrichissement limite l'intérêt de certaines techniques pour le développement de dispositifs de détection rapide. Par exemple les méthodes de spectroscopie, comme la spectroscopie Raman [62] ou à transformée de Fourier [32], peuvent détecter certes quasi instantanément, mais à des concentrations supérieures à 10^5 UFC.mL⁻¹, ce qui correspond à un temps d'enrichissement préalable d'au moins 7h. Cela n'est pas compétitif avec d'autres techniques émergentes [63].

Les méthodes de détection pour l'alimentaire doivent donc être évaluées également selon leur sensibilité et leur délai de détection par rapport à la contamination d'un échantillon réel de 250 mL.

c. Solutions testables : volume et transparence

S'intéresser à des échantillons réels peut mettre en évidence d'autres limitations potentielles de certaines méthodes de détection.

Tout d'abord, le volume analysable par la méthode limite fortement la concentration minimale analysable. Ainsi, un calcul simple nous montre que la PCR, qui analyse un volume de quelques microlitres [64], ne peut fonctionner que sur un échantillon qui possède au moins un pathogène par microlitre, soit une concentration de 10^3 UFC.mL⁻¹. Cette limitation est contournable grâce à des techniques de concentration, que nous verrons plus loin, mais il faut prendre en compte ce critère malgré tout. Si le volume analysé est de moins de 250 mL, il faudra obligatoirement avoir une phase d'amplification (enrichissement ou concentration) avant l'analyse.

D'autre part, les échantillons réels ont des compositions complexes : le sang et les urines sont des fluides colorés et riches en hématies et leucocytes. Les aliments solides sont préparés pour être testés en étant broyés et dilués dans une solution de milieu de culture spécifique à l'aide d'un broyeur homogénéisateur de laboratoire de type Stomacher®. Les échantillons alimentaires sont également troubles et riches en composants de taille diverses.

Ce point limite donc l'utilisation des techniques optiques nécessitant de sonder la solution en volume, telles que la microscopie optique. La microscopie optique peut être utilisée pour les échantillons sanguins ou d'urines qui ne sont pas opaques lorsqu'ils sont étalés en faibles épaisseurs, mais ce n'est pas applicable pour les échantillons alimentaires.

La PCR est également particulièrement sensible à la présence de composants inhibiteurs se trouvant dans les aliments ou dans les milieux biologiques. Un problème pour l'utilisation de la PCR en routine pour les tests alimentaires en laboratoire est donc lié à la difficulté d'obtenir des solutions « propres » pour effectuer les mesures.

À l'opposé, plusieurs méthodes basées sur la reconnaissance antigène-anticorps présentent une meilleure tolérance pour les milieux complexes. En effet, les anticorps sondes en solution ou fixés sur une surface reconnaissent et fixent uniquement les antigènes spécifiques du pathogène à détecter dans la solution à tester. Le couplage anticorps-antigène, en cas de présence du pathogène, entraîne une modification du milieu : formation d'agrégats pour les tests sérologiques d'agglutination [65], de précipités pour les tests d'immuno-précipitation [66] qui peut être décelable même dans un milieu complexe.

d. Complexité du procédé et marquage

Toutes les limitations que nous avons pu voir jusqu'à présent ont dans les faits des solutions. Par exemple, les milieux complexes peuvent être centrifugés, filtrés pour être compatibles avec des analyses PCR [67]. Les analyses nécessitant un volume d'étude

faible peuvent être précédées par des étapes de concentration chimique, physique, physicochimique ou biologique [68].

Mais ce type de résolution nous amène à notre dernier point d'évaluation des techniques de détection : la complexité de l'analyse. En effet, le fait de rajouter des étapes de purification ou de concentration rajoute des étapes au protocole, complexifie la méthode et augmente potentiellement les incertitudes de mesure.

Le nombre d'étapes dans le protocole peut également être un désavantage pour les techniques qui nécessitent un marquage fluorescent des bactéries pour la détection. C'est le cas pour les techniques basées sur la microscopie de fluorescence [63], même si les limites de détections avancées de 10^2 UFC.mL⁻¹ sont assez compétitives.

Cette section nous a donc permis de comprendre quels sont les critères d'intérêt lorsque l'on souhaite effectuer de la détection en microbiologie. La conclusion de cet exposé est qu'il n'existe pas de méthode de détection parfaite, mais plutôt des techniques adaptées pour des applications spécifiques.

Dans la prochaine section nous allons nous focaliser sur un type de détecteurs spécifiques, particulièrement adaptés à la détection de pathogènes en milieu complexes : les biocapteurs.

1.2.3 Les biocapteurs

Le premier biocapteur a été inventé il y a plus de cinquante ans par Clark et Lyons [69] dans le but mesurer la concentration d'oxygène dissout dans le sang à l'aide d'électrodes. Du fait de leurs nombreuses caractéristiques avantageuses (petite taille, rapidité, facilité d'utilisation, possibilité de les utiliser sur site, faible coût, etc.), le développement des biocapteurs est en plein essor depuis, dans des domaines variés comme l'agroalimentaire, le contrôle environnemental, la santé ou le militaire.

a. Fonctionnement d'un biocapteur

Le fonctionnement d'un biocapteur repose sur la transduction : le signal biochimique (présence ou absence de l'espèce cible à une certaine concentration) est traduit en signal physique mesurable, quantifiable par une chaîne de mesure. Il est composé d'une surface de reconnaissance, et d'un transducteur et d'un détecteur. En contact de l'analyte à détecter, la cible, le transducteur va permettre de transformer une interaction biologique en un signal physique quantifiable. La Figure 1.8 résume le principe de fonctionnement d'un biocapteur.

La biopuce est un support physique qui contient les ligands, les composés « sondes » dédiées à la reconnaissance des composés « cibles » en solution. Le choix des sondes est dépendant de la molécule cible recherchée. Il s'agit fréquemment d'anticorps (Ac) mais de nombreuses autres molécules peuvent être utilisées comme des sucres ou des protéines [70].

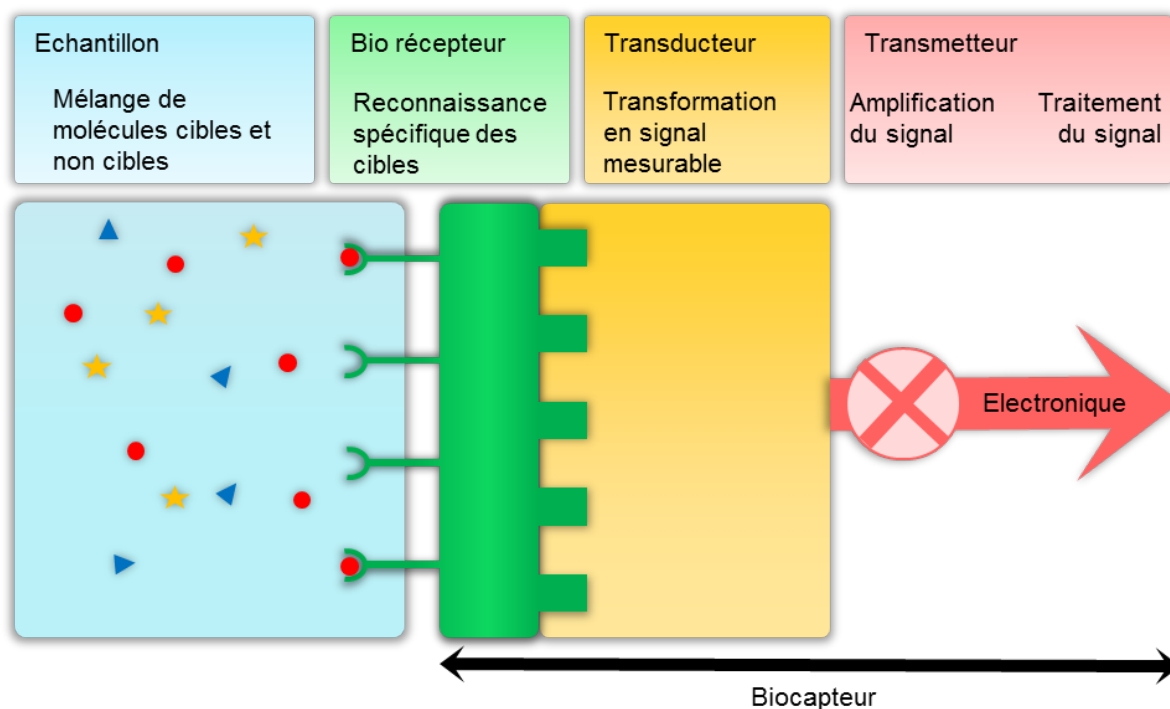


Figure 1.8 Principe de fonctionnement d'un biocapteur

Au-delà de son principe de fonctionnement, un biocapteur est caractérisé par plusieurs paramètres parmi lesquels :

La **sensibilité** : C'est le rapport entre la réponse du capteur (le signal de sortie) et la variation de la grandeur à mesurer.

La **sélectivité** : Principalement due au bio-récepteur sélectionné, la sélectivité est la capacité du système à distinguer uniquement l'analyte cible, cela même en milieu complexe qui comprend différents substrats pouvant potentiellement interférer.

La **limite de détection** : C'est la plus petite valeur de la grandeur à mesurer produisant un signal significativement différent du bruit de fond, c'est-à-dire la concentration minimale de la cible qui peut être détectée par le biocapteur.

Le **temps de réponse** : Temps nécessaire pour que le capteur fournisse un signal positif spécifique. Ce temps de réponse est régulièrement défini comme le délai nécessaire pour obtenir un rapport signal sur bruit (RSB) supérieur à 3. Cette définition sera utilisée dans la suite du projet

b. Principaux types de biocapteurs

Les biocapteurs sont en général classés en fonction du type de transduction utilisée, c'est-à-dire selon la nature du signal physique obtenu à partir du signal biologique.

Parmi les méthodes utilisées, les plus courantes [51] sont les transductions électrochimiques, acoustiques, optiques ou mécaniques qui exploitent directement la modification d'un paramètre physique suite à l'adsorption d'une cible sur la biopuce. Ces paramètres physiques sont respectivement la fréquence d'oscillation, le courant issu d'une

réaction d'oxydo-réduction, le déphasage d'une onde acoustique, une variation d'intensité lumineuse ou une déformation mécanique.

Les biocapteurs électrochimiques ont l'avantage d'être compatibles avec des milieux troubles, présentent une bonne sensibilité et sont facilement miniaturisables [71]. Ces capteurs reposent sur la mesure du courant ou de la variation de potentiel induit par les interactions se déroulant à l'interface entre la surface des électrodes et l'échantillon. Selon la nature du signal mesuré, les biocapteurs électrochimiques se divisent en capteurs ampérométriques (mesure du courant), en capteurs de potentiel (mesure de la tension), ou capteurs d'impédance (mesure d'un courant et d'une tension pour en déduire une résistance) [72].

Les biocapteurs acoustiques sont des détecteurs de variation de masse dont le fonctionnement est basé sur un cristal oscillant, fonctionnalisé par des sondes. La fréquence de résonance du cristal varie selon la quantité de matière venant se fixer de manière spécifique. Ce type de capteur utilise en général des transducteurs piézoélectriques qui ont la capacité de traduire des ondes acoustiques en signal électrique en fonction de leurs fréquences. Ils sont loin d'être les biocapteurs les plus répandus dans les applications en microbiologie, mais leur efficacité a déjà été démontrée [73].

Les biocapteurs à cantilever reposent sur la variation des propriétés mécaniques des cantilevers suite à l'accroche de molécules sur ceux-ci. Les modifications mesurées peuvent être la flexion du cantilever ou sa fréquence d'oscillation. Les limites avancées pour ce type d'application sont excellentes avec des concentrations limites de détection de quelques dizaines voire quelques unités de bactéries par millilitre [74]–[77].

La dernière famille de biocapteurs, les biocapteurs optiques, sont les biocapteurs les plus communément utilisés pour la détection de toxines et de pathogènes alimentaires. En effet, ce sont des outils présentant une bonne adaptabilité, faciles à interpréter puisqu'il s'agit de signaux lumineux, et facilement amplifiables en les couplant à d'autres techniques. **Pour ce projet, nous allons utiliser un biocapteur optique basé sur la résonance des plasmons de surface**, une technique qui sera étudié plus en détail dans le prochain chapitre.

Cette section nous a permis de présenter les biocapteurs dans un cadre général et de les replacer dans les enjeux de la détection d'échantillons réels : ils fournissent des méthodes de détection versatiles, très sensibles, compatibles avec des milieux plus ou moins complexes et dans le cas des transducteurs optiques, sont faciles à utiliser et à interpréter. Ils semblent donc particulièrement adaptés à notre problématique.

c. Méthodes d'optimisation des biocapteurs

Un grand avantage des transducteurs optiques est leur compatibilité avec d'autres techniques d'amélioration de la détection. Dans cette section, nous allons voir quelles stratégies peuvent être mises en place pour optimiser la détection des biocapteurs, et en particulier des biocapteurs optiques.

Dans le cas des biocapteurs reposant sur la détection sur une surface sensible, les améliorations des performances de biocapteurs reposent principalement sur trois stratégies : augmenter la probabilité de contact entre cibles et surface sensible, optimiser les sondes pour diminuer le bruit de mesure ou augmenter le signal, ou améliorer la sensibilité du transducteur.

Pour augmenter la probabilité de rencontre avec la surface sensible, une agitation mécanique est envisageable. En effet, les phénomènes régissant la probabilité de rencontre entre cible et surface sont la diffusion, la gravité, et la convection. Par exemple l'utilisation d'un flux comme phénomène de convection active peut fortement favoriser la rencontre avec la surface.

D'autres techniques pour confiner les cibles en surfaces ont montré leur efficacité comme l'utilisation de systèmes microfluidiques [78]–[80], ou de l'électrophorèse [81]. L'utilisation de la chimiotaxie des bactéries pour les attirer en surface grâce à un gradient de nutriment a également été envisagée [82].

La seconde stratégie a donné lieu à de nombreuses recherches d'optimisations sur la nature des cibles utilisées [83] et sur les voies chimiques utilisées pour effectuer la fonctionnalisation des surfaces sensibles [84]–[87].

Pour la troisième stratégie, les études d'optimisation ont principalement porté sur l'augmentation des performances du transducteur [88], sur le marquage des cibles par le biais de molécules secondaires non intrusives [89], ou sur l'amplification chimique de la réponse [90].

Ce qui est particulièrement intéressant concernant ces différentes optimisations est qu'elles sont compatibles entre elles et avec les biocapteurs optiques. Il est donc possible d'optimiser indépendamment différents aspects du biocapteur pour envisager une combinaison des optimisations dans un second temps. **Dans ce projet, nous nous sommes focalisés sur une nouvelle stratégie d'optimisation, basée sur l'utilisation d'une résolution améliorée pour permettre de passer d'une réponse collective à une réponse par évènement bactérien individuel présent sur la surface du biocapteur.**

Cette technique d'imagerie plus précise de la surface du biocapteur nous a également menés à considérer notre système pour des applications non plus dans la détection et l'identification de bactéries mais dans l'étude plus fondamentale du comportement bactérien en interaction avec les surfaces. Un tour d'horizon des techniques disponibles dans ce domaine est donc à effectuer pour positionner notre système.

1.3 Méthodes d'étude du comportement en surface

Les techniques d'études du comportement bactérien sont nombreuses et variées. Dans cette partie nous allons nous restreindre aux techniques portant sur l'étude du

mouvement bactérien à proximité des interfaces et de l'adhésion bactérienne sur des surfaces fonctionnalisées chimiquement.

Les bactéries sont en général peu enclines à rester à l'état planctonique, c'est-à-dire en flottaison libre dans un liquide. En présence de surfaces, elles ont tendance à se fixer à celles-ci pour former des communautés multicellulaires plus ou moins complexes appelées des biofilms. Ce type de formation confère entre autres une protection et une meilleure gestion des ressources pour les organismes qui en font partie [91]–[93]. Comme la communauté est plus résistante, elle est plus difficile à éliminer, ce qui cause des problèmes industriels (obturation de conduits) [94] et sanitaires (résistance aux nettoyages bactéricides) [25] importants. Les biofilms font donc l'objet de nombreuses recherches pour étudier leurs mécanismes de formation et définir des stratégies pour empêcher leurs formations [95], [96]. La restriction que nous nous sommes fixés sur la bibliographie n'en est donc pas réellement une devant la richesse des travaux disponibles sur la formation et la prévention des biofilms. Le nombre de publication concernant les biofilms a plus que quadruplé en l'espace de 10 ans au début des années 2000, passant de moins de 200 à plus de 800 publications par an [91].

Les techniques que nous allons voir dans cette section sont en réalité assez semblables aux méthodes dont nous avons discuté précédemment en détection et identification de bactéries, car les stratégies d'études restent les mêmes.

Les études concernant les facteurs influençant la formation des biofilms peuvent être divisées en deux groupes. Certaines études quantifient l'effet à moyen terme d'une modification chimique de la surface ou génétique des bactéries sur la propension de certaines souches à former des biofilms sur des surfaces particulières. L'analyse s'effectue ensuite sur le biofilm formé (ou non) au bout de plusieurs heures voire plusieurs jours. Nous allons utiliser le terme d'analyses « en point final » pour ce type d'expériences, car il ne s'agit pas de visualiser en direct la formation du biofilm, mais d'observer indirectement l'effet de certains paramètres sur sa formation.

Le deuxième type d'étude, que nous appellerons « cinétiques » s'attache à étudier en temps réel les premières étapes d'adhésion des bactéries aux surfaces, ou leur interaction avec celle-ci.

1.3.1 Méthodes d'étude en point final

Les analyses en point final ont généralement en commun de devoir perturber l'intégrité du biofilm pour effectuer les mesures ou les observations. La perturbation peut être le séchage de l'échantillon pour observation dans le cas de l'observation en microscopie à force atomique (AFM) [97] ou en microscope électronique à balayage [98], [99] (MEB). Il peut s'agir de destruction de l'échantillon pour extraire le matériel génétique dans le cas des analyses de type PCR [100], ou de perturbation par mise en contact avec

des marqueurs pour être observé en fluorescence [99], [101]. La partie fixée en surface peut aussi être remise en suspension pour être quantifiée par densité optique [99], [102]–[104].

Ces techniques permettent d'évaluer les paramètres ayant une influence sur la capacité des bactéries à s'organiser en biofilm. Parmi les études disponibles, nous pouvons citer la mise en évidence de l'importance des pili et des flagelles dans l'adhésion aux surface [46], [105], [106], l'importance de la sécrétion d'alginate [107] et la manière dont celle-ci est régulée [108] lors de la formation de biofilms par *Pseudomonas aeruginosa*, ou encore l'impact de la structuration de la surface sur la capacité des bactéries à s'agréger [97], [99].

Les études de la variation d'expressions de différents gènes à différents moments de la formation des biofilms a également permis de mettre en évidence différentes voies métaboliques impliquées lors de la formation des biofilms, grâce à la PCR [100].

Les méthodes d'étude en point final ont l'avantage d'être quantitatives, mais elles ne sont pas pertinentes pour étudier en continu les phénomènes étudiés.

1.3.2 Méthodes d'études cinétiques

Les méthodes d'études cinétiques, à l'opposé, consistent à imager en temps réel la proximité de l'interface pour étudier le comportement des bactéries. Ces techniques reposent donc sur des dispositifs d'imagerie, et plus précisément majoritairement à des systèmes de microscopie.

Ces techniques sont utilisées à la fois dans le domaine de la recherche en microbiologie pour comprendre le comportement bactérien, mais également dans certains domaines de la physique où les bactéries sont utilisées comme modèles de micronageurs [109], [110].

Les dispositifs de microscopie classiques et en temps réel fonctionnent dans la majorité des cas avec des échantillons de faible épaisseur et partiellement transparents car ils fonctionnent en transmission [111], [112], [108].

Des techniques de microscopie en réflexion sont également utilisées, comme la microscopie de contraste d'interférence en réflexion pour évaluer qualitativement la distance entre bactéries et surface [113], ou la réponse à un traitement chimique de bactéries situées à proximité d'une surface [114].

Finalement, d'autres techniques d'imagerie en réflexion reposent sur l'interaction entre un champ évanescent et la solution testée. Ces méthodes ont une profondeur de champ faible de quelques centaines de nanomètres, sont très sensibles à la distance entre les objets imagés et l'interface où prend naissance l'onde évanescente, elles permettent donc également de tirer des conclusions quant aux distances auxquelles se situent les bactéries. C'est le cas de la microscopie de fluorescence en réflexion totale interne [115], [116].

La possibilité d'observer la proximité de la surface et d'avoir une bonne sensibilité à la distance relative entre les objets étudiés et l'interface est très avantageuse pour l'étude du comportement bactérien et des prémisses de la formation des biofilms. En effet ce type de méthode permet de n'observer que les bactéries suffisamment proches de la surface pour être en interaction avec celle-ci, et fournit une évaluation de l'éloignement relatif à l'interface, ce qui est important pour comprendre leur comportement et leur mécanisme d'interaction avec la surface.

Une autre technique d'imagerie repose également sur l'interaction avec un champ évanescent : l'imagerie de résonance des plasmons de surface (SPRI). Pourtant, à notre connaissance, cette technique n'a jamais été utilisée pour évaluer des distances relatives entre des objets et une interface. Des travaux portant sur l'étude de l'établissement de biofilms d'*E. coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* sur une surface d'or en imagerie SPR sont disponibles [117], mais ceux-ci fournissent une étude globale de la formation d'un biofilm en 6h et du retrait d'un biofilm établi par rinçage de manière qualitative. L'absence d'étude évaluant les distances entre surfaces et objets basées sur la SPRI sont vraisemblablement dues au fait que ce type de système est limité en résolution et ne permet généralement pas l'observation d'individus uniques aisément.

La mise en contexte que nous avons effectuée dans ce chapitre nous a permis de montrer l'importance de la détection et de l'identification des bactéries pathogènes, et de l'étude du comportement bactérien proche des surfaces. Les techniques de détection commerciales actuelles nécessitent un délai important qui peut être délétère pour le patient ou le consommateur. Pour pallier ce problème, des méthodes alternatives ont été développées, menant en particulier à l'essor des biocapteurs. Parmi ceux-ci, les techniques basées sur une transduction optique, tels que biocapteurs SPR, sont particulièrement attrayantes car elles peuvent être de petite taille, sensibles, faciles d'utilisation, versatiles, et compatibles avec de nombreuses optimisations. Au sein des méthodes d'étude du comportement bactérien proche des surfaces, les techniques d'imagerie basées sur la réflexion totale interne et l'utilisation d'un champ évanescent fournissent des informations ciblées sur les objets d'intérêt.

Dans ces travaux, nous avons donc développé un système d'imagerie SPR optimisé en résolution pour des applications en microbiologie. De nombreux systèmes basés sur le phénomène de SPR existent, et sont utilisés dans des applications en microbiologie. Cependant, très peu de systèmes présentant une résolution optimisée ont démontré leur capacité à détecter et identifier des bactéries. Une première partie du travail effectué a donc porté sur l'adaptation d'un système existant pour le rendre pertinent en microbiologie. Dans le prochain chapitre, nous allons donc nous intéresser aux systèmes basés sur le phénomène de SPR et sur la mise en place de notre système.

2 MISE EN PLACE DE LA SPRI OPTIMISEE EN RESOLUTION POUR L'UTILISATION EN MICROBIOLOGIE

Afin de positionner les biocapteurs SPR parmi les différentes méthodes que nous avons vues dans le chapitre précédent, et de comprendre son intérêt à la vue des critères d'évaluation que nous avons mis en évidence, il est maintenant nécessaire de discuter de la technique sur laquelle s'établit le travail effectué.

Dans cette partie, nous allons donc étudier les bases de la théorie de la SPR afin de comprendre les nuances entre les différents dispositifs reposant sur le phénomène de résonance de plasmons de surface. Cela va nous permettre de justifier les choix effectués dans le montage utilisé qui sera ensuite présenté en seconde moitié du chapitre.

2.1 État de l'art de la SPRI en microbiologie

2.1.1 Qu'est-ce qu'un biocapteur SPR et comment différencier les détecteurs SPR ?

a. Théorie du phénomène de résonance des plasmons de surface (SPR)

Une explication très détaillée de la théorie de la SPR, qui repose sur les lois de l'électromagnétisme appliquées à une interface entre un métal et un diélectrique, peut être facilement trouvée dans la littérature [118], [119]. Ce paragraphe se propose plutôt de fournir des bases de compréhension du phénomène de résonance des plasmons de surface afin d'introduire les grandeurs qui seront utilisées dans la suite, et d'expliquer les notions qui seront importantes dans les prochains paragraphes pour comprendre les différents choix effectués au cours du projet.

La résonance des plasmons de surface est un phénomène qui se produit à l'interface entre un métal et un milieu diélectrique, tel que l'eau. Il s'agit d'un couplage entre une onde incidente polarisée linéairement avec un champ magnétique orthogonal à la surface (on parle de polarisation transverse-magnétique, TM) et les électrons de conduction du métal.

On considère donc (Figure 2.1, page suivante) une interface infinie entre un métal et un diélectrique selon le plan $(0, \vec{u}_x, \vec{u}_y)$. On définit également une onde incidente qui se propage selon \vec{u}_x . Les propriétés de l'interface étant invariantes selon \vec{u}_x et \vec{u}_y , l'amplitude de l'onde qui se propage à l'interface ne dépend pas de x et y , et celle-ci peut donc s'exprimer :

$$\overrightarrow{E}(x, y, z, t) = \overrightarrow{E}(z) \exp(i[k_x x - \omega t])$$

où k_x est le vecteur d'onde incident et $\omega = \frac{2\pi c}{\lambda}$ est la pulsation de l'onde.

Le phénomène de résonance est observé lorsque le vecteur d'onde k_x du faisceau incident, est égal au vecteur d'onde k_{SPR} caractéristique des plasmons de surface. Ce vecteur dépend directement des permittivités $\epsilon_{m\acute{e}tal}$ et $\epsilon_{di\acute{e}lectrique}$ des deux milieux en présence selon l'équation suivante :

$$k_{SPR} = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \text{Re} \left(\sqrt{\frac{\epsilon_{m\acute{e}tal} \cdot \epsilon_{di\acute{e}lectrique}}{\epsilon_{m\acute{e}tal} + \epsilon_{di\acute{e}lectrique}}} \right) \text{ (éq. 2.1)}$$

Dans ces conditions, l'énergie incidente est transmise aux électrons libres du métal au lieu d'être réfléchi, ces électrons oscillent alors de manière collective, et cette excitation se développe le long de l'interface selon la direction de propagation \vec{u}_x . Cela induit la création d'une onde évanescente à l'interface des deux milieux : on parle de plasmon propagatif. Cette onde évanescente se crée à l'interface entre le métal et le diélectrique, et son amplitude décroît exponentiellement en s'enfonçant dans le diélectrique sur une longueur caractéristique $L_{p\acute{e}n\acute{e}t\acute{r}ation}$ (direction \vec{u}_z sur la Figure 2.1).

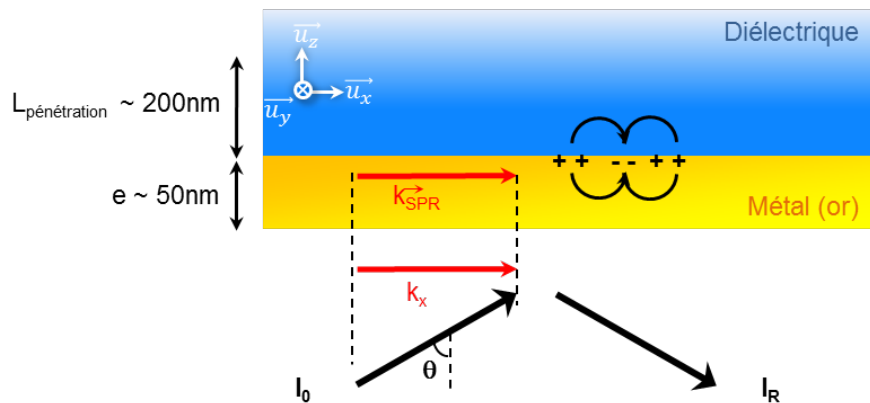


Figure 2.1 Principe de la résonance des plasmons de surface et positionnement de la théorie

La biodétection plasmonique repose sur l'extrême sensibilité de cette onde évanescente à toute fixation de matériel biologique à la surface de l'or. En effet, les conditions de couplages sur le vecteur d'onde sont fortement dépendantes des permittivités diélectriques du milieu diélectrique (voir éq. 2.1) et donc de l'indice de réfraction. L'adsorption de molécules cibles au niveau de l'interface entraîne une modification des propriétés optiques de la solution (c'est-à-dire du milieu diélectrique) au voisinage de la surface, suffisante pour pouvoir perturber le couplage plasmon de façon détectable. On parle ainsi de capteur SPR, car il y a transduction d'un signal chimique (accroche de molécule en surface) en un signal optique mesurable.

Plusieurs grandeurs d'intérêts peuvent être définies pour caractériser le phénomène de résonance de plasmon de surface. L'aspect propagatif du phénomène est quantifié par la distance de propagation du plasmon ($L_{propagation}$), tandis que la pénétration de l'onde évanescente dans le diélectrique est définie par la profondeur de pénétration dans le diélectrique ($L_{p\acute{e}n\acute{e}t\acute{r}ation}$), aussi appelée épaisseur de peau dans la solution. Une profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans le métal peut également être définie, mais cette grandeur n'est pas utile dans notre projet. Dans la suite, la notation $L_{p\acute{e}n\acute{e}t\acute{r}ation}$

fera donc référence à la profondeur de pénétration dans le diélectrique, et toute référence à une épaisseur de peau fera implicitement référence à l'épaisseur de peau de l'onde évanescente dans la solution.

Les deux paramètres d'intérêt, $L_{propagation}$ et $L_{pénétration}$ sont définis en fonction des différentes caractéristiques du métal et du diélectrique selon les deux expressions ci-dessous :

$$L_{pénétration} = \frac{\lambda}{4\pi} \left[\text{Im} \left(\sqrt{\frac{\epsilon_d^2}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right) \right]^{-1} \quad (\text{éq. 2.2}) \quad L_{propagation} = \frac{\lambda}{4\pi} \left[\text{Im} \left(\sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right) \right]^{-1} \quad (\text{éq. 2.3})$$

Ces deux formules montrent que les deux grandeurs sont directement fonction de la longueur d'onde d'illumination. Cependant, étant donné que les permittivités des deux milieux dépendent également de la longueur d'onde d'illumination, la relation entre $L_{pénétration}$ ou $L_{propagation}$ et la longueur d'onde n'est pas exactement linéaire. Les Figure 2.2 a et Figure 2.2 b représentent respectivement la variation de la profondeur de pénétration et de la distance de propagation en fonction de la longueur d'illumination, en prenant pour diélectrique l'eau. Les valeurs de permittivité utilisées sont issues de [120] pour l'eau et de [121] pour les données concernant l'or.

Sur la Figure 2.2 b, deux distances de propagations sont représentées, correspondant au cas théorique d'épaisseur de métal semi-infini (L_{∞}) et au cas épaisseur finie de 50 nm (L_{50nm}) qui correspond au cas expérimental. Cette seconde courbe a été tracée en utilisant une modélisation proposée par L. Laplatine [9].

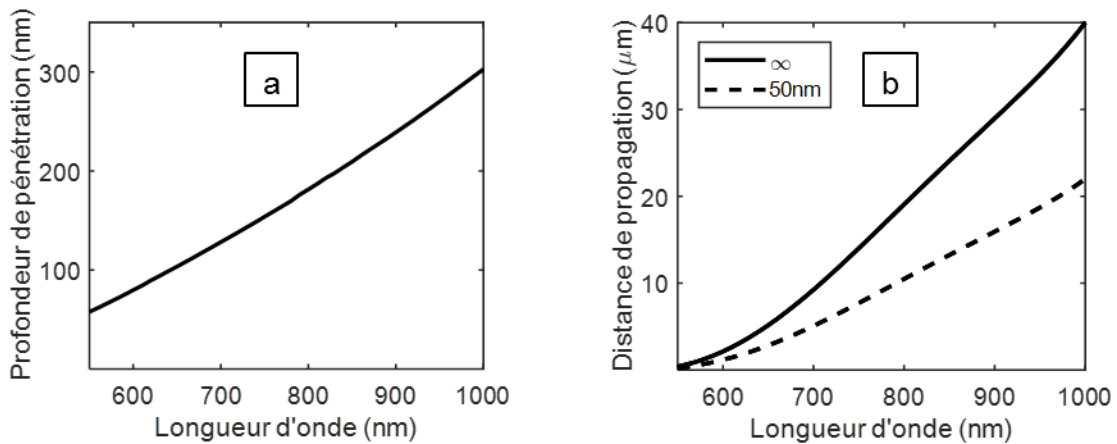


Figure 2.2 Dépendance des paramètres d'intérêt en fonction de la longueur d'onde pour une interface or/eau :
a. Profondeur de pénétration dans le diélectrique
b. Distance de propagation de l'onde plasmon pour une épaisseur infinie et une épaisseur finie de 50 nm

La profondeur de pénétration a des valeurs de l'ordre de quelques centaines de nanomètres, et est multipliée par deux entre une illumination à 625 nm (~100 nm) et une illumination à 825 nm (~200 nm). Cette grandeur a son intérêt, car elle permet d'évaluer jusqu'à quelle distance de l'interface le phénomène plasmon est sensible. Ainsi, s'il y a une modification des propriétés optiques du diélectrique à une distance supérieure à l'épaisseur

de peau, le plasmon ne sera pas impacté et la modification ne sera pas détectée ; à l’opposé, si ces variations ont lieu dans une zone située dans cette épaisseur de peau, le plasmon sera modifié et ce changement pourra être détecté.

La distance de propagation est une caractéristique importante également, car elle permet d’évaluer quelle est la taille théorique minimale d’une zone où la résonance plasmon est observable, dans la direction de propagation. En effet, quelle que soit la technique qui sera utilisée pour observer le phénomène de SPR, si le transducteur utilisé est composé d’une surface d’or plane d’une épaisseur d’environ 50 nm, il est d’ores et déjà possible d’affirmer que la résolution dans le sens de propagation sera supérieure ou égale à la distance de propagation. La distance de propagation est toujours plus faible pour une couche mince de métal que pour un milieu semi-infini, et ce d’un facteur proche de 2. Pour le cas réel, avec une source lumineuse qui émet dans le visible et donc en dessous de 800 nm, on pourra donc s’attendre à avoir une résolution de l’ordre de quelques micromètres (entre 5 μm et 10 μm selon la longueur d’onde).

La profondeur de pénétration et la distance de propagation permettent donc de caractériser les plasmons. Ceux-ci n’existent que si l’on parvient à exciter les électrons du métal avec la lumière incidente. Plusieurs manières d’effectuer ce couplage existent.

b. Différents types de couplage SPR

Comme nous l’avons vu dans le paragraphe précédent, la résonance a lieu si l’on parvient à vérifier les conditions de couplage, c’est-à-dire si l’on parvient à avoir $k_x = \frac{2\pi}{\lambda} = k_{SPR}$.

Sur la Figure 2.3.a, page suivante, est représentée en rouge la relation de dispersion ($\omega = f(k)$) qui doit être vérifiée pour avoir résonance plasmonique. Ce graphique montre qu’une illumination directe (ligne noire sur la Figure 2.3, définie par l’équation $k_x = \frac{\omega}{c}$) ne peut pas donner lieu à un couplage plasmon, car il n’y a jamais intersection entre la courbe de dispersion en illumination directe et la courbe de résonance. Par conséquent des stratégies ont été développées pour réaliser un tel couplage.

Plus précisément, deux solutions sont utilisées : l’excitation à travers le métal via un milieu d’indice élevé (courbe verte), et l’excitation par un réseau de diffraction (courbe bleue).

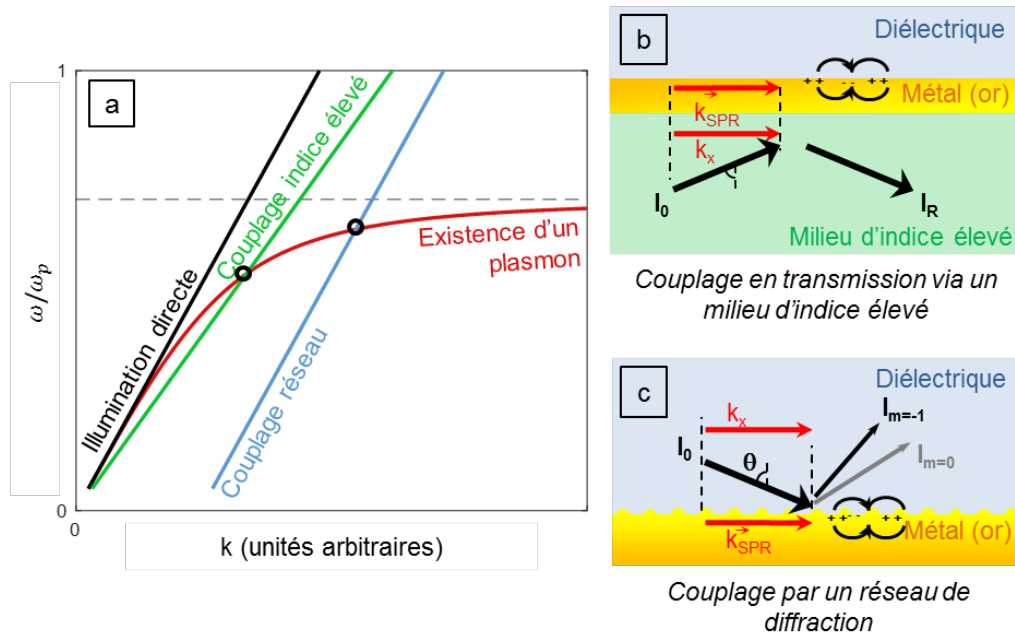


Figure 2.3 Différentes techniques de couplage permettant d'obtenir une résonance de plasmons de surface

- a. Relation de dispersion selon les différentes techniques de couplage**
- b. Principe du couplage en transmission via un milieu d'indice élevé**
- c. Principe du couplage par réseau de diffraction**

Le couplage à travers le métal via un milieu d'indice élevé revient à utiliser un milieu d'indice de réfraction plus important que celui du diélectrique sondé comme milieu incident (Figure 2.3.b). Analytiquement, l'utilisation d'un milieu d'indice élevé se traduit par une modification du vecteur d'onde incident qui dépend de l'angle d'incidence (θ) et de l'indice de réfraction du milieu utilisé (n_p) selon la relation : $k_x = \frac{\omega}{c} n_p \sin(\theta)$. Graphiquement, cela se traduit donc par un abaissement de la courbe $\omega = f(k_x)$ qui permet à la courbe d'avoir une intersection avec la courbe de résonance (point entouré en noir sur la Figure 2.3). Cette méthode de couplage est communément appelée configuration de Kretschmann et a été découverte indépendamment par Otto[122] et par Kretschmann et Raether [123].

L'utilisation d'un réseau de diffraction (Figure 2.3.c) pour le couplage se traduit, si les cavités du réseau sont orientées perpendiculairement à la surface, par une modification du vecteur d'onde selon l'équation : $k'_{xm} = k_x + m \frac{2\pi}{a}$, où a est le pas du réseau et m est un entier. Ce vecteur incident modifié a les mêmes propriétés dispersives que le vecteur d'onde initial. Graphiquement, cela se traduit donc par une translation de la courbe de dispersion vers des k supérieurs.

Ces deux solutions, couplage par utilisation de milieu d'indice élevé ou par réseau de diffraction, sont utilisées pour réaliser des détecteurs basés sur la SPR, mais la configuration de Kretschmann est de loin la plus utilisée. En effet, si le couplage par réseau de diffraction est parfois choisi pour la facilité de production et le bas coût de la biopuce [124], le couplage par utilisation de milieu d'indice élevé offre une bien meilleure sensibilité [125], est plus flexible dans son utilisation et donc plus propice aux optimisations [126].

Enfin, et surtout, l'utilisation d'un réseau de diffraction est peu adaptée aux techniques d'imagerie. Dans la littérature, seul un exemple de biodétection utilisant explicitement l'imagerie SPR basée sur réseau de diffraction a été trouvé [124]. Dans les autres cas, la SPR sur réseau de diffraction est utilisée pour effectuer des mesures en parallèle sur différents points de mesures discrets sur la surface de la biopuce [11] – [13], on ne peut donc pas véritablement parler d'imagerie.

Dans notre projet, l'objectif est de réaliser un outil d'imagerie adapté à la détection et à l'étude, nous allons donc à partir de maintenant nous focaliser sur le couplage à travers le métal grâce un milieu d'indice élevé. Cependant, il peut être intéressant de noter que les stratégies de détection que nous allons voir pour ce cas particulier sont également utilisées pour les systèmes SPR à réseau.

c. Différents types d'imageurs SPR

Nous avons vu précédemment que la lumière incidente doit traverser un milieu d'indice élevé avant d'arriver à l'interface or/diélectrique, et que la mesure effectuée consiste à collecter la lumière réfléchi à l'interface. De manière générale, l'imagerie SPR consiste à faire l'image du plan de l'interface sur le capteur d'une caméra. Cependant, selon les optimisations visées, différentes stratégies ont été mises en place pour répondre au besoin d'utiliser un milieu d'indice élevé pour remplir les conditions de couplage. Nous présentons sur la page suivant en Figure 2.4 les différentes stratégies sous forme de schéma de fonctionnement.

Il existe principalement deux types d'imagerie SPR à milieu incident d'indice élevé : l'imagerie SPR à prisme et l'imagerie SPR à objectif de microscope, que l'on va dès à présent appeler microscopie SPR par souci de simplicité. Dans les imageurs SPR basés sur l'utilisation d'un prisme, nous allons distinguer deux cas particuliers de prismes : les prismes optimisés en champs (OC) et les prismes optimisés en résolution (OR).

Pour les imageries à prisme, les optimisations sont réalisées en prenant comme hypothèse que les solutions sondées ont des caractéristiques proches de celle de l'eau. Les conditions de résonance plasmon sont donc celles de la résonance dans l'eau.

L'imagerie SPR à prisme OC est optimisée pour obtenir une image de l'échantillon la plus homogène possible, en termes de résolution. C'est pour cette raison que le prisme est conçu de sorte que le faisceau en sortie du prisme soit orthogonal au plan image (plan en rouge pointillé sur la Figure 2.4.a), et que la caméra soit elle-même orthogonale à cet axe optique. C'est ce type d'optimisation qui est utilisé dans certains appareils commerciaux tels que l'appareil OpenPlex commercialisé par Horiba Jobin Yvon.

L'imagerie à prisme OR (Figure 2.4.b.) est réalisée pour minimiser les aberrations géométriques. Le prisme est donc conçu pour que le faisceau en sortie soit orthogonal à la face de sortie du prisme. Les faisceaux d'entrée et de sortie du prisme sont ainsi en incidence normale. Cette optimisation implique que la caméra, fixée orthogonale à l'axe optique, n'est pas orthogonale au plan image. Il faut donc déplacer la caméra

longitudinalement le long de l'axe optique pour prendre plusieurs images partielles du plan image, puis reconstruire l'image.

La microscopie SPR (Figure 2.4.c) consiste à focaliser le faisceau incident dans le plan focal arrière d'un objectif de microscope à immersion de forte ouverture numérique. Le substrat est ainsi illuminé par un faisceau collimaté d'angle déterminé par la distance à l'axe optique du faisceau incident. On limite ainsi les aberrations optiques et on obtient directement une image du plan sondé avec la caméra.

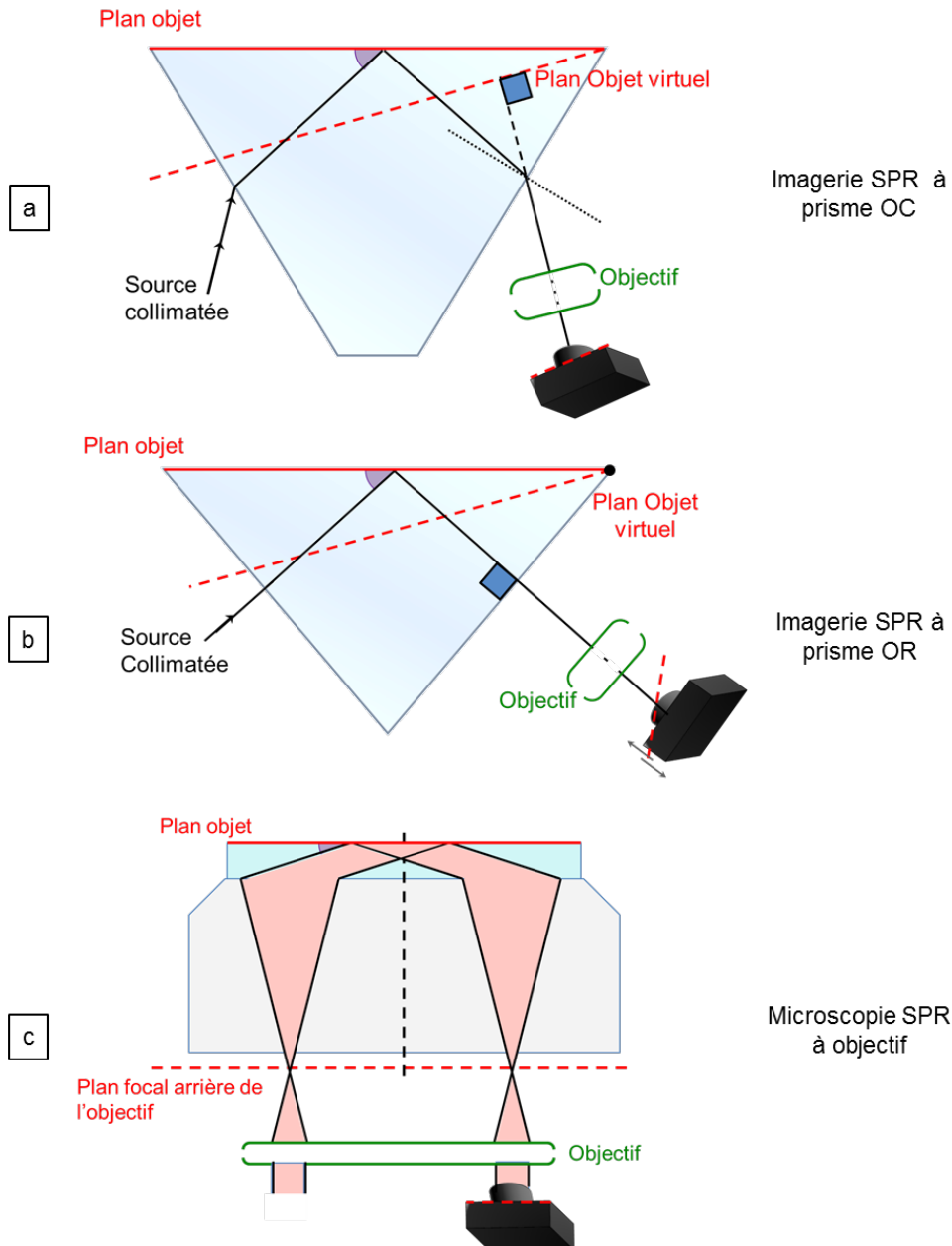


Figure 2.4 Différents types d'imageur SPR à milieu d'indice élevé

Les caractéristiques des différentes techniques d'imagerie SPR sont à étudier selon trois critères principaux : la taille du champ d'observation, la présence d'aberrations, et le besoin de post-traitement de reconstruction. **Un système SPR idéal combinerait à la fois un grand champ, une haute résolution et de l'imagerie en temps réel.**

Le grand champ est possible si le système d'imagerie a un grossissement modéré. Cette information est intuitive : si le grossissement est important, la taille du champ collecté par les pixels est faible. Avec des grossissements inférieurs à 20X, les systèmes d'imagerie à prisme sont considérés comme des systèmes « grand champ ». En revanche, l'utilisation d'objectifs de microscope à grande ouverture numérique ($NA > 1,4$) oblige à travailler à grand grossissement donc la microscopie SPR a un champ d'une centaine de micromètres seulement.

La haute résolution est possible si le grossissement utilisé est suffisant pour que la résolution ne soit pas limitée par la taille des pixels, et si les aberrations optiques sont limitées, ce qui signifie que l'axe optique du système doit être perpendiculaire aux dioptries. C'est le cas en microscopie SPR grâce à l'utilisation de l'objectif de microscope de fort grossissement pour vérifier les conditions de couplage. C'est également le cas de l'imagerie à prisme OR, car le prisme OR est construit pour avoir un axe optique orthogonal aux dioptries d'entrée et de sortie du faisceau de lumière [9] (Figure 2.5.b), et le grossissement utilisé est au minimum de 10X. En revanche, l'imagerie SPR à prisme OC est optimisée pour obtenir un axe optique de sortie orthogonal au plan image, les rayons de sortie ne sont donc pas orthogonaux à la face du prisme (Figure 2.5.a), et des aberrations optiques sont présentes [9]. De plus, ce type de système est utilisé pour des analyses globales, donc le grossissement ne dépasse pas les 5X.

Enfin, le temps réel est possible si l'image obtenue directement ne nécessite pas de reconstruction. C'est le cas de l'imagerie SPR à prisme OC, car le prisme est optimisé pour avoir un axe optique de sortie orthogonal au plan objet, et ainsi la caméra capture directement le plan image. En revanche, comme le prisme OR est optimisé par rapport aux aberrations, l'axe optique n'est pas orthogonal au plan objet ni au plan image, et donc la caméra ne se situe pas dans le plan image. Elle doit donc balayer ce plan. Les images prises pendant le balayage vont ensuite permettre la reconstruction du plan image. Ce mécanisme est automatisable, et il est possible de remplacer le déplacement mécanique de l'ensemble par un objectif réglable en focalisation. Cependant à l'heure actuelle, la reconstruction se réalise après les expériences.

Ces éclaircissements nous permettent donc de justifier à posteriori l'utilisation de « microscopie » SPR en opposition à « imagerie » SPR pour qualifier respectivement l'imagerie SPR à objectif de microscope et l'imagerie SPR à prisme OR qui a un champ plus large. Cette distinction d'appellation sera conservée dans la suite. Le tableau page suivante présente les performances des trois types d'imagerie SPR (ou SPRI).

Type d'imagerie	Champs	Résolution	Temps réel
à prisme OC	1 cm ² [130], [131]	> 13 μm (taille d'un pixel)	Oui
Microscopie SPR	230 μm x 170 μm [10]	2 x 5 μm à 632nm [132]	Oui
à prisme OR	1,5 x 1 mm [9]	1,7 x 2,8 μm à 632nm[9]	Reconstruction

Tableau 2.1 Performances comparées des différentes imageries SPR d'intérêt

Pour la SPRI à prisme OR, la résolution dépend de la distance parcourue dans le prisme entre le plan objet et la caméra, et est donc optimale lorsqu'on image l'extrémité du prisme côté face de sortie (point noir sur la Figure 2.4.b). C'est à proximité de cette extrémité qu'est évaluée la résolution.

Concrètement, ces trois techniques ont été utilisées afin d'imager différents types de cellules eucaryotes, ce qui nous permet de présenter Figure 2.5 une comparaison des trois techniques [9], [133]–[135].

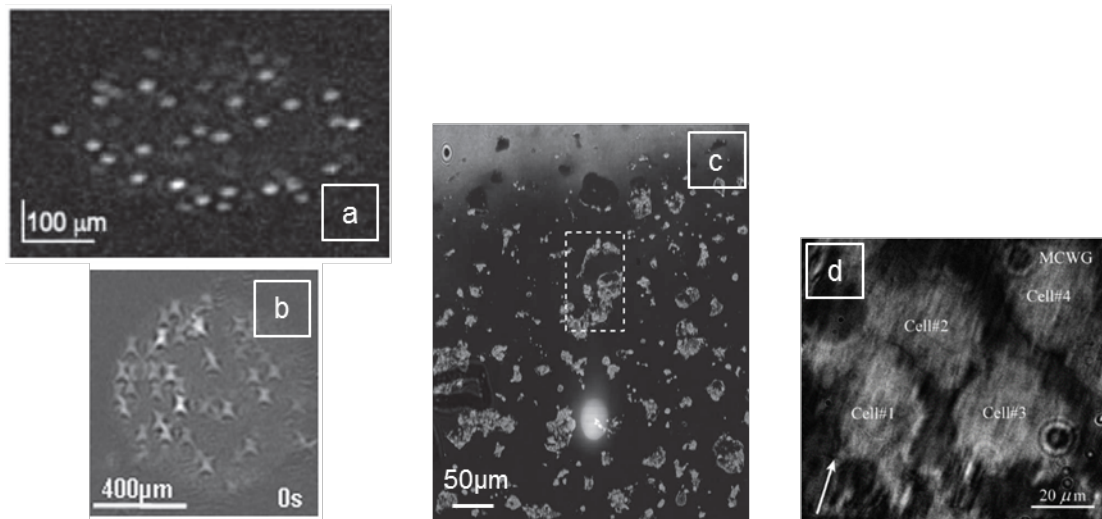


Figure 2.5 Comparaison des trois types d'imagerie SPR
a. Images SPR à prisme OC différentielle zoomé sur un plot d'anticorps anti CD19 sur lequel sont fixées des cellules LS102.9 [133]
b. Lymphocytes B individuels sur un plot d'ADN vus en SPRI à prisme OC [134]
c. Cellules adhérentes individuelles prises en SPRI à prisme OR [9]
d. Cellules HEK-293 prises en microscopie SPR sur substrat de type guide d'onde à recouvrement métallique [135]

Sur les Figure 2.5 a et b, qui sont des zooms d'une image SPRI à prisme OC plus large, on peut observer les aberrations géométriques induites par le prisme non optimisé pour la résolution. Ici les distorsions sont telles que l'anisotropie de résolution due à la propagation du plasmon n'est pas visible.

La Figure 2.5.c présente un champ de plusieurs centaines de micromètres, sans aberration optique visible, et une limite de résolution de quelques micromètres. La dernière

image (Figure 2.5.d) présente une résolution améliorée, due à l'utilisation d'une biopuce SPR particulière de type guide d'onde à recouvrement métallique (MCWG en anglais pour « Metalclade Waveguide »), mais un champ d'observation plus faible d'une centaine de micromètres.

Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons l'appellation imagerie SPR « classique » pour parler de toutes les techniques de SPRI à prisme utilisant un prisme autre que qu'un prisme optimisé en résolution.

d. Différentes stratégies de détection en imagerie SPR

Dans le paragraphe 2.1.1 a, nous avons vu que le principe de la détection SPR consiste à mesurer l'effet de l'accroche de cibles à la surface sur la résonance plasmonique. Pour reprendre les termes des biocapteurs évoqués dans la seconde partie du premier chapitre (1.2.3 a), la transduction par SPR consiste à traduire une accroche de molécules en surface par une variation de signal optique. Cette variation de signal optique peut être quantifiée par plusieurs grandeurs que nous allons voir dans ce paragraphe.

Pour un système donné, la résonance plasmonique peut être caractérisée par les conditions en angle et en longueur d'onde (θ, λ) pour lesquels le couplage plasmon est maximal. En champ lointain, lorsque le couplage est maximal, la quantité de lumière réfléchie est minimale et on mesure ainsi un minimum d'intensité réfléchie. On peut ainsi quantifier la modification de la résonance de trois manières. La première consiste à quantifier le décalage en longueur d'onde de la résonance à angle constant, on parle alors d'interrogation spectrale. La seconde revient à mesurer le décalage angulaire de la résonance à longueur constante, on parle alors d'interrogation angulaire. On peut enfin évaluer la variation de la quantité de lumière réfléchie pour un angle et une longueur d'onde donnés, on parle alors d'interrogation en réflectivité.

L'interrogation spectrale (Figure 2.6.a page suivante) consiste à utiliser une source de longueur d'onde variable pour effectuer un balayage spectral de l'échantillon afin de mesurer le décalage du minimum de réflectivité en réponse à l'accroche en surface d'espèce biologique. Cette méthode de détection offre la meilleure sensibilité à la fois théoriquement [10] et expérimentalement [136]. Cependant, le cout inhérent à l'utilisation d'une source à longueur d'onde variable de type monochromateur (plusieurs dizaines de milliers de dollars à l'achat) limite fortement les applications industrielles de ce type de détection. Il est intéressant de noter cependant que certaines alternatives existent, comme l'utilisation de plusieurs sources monochromatiques peu coûteuses pour effectuer un balayage spectral discret [137].

L'interrogation angulaire (Figure 2.6.b) est plus économique, car elle repose sur le balayage angulaire à longueur d'onde fixe et nécessite simplement l'utilisation de moteurs mécaniques (moins de 500 € pour un actuateur motorisé de laboratoire). Cette technique offre une sensibilité moins élevée que l'interrogation spectrale, mais est tout de même très utilisée pour de la détection à faible concentration [15], [16].

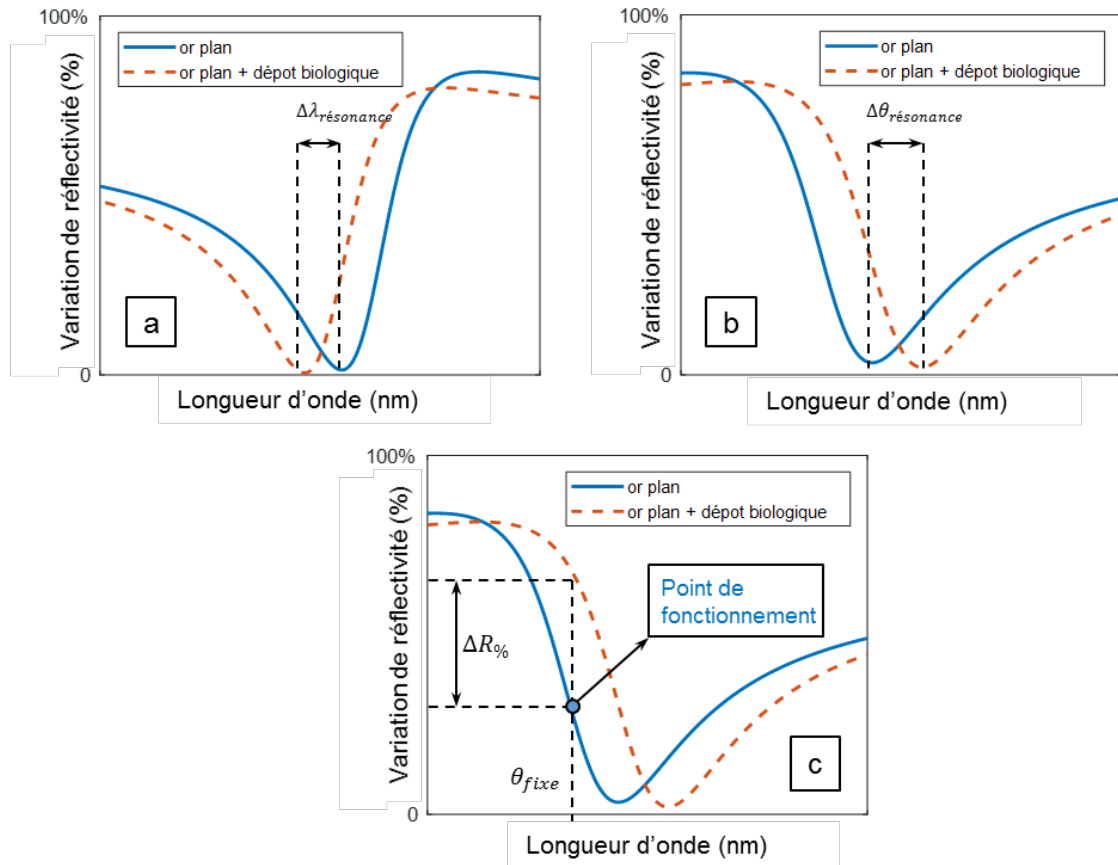


Figure 2.6 Principe de l'interrogation spectrale (a), de l'interrogation angulaire (b) et de l'interrogation en réflectivité (c)

Ces deux techniques sont souvent mises en place pour des mesures où une grande sensibilité aux variations du milieu est nécessaire, mais elles nécessitent un balayage angulaire ou en longueur d'onde pour chaque mesure effectuée, ce qui peut être fastidieux ou peut limiter la fréquence d'acquisition du système.

Une troisième technique est donc aussi très utilisée : l'interrogation en réflectivité (Figure 2.6.c). Travaillant à longueur d'onde et à angle constant, cette technique repose sur la mesure de la variation en réflectivité en réponse à une modification du voisinage de la surface. En se positionnant au point de pente maximale de la courbe de résonance plasmonique (appelé point de fonctionnement), il est possible de maximiser la réponse du système ($\Delta R_{\%}$) à une modification du milieu. Cette technique est donc la plus pratique à mettre en place, car elle ne nécessite aucun balayage une fois le réglage initial de positionnement effectué. Elle est cependant limitée en sensibilité et est donc plutôt utilisée pour la détection ou l'étude de particules de taille conséquente telles que des cellules ou des bactéries, contrairement aux deux premières techniques qui vont être utilisées pour la détection de molécules (protéines, ADN, etc.).

Les performances comparées des trois types de détections sont résumées dans le tableau ci-dessous à titre de conclusion de paragraphe.

Type d'interrogation	Sensibilité	Balayage	Cout	Linéarité	Dynamique
Spectrale	+++	Oui	+(+)	+	+
Angulaire	++	Oui	+	+	+
En réflectivité	+	Non	-	-	-

Tableau 2.2 Performances comparées des différents types d'interrogation

Cette section nous a donc permis de poser les bases de l'imagerie SPR et de mettre en évidence les nuances entre les différents types de couplage (à réseau ou à indice élevé), les différents types d'interrogation (spectrale, angulaire ou en réflectivité) et d'imagerie (à prisme optimisé en champs, à prisme optimisé en résolution, à objectif de microscope).

Ce cadre théorique général va nous permettre dans la suite de réaliser un état de l'art des différentes utilisations de la SPR(I) dans le domaine de la microbiologie.

2.1.2 Utilisation de la SPR(I) en microbiologie

L'état de l'art de l'utilisation de la SPR pour des applications en microbiologie peut être divisé en deux catégories, selon que les développements présentés par les auteurs portent plutôt sur des avancées en microbiologie ou plutôt sur une avancée technique. En effet, un système SPR commercial peut être utilisé en routine dans des laboratoires de recherche en microbiologie, ou bien le système SPR peut être ce sur quoi porte la recherche. Le projet développé dans ce manuscrit se situe dans la deuxième catégorie, mais il est intéressant de noter que la très grande majorité des publications qui traitent à la fois de SPR et de microbiologie appartiennent à la première catégorie, précisément car il s'agit d'un test de routine. Par conséquent, même si les travaux qui vont être présentés dans la suite sont plutôt à positionner par rapport aux autres développements techniques concernant la SPR, il semble essentiel d'avoir une vision des utilisations réelles de la SPR en routine en laboratoire de microbiologie afin d'avoir une certaine cohérence quant aux attentes des potentiels utilisateurs futurs. Cette section va donc à la fois porter sur les utilisations de la SPR pour faire des analyses en microbiologie et pour faire de la détection de bactéries.

a. Étude des mécanismes en microbiologie par estimation d'interactions moléculaires

Historiquement, les systèmes de SPR ont d'abord été développés pour l'étude d'interactions moléculaires. Aujourd'hui encore, les utilisations en laboratoires de systèmes SPR commerciaux tels que BIAcore™ de GE, OpenPlex™ d'HORIBA Scientific, ou bien Spreeta® sont encore très majoritairement utilisés dans cette application. Il est d'ailleurs

intéressant de noter que les lettres BIA du premier appareil cité signifient « Biomolecular Interaction Analysis ». La SPR est considérée dans le domaine pharmaceutique comme une référence (« gold standard » [140]) pour les mesures de constantes d'affinité dans le développement de médicaments. Une première partie des applications de la SPR à la microbiologie a donc porté sur l'analyse d'interactions moléculaires entre des molécules issues de bactéries et des espèces chimiques d'intérêt [141]–[143].

Le principe de l'étude d'interaction moléculaire en SPR consiste à immobiliser sur la biopuce d'or une molécule A (Figure 2.7, page suivante) et d'évaluer la variation du signal suite à l'injection d'une molécule B dont on souhaite étudier les affinités avec A.

Ainsi, une des plus vieilles études sur l'utilisation de la SPR pour des recherches en microbiologie publiée en 1994 consiste à analyser l'interaction entre des adhésines issues de bactéries pathogènes et des composants de la matrice extracellulaire des cellules, le collagène et la fibronectine [141] dans le but de comprendre le phénomène d'adhésion de bactéries pathogènes aux cellules hôtes. Ce type d'expérience est la transposition directe des évaluations d'interactions moléculaires dans le domaine spécifique de la microbiologie. Il est donc également basé sur la mesure des constantes d'interaction par l'analyse d'intensité du signal pour évaluer la spécificité. Ce type d'analyse est toujours très utilisé dans le domaine de la microbiologie [142], [143].

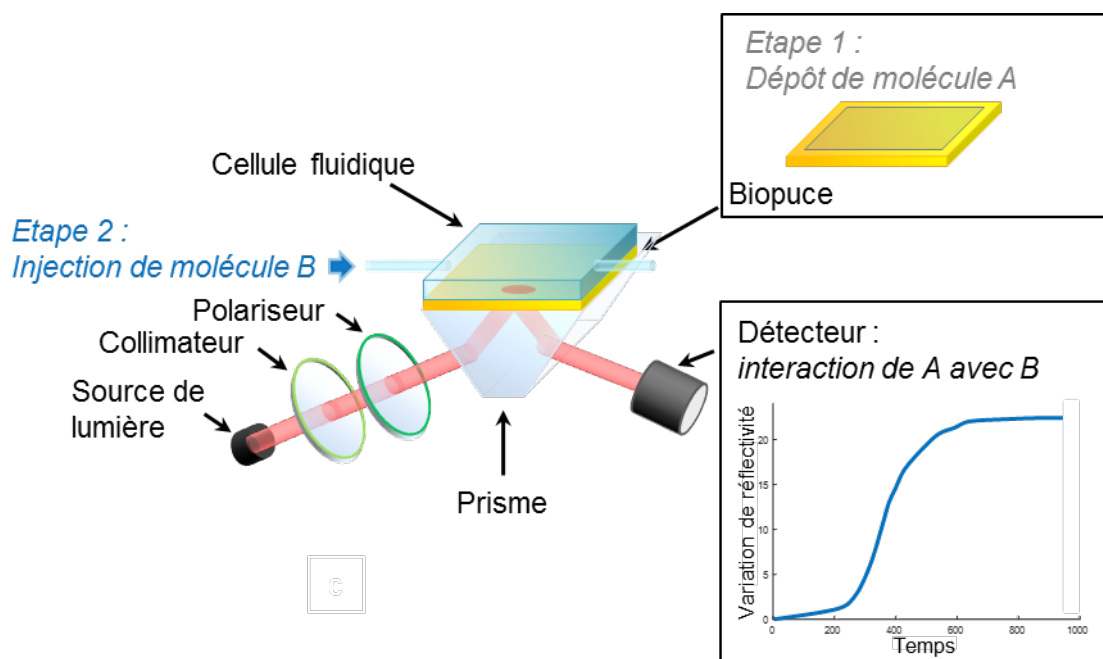


Figure 2.7 Principe de fonctionnement d'un système SPR à prisme

Un autre type d'analyse moléculaire tire profit de la sensibilité en surface du phénomène de SPR pour estimer l'effet de composants bactériens sur la cohésion d'un tapis de molécules cibles. On peut citer par exemple les travaux de Tun [144], qui évaluent la conséquence de l'injection de toxines issues de bactéries pathogènes sur certains composants de membranes des cellules cibles. Dans ce cas, la surface du biocapteur est recouverte d'une bicouche lipidique, composant principal des membranes cellulaires, et

cette surface est mise en contact avec différentes toxines. La SPR permet dans ce cas de différencier deux phénomènes distincts d'atteinte à la cohésion de la membrane lipidique : la création de pores dans la membrane lipidique correspond à une insertion de molécules dans la membrane, donc à une augmentation de la masse et ainsi à une augmentation du signal SPR, tandis que l'hydrolyse des lipides correspond à une perte de masse et à une baisse du signal SPR.

Ce type d'utilisation de la SPR pour l'étude de bactéries porte principalement sur les molécules membranaires, et une première étape consiste à obtenir les molécules d'intérêt par purification, puis à les immobiliser en surface de la puce pour évaluer leur interaction. L'étape d'obtention des molécules d'intérêt et de leur immobilisation peut être complexe, mais ce type d'étude permet d'avoir des réponses spécialisées sur l'effet des solutions testées sur les réactifs fixés et peut permettre d'identifier les acteurs des phénomènes analysés.

b. Étude d'interactions entre molécules d'intérêt et bactéries entières

Pour répondre à certaines problématiques, une étude aussi spécialisée que les analyses moléculaires n'est pas nécessaire. Dans ces situations, c'est la réponse de la bactérie dans sa globalité qui est intéressante.

Assez rapidement dans le développement des capteurs SPR, l'intérêt d'analyser des bactéries entières a été mis en évidence. Qu'il s'agisse d'estimer l'accroche de microorganismes à des surfaces spécifiques [145] ou, plus rare, d'évaluer l'effet d'actifs sur des bactéries immobilisées en surface [146], la littérature référence déjà des expériences en 1997.

Dans le cas plus courant d'expériences d'accroche de pathogènes à différentes surfaces spécifiques, la technique de SPR est utilisée pour quantifier une affinité actifs - bactéries et permet ainsi d'estimer la capacité d'adhésion des microorganismes analysés.

Il est ainsi possible à la fois de comparer la capacité d'adhésion de plusieurs souches bactériennes à un même substrat [147], [148], de déterminer quelles mutations d'une même souche vont présenter un comportement différent par rapport à la surface étudiée [145], ou encore de comparer l'adhésion d'une même souche sur différentes surfaces traitées chimiquement [149], [150].

Ces expériences peuvent avoir plusieurs applications. L'objectif peut être d'étudier la formation des biofilms [117] afin de mettre en place des méthodes d'inhibition des biofilms potentiellement néfastes. Dans ce cas, ce n'est plus seulement l'interaction entre bactérie et surface qui est considérée, mais c'est l'influence d'un paramètre d'inhibition sur cette capacité d'interaction qui est traitée.

Les exemples sont ici très applicatifs et variés : évaluation de l'inhibition par différents composés de l'adhésion d'*E. coli* O157 : H7 à des composants alimentaires¹ [151], recherche d'anticorps permettant d'empêcher l'adhésion de *Streptococcus mutans* et ainsi d'empêcher la formation des caries [152], inhibition de l'adhésion bactérienne par un peptide de synthèse bio-inspiré [153], etc.

Ce type d'analyse s'inscrit dans les méthodes d'études indirectes que nous avons pu voir dans le premier chapitre : il est possible de quantifier l'adhésion bactérienne aux surfaces analysées, mais il n'est pas possible d'observer le comportement individuel des pathogènes et donc l'effet mécanique, par exemple, des modifications effectuées, sur ce comportement.

Un autre objectif dans l'étude d'interactions entre bactéries et molécules peut être de mettre en évidence des interactions spécifiques entre les surfaces sur lesquelles sont déposées des molécules, et le pathogène en question pour un futur dépistage [150]. C'est ce qui peut être fait pour trouver les anticorps qui vont offrir une spécificité optimale avec le type de bactéries considéré. Les anticorps qui sont alors retenus vont pouvoir être utilisés pour effectuer du criblage de bactéries, afin de procéder à la détection des pathogènes pour lesquels leur spécificité a été démontrée.

c. Détection de bactéries par analyse moléculaire

De la même manière que la SPR permet d'étudier la bactérie entière ou bien ses composants, cette technique permet également de détecter la présence de bactéries en décelant des bactéries intègres ou bien certains de ses composants.

Plus proche de l'utilisation traditionnelle de la SPR, nous allons d'abord nous intéresser à la détection de bactéries par analyse moléculaire.

Le premier type de détection revient à déceler la présence de matériel génétique (de type ADN ou ARN) dans une solution purifiée de bactéries lysées en fonctionnalisant la biopuce avec la séquence complémentaire de l'ADN recherché. On peut par exemple citer la détection d'ARN issu de *Legionella pneumophila* à des concentrations picomolaires en moins de 3 h [154], ou encore la détection simultanée de *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Salmonella typhimurium* grâce à leur ARN et l'immobilisation de leur séquence complémentaire [155], ou encore la discrimination des ADN de *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* dans un environnement 10 fois plus concentré en ARN étranger [156].

Dans le cas des bactéries qui doivent leur pathogénicité à la production de toxines, il est pertinent de déceler la présence de la toxine plutôt que la présence de la bactérie elle-même. C'est ce qui peut être effectué pour le dépistage de l'enterotoxine B du staphylocoque [157].

¹ L'article porte sur le collagène I, un des principaux composants du tissu conjonctif animal, étant donné que la souche pathogène étudiée se retrouve principalement dans la viande

Un dernier type de détection de type « moléculaire » consiste non pas à détecter des composants de la bactérie ou ses sécrétions, mais à détecter la modification d'une solution d'anticorps suite à son contact avec les pathogènes. On parle alors d'inhibition soustractive, et la concentration en anticorps dans la solution qui a été en contact avec les bactéries est inversement proportionnelle à la concentration en microorganismes de la solution initiale [158]–[161].

La détection de bactéries par la mesure d'interaction molécule-molécule peut donc se faire en analysant le matériel génétique, les sécrétions, ou la modification d'une solution par le pathogène en question. Une bactérie ayant sa membrane naturellement tapissée de sites antigéniques, il est tentant d'effectuer la détection des pathogènes directement.

d. Détection de bactéries entières

L'utilisation de la SPR pour la détection de cellules entières est donc la suite logique de l'étude de l'interaction entre molécule bactérienne et substrat déterminé : celle-ci a pu permettre la mise en lumière de couples bactéries-substrats spécifiques, et ce substrat va pouvoir être réutilisé pour une reconnaissance ciblée des pathogènes.

Le principe de la détection de bactéries entières par SPRI est donc le même que celui de l'étude de l'interaction bactéries-molécules à la différence près qu'on ne cherche pas ici à quantifier l'interaction, mais juste à déceler ou non un signal d'accroche.

Une expérience standard de test de détection consiste à fixer en surface de la biopuce des anticorps spécifiques du pathogène ciblé, et d'injecter une solution saline non nutritive, telle que du PBS, contenant une concentration connue de la bactérie à tester, et à tester la capacité du système SPR à fournir un signal de détection. L'utilisation d'une solution non nutritive permet de bloquer la croissance bactérienne et donc de déterminer objectivement la limite détectable. Les performances du capteur sont évaluées en injectant différentes concentrations de microorganismes et en mesurant la quantité minimale mesurable en un temps donné, ou le temps nécessaire pour détecter une certaine concentration. Ce type d'expérience a été validé pour de nombreuses souches bactériennes pathogènes, avec plus ou moins de succès en termes de limite détectable : *Salmonella enteritidis* et *Listeria monocytogenes* à 10^6 UFC.mL⁻¹ [162], *Legionella pneumophila* à une concentration de 10^5 UCF.mL⁻¹ [163], *Vibrio Cholerae* à une concentration de 10^9 UFC.mL⁻¹ [164], *E. coli* K12 à 10^3 UFC.mL⁻¹ [165], etc.

Ces expériences de détection modèle ont l'avantage d'être assez reproductibles et faciles à réaliser, car elles sont de surcroît régulièrement effectuées avec des bactéries mortes, ce qui permet de s'astreindre de la plupart des réglementations sanitaires. Mais de nombreuses recherches s'éloignent de ce modèle pour tenter d'améliorer les limites de détection tout en se rapprochant des cas réels de contamination par des pathogènes [166]–[168].

Les travaux d'amélioration de la limite de détection peuvent être regroupés de la même manière que nous l'avons fait dans le premier chapitre, lorsque nous avons discuté des méthodes d'optimisation des biocapteurs (1.2.3 c).

Ainsi, certains travaux portent sur l'amélioration de la *sensibilité du transducteur* SPR par utilisation de plasmons de surface à longue portée (LRSP pour Long Range Surface Plasmon en anglais) qui permet de sonder plus en profondeur la solution étudiée. Dans la mesure où une bactérie est de l'ordre du micromètre alors que le champ plasmon évanescent classique a une épaisseur de peau de l'ordre de la centaine de nanomètres, l'idée de sonder plus en profondeur la solution semble donc très pertinente pour sonder une portion plus grande des bactéries immobilisées et donc obtenir une variation de signal plus importante. Une étude montre une sensibilité plus importante pour la détection de bactéries avec un montage à LRSP comparé à un montage de SPR classique [169]. Un inconvénient majeur de l'utilisation de LRSP est la perte de résolution, car l'augmentation de l'épaisseur de peau s'accompagne également d'une augmentation de la distance de propagation. L'utilisation de LRSP va donc limiter fortement toute tentative d'amélioration en résolution du système SPR. Par conséquent, lorsque la résolution est à privilégier devant la sensibilité, les LRSP ne sont pas adaptés.

D'autres travaux d'amélioration de la détection portent sur l'*optimisation des sondes*. Nous ne reviendrons pas sur la littérature très fournie qui porte sur l'optimisation de l'immobilisation des anticorps sur le biocapteur [86], [85], [170], [171] que nous avons évoquée dans l'introduction aux biocapteurs. En revanche, il est important de noter qu'il existe des alternatives aux anticorps, avec des spécificités et des performances comparables. On peut citer en particulier l'utilisation de phages [172]–[174] ou des aptamères [175], [176].

Afin d'agir sur la limitation induite par la diffusion de la détection, différentes stratégies de concentration ont été proposées. Par exemple, la mise en place d'un gradient magnétique peut être utilisée [89], [177]–[179]. Dans ces situations, des nanoparticules magnétiques sont fonctionnalisées avec des anticorps spécifiques et mises en contact avec la solution de bactéries à tester. Les nanoparticules vont se fixer aux microorganismes et être entraînées en surface lors de l'application du champ magnétique. Les bactéries sont ainsi concentrées en surface et décelables directement.

L'utilisation des nanoparticules fonctionnalisées a également un deuxième avantage, celui « d'alourdir » les bactéries cibles et donc d'amplifier le signal détecté. Cette amplification du signal par greffage de molécules supplémentaire sur le pathogène est assez utilisée. L'ajout d'anticorps pour amplifier le signal suite à l'accroche de bactérie, aussi appelée détection « sandwich » (*sandwich assay* en anglais, car la bactérie est entourée de part et d'autre d'anticorps) a montré son efficacité a de nombreuses reprises pour la détection SPR [180]–[182]. Par contre, du point de vue de la complexité de la méthode, cette stratégie implique l'ajout d'une étape dans le protocole de détection, ce qui

complexifie la tâche. L'utilisation de ces lests moléculaires n'est donc pas toujours un choix astucieux.

Enfin, toute application pratique d'un système de détection SPR nécessite la possibilité d'effectuer des mesures en parallèles de la présence de différentes espèces pathologiques, et d'avoir des contrôles négatifs. La technique consiste alors à fonctionnaliser des zones disjointes par différentes molécules sondes (généralement des anticorps), que l'on appelle des plots. Tous ces plots sont en contact avec la solution à tester et l'imagerie SPR permet d'observer simultanément les différentes zones comme cela est représenté Figure 2.8, page suivante, et ainsi de détecter simultanément différentes espèces [183], [184].

Les optimisations en termes de limite de détection sont donc très semblables à celles que nous avons vues dans la présentation générale des biocapteurs. Une dernière optimisation se révèle particulièrement intéressante dans le cadre d'une utilisation réelle pour la détection industrielle : la méthode de culture capture mesure (CCM)[183].

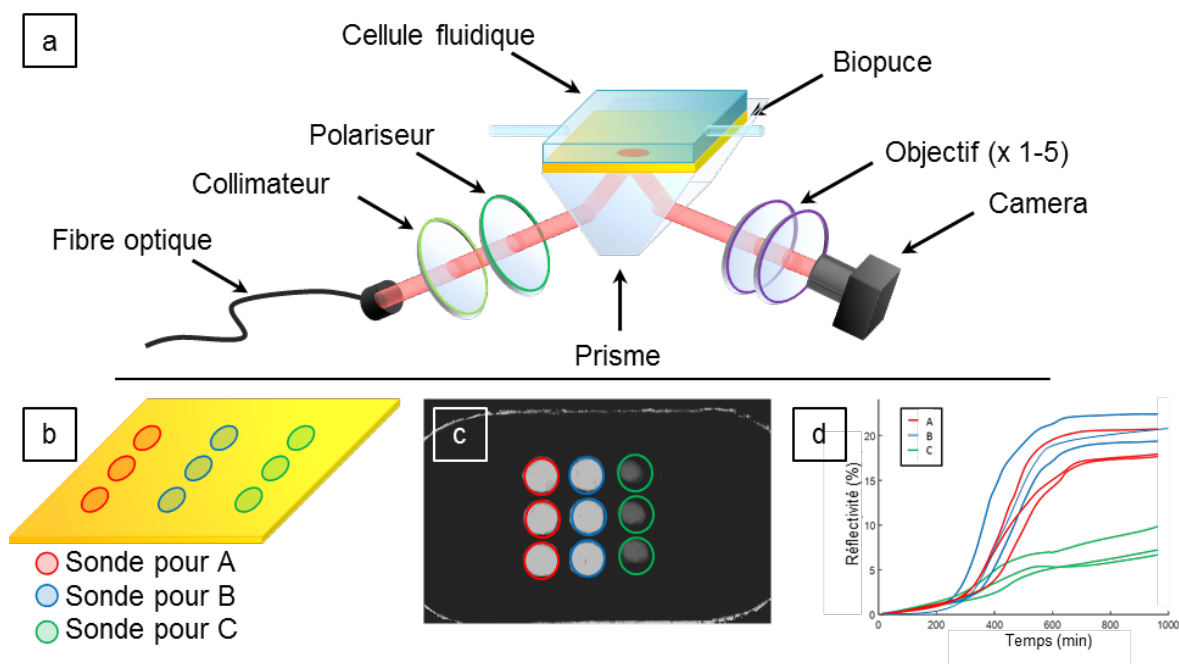


Figure 2.8 Principe de fonctionnement de la détection en SPRI à prisme
a. Montage d'imagerie SPR
b. Fonctionnalisation de surface pour la détection spécifique de différentes cibles
c. Image de variation d'intensité suite à l'accroche des cibles aux plots de molécules sondes
d. Suivi cinétique de l'accroche des cibles aux sondes

Comme nous l'avons dit dans l'introduction, les normes sanitaires requièrent de déceler un pathogène dans 250 mL d'échantillon, alors que les méthodes que nous avons vues jusqu'à présent ont des limites de détection d'au minimum quelques centaines bactéries par millilitre. Ces méthodes nécessitent donc une phase d'amplification, ce qui allonge grandement les délais de détection. La CCM part du constat que tout le temps où la solution bactérienne à tester n'est pas dans la chambre de mesure est du temps perdu

en termes de diffusion et de probabilité de rencontre des microorganismes en solution avec la surface sensible. L'idée est donc d'effectuer cette phase de croissance bactérienne directement dans la cellule expérimentale, permettant de déceler la contamination d'une solution par quelques bactéries[68]. La limite de détection théorique de cette méthode, en termes de concentration, est ainsi d'une bactérie capable de se multiplier dans tout le volume de solution injectée dans le système de détection, puisque la croissance bactérienne va théoriquement permettre d'atteindre une concentration détectable au bout d'un certain temps. Cette modalité de détection CCM a été développée au laboratoire de Grenoble et est très utilisée par la société Prestodiag ; Elle sera mise en place dans le système utilisé dans ce projet.

On peut noter que toutes les optimisations que nous avons pu voir depuis le début de ce chapitre sont à priori parfaitement compatibles avec n'importe quel type de modalité de détection SPR, avec n'importe quel système d'imagerie SPR.

e. Observations directes

Jusqu'à présent, toutes les applications que nous avons vues traitant de bactéries entières n'ont pas pour objet l'étude d'évènements ponctuels. Il s'agit d'avoir suffisamment de matériel adhérent en surface pour obtenir un signal observable à l'échelle d'un plot d'anticorps, qu'il s'agisse de la détection ou de l'étude. Mais de nombreuses applications en microbiologie pourraient tirer avantage d'une analyse plus fine des évènements de surface, et c'est l'observation d'évènements uniques qui est recherchée. Nous allons voir qu'imager des bactéries uniques est envisageable en SPR.

La microscopie SPR a prouvé il y a plusieurs années la possibilité d'observer assez finement des cellules gliales [10], [185]. Cependant, encore aujourd'hui, aucune application en microbiologie n'est rapportée. Cela est probablement dû à l'intérêt limité supposément d'imager un objet de même taille voire est plus petit que la résolution de l'appareil. Cependant, cette résolution est largement suffisante pour l'observation d'évènements uniques dans le cas où la concentration est suffisamment faible.

C'est ce qui a été effectué dans les travaux de L. Laplatine en utilisant l'imagerie SPR à prisme OR, qui a montré la possibilité d'obtenir des signaux de bactéries individuelles grâce à une technique d'imagerie SPR à prisme optimisé en résolution [9].

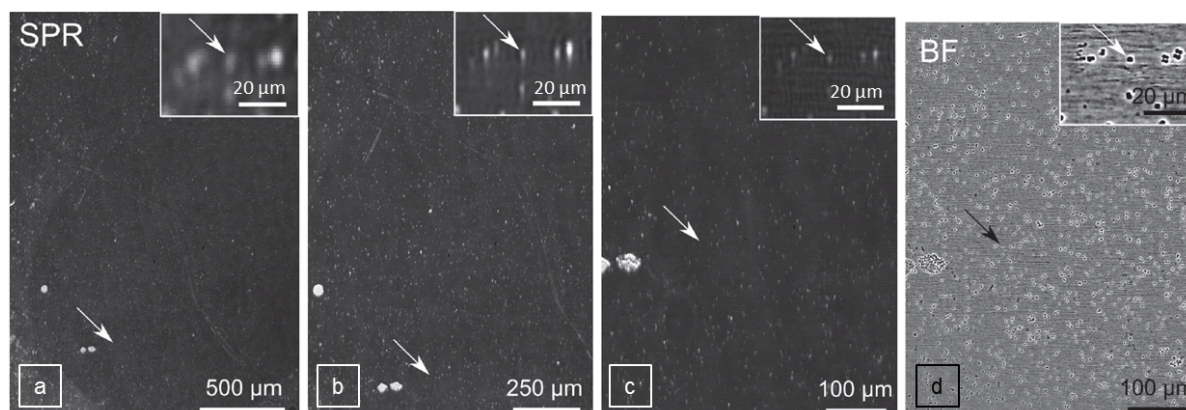


Figure 2.9 Observations d'événements bactériens uniques par SPRI HR à prisme à $\lambda = 632$ nm avec différents objectifs

a. Objectif $\times 4$ b. Objectif $\times 10$ c. Objectif $\times 20$

d. Microscopie à champ clair - Images tirées de Laplatine et collaborateurs [9]

Au vu de tout ce que nous avons pu voir depuis le début de cette introduction à la SPRI en microbiologie, la SPRI à prisme OR semble prometteuse. Tout d'abord, son champ relativement grand est compatible avec tous les exemples d'expérimentation que nous avons présentés jusqu'à présent, même les analyses parallèles. En même temps la résolution améliorée par rapport à toutes les applications citées dans cette section va permettre d'obtenir des analyses plus fines des phénomènes en jeu. La capacité d'observer des bactéries uniques tout en gardant tous les avantages de la SPRI (compatibilité avec des milieux complexes, facilité de lecture, etc.) est très prometteuse. Elle peut nous permettre d'une part d'affiner les méthodes de détection en ne basant plus cette détection sur la localisation des maximums d'intensité à l'échelle de la puce et des plots d'anticorps, mais en tirant profit des maximums d'intensité représentant des bactéries uniques. D'autre part, toutes les questions concernant l'influence des surfaces sur les comportements bactériens trouvent une nouvelle perspective. **La SPRI à prisme OR pourrait aider à ne plus simplement quantifier l'adhésion, mais à qualifier les variations de comportements bactériens par rapport aux changements de surface.**

Les travaux réalisés dans ce projet ont eu pour objectif de faciliter l'utilisation de la SPRI à prisme OR pour pouvoir ensuite tenter de montrer le potentiel réel de la technique.

La prochaine section présente le fonctionnement du montage SPRI à prisme OR pour l'utilisation en microbiologie.

2.2 Présentation du montage optique de SPRI à prisme OR couplé à un microscope de type Nomarski

Dans cette partie, nous allons présenter le montage utilisé à Grenoble pour l'étude et la détection de bactéries pathogènes. Le banc expérimental qui va être décrit a été pensé comme un compromis entre simplicité d'expérimentation, versatilité du système, mais également compatibilité avec des expérimentations sur des souches bactériennes de classe II. Le montage originel avait été développé par L. Laplatine pendant son doctorat [2] et nous présentons ici le fonctionnement du montage dans une perspective d'utilisation en microbiologie ainsi que les adaptations réalisées.

2.2.1 Spécificités optiques du montage utilisé

a. Spécificités du montage utilisé dans la variété des systèmes SPR existants

Commençons par replacer le montage de SPRI à prisme OR dans la diversité des systèmes SPR que nous avons pu voir.

Afin d'avoir un système modulable et capable de réaliser de l'imagerie, nous avons choisi d'utiliser le couplage avec un milieu d'indice élevé (cf. paragraphe 2.1.1.b).

Contrairement aux espèces traditionnellement détectées en SPRI, c'est-à-dire des molécules telles que des protéines, des sucres, ou des fragments d'ADN, ayant une taille de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres, il est important d'observer qu'une bactérie est un grand objet, de l'ordre du micromètre. Par conséquent, la sensibilité, c'est-à-dire la capacité à mesurer une faible modification de l'environnement, n'est pas le premier enjeu. En SPRI, l'accroche d'une bactérie est un évènement qui perturbe suffisamment l'environnement pour être observé individuellement. Parmi les différents paramètres mesurables pour effectuer la détection (cf. paragraphe 2.1.1.c), nous avons donc choisi l'interrogation en réflectivité, qui est moins sensible, mais notablement plus simple à mettre en place puisqu'elle ne nécessite pas de balayage (angulaire ou spectrale), et permet donc une fréquence d'acquisition plus. D'autre part, l'observation de bactéries uniques a été démontrée dans cette modalité, ce qui limite les adaptations à effectuer sur le montage.

L'utilisation de la technique de SPRI à prisme OR (cf. partie 2.1.1.d) a été choisie pour son compromis entre résolution (de l'ordre de grandeur de la bactérie) et champ large (de l'ordre du mm^2). La microscopie SPR ne fournit pas un champ suffisant, tandis que la résolution fournie par la SPRI classique n'est pas suffisante pour pouvoir observer des bactéries uniques, et le grossissement utilisé ne permet pas un échantillonnage suffisant des bactéries. Comme schématisé Figure 2.10, en plus de la distorsion due au prisme, le nombre de pixels utilisés pour imager une hypothétique bactérie unique en SPRI classique est de quelques pixels, ce qui peut être insuffisant pour permettre d'identifier un signal spécifique du bruit environnant.

Pour conserver la bonne résolution de la technique, l'utilisation de LRSP (cf. partie 2.1.2.b) n'a pas été envisagée.

Ainsi le montage utilisé est un montage de SPRI à prisme OR basé sur l'interrogation en réflectivité, adapté d'un montage existant au sein du laboratoire, développé dans des travaux précédents[2].

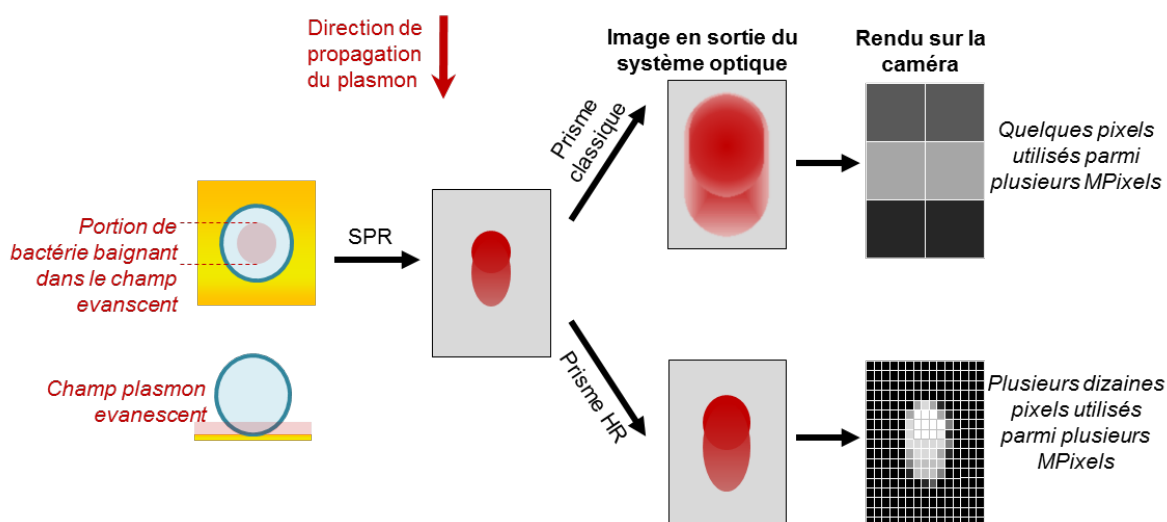


Figure 2.10 Comparaison entre la SPRI à prisme OC et la SPRI à prisme OR pour imager une bactérie

b. Longueur d'onde

L'observation de bactéries réalisée par Loïc Laplatine au CEA Grenoble a été effectuée à 632 nm, une longueur d'onde assez courte afin de minimiser la distance de propagation du phénomène plasmon. Son observation avait porté sur *Staphylococcus Epidermidis*, mais dans les expériences préliminaires que nous avons effectuées sur *E. Coli*, nous n'avons pas pu observer d'évènements bactériens uniques à cette longueur d'onde. Bien que nous n'ayons pas fait d'analyse supplémentaire pour expliquer cette observation, il est possible que les différentes morphologies de ces deux cellules soient en cause. À 632 nm, la profondeur de pénétration de moins de 100 nm rend la détection particulièrement dépendante de la capacité de déformation des organismes et de la présence de pili ou de flagelles sur eux. *E. coli* est un bacille, une bactérie en forme de bâtonnet, et possède de nombreux pili ainsi qu'un flagelle, tandis que *S. epidermidis* a une forme sphérique, ne possède ni pili ni flagelle, et se trouve très majoritairement sous forme d'agrégat de plusieurs cellules. Ces différences peuvent expliquer que la modification de signal SPR induite par *E. coli* pour la longueur d'onde 632 nm ne soit pas suffisante pour être observable dans les conditions expérimentales.

Nous avons donc choisi d'utiliser une longueur d'onde plus élevée, de 735 nm.

Le choix d'une longueur d'onde supérieure est justifié par la meilleure sensibilité et la plus grande profondeur de pénétration du plasmon. Il faut garder en mémoire qu'une bactérie est un objet grossièrement sphérique ou ellipsoïde de 1 μm , entouré de pili longs

de quelques micromètres dans le cas d'*E. coli*, mais également des bactéries du genre *Listeria*. En prenant une faible profondeur de pénétration, on limite le volume de bactéries sondé (Figure 2.11), mais on diminue aussi la distance maximale de la surface à laquelle le corps de la bactérie peut être détecté. À 735 nm, la profondeur de pénétration est doublée par rapport à 632nm (voir Figure 2.2), ce qui quadruple approximativement le volume de bactéries sondé.

L'objectif de cette modification est, entre autres, de pouvoir observer des variations

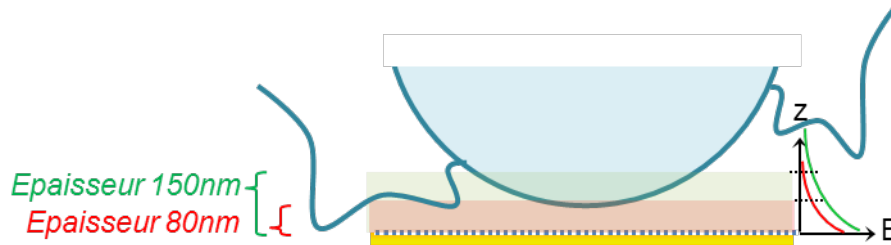


Figure 2.11 Comparaisons entre une profondeur de pénétration de 80 nm, une profondeur de pénétration de 150 nm, et une bactérie de 1 µm

d'intensité qui puissent correspondre à une variation de distance à la surface de la bactérie.

Cela a pour effet de dégrader la résolution à la fois dans le sens de propagation où la distance de propagation double entre 632 nm et 735 nm, mais également, dans une moindre mesure, dans le sens orthogonal à la propagation, car la limite de diffraction est également proportionnelle à la longueur d'onde.

Dans ces conditions, la limite de résolution dans le sens de propagation est supposée être de 7 µm. Dans la direction orthogonale, la résolution dépend de l'ouverture numérique du système et est estimée autour de 0,5µm.

c. Couplage avec un microscope de type Nomarski

La première observation de bactéries uniques en SPRI à prisme OR a été validée par observation simultanée en microscopie à champ clair (cf. Figure 2.9). Cependant la technique du champ clair est limitée en contraste pour des objets transparents, et en particulier pour des bactéries à proximité d'un substrat réfléchissant tel que l'or. C'est pour cette raison que nous avons opté pour de la microscopie en contraste interférentiel différentiel (DIC en anglais pour Differential Interference Contrast), aussi connu sous le nom de microscopie de Nomarski. Ce type d'observation est très performant pour les sujets biologiques transparents, d'indice de réfraction proche de celui du milieu environnant. Il est dépourvu de l'artéfact en halo lumineux des images en contraste de phase, de plus les systèmes d'imagerie DIC ont une profondeur de champ de plusieurs micromètres.

Ce type de microscopie repose sur le contraste issu de l'interférence entre deux faisceaux cohérents entre eux ayant traversé l'échantillon. Le principe, présenté Figure 2.12 consiste à séparer également un faisceau incident polarisé linéairement grâce à un prisme de Wollaston. Les deux faisceaux issus de ce prisme, polarisés linéairement orthogonalement l'un par rapport à l'autre, vont interagir avec l'échantillon, ce qui va modifier l'amplitude respective des deux ondes polarisées orthogonalement l'une par rapport à l'autre. Celles-ci vont ensuite repasser dans un prisme de Wollaston qui va recomposer le faisceau incident, ce qui va créer des interférences entre les deux faisceaux. Un dernier polariseur va permettre de filtrer la lumière pour ne laisser passer que la composante de la lumière porteuse d'information sur l'échantillon.

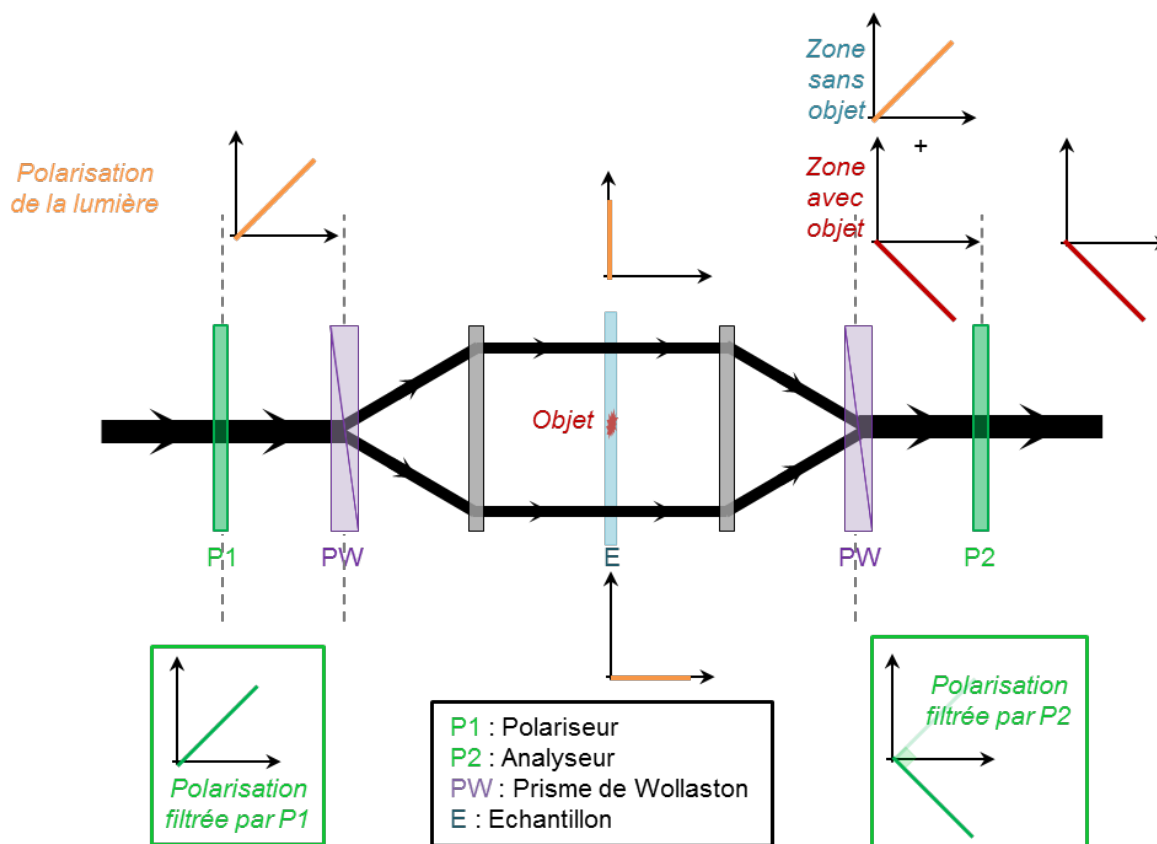


Figure 2.12 Principe de la microscopie de Nomarski

Dans les faits, le montage utilisé n'utilise pas la lumière transmise par l'échantillon, mais celle réfléchi par celui-ci. Ainsi, un seul prisme de Wollaston est nécessaire, et sert à la fois à décomposer la lumière incidente et à recomposer la lumière réfléchi. Le montage total de la partie SPRI à prisme OR, couplée à la microscopie de Nomarski, est décrit dans la prochaine section (0).

Le dispositif que nous avons développé devait donc répondre à ces spécifications.

2.2.2 Présentation du montage optique final

Le montage utilisé est assez semblable au montage de SPRI à prisme « normal » que nous avons vu dans le paragraphe 2.1.2 a, et est schématisé de manière complète Figure 2.16 qui va servir de base pour l'explication du montage.

Comme expliqué précédemment, le montage est divisé en une partie supérieure réservée à la microscopie de Nomarski (Figure 2.14), et une partie inférieure dédiée à l'imagerie SPR à prisme OR (Figure 2.13).

a. Montage SPRI à prismes OR

Concernant le système d'imagerie, la source de lumière utilisée est une diode électroluminescente (DEL) fibrée (M735F1, Thorlabs), couplée à une fibre optique de calibre 1 mm, et collimatée par une lentille asphérique de focale 35 mm et de diamètre 25 mm. Le faisceau parallèle résultant est ensuite polarisé linéairement transverse magnétique (voir 2.1.1 a) par un polariseur. Cette partie du montage est représentée sur la Figure 2.13. Le faisceau issu du polariseur va ensuite entrer dans le prisme OR et être réfléchi par la base du prisme.

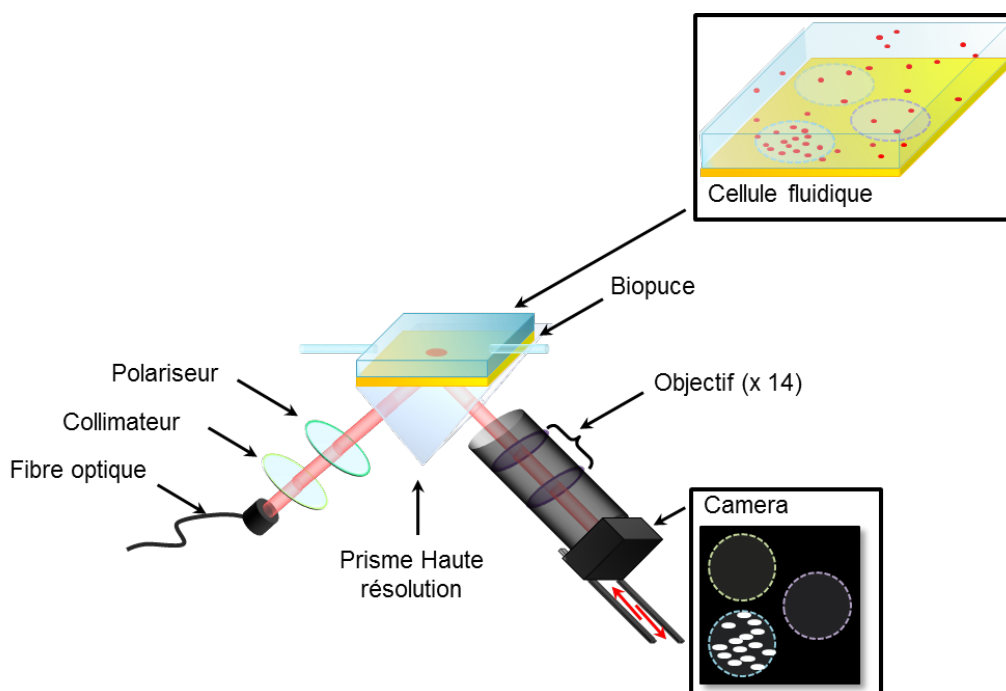


Figure 2.13 Schéma de la partie SPRI à prisme OR du montage du CEA Grenoble

Les prismes utilisés, optimisés pour la haute résolution [2], sont des prismes réalisés en verre N-SF66 ($n=1,9$ à 740nm [186]). Les performances en termes de résolution sont fonction de l'indice du milieu utilisé pour fabriquer le prisme : plus l'indice de réfraction est élevé, meilleures seront les performances. Le N-SF66 est un des verres disponibles sur le marché ayant le plus haut indice de réfraction. Pour des questions de coup, la possibilité d'utiliser des matériaux transparents autre que le verre ayant des indices plus élevés, tel

que le diamant, n'a pas été envisagée. Le N-SF66 a donc été choisi comme un bon compromis entre ces deux contraintes.

Une fois le matériau choisi, la géométrie du prisme a été optimisée pour se placer en condition d'incidence normale pour l'excitation plasmonique (voir 2.1.1 c). Il s'agit donc de prismes isocèles d'angle au sommet 83° dont la base a pour dimension $25 \times 12,5$ mm (Schott Glaswerke AG, Suisse/Malaisie).

La métallisation des bases des prismes est réalisée dans une des salles blanches du CEA Grenoble (PTA) en utilisant un évaporateur rotatif (Plassys). Les couches déposées sont de 2 nm de chrome et 53 nm d'or. Ces paramètres ont également fait l'objet de travaux précédents visant à optimiser la sensibilité du capteur. On appelle ainsi biopuce le prisme dont la base est métallisée selon les paramètres précédents.

Afin d'imager la base du prisme sur lesquels les rayons sont réfléchis, celle-ci est couplée à une caméra CMOS (4 MP, ORCA 4.0, Hamamatsu) grâce à un équivalent d'objectif 14X, réalisé grâce à la combinaison d'une lentille de focale 210mm et une lentille de focale 150 mm. Cela permet d'obtenir une largeur de champs de l'ordre du millimètre, sachant que le capteur de la caméra est composé de pixels carrés de côté $6,5 \mu\text{m}$ et assemblés en une matrice de taille 2048×2048 pixels. La dynamique de la caméra est de 16 bits.

Comme nous l'avons expliqué dans la partie 2.1.1 c, en configuration SPRI à prisme OR, le plan image du système n'est pas perpendiculaire à l'axe optique. Par conséquent, le plan image doit être balayé afin de récupérer l'intégralité de l'image résolue. La caméra est donc placée sur une platine translatable contrôlée par un picomoteur (Newport Corporation, USA). Grâce à ce mécanisme, des séquences d'images SPR sont prises en déplaçant la caméra (flèches rouges sur la Figure 2.13) à intervalles fixes dans le plan image. La reconstruction des images sera expliquée dans la partie traitement de données en 2.5.1 L'ensemble du montage est piloté par un programme LabView.

b. Partie microscopie de Nomarski

Les images de microscopie de Nomarski sont quant à elles enregistrées grâce à détecteur CMOS (Canon 600D, 18 MP) monté sur un microscope Olympus (UMDIC, Olympus, Japon) avec un objectif 10X (MPFLN10X, Olympus, Japon) placé au-dessus du système SPRI (partie supérieure du schéma). La caméra utilisée est une caméra couleur, avec trois canaux de 8bits chacun. Pour le traitement d'image, ces images RGB sont transformées en images 32 bits à un canal.

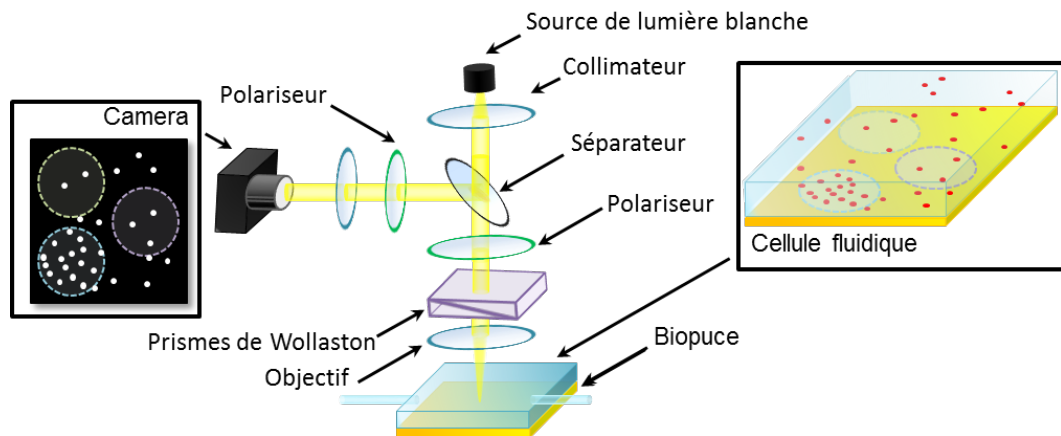


Figure 2.14 Schéma de la partie microscopie de Nomarski du montage du CEA Grenoble

c. Couplage des deux types d'imagerie

Les systèmes de SPRI à prisme OR et de microscopie de Nomarski sont réglés de manière à imager la même zone sur la surface d'or et les deux caméras sont synchronisées pour effectuer des acquisitions quasi simultanées.

Il est d'ores et déjà important de noter que les informations qui vont être récoltées en microscopie de Nomarski et en SPRI à prisme OR sont complémentaires, mais pas équivalentes, et ce pour deux raisons principales : la résolution et la profondeur de champ/profondeur de pénétration. Comme représenté sur le schéma, pour une solution contenant des bactéries, la SPRI à prisme OR ne pourra rendre compte que des bactéries à très grande proximité de la surface (de l'ordre de la centaine de nanomètres maximum), et les signaux observés seront déformés par la propagation du plasmon : ce sont les taches ovales sur la caméra en bas à droite, côté SPRI à prisme OR. À l'opposé, en Nomarski, la profondeur de champ de plusieurs micromètres permet de voir plus en profondeur dans la solution, avec une résolution meilleure et isotrope : on s'attend à observer des points lumineux sphériques et proches de la taille réelle des bactéries en microscopie de Nomarski. Cette nuance va avoir son importance pour l'interprétation des résultats dans les prochains chapitres. Nous concluons cette partie avec un schéma du montage entier en Figure 2.16 et une photographie du montage réel Figure 2.15 où sont rappelés les différents éléments que nous avons définis.

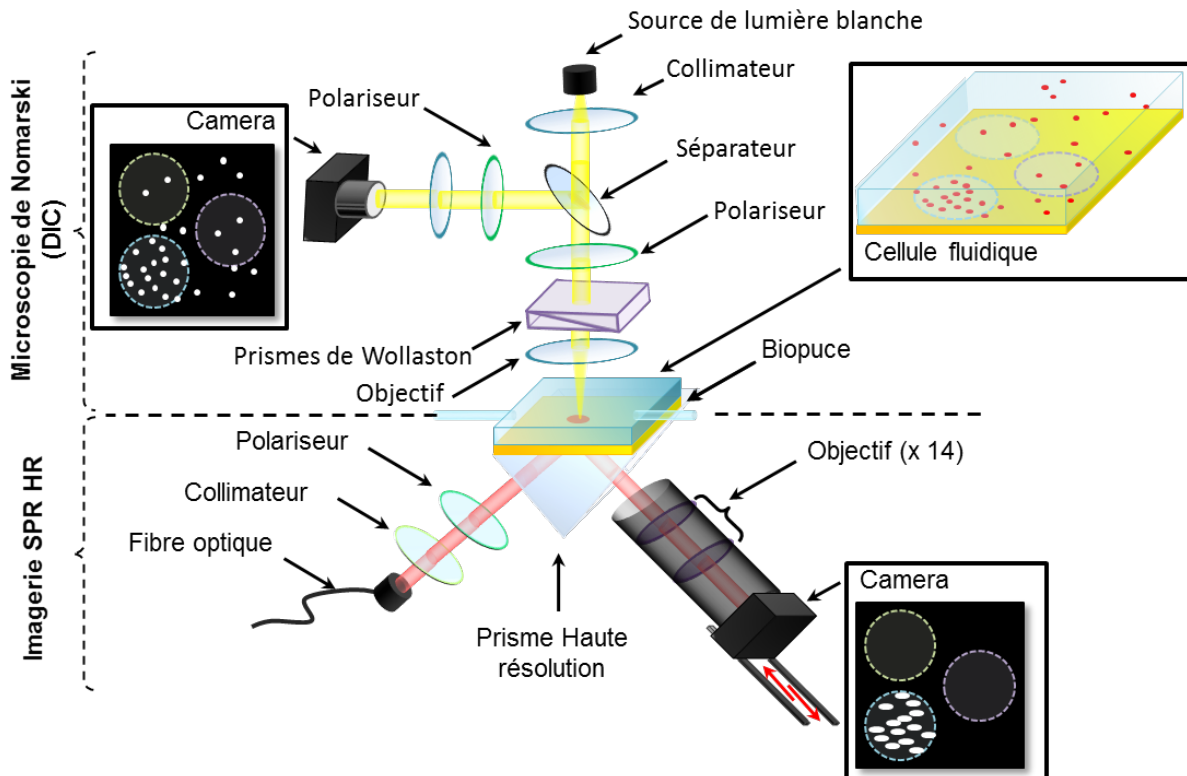


Figure 2.16 Schéma du montage de SPRI HR à prisme de Grenoble

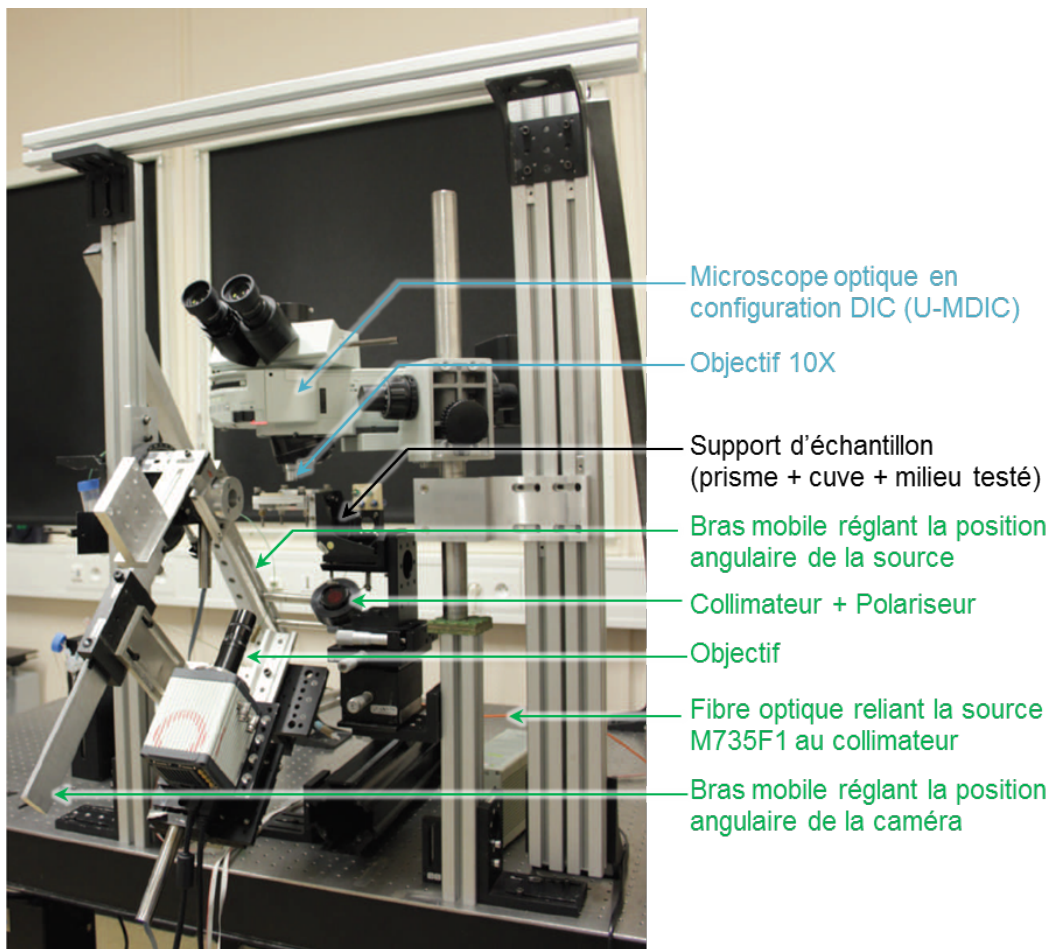


Figure 2.15 Photographie du montage optique

Nous avons donc pu voir ici les détails optiques du montage utilisé, mais de nombreuses précisions restent encore à apporter : en quoi consiste la cuve expérimentale ? Quelles sont les conditions d'expérience pour la microbiologie ? Quel type de fonctionnalisation de surface a été choisie, étant donné que nous avons vu que toute détection spécifique passe par le dépôt de sondes particulières en surface ?

Dans la suite de ce manuscrit, l'appellation SPRI HR va être utilisée pour qualifier notre système d'imagerie SPR à prisme optimisé en résolution, utilisant un grossissement suffisant pour ne pas être limité par la taille d'un pixel mais par la propagation du plasmon et les aberrations optiques du système, et effectuant la reconstruction des images par balayage.

2.3 Élaboration d'une cuve compatible avec la croissance bactérienne

Dans l'introduction générale (Chapitre 1), nous avons pu avoir un aperçu de la dangerosité de certaines souches pathogènes. Un des objectifs de ce projet de thèse a été d'étudier ces bactéries à l'aide du montage que nous venons de décrire. Il a donc fallu développer une cuve expérimentale compatible avec le montage préexistant, et répondant aux précautions requises lorsqu'il s'agit de bactéries de classe II. Cette section détaille les prérequis quant à la conception de la cuve et les solutions mises en place.

2.3.1 Prérequis pour la conception de la cuve

Les impératifs à prendre en compte dans la conception de la cuve sont de trois ordres. Tout d'abord, la cuve doit être biocompatible et permettre la croissance bactérienne, puisque les expériences de détection vont être effectuées en CCM (explications dans le paragraphe 2.1.2 d). D'autre part, il faut que la cuve puisse être intégrée au montage en place et permettre les observations recherchées. Enfin, la manipulation de souches de classe II nécessite la mise en place de précautions dans la conception de la cuve.

a. Impératifs de biocompatibilité et de croissance

Afin de permettre une croissance bactérienne contrôlée et performante, il est nécessaire d'utiliser des matériaux biocompatibles et de réguler la solution testée en température.

Toutes les souches ciblées dans nos études sont des souches bactériennes qui se développent dans le corps humain. La plupart des bactéries en question [71]–[73] ont d'ailleurs une température de croissance optimale proche de celle du corps humain. Il est donc très commun de réaliser les expériences à une température de 37 °C, et c'est donc la température choisie pour nos expériences en CCM.

Pour assurer la biocompatibilité du matériau dans lequel est fabriquée la cuve, nous avons choisi le polydiméthylsiloxane (PDMS), qui est un polymère utilisé et approuvé

depuis plusieurs dizaines d'années pour des utilisations en milieux biologiques [190], ainsi que le verre.

Afin d'être en condition de croissance bactérienne, les milieux dans lesquels sont injectées les bactéries sont les milieux de culture habituels des souches étudiées et seront décrits plus loin.

b. Insertion dans le système optique

Le montage optique existant que nous avons vu dans la section précédente (2.2.2) comporte également un support pour le prisme où doit s'insérer la cuve. Ce support est représenté Figure 2.17. Deux rigoles positionnées latéralement par rapport au prisme ont été conçues pour y insérer la cuve et les ressorts permettent de maintenir en pression la cuve sur le prisme. Ce support, ainsi que la taille du prisme définissent ainsi les dimensions de la cuve et de son matériau support : le matériau doit avoir une épaisseur maximale de 2 mm, et une largeur de 4 cm, tandis que la cuve doit avoir des dimensions inférieures à 25 x 12,5 mm.

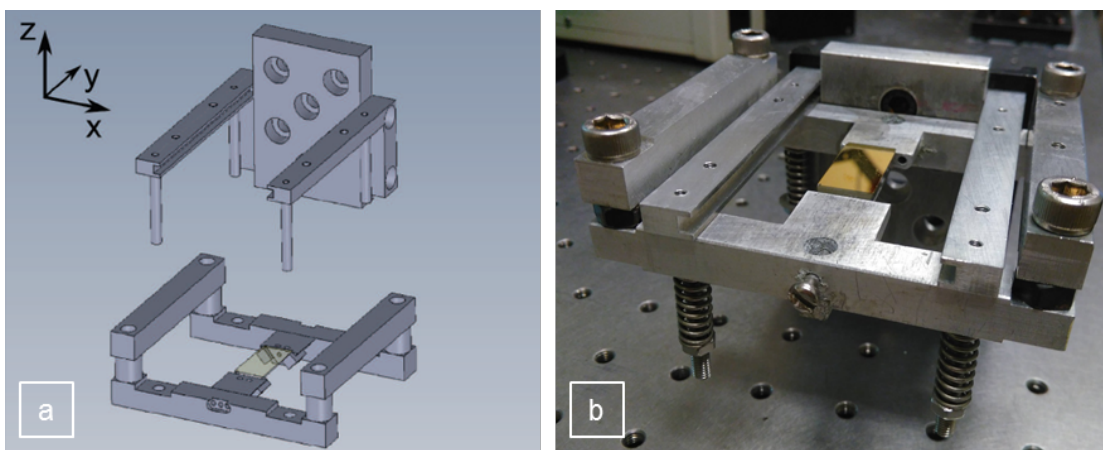


Figure 2.17 Pièces du support existant avec lesquelles doit s'agencer la cuve
a. vue SolidWorks des différentes parties du support [2]
b. Photographie du support monté avec prisme placé dans son emplacement

Un autre prérequis pour l'utilisation dans le montage décrit est la nécessité d'utiliser des matériaux transparents afin de pouvoir réaliser des observations en microscopie de Nomarski en traversant la cuve. Les deux matériaux choisis, le PDMS et le verre, remplissent cette condition.

c. Sécurité microbiologique

Les dernières précautions sont à imputer au fait que certaines souches étudiées sont de classe II. Par conséquent, elles doivent être manipulées en zone particulière, les laboratoires microbiologiques de sureté P2, et tout élément qui sort de cette zone doit être parfaitement étanche et doit pouvoir subir une décontamination. Cela signifie donc que l'injection des souches bactériennes doit s'effectuer au sein d'un laboratoire P2, et

qu'ensuite, l'ensemble « support de prisme + cuve » doit être étanche pour pouvoir être sorti du P2 et être introduit dans le ban expérimental.

D'autre part, les étapes de décontamination nécessaires entre chaque expérience peuvent abîmer la cuve, et il est donc préférable d'utiliser des matériaux résistants et peu onéreux afin de pouvoir remplacer facilement les cuves utilisées.

2.3.2 Présentation et performances de la cuve

a. Présentation de la cuve expérimentale

La cuve construite est présentée Figure 2.18. Une cellule fluïdique de 200 μL , de dimension 10 x 15mm est creusée dans un bloc de PDMS (Stylgard 184, proportion réticulent : élastomère 1 : 10) d'épaisseur 1,5 mm et de dimension 3 x 5cm.

La cellule en PDMS est collée par activation moléculaire au plasma (40 W, 0,6 mbar, 75 % O₂, 25 % Ar pour 30 s, Femto 300, Diener Electronic, Allemagne) à une plaque de verre de dimension 4 x 6 cm.

Afin de réaliser une régulation en température, des fils résistifs chauffants entourant la cuve et une thermistance sont inclus dans le PDMS. Il s'est avéré plus simple de réaliser cette étape au moment où le PDMS est encore liquide, en fixant les fils résistifs et la thermistance dans le contenant. La tension appliquée aux fils chauffants est régulée par un contrôleur PID (Proportionnel Intégral Dérivateur) modulé par la température de la cuve mesurée par la thermistance. Le schéma de fonctionnement du circuit est résumé Figure 2.18.c. Cette régulation est effectuée grâce à un programme LabView.

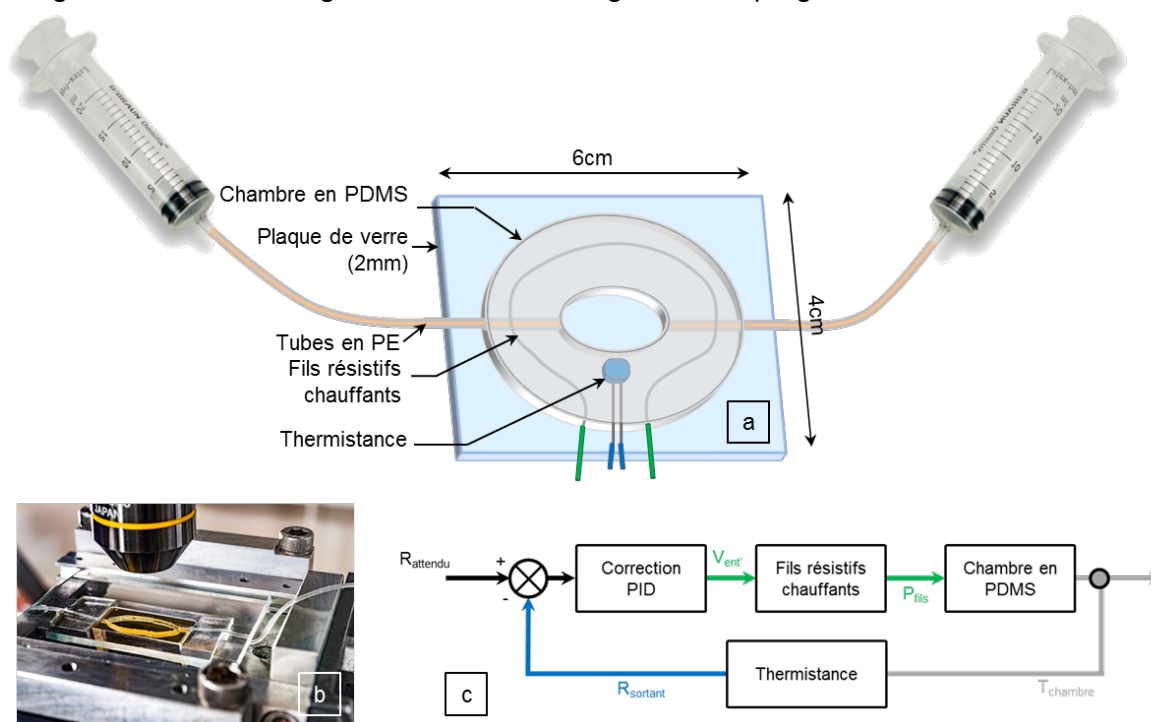


Figure 2.18 Développement d'une cuve biocompatible chauffante
a. Schéma de la cuve

b. Photographie de la cuve en position sur le prisme dans le support adapté
c. Diagramme de fonctionnement de la cuve

L'injection de la solution à tester est réalisée par des tubes en Polyester (PE), qui sont également fixés dans le contenant lorsque le PDMS est encore liquide. Des seringues en bout de tubes permettent de circonscrire le liquide à l'intérieur des tubes et de la cuve, de réguler les surpressions potentielles et d'assurer l'étanchéité du montage.

La cuve réalisée est ainsi étanche, transparente, régulée en température, et construite en matériaux peu coûteux, et s'insère facilement dans le montage existant.

La stabilité de régulation de la température a été évaluée et est développée dans le prochain paragraphe.

b. Efficacité de la régulation de la température

Le chauffage initial de la cuve et la régulation d'une solution aqueuse injectée dans la cuve sur plusieurs heures ont été étudiés et sont présentés Figure 2.19.

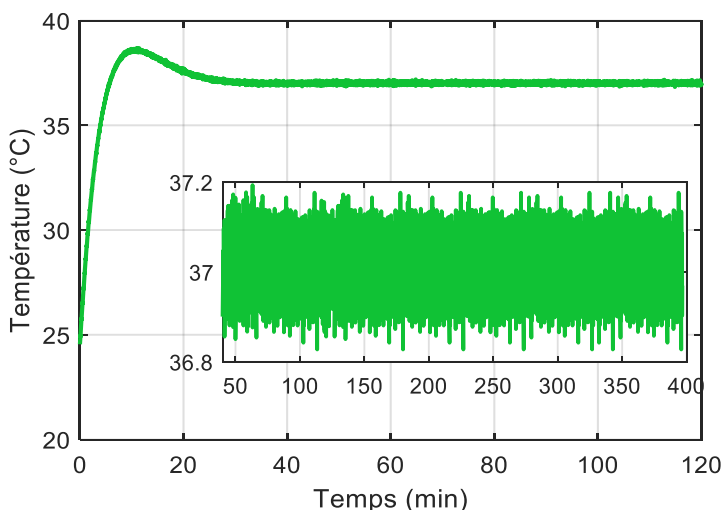


Figure 2.19 Stabilisation de la température dans la cuve

La variabilité de la température mesurée par la thermistance est de $\pm 0,15^{\circ}\text{C}$, avec un écart-type de $0,03^{\circ}\text{C}$ ce qui est satisfaisant pour la croissance bactérienne.

Le phénomène de résonance plasmon est lui-même sensible à la température et les systèmes de détection moléculaires ont une variabilité en température plus faible que celle affichée par notre système. Il faut donc évaluer la variation du signal SPR créée par cette variation en température et la comparer au signal produit par la fixation d'une bactérie.

Une variation de la température de $0,15^{\circ}\text{C}$ provoque une variation de l'indice de réfraction de l'ordre de 10^{-5} RIU (unité d'indice de réfraction) [191], [192]. Pour une sensibilité SPR moyenne de $1000\ \%/ \text{RIU}$, on obtient une variation du signal SPR de $0,02\ \%$, tandis que la variation locale de signal induite par la fixation d'une bactérie est supérieure à $1\ \%$ (valeur expérimentale). La variation de signal due à la température est donc bien négligeable devant les signaux étudiés. Le système que nous avons réalisé est donc bien adapté à l'application visée.

Cette partie nous a permis de décrire l'intégralité du montage optique et nous avons vu comment les solutions étudiées sont injectées dans celui-ci. Nous allons maintenant nous intéresser aux méthodes de fonctionnalisation de surface et de culture microbiologiques utilisées dans ce projet.

2.4 Microbiologie et chimie

Jusqu'à présent, la biopuce que nous avons décrite est un prisme ayant sa base métallisée. Nous avons vu dans l'état de l'art sur les biocapteurs et sur les techniques de SPR que toute détection spécifique de bactéries repose sur le greffage en surface de sondes localisées afin de détecter des réponses spécifiques qui servent de signature de la présence des espèces visées.

Nous allons voir dans cette section quelles sondes ont été sélectionnées, comment elles sont fixées en surface, et enfin en quoi consistent les solutions de pathogènes testées.

2.4.1 Choix des anticorps et préparation de la biopuce

Parmi l'éventail des ligands possibles pour la détection de bactéries [83], les anticorps restent la solution la plus efficace lorsqu'il s'agit d'obtenir une bonne spécificité. C'est le type de ligands principalement utilisé en SPR pour la microbiologie comme nous l'avons vu dans la partie 2.1.2, et comme une partie du projet consiste à améliorer les techniques de détection et d'étude déjà existantes, il semble pertinent d'utiliser des anticorps déjà référencés.

Pour la détection des souches de *Listeria*, trois anticorps monoclonaux développés par l'entreprise partenaire Prestodiag (Villejuif, France) ont été utilisés. Les méthodes d'obtention de ces anticorps sont décrites dans le doctorat d'Alexandra Morlay [193], et la nomenclature utilisée dans ce manuscrit reprend celle développée par A. Morlay pour plus de continuité et de clarté. Les deux anticorps polyclonaux dirigés contre *Listeria monocytogenes* sont appelés LiM14 et LiM16, et un troisième anticorps polyclonal, dirigé contre des souches de *Listeria* autre que *monocytogenes*, nommé Lis12 a été utilisé pour la détection spécifique de *Listeria innocua*.

Pour la détection d'*E. coli* ATCC 11775, l'anticorps spécifique choisi est un anticorps polyclonal anti-*E. coli* de lapin de type IgG (Abcam ref.31499). Ce choix est basé sur le travail de Mélissa Ménétrier en interne dans notre laboratoire, démontrant une très bonne réponse en SPRI à prisme OC de cette souche bactérienne pour l'anticorps. Dans la suite, cet anticorps sera nommé anticorps anti *E. coli* par souci de simplicité, puisqu'il n'y a pas de confusion possible.

Un anticorps monoclonal, que l'on appellera KLH, dirigé contre les hémocyanines d'une espèce de mollusque (Keyhole Limpet Hemocyanin en anglais) a été utilisé comme contrôle négatif pour toutes les expériences.

Pour la fixation des anticorps à la surface d'or, plusieurs types de fonctionnalisations de surfaces ont été utilisés. Toutes ces techniques sont basées sur le fait que l'or est un matériau conducteur, et un accepteur d'électron (acide de Lewis) qui va se lier à des donneurs d'électrons (base de Lewis) pour former une liaison covalente de coordination. Le donneur d'électron peut être des molécules contenant des sulfures [194], des phosphines [195], des amines primaires [196].

Dans toutes les situations, le protocole expérimental est assez similaire : des solutions d'anticorps à une concentration de $1\mu\text{M}$, fonctionnalisés ou non comme nous allons le voir, sont déposées séquentiellement grâce à un robot ou à la main grâce à une micropipette $10\mu\text{L}$. On obtient ainsi une matrice de plots d'anticorps spécifiques.

a. Électropolymérisation

La première solution considérée est l'électropolymérisation du polypyrrole. Cette solution est très utilisée, car elle présente une excellente stabilité et une bonne biocompatibilité des dépôts réalisés [197]. Elle est notamment largement mise en œuvre pour des applications en biocapteurs [68], [83]–[85].

Le protocole usuel de greffage d'anticorps par procédé d'électropolymérisation est résumé Figure 2.20. Il se déroule en deux étapes : tout d'abord il s'agit de fonctionnaliser les anticorps en leur fixant un groupe pyrrole par réaction entre l'amine de la protéine et le groupement NHS du pyrrole (a.). La seconde étape consiste à polymériser les pyrroles sur la surface d'or qui sert d'anode à la réaction d'électropolymérisation (b.).

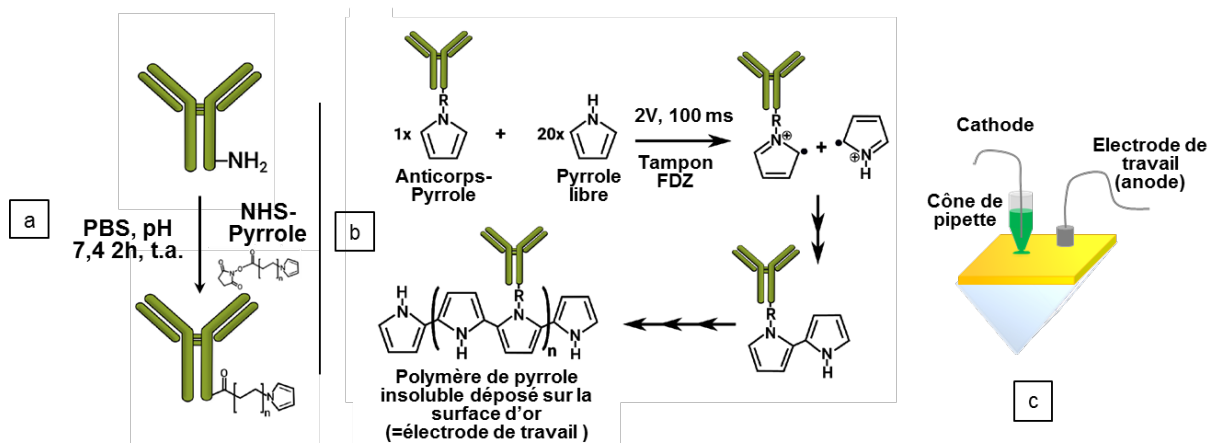


Figure 2.20 Fonctionnalisation de la surface d'or par électropolymérisation
a. Fonctionnalisation des anticorps
b. Électropolymérisation des anticorps pyrrolés
c. Schéma du montage expérimental
t.a. : température ambiante

Parmi les inconvénients de cette méthode, on peut citer l'inhomogénéité des dépôts liée au caractère potentiellement hétérogène des lignes de champs sur la surface.

b. Thiols NHS

Cette fonctionnalisation est également assez utilisée dans le domaine des biocapteurs, car elle offre des surfaces fonctionnalisées plus homogènes qu'avec la fonctionnalisation au pyrrole. En revanche, elle est considérée comme moins stable donc plus délicate à conserver. Le principe est de greffer un groupement thiol (-NHS) à la molécule que l'on souhaite fixer à l'or, et d'utiliser l'affinité sulfure-or du fait qu'ils sont un couple acide-base de Lewis. La réaction s'effectue sur plusieurs heures c'est pourquoi les échantillons sur lesquels sont déposées les solutions de thiols sont laissés en atmosphère humide contrôlée (solution aqueuse saturée en sel de KNO_3 fournissant une humidité de 97 %) pendant 8 h.

Le greffage du groupement thiol sur la molécule d'intérêt, tout comme le greffage d'un groupement pyrrole dans le paragraphe précédent, peut parfois être une étape supplémentaire fastidieuse dans le protocole de réaction chimique. Par conséquent, nous avons ici privilégié cette technique uniquement lorsque les molécules que l'on cherchait à fixer étaient directement fournies avec un groupement thiol, à savoir lorsque nous avons travaillé avec des peptides antimicrobiens (partie 4.5 dans le chapitre 4).

L'avantage de cette fonctionnalisation est que la formation de la couche d'anticorps s'effectue par auto-organisation, et fournit donc une monocouche homogène d'anticorps.

c. Adsorption directe

Une troisième technique, légèrement différente des deux premières, repose sur l'adsorption des protéines directement sur les surfaces solides telles que l'or [200], [201] grâce à des interactions hydrophobes et à la présence de sulfures en surface des protéines. Dans ce cas, la solution déposée contient uniquement des anticorps dans un tampon salin (1 μM d'anticorps dans du PBS) et la réaction s'effectue en 1 h en chambre humide.

Cette technique est extrêmement simple, mais assez controversée, car les phénomènes en jeu ne sont pas parfaitement compris et qu'il n'est pas possible de contrôler comment la protéine va s'adsorber en surface. Par conséquent, comme la spécificité de la protéine est due à sa structure tridimensionnelle, il est assez probable que ce type de fonctionnalisation altère sa réactivité en modifiant sa conformation 3D.

Ce problème de modification de conformation se pose aussi dans une bien moindre mesure pour les deux premiers types de fonctionnalisations. En effet, la fixation d'un groupement pyrrole ou thiol sur la protéine peut se faire par réaction avec n'importe quel NH_2 accessible de la protéine et donc la perte de réactivité peut aussi avoir lieu.

On peut résumer les avantages et inconvénients de chacune des trois techniques présentées ci-dessous dans un tableau simple.

	Electropolymérisation	Thiols	Adsorption directe
Complexité du protocole	++	+	-
Temps de réaction	s	12h	1h
Contrôle de la conformation des protéines	~	~	-
Homogénéité de la surface	-	++	+

Tableau 2.3 Avantages et inconvénients des trois techniques de fonctionnalisation de surfaces utilisées

d. Passivation

Une dernière étape de la fonctionnalisation consiste à passiver les surfaces d'or non fonctionnalisées avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) ou de polymères-thiols tels que du polyéthylène glycol (PEG 800 ou PEG 2000). Cette étape se déroule en quelques minutes pour la BSA ou quelques heures pour le PEG et consiste à recouvrir la surface avec un large excès de ces molécules passivantes.

Nous avons donc vu comment fonctionnaliser une biopuce d'or pour obtenir différents plots réagissant spécifiquement avec les différentes cibles. Il nous faut maintenant expliciter la préparation des solutions bactériennes.

2.4.2 Souches, milieu, protocoles

Les souches bactériennes utilisées sont issues d'échantillons naturellement contaminés : *E. coli* ATCC 11775 provient d'un échantillon urinaire et les souches de *Listeria monocytogenes* et *innocua* sont issues d'échantillons alimentaires contaminés fournis par l'Institut Scientifique d'Hygiène et d'Analyse (ISHA, Massy, France).

Les souches bactériennes, sorties du stock conservé à -80 °C sont étalées sur des géloses d'Agar Tryptone Soja (TSA, Biomérieux, France) et incubées sur la nuit à 37 ° ± 1 ° C.

Préalablement à toute expérience, la veille, une colonie de la souche d'intérêt est inoculée dans 10 mL de bouillon de Tryptone Soja (TSB, Sigma Aldrich, Missouri, USA) à 37 °C ± 1 °C pendant 18 h ± 2 h. Avant l'expérience, la concentration en bactéries est alors ajustée à 1MacFarland (McF) à l'aide d'un densitomètre (Grand Instrument) en ajoutant un tampon peptone (BPW, Biomérieux).

Pour chaque expérience, jusqu'à 7 dilutions au dixième sont effectuées consécutivement dans du TSB. Selon l'expérience visée, une des sept dilutions est injectée dans la cuve expérimentale.

Pour connaître la concentration bactérienne, nous étalons entre 50 ou 100 μL de chacune des dilutions sur des géloses de TSA (2 géloses par dilution). Le lendemain, le dénombrement des colonies ayant crû sur la nuit est effectué.

Parallèlement à ces géloses, la stérilité du milieu utilisé pour les dilutions est évaluée en incubant trois tubes de 5 mL du TSB utilisé et en vérifiant l'absence visuelle de croissance dans chaque tube.

Une expérience classique de détection en SPRI à prisme OR en CCM est donc assez semblable dans son déroulement à une expérience de détection en SPRI habituelle en CCM : une biopuce fonctionnalisée avec des anticorps adaptés est insérée dans le montage. On injecte ensuite une solution bactérienne de concentration connue et on observe la modification du signal SPR au cours du temps. La véritable différence expérimentale se situe dans les données collectées et dans le traitement d'image. C'est ce que nous allons voir dans la prochaine section.

2.5 Traitement de données

2.5.1 Reconstruction d'images à partir du balayage du plan image

a. Reconstruction des images SPRI HR

La reconstruction des images résolues à partir des images brutes est schématisée Figure 2.21 pour un balayage spatial en trois positions. Dans nos expériences, le balayage s'effectue en 15 positions différentes.

Le balayage du plan image avec la caméra a fourni des séquences d'images mises au point sur différentes zones de la biopuce (« 1. Images brutes » sur la Figure 2.21). Le premier travail à effectuer consiste à réaligner les mêmes images de différentes séquences entre elles : tous les premiers clichés de toutes les séquences doivent être réalignés le mieux possible entre eux, et ainsi de suite pour les 15 clichés qui composent la séquence (« 2. Réalignement des images de même x » sur la Figure 2.21). Cette étape a pour objectif de tenter de diminuer les dérives de l'instrument qui peut nuire à la qualité globale de l'image à terme.

La seconde étape de traitement d'images consiste à reconstruire les images nettes du plan image. Un algorithme écrit en Python permet de reconstruire une image résolue en précisant la position de la bande de netteté sur plusieurs images de la séquence.

À partir de ces positions de netteté ponctuelles sur quelques images, l'algorithme extrapole les zones résolues correspondant à chaque image de la séquence et reconstruit l'image finale en accolant toutes les bandes de netteté entre elles (3. Reconstruction des

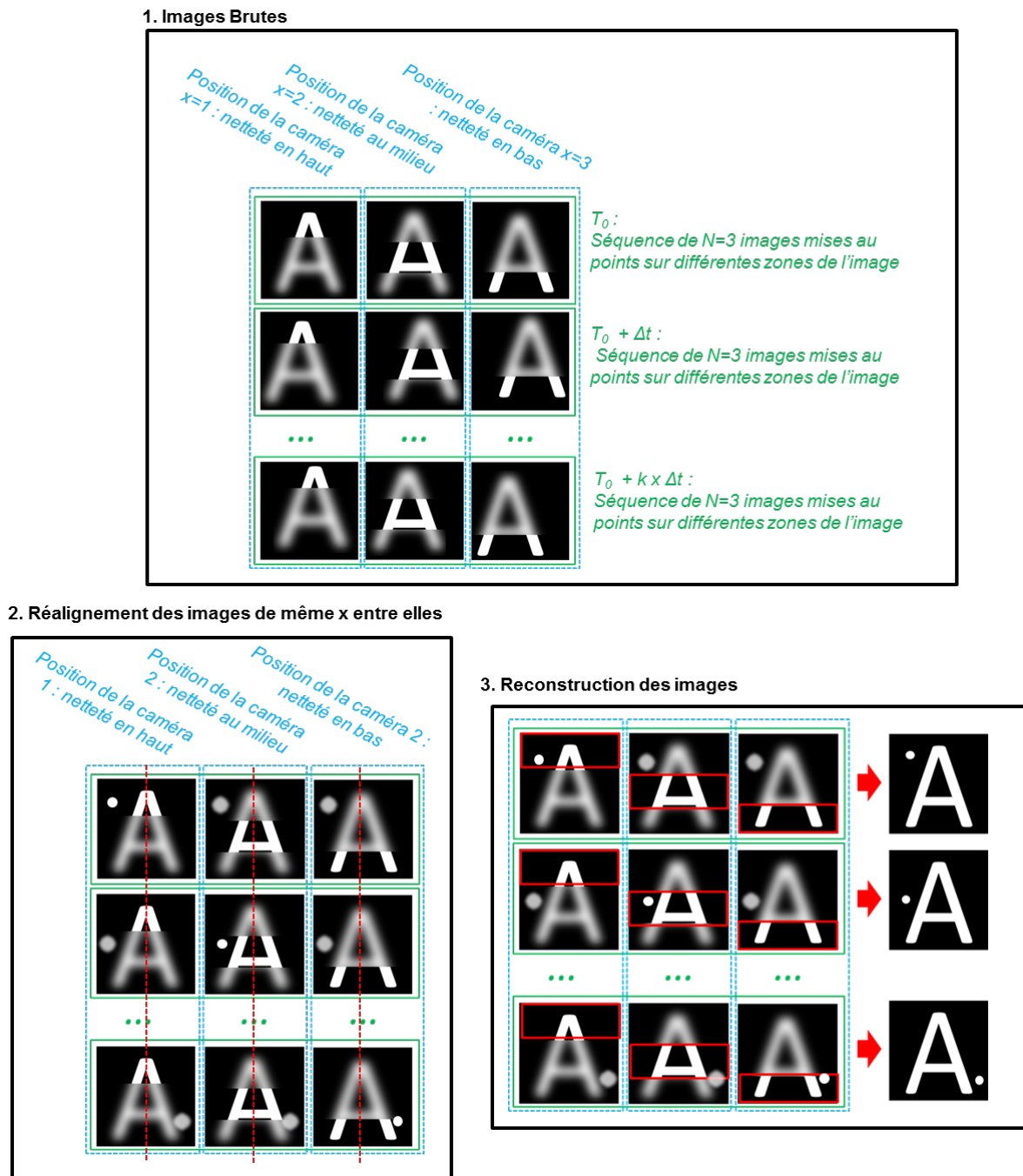


Figure 2.21 Différentes étapes de reconstruction des images résolues à partir des images séquentielles brutes

images sur la Figure 2.21).

Sur la Figure 2.22, nous montrons un exemple réel de deux images brutes extrêmes ayant des nettetés en haut et en bas de l'image (clichés a et b sur la Figure 2.22), ainsi que l'image finale reconstruite en c. Les zones encadrées en rouges

contiennent des défauts d'or qui permettent de mettre en évidence la relative netteté entre les zones.

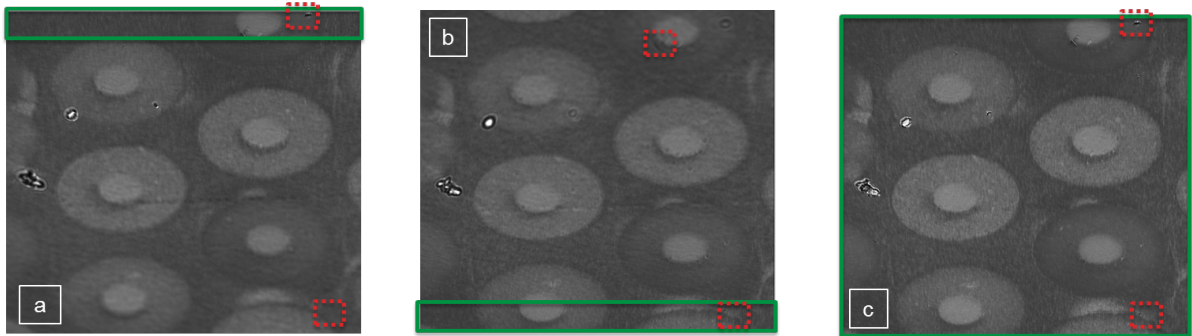


Figure 2.22 Comparaison entre deux images brutes extrémales prises en scannant le plan image de l'objectif en SPRI HR à prisme et une image reconstruite à partir d'un balayage de 15 images
a. Bande de netteté en haut de l'image
b. Bande de netteté en bas de l'image
c. Image nette reconstruite

b. Traitement global des images

Nous l'avons dit dans la première section de ce chapitre, la sensibilité n'est pas un facteur limitant dans nos expériences, car les bactéries sont des objets de taille importante qui créent une modification suffisante de la résonance plasmon. Cependant, ces modifications ne sont pas facilement visibles sur les images brutes du fait des variations d'intensité sur les différentes parties de la puce : différence entre plot d'anticorps et surface d'or passivée, imperfections de l'or, etc.

C'est pour cette raison que toutes les analyses sont réalisées sur des images différentielles : une image est définie comme image de référence en début d'expérience et

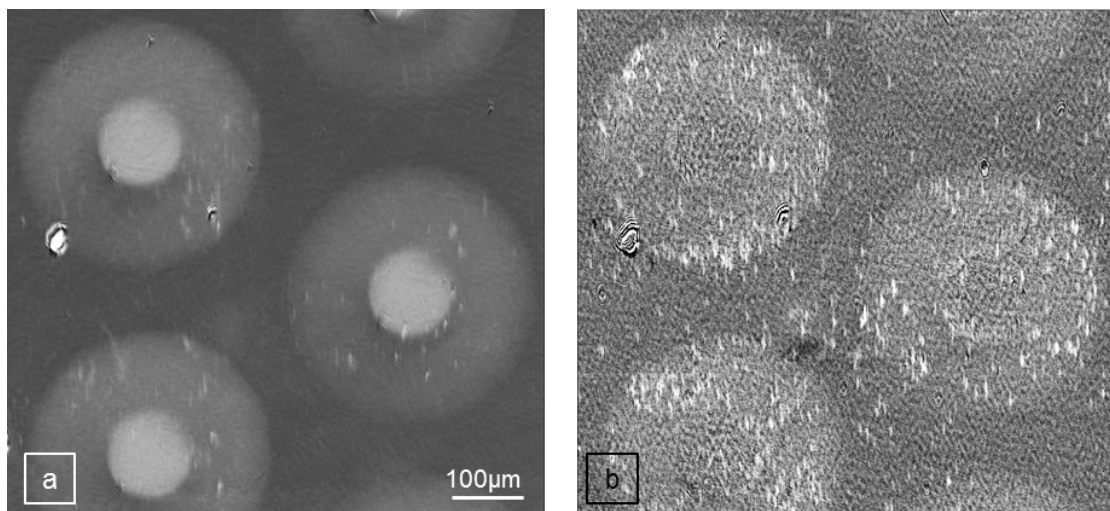


Figure 2.23 Image brute (a.) VS image différentielle (b.) en SPRI HR à prisme

est soustraite à toutes les suivantes. Les événements bactériens deviennent alors plus visibles (Figure 2.23).

Ce traitement est également réalisé sur les images de microscopie de Nomarski pour un meilleur contraste.

Afin de comparer les dynamiques relatives des deux types d'images, on présente également, sur la Figure 2.24, les dynamiques des différentes images par rapport à la dynamique de la caméra.

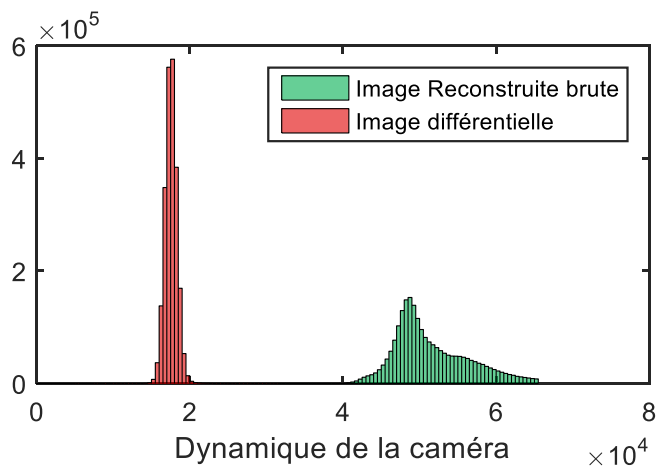


Figure 2.24 Dynamiques comparées d'une image reconstruite brute et d'une image différentielle – pour faciliter la comparaison graphique l'image différentielle utilisée a été ajustée en soustrayant le minimum afin d'obtenir des valeurs uniquement positives

Sur les images brutes reconstruites, la différence de contraste induite par les bactéries est complètement masquée par la variabilité du signal global, dû entre autres aux différences de contrastes entre les plots. Sur les images différentielles, ces variabilités sont annulées et les bactéries sont visibles.

2.5.2 Analyse des images

Les images différentielles que nous avons définies servent ainsi de base à toutes les analyses réalisées.

a. Analyse classique de l'accroche bactérienne

Afin de comparer les performances de la SPRI à prisme OR aux autres techniques de SPRI classique, un traitement des images de type *sensorgramme* a été réalisé : les plots d'anticorps sont définis comme des régions d'intérêt (cercles bleus et verts sur l'image a de la Figure 2.25), et la variation globale du signal sur le plot est observée au cours du temps. Cette analyse fait perdre toutes les informations sur la répartition spatiale de l'intensité à l'intérieur d'un plot d'anticorps, et correspond donc exactement aux traitements SPR classiques.

b. Détection d'évènement

Le traitement que l'on va appeler *haute résolution* (HR) tire profit de la capacité d'observer la répartition spatiale de l'intensité sur un plot. L'analyse HR consiste à compter le nombre d'évènements bactérien par plots d'anticorps.

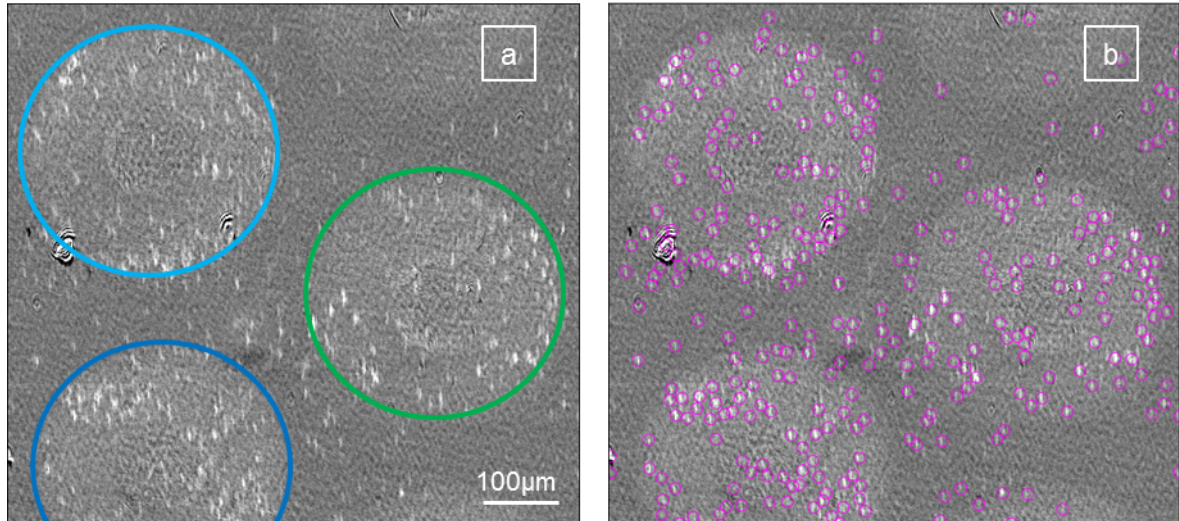


Figure 2.25 Détection d'évènements sur les images reconstituées différentielles de SPRI HR

a. Image différentielle b. Détection d'évènement

– Les différentes zones contourées en couleurs sur l'image a. représentent différentes zones fonctionnalisées

Grâce à l'extension Trackmate de Fiji (nouvelle version d'image J), il est en effet possible de réaliser de la détection d'évènements ponctuels. Le principe est de définir une taille attendue des particules et d'appliquer un filtre laplacien de gaussien aux images à traiter. Sur cette image filtrée, les maxima locaux correspondent à la présence d'un évènement. Cette extension fournit ensuite une liste de tous les points détectés sur toutes les images de la série analysée, avec leur position et l'image à laquelle ils appartiennent. Il est ensuite possible de calculer le nombre d'évènements par zone d'intérêt au cours du temps. Un exemple de détection d'évènements est présenté sur la Figure 2.25.

La taille « attendue » des particules est appelée le rayon du blob, et sera notée R_{blob} . Cette notion aura son intérêt dans le chapitre 4. Les valeurs données à Trackmate pour la détection d'évènements en SPRI HR est de $7,4\mu\text{m}$ et pour la détection en microscopie de Nomarski elle est de $2\mu\text{m}$. Ces valeurs sont cohérentes avec les valeurs réelles des tailles des points d'intensité mesurés sur les différents types d'images.

Nous avons donc pu voir dans ce chapitre comment fonctionne notre système d'imagerie SPR à prisme, et comment se déroulent les expériences. Le prochain chapitre va présenter les résultats des expériences de détection de pathogènes.

3 ANALYSE STATIQUE DES EVENEMENTS BACTERIENS EN SPRI A PRISME OPTIMISE EN RESOLUTION

3.1 Présentation des expériences réalisées

Dans cette partie, nous allons étudier les apports de la SPRI HR et du comptage d'évènements bactériens discrets pour caractériser notre système de détection SPR et détecter précocement des microorganismes. Ce travail a fait l'objet d'une publication en cours de révision dans le journal Lab on a Chip².

Afin d'adresser une problématique réelle de détection de pathogènes, nous avons effectué des expériences de détection de deux souches de *Listeria* en condition de croissance, à différentes concentrations initiales, et en suivant en simultanément l'évolution de la solution en SPRI HR à prisme et en microscopie de Nomarski, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent (2.2.2 c).

La liste des expériences réalisées est présentée dans le Tableau 3.1.

Nombre d'expérience	Concentration initiale (= après numération) (UFC.mL ⁻¹)	Souche
N=1	2.10 ⁴	<i>L. monocytogenes</i> & <i>L. innocua</i>
N=2	2.10 ⁴	<i>L. monocytogenes</i>
N=2	2.10 ⁴	<i>L. innocua</i>
N=1	3.10 ⁶	<i>L. monocytogenes</i>
N=2	2.10 ²	<i>L. monocytogenes</i>

Tableau 3.1 Récapitulatif des différentes expériences effectuées en détection de *Listeria*

Celles-ci ont été effectuées grâce à une collaboration avec Alexandra Morlay de la société Prestodiag, qui présente certains résultats préliminaires de ces expériences dans son manuscrit publié en décembre 2016 [193].

Comme nous l'avons vu dans le chapitre de mise en contexte, *Listeria monocytogenes* est un des cinq principaux contaminants alimentaires bactériens, tandis

² M. Boulade, A. Morlay, F. Piat, Y. Roupioz, T. Livache, P. G. Charette, M. Canva, L. Leroy, « Early detection of bacteria using resolution-optimized SPR imaging and automated event counting : experiments with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* », Lab On a Chip, janv. 2019, en révision

qu'à l'heure actuelle, *Listeria innocua* est une souche considérée inoffensive. Les deux souches sont en revanche très proches génétiquement, au point que la comparaison des deux génomes est utilisée dans les recherches sur l'origine génétique de la pathogénicité des bactéries [42]. La différenciation de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria innocua* est par conséquent régulièrement effectuée dans des expériences de détection afin de démontrer la spécificité du système étudié [202]. Ce couple nous a donc paru pertinent pour mettre en évidence et caractériser les performances de notre système.

Pour effectuer cette détection spécifique, des plots d'anticorps Lis 12, LiM16 et LiM14 et du contrôle KLH ont été fonctionnalisés par électropolymérisation sur la surface d'or (2.4.1 a). Cette stratégie de fonctionnalisation de surface a été choisie pour correspondre aux procédés de fabrication de l'entreprise Prestodiag. Cette technique a été sélectionnée en interne pour sa stabilité. Cela va avoir des conséquences sur l'homogénéité des plots d'anticorps, comme nous allons le voir dans la suite (3.2.2). Le plan de dépôt a été conçu afin de permettre l'observation des quatre types d'anticorps sur une même zone d'observation en SPRI HR de $1,5 \times 1 \text{ mm}^2$.

La concentration en solution au moment de la détection de *Listeria monocytogenes* par SPRI classique se situe entre 10^5 UFC.mL^{-1} et 10^7 UFC.mL^{-1} [158], [159], [203], [204]. Les premières expériences ont donc été effectuées à 10^4 UFC.mL^{-1} , une concentration inférieure aux concentrations limites tabulées, mais qui permettra à priori d'avoir une réponse en quelques heures seulement (on rappelle que le temps de doublement de *Listeria* est situé autour de 40 min dans les conditions de croissance optimales).

Une expérience d'injection à forte concentration (10^6 UFC.mL^{-1}) a été réalisée pour mettre en évidence la réponse « immédiate » du système au-delà d'une certaine concentration.

Enfin, dans le but de se situer dans des conditions plus proches des conditions réelles de détections, des expériences avec des injections à plus faible concentration, de 10^2 UFC.mL^{-1} ont ensuite été menées.

Afin de montrer la spécificité du système étudié, les deux souches de *Listeria* ont été détectées simultanément et séparément, à des concentrations initiales identiques.

Toutes les expériences ont été réalisées en observation couplées avec de la microscopie de Nomarski afin de valider les observations effectuées avec la SPRI HR. Le but est également de tirer profit de la relativement grande profondeur de champs du microscope de Nomarski pour observer le comportement bactérien non seulement en surface mais également dans le volume proche de l'interface.

3.2 Comparaison qualitative des images prises selon les deux modalités et évaluation de la qualité de l'image SPRI HR

Une comparaison des images différentielles obtenues en microscopie de Nomarski (a) et en SPRI HR (b), ainsi qu'un exemple de détection d'évènements individuels (c et d) sont présentés Figure 3.1. Plusieurs observations peuvent être réalisées à partir de ces images.

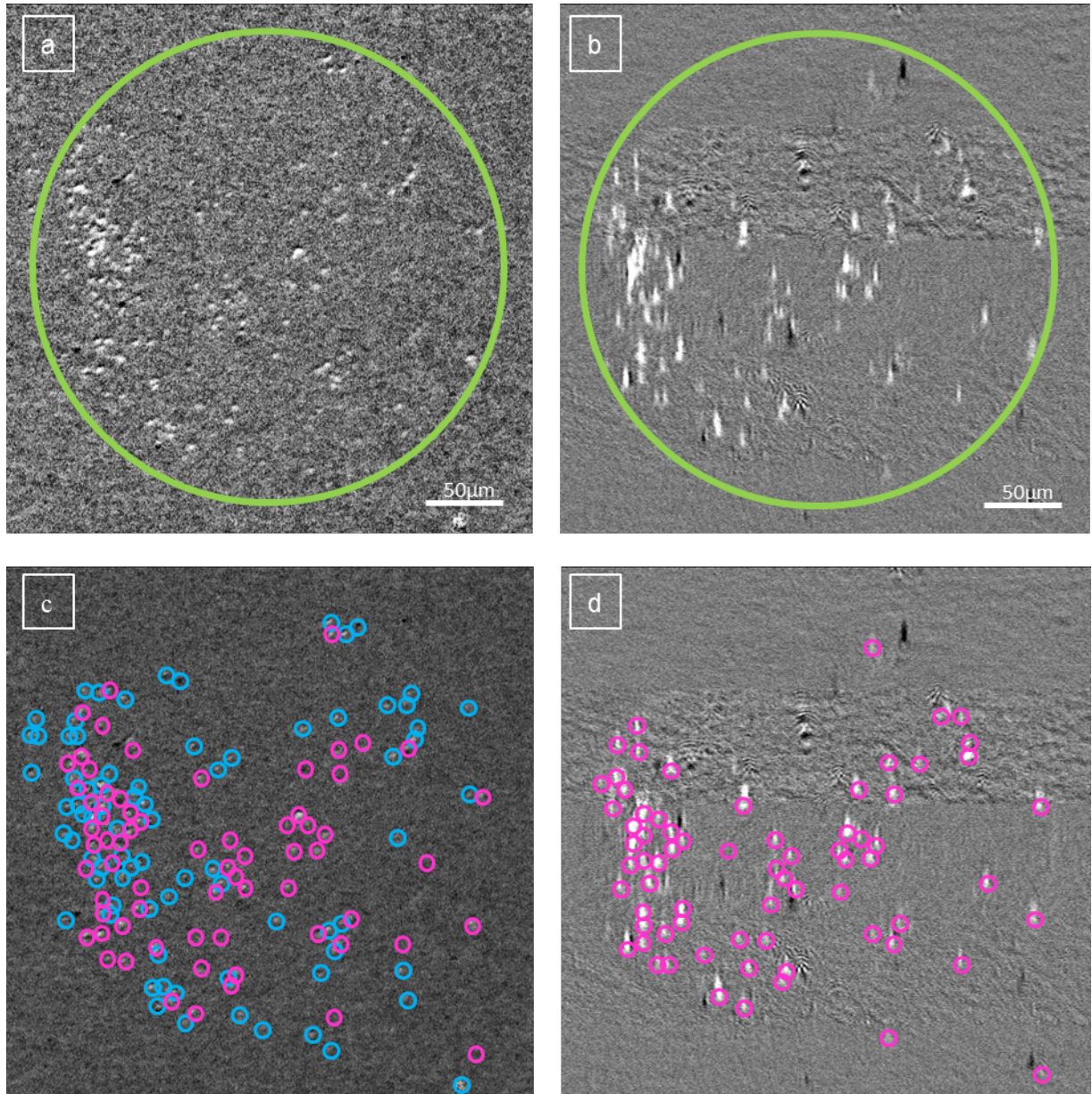


Figure 3.1 Comparaison de la détection en microscopie de Nomarski et en imagerie SPRI HR à prisme (images différentielles)

a. Image différentielle en microscopie de Nomarski

b. Image différentielle en SPRI HR

c. Détection d'évènements sur a. *en rose, les évènements détectés correspondent aux évènements détectés en SPRI, en bleu les évènements supplémentaires*

d. Détection d'évènement sur b.

3.2.1 Résolution et taille de bactéries

Nous avons vu dans les chapitres précédents que *Listeria* a une taille moyenne de $2 \times 0,5 \mu\text{m}$, et que la résolution du système est estimée à $0,5 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$ respectivement dans le sens orthogonal et dans le sens parallèle à la propagation du plasmon. Dans la mesure où l'orientation des bactéries selon la direction de propagation est inconnue et est à priori aléatoire, on peut déterminer un intervalle de taille de tache bactérienne observée en SPRI HR, calculé en prenant les positions extrémales de la bactérie. L'hypothèse ici est que la distance de propagation correspond à la résolution observée.

Parmi les trois positions extrémales possibles de la bactérie (Figure 3.2), le cas le plus avantageux en termes de taille de tache est lorsque la bactérie est orientée orthogonalement au plan de la surface d'or (Figure 3.2a), auquel cas la taille attendue de la tache est de $1 \times 7,5 \mu\text{m}$. Les cas plus désavantageux où la bactérie est parallèle au plan de la surface d'or (Figure 3.2.b et c) donnent respectivement une résolution de $2,5 \times 7,5$

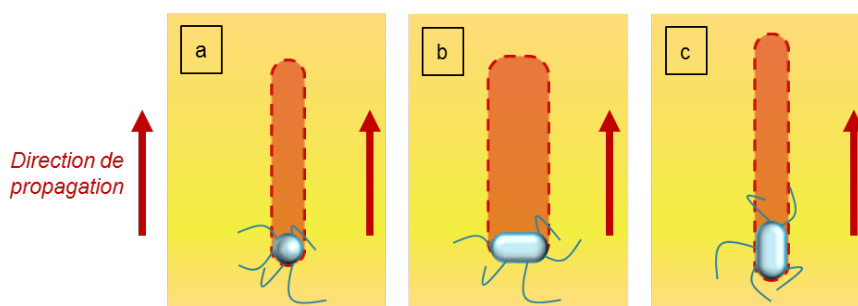


Figure 3.2 Trois orientations possibles pour l'évaluation de la résolution
a. Bactérie orthogonale au plan de l'interface
b. Bactérie orthogonale à la direction de propagation
c. Bactérie parallèle à la direction de propagation

μm (b) et de $1 \times 9 \mu\text{m}$.

Compte tenu de ces positions extrémales, la résolution théorique est comprise dans l'intervalle : $[1 ; 2,5] \mu\text{m}$ dans la direction orthogonale à la propagation, et $[7,5 ; 9] \mu\text{m}$ dans le sens de propagation. Dans nos expériences, le champ plasmon va être imagé sur la caméra et la résolution expérimentale va pâtir des aberrations optiques du système d'imagerie.

Sur les images de SPRI HR (Figure 3.1.b), la taille des taches bactériennes est évaluée à $2,7 \pm 0,5 \mu\text{m} \times 7,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$, respectivement dans le sens perpendiculaire à la propagation plasmon et dans le sens de la propagation. Ces valeurs sont cohérentes avec les résolutions théoriques déterminées plus haut. La résolution dans la direction de propagation est proche du minimum de résolution attendue. Cela peut s'expliquer par le fait que la taille réelle de l'évènement bactérien ne dépend pas de la taille de la bactérie, mais de la portion de bactérie en interaction avec le champ plasmon évanescent, et cette portion a des dimensions plus faibles que la bactérie entière (voir paragraphe 2.2.1 a et plus particulièrement Figure 2.10 pour plus d'explication). Également, il est possible que la distance de propagation réelle du plasmon ne soit pas exactement la distance sur laquelle

le plasmon est visible. En effet, la distance de propagation est définie théoriquement de manière mathématique comme la distance caractéristique de l'exponentielle, mais il est possible que cette distance ne corresponde pas exactement à la résolution des images SPRI HR.

La résolution orthogonale légèrement élevée peut être imputée aux aberrations optiques inhérentes au système optique.

Sur les images DIC (Figure 3.1.a), la taille des bactéries est de $2,0 \pm 0,2 \mu\text{m} \times 0,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$. La variabilité des tailles observées est à imputer partiellement à la variabilité de la taille réelle des bactéries [35, p. 598]. Mais elle est principalement due aux aberrations optiques liées à l'épaisseur de la cuve et au grossissement de l'objectif du microscope. En effet, en choisissant un objectif 10X afin d'obtenir un champ d'observation équivalent au champ SPR, on se place dans une situation où une variabilité d'un pixel dans la mesure de la taille correspond à une variation de taille de 10%.

Sur les analyses de détection d'évènements (Figure 3.1 c et d), on peut voir que plus d'individus sont détectés sur les images DIC. Cela est dû, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, à la différence de profondeur de champ entre les deux techniques. Comme schématisé Figure 3.3, le champ évanescent du phénomène plasmon a une profondeur de pénétration de moins de 200 nm pour une illumination à 740 nm, tandis que le microscope de Nomarski a une profondeur de champ autour de $8 \mu\text{m}$ avec l'objectif utilisé. La valeur exacte de cette profondeur de champ dépend fortement du plan de focalisation, par conséquent elle varie entre les expériences, nous ne donnons donc pas de valeur précise volontairement.

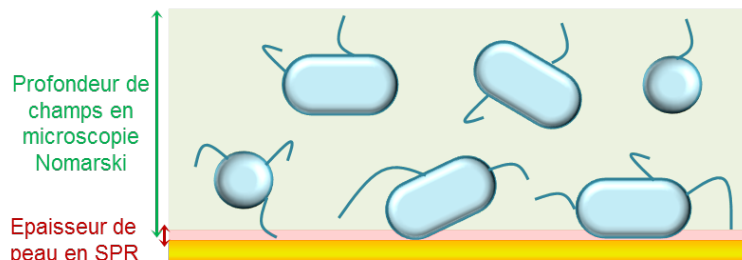


Figure 3.3 Différences de profondeur de champs entre SPRI HR et microscopie de Nomarski

En conséquence de cette différence de profondeur de champ, certaines bactéries en solution dans la cuve expérimentale peuvent être vues par le microscope de Nomarski tout en étant hors de la portée de l'onde évanescente du plasmon. Cela explique la différence entre le nombre de bactéries observées par chacun des systèmes. Pour des densités de bactéries plus importantes, un autre phénomène peut s'ajouter pour justifier la différence de bactéries vues : la résolution plus faible en SPRI HR peut rendre des objets proches indiscernables entre eux.

Les images présentées sur la Figure 3.1 sont ajustées en contraste pour un meilleur rendu visuel. Il est donc important de fournir plusieurs grandeurs typiques pour quantifier les signaux réels. Les réglages des temps d'exposition pour chacune des modalités

d'imagerie ont été déterminés pour obtenir un étalement maximal de l'intensité sur la dynamique de la caméra, tout en conservant un temps d'exposition compatible avec la fréquence d'acquisition. Les images analysées, qui sont les images différentielles, ont donc une plage de variation d'intensité qui est déterminée par le temps d'exposition des images brutes. En termes de niveaux de gris, sur une image différentielle, une tache bactérienne en SPRI HR correspond à une variation du signal autour de 2000, pour une dynamique de caméra de 16bits ($\sim 7 \times 10^4$ niveaux de gris) et un bruit quadratique autour de 500.

Pour les images en microscopie de Nomarski, les images différentielles ont une dynamique sensiblement plus faible : sur une dynamique de caméra de 3x8 bits ($\sim 10^4$, 8 bits par canal de couleur RVB), les images différentielles ont un bruit quadratique de 20, et l'accroche d'une bactérie provoque une élévation d'intensité de 100.

Le rapport signal sur bruit (RSB) est donc plus grand pour les images différentielles en microscopie de Nomarski (RSB=5) que pour les images différentielles SPRI HR (RSB=4), mais la variation de signal est plus importante en SPRI HR qu'en microscopie de Nomarski.

Ces observations couplées nous permettent ainsi de valider l'observation de bactéries individuelles en SPRI HR et nous ont permis de caractériser les signaux bactériens aussi bien en image SPR HR qu'en microscopie de Nomarski. Avant de passer à l'application de l'analyse des signaux pour la détection de bactéries, nous allons voir que l'analyse temporelle des signaux selon les deux modalités peut nous fournir des informations supplémentaires sur notre système expérimental.

3.2.2 Répartition qualitative des bactéries sur un plot

L'étude des images brutes et différentielles obtenues en SPRI HR, dont certaines sont fournies en Figure 3.4 nous permette d'effectuer différentes observations.

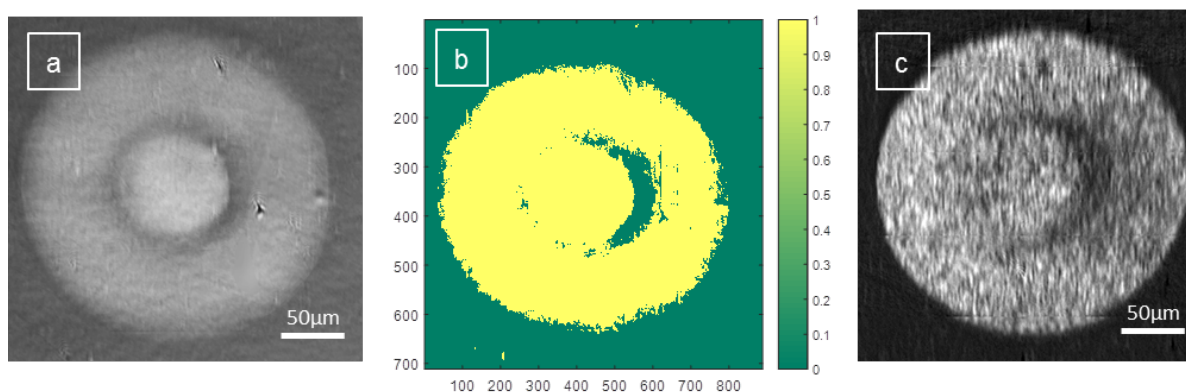


Figure 3.4 Inhomogénéités de surface observées sur un même plot d'anticorps LiM16 sur différents types d'image SPRI HR, pour une injection initiale à 10^2UFC.mL^{-1}
a. Image SPRI HR brute avant injection
b. Détection de surface effective grâce à Matlab
c. Image SPRI HR différentielle 8h40 après injection

Sur l'image a, tout d'abord, on peut voir que la fonctionnalisation de surface n'est pas homogène. Cet inconvénient est dû au fait de la stratégie de fonctionnalisation utilisée qui est très sensible aux inhomogénéités des lignes de courants lors de la réaction d'électrochimie. Ce phénomène complique l'analyse de la densité surfacique par unité de surface fonctionnalisée, car la surface fonctionnalisée visible en SPRI a une forme complexe. De plus, la taille de l'anneau non sensible à l'intérieur du plot a une taille variable selon les différentes zones étudiées.

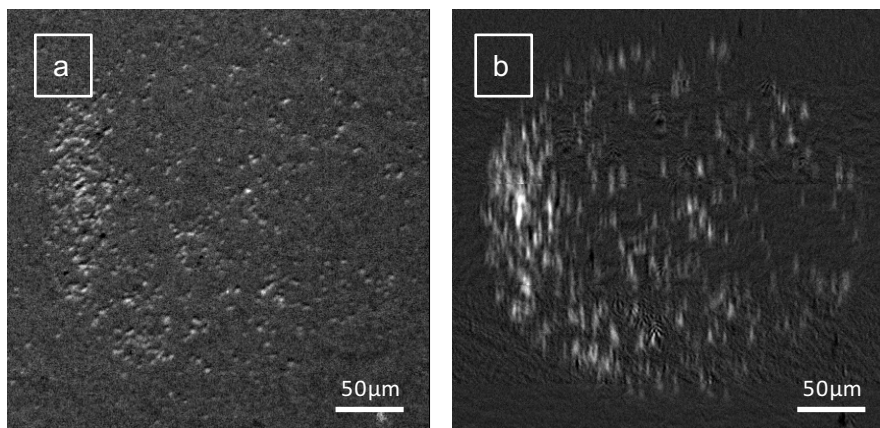
Cette surface, qui apparaît avec le même contraste que l'or non fonctionnalisé sur les images SPRI HR brutes, a une influence directe sur l'accroche bactérienne. Sur la Figure 3.4.c, qui présente une image différentielle de SPRI HR en fin d'expérience, quand la surface est saturée en pathogènes, on peut en effet observer une déplétion en bactéries au niveau de ces zones non fonctionnalisées.

Il est donc nécessaire de prendre en compte la surface fonctionnalisée réelle et non simplement le disque total lors du dénombrement par unité de surface. Cette délimitation de surface effective est effectuée grâce aux images brutes initiales, tel que celle représentée Figure 3.4.a. Ces images permettent de définir un seuil d'intensité qui définit la présence ou l'absence de fonctionnalisation sur un pixel. Les pixels ayant une intensité supérieure au seuil et se situant dans la zone théorique du plot définissent la surface effective de la zone d'anticorps. Cette zone effective calculée est représentée Figure 3.4.b. Dans la suite, toute notion de densité surfacique sur plot d'anticorps en SPRI HR se réfèrera implicitement à la surface effective du plot d'anticorps.

Pour la microscopie de Nomarski, ce phénomène de déplétion locale est moins contrasté, du fait que l'on observe également des bactéries en solution. Par conséquent, la surface utilisée pour définir les densités surfaciques de bactéries par plot d'anticorps est dans ce cas le disque entier.

Un deuxième type d'inhomogénéité est observable sur les plots d'anticorps, cette fois-ci visible à relativement faible nombre de bactéries en surface, et sur les images différentielles. Il s'agit de l'inhomogénéité de répartition des bactéries en surface de plots spécifiques. Un exemple est représenté sur la Figure 3.5.

Sur ces images on peut voir que l'accroche bactérienne s'effectue en partie en formant des surconcentrations locales de bactéries, comme ici à droite du plot. Cette tendance peut encore une fois être due à l'inhomogénéité de la fonctionnalisation de surface, mais d'autres phénomènes semblent plus probables. Tout d'abord, une fois une première bactérie fixée sur la zone fonctionnalisée, celle-ci peut se multiplier et donner naissance à d'autres bactéries qui elles-mêmes, étant directement présentes à la surface du capteur, ont une probabilité plus grande d'être elles-mêmes reconnues et fixées par les anticorps. D'autre part, en se fixant à la surface, la bactérie crée un point d'ancrage pour les bactéries en solution, qui vont alors plus facilement se fixer elles-mêmes, dans des mécanismes que l'on peut rapprocher de ceux des premières étapes de formation des biofilms.



**Figure 3.5 Inhomogénéité de répartition des bactéries sur un plot d'anticorps LiM16 vues en images différentielles :
a. en microscopie de Nomarski b. en SPRI HR**

Sur l'image en SPRI HR, on peut observer que cette agrégation des bactéries empêche de discerner les événements individuels comme c'est le cas en microscopie de Nomarski. Cela a pour conséquence que le nombre d'objets observés en SPRI HR risque d'être sous-estimé.

3.3 Évaluation des temps de doublement et qualité de la cuve

Comme nous l'avons dit dans la partie précédente, la profondeur de champ de la microscopie de Nomarski permet de sonder la quantité de bactéries présentes sur plusieurs microns de profondeur de solution. Il est donc possible de suivre en temps réel la croissance en surface par la SPRI et la croissance à la fois en surface et sur les premiers microns de la solution en microscopie de Nomarski. Le volume fixe défini par la profondeur de champs de la microscopie permet d'évaluer quantitativement des paramètres comme le taux de croissance bactérienne en volume. Une connaissance quantitative de la croissance dans la cuve peut nous permettre d'estimer l'influence de la cuve sur l'efficacité de la croissance bactérienne en volume. En effet, de nombreuses publications démontrent la biocompatibilité du PDMS, mais il ne faut pas oublier que notre cuve contient un volume relativement faible de solution, ce qui n'est à priori pas idéal, car les conditions de croissance optimales sont mesurées en large volume, où le brassage nutritif est plus conséquent.

Pour évaluer la croissance en volume et en surface, une modélisation des phénomènes en jeu s'impose.

3.3.1 Hypothèses

Afin d'estimer les courbes expérimentales de manière adéquate pour en extraire des temps caractéristiques, il est nécessaire de comprendre l'évolution théorique du nombre de bactéries à proximité d'une surface en faisant différentes hypothèses sur les phénomènes à l'origine de la présence de bactéries proche de l'interface.

Pour les deux modalités d'imagerie, les profondeurs sondées sont différentes, les phénomènes à l'origine de l'accumulation bactérienne n'ont par conséquent possiblement pas le même poids, mais le raisonnement théorique est le même. On cherche donc à modéliser l'augmentation du nombre de bactéries en fonction du temps, dans un volume sondé qui s'étend sur une distance D depuis l'interface (Figure 3.6). Cette quantité dépend de la surface de capteur considérée, c'est pourquoi dans la suite nous allons raisonner sur un nombre de bactéries par unité de surface de capteur, ou densité surfacique de bactérie.

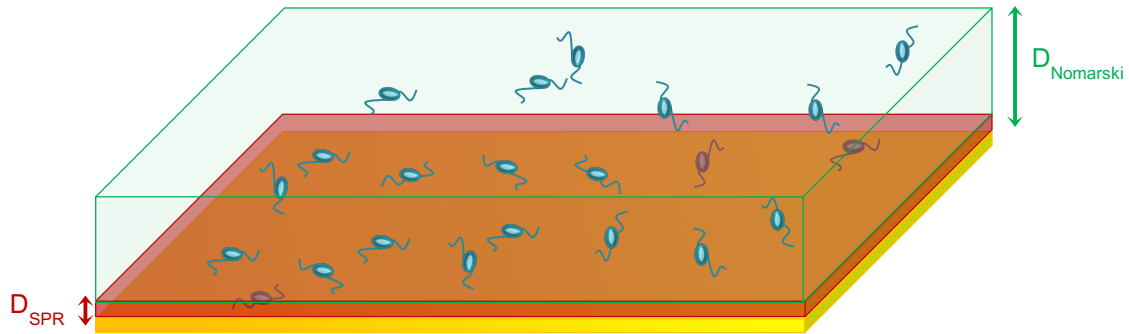


Figure 3.6 Situation modélisée : étude de l'évolution du nombre de bactéries dans un volume d'épaisseur D partant de la surface de l'interface

L'augmentation du nombre de bactéries en surface peut s'expliquer par deux phénomènes : l'adsorption en surface de bactéries qui croissent en volume sous l'effet de la diffusion et de la gravité (Figure 3.7a), et la croissance en surface de bactéries déjà fixées en surface Figure 3.7b).

Considérons une solution de milieu de culture contenant des bactéries. Comme le milieu est riche en nutriments, les bactéries ont un certain taux de division. La concentration en bactéries évolue donc en fonction du temps de manière exponentielle, tant que l'appauvrissement du milieu de culture est négligeable. L'évolution de la concentration au cours du temps peut donc être décrite par : $C(t) = C_0 \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right)$ où C_0 est la concentration à l'instant initial, et τ_v est la constante de temps caractéristique de la croissance bactérienne en volume.

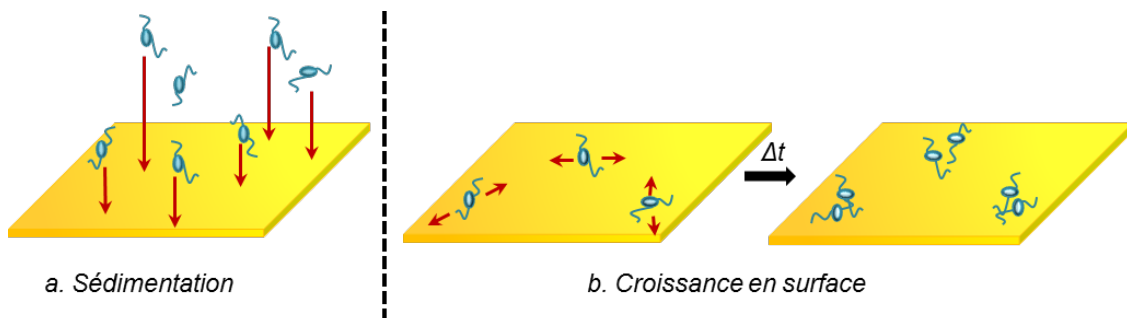


Figure 3.7 Différents facteurs possibles responsables de l'augmentation du nombre de bactéries proche de la surface
a. Sédimentation : dépôt de bactéries en volume sur la surface due par gravité
b. Croissance des bactéries déjà présentes sur la surface

Pour des molécules comme pour des bactéries non motiles, la probabilité qu'un individu rentre dans le volume de détection dépend uniquement de phénomènes de transports passifs de matières, telles que la gravité, le mouvement brownien ou les mouvements de flux. Dans les expériences présentées ici, il n'y a pas de flux appliqué, et le volume de détection est le volume délimité par la surface du capteur et l'épaisseur D .

L'article de Squires, Messinger et Manalis [205] propose une méthode simple et pertinente de l'étude de cette problématique, dans le cas d'espèces moléculaires. En s'inspirant de cette méthode, nous pouvons analyser ces phénomènes dans le cas bactérien. Si la bactérie n'est pas motile, en première approximation, en l'absence de flux, le mouvement brownien et la gravité sont les premiers facteurs à prendre en compte (Figure 3.7). L'analyse de ces deux phénomènes (voir Annexe 1) montre que la diffusion a un rôle négligeable par rapport à la gravité.

L'accès des bactéries à la surface est donc régi par leur vitesse de sédimentation, que l'on notera v_g dans la suite. En effet, soumise à la gravité, une bactérie se rapproche d'une distance $v_g * \Delta t$ de la surface en un temps Δt . Cela signifie également que toute bactérie se situant à une distance inférieure à $v_g * \Delta t$ de la surface du capteur sera sur la surface du capteur au bout de Δt .

D'autre part, les conditions initiales choisies sont qu'au temps initial $t = 0$, il n'y a aucune bactérie en surface $N(t) = 0$.

À partir de ces conditions, trois cas sont possibles, selon la capacité des bactéries à poursuivre leur croissance en surface ou non, et à quelle vitesse de division. Étudions ces trois cas.

a. Croissance en surface identique à la croissance en volume

Le cas le plus simple à analyser est celui où la bactérie a la même cinétique de croissance en surface qu'en solution. Dans cette situation, l'augmentation du nombre de bactéries par unité de surface est due à deux phénomènes : la division de bactéries en surface avec un temps caractéristique τ_v , et la sédimentation des bactéries en volume, qui elles aussi ont une croissance à un taux τ_v . En termes d'équation, on peut exprimer la variation surfacique du nombre de bactéries en surface de la manière suivante :

$$dN = \underbrace{\frac{dt}{\tau_v} N(t)}_{\text{Croissance en surface}} + \underbrace{C_0 \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) * v_g * dt}_{\text{Sédimentation}}$$

Où N est la densité surfacique de bactéries (en bactéries par mm^2 de capteur), et les autres grandeurs ont déjà été définies plus haut.

Ce qui donne l'expression de $N(t)$ suivante :

$$N(t) = C_0 \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) * v_g * t \quad (\text{éq. 3.1})$$

b. Pas de croissance en surface

Un autre cas facile à appréhender consiste à supposer que la surface bloque la croissance des bactéries qui y sont accrochées. Dans ce cas, une nouvelle bactérie ne peut arriver en surface que si elle sédimente. En termes d'équation, on peut exprimer $N(t)$ de la manière suivante :

$$dN = \underbrace{C_0 \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) * v_g * dt}_{\text{Sédimentation}}$$

Ce qui donne l'expression de $N(t)$ suivante :

$$N(t) = C_0 * v_g * \tau_v \left(\exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) - 1 \right) \quad (\text{éq. 3.2})$$

c. Le temps de croissance en surface est différent du temps de croissance en volume

Le dernier cas, plus compliqué, mais plus vraisemblable à priori, consiste à supposer que la croissance en surface est possible, mais qu'elle s'effectue avec un taux de croissance différent du taux de croissance en volume. On définit donc un temps caractéristique de croissance en surface τ_s , et l'équation qui régit la densité surfacique de bactéries devient :

$$dN = \underbrace{\frac{dt}{\tau_s} N(t)}_{\text{Croissance en surface}} + \underbrace{C_0 \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) * v_g * dt}_{\text{Sédimentation}}$$

Ce qui donne :

$$N(t) = C_0 v_g \frac{\tau_v \tau_s}{\tau_s - \tau_v} \left[\exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) - \exp\left(\frac{t}{\tau_s}\right) \right] \quad (\text{éq. 3.3})$$

Nous obtenons ainsi trois expressions possibles pour modéliser les données expérimentales.

a. Prise en compte des conditions expérimentales

Dans les paragraphes précédents, les expressions théoriques obtenues rendent compte du nombre de bactéries par unité de surface du capteur. Cependant, en imagerie SPRI, le nombre de bactéries apparentes sur l'image différentielle n'est pas nécessairement égal au nombre réel. En effet, du fait de la limitation en résolution du système, si l'adhésion d'une bactérie à la surface se déroule trop proche d'une bactérie déjà en surface, cette adhésion ne sera pas détectée. Ainsi, plus la surface est encombrée en bactéries, plus la probabilité qu'une nouvelle bactérie crée un signal en SPRI est faible. Il va donc falloir plus de temps que prévu pour voir le nombre de bactéries en surfaces doubler.

Pour modéliser cette réalité expérimentale, on modélise le nombre $SPR(t)$ le nombre d'évènements bactériens détectés sur les images SPRI HR au cours du temps. Comme

nous l'avons dit, la variation du nombre d'évènements bactériens détectés est une fraction du nombre réel de bactéries nouvellement arrivées en surface modulée par une probabilité de détection proportionnelle que l'on va noter α . On a donc l'équation :

$$dSPR(t) = dN(t) * \frac{S_{libre}}{S_{tot}}$$

La surface libre réelle dépend de la répartition des bactéries sur la surface et nous avons vu précédemment que cette répartition n'est pas homogène. De plus, il est probable que dans le cas de croissance surfacique, la probabilité que deux bactéries filles soient indiscernables l'une de l'autre est plus élevée. Cependant, par souci de simplicité, nous allons ici supposer qu'elle l'est, en gardant à l'esprit que le cas réel risque de donner des résultats inférieurs. On peut donc modéliser la surface occupée (S_{occ}) en fonction de l'encombrement moyen généré par l'accroche d'une tache bactérienne (S_{bact}) et du nombre de bactéries présentes en surfaces ($N(t) * S_{tot}$) de la manière suivante : $S_{occ} = N(t) * S_{tot} * S_{bact}$.

L'équation régissant les variations de $SPR(t)$ évolue ainsi en :

$$\frac{dSPR(t)}{dt} = \frac{dN(t)}{dt} * [1 - N(t) * S_{bact}]$$

Cette équation se résout facilement indépendamment de l'expression de $N(t)$ devient :

$$SPR(t) = N(t) - S_{bact} * \frac{N(t)^2}{2} \text{ (éq. 3.4)}$$

Nous pouvons tenter d'évaluer l'effet de ce facteur correctif en tenant compte des valeurs des différents paramètres. L'encombrement induit par l'accroche d'une bactérie dépend de la taille de la tache bactérienne créée lors de l'accroche, mais n'est pas exactement égal à celle-ci. En effet, l'encombrement correspond à toute la portion de la surface sur laquelle on ne pourra pas détecter de nouvel évènement du fait qu'une bactérie

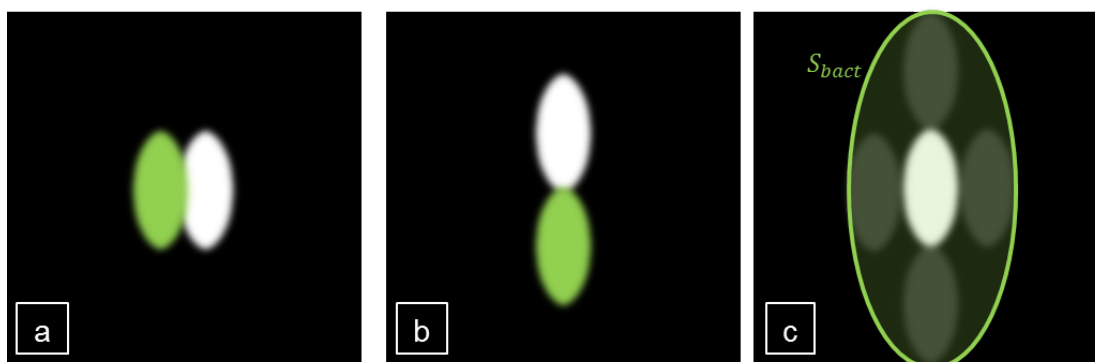


Figure 3.8 Définition de S_{bact} comme la surface d'encombrement induit par l'accroche d'une bactérie

a. Deux bactéries trop proches côte à côte forment une seule tache lumineuse continue et ne seront détectées que comme un seul évènement

b. Cas équivalent au a. dans la direction verticale

c. Définition de S_{bact}

est déjà accrochée. Ainsi, sur la Figure 3.8, nous pouvons voir que cet encombrement correspond en réalité à une surface de dimensions doubles par rapport à celle de la tache bactérienne.

Ainsi, pour la SPR, nous avons un S_{bact} de $5,4 \mu\text{m} \times 15,8 \mu\text{m}$. Dans ces conditions, le terme correctif cesse d'être négligeable, c'est-à-dire devient supérieur à 1% du terme principal, à partir d'environ 200 bactéries. Cette valeur est bien sûr optimiste car nous avons négligé tous les phénomènes d'inhomogénéité d'accroche.

Dans le cas de la microscopie de Nomarski, ce terme existe à priori également. Si nous effectuons le même calcul avec la taille de la tache bactérienne observée avec cette technique, le terme correctif n'a d'influence qu'au-delà de plusieurs milliers de bactéries en surfaces, nous pouvons donc définitivement négliger le terme.

3.3.2 Critères d'évaluation des modèles

Afin de confronter ces expressions théoriques à la réalité de nos expériences, nous devons définir deux choses : des critères d'évaluation d'exactitude des simulations et une grandeur mesurable qui puisse être comparée à des valeurs présentes dans la littérature.

Les modélisations sont ajustées aux données expérimentales en utilisant la méthode des moindres carrés consistant à trouver les paramètres de modélisation minimisant les carrés des écarts entre données expérimentales et données théoriques. Cette méthode est très largement utilisée dans les modélisations, mais elle a un inconvénient : elle ne rend pas compte du signe de l'écart entre théorie et expérience, donc si la modélisation surévalue ou sous-évalue constamment les données expérimentales, cela peut potentiellement donner le même résultat que si les points sont équitablement répartis. C'est pourquoi **la qualité de la modélisation est appréciée en observant la répartition des écarts relatifs entre la modélisation et les données expérimentales, que l'on appelle le résidu. La modélisation sera d'autant plus juste que le résidu est faible et centré autour de zéro.**

Pour renforcer la validité du modèle, celui-ci doit fonctionner sur plusieurs zones d'un même capteur avec les mêmes paramètres. Ainsi, sur une même expérience, il faudra à la fois étudier la forme du résidu et la reproductibilité de la simulation sur des surfaces de capteur différentes.

Finalement, dans le but de donner un sens physique aux modélisations, il est important de tirer de ces modélisations des grandeurs comparables à la littérature. Pour évaluer la croissance bactérienne, le critère le plus utilisé est le temps de doublement τ_2 . Celui-ci peut être facilement calculé à partir des équations précédentes en utilisant le temps caractéristique par la formule : $\tau_2 = \tau_{vous} \cdot \ln(2)$.

3.3.3 Efficacité de la croissance bactérienne dans la cuve

a. Modèle le plus pertinent en microscopie de Nomarski

Nous présentons Figure 3.9 les résidus des trois types de modélisations possibles, pour les données obtenues en microscopie de Nomarski, pour une expérience particulière d'injection à 10^2 UFC.mL^{-1} , sur deux zones différentes du capteur. Ces modélisations ont été effectuées sur d'autres expériences et présentent des résultats similaires à ceux dont nous allons discuter.

Pour ces trois modélisations, la somme des carrés des écarts entre théorie et expérience après optimisation a donné des résultats équivalents. En revanche, lorsque l'on compare les écarts relatifs, les résidus des exponentielles simples (Figure 3.9.b) présentent une dérive progressive au cours du temps, tandis que les deux autres types de

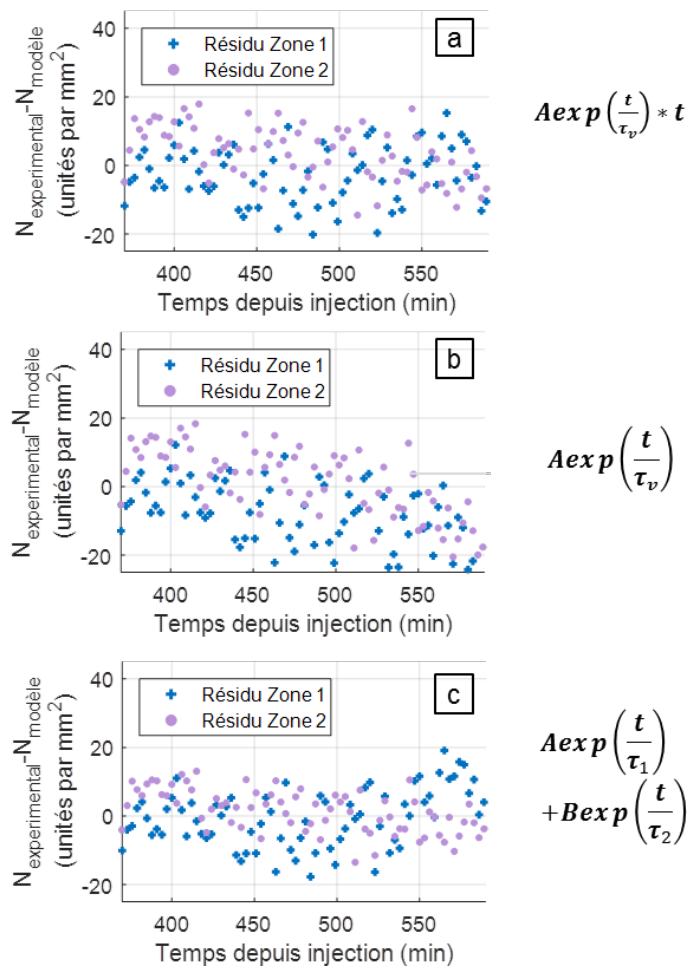


Figure 3.9 Comparaisons des résidus obtenus pour les trois modélisations de croissance des données de comptage de bactéries en microscopie de Nomarski

a. Résidu de la modélisation $Aexp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) * t$ (croissance identique en volume et surface)

b. Résidu de la modélisation $Aexp\left(\frac{t}{\tau_v}\right)$ (pas de croissance en surface)

c. Résidu de la modélisation $Aexp\left(\frac{t}{\tau_1}\right) + Bexp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)$ (croissance différente)

- injection initiale 10^2 UFC.mL^{-1} -

modélisations sont centrés en autour de zéro, et ceci pour les deux zones modélisées. Nous avons donc décidé de rejeter le modèle exponentiel simple.

Les modèles a et c donnent des résidus très similaires. Pour discriminer entre ces deux modèles, on considère le nombre de variables utilisées dans les modélisations. Seuls deux paramètres sont ajustables (A et τ_v) dans la première expression, tandis que la troisième expression présente quatre variables (A , B , τ_1 , et τ_2). Comme les deux modèles donnent des résultats équivalents, mais que l'un est plus simple mathématiquement en termes de variables, nous avons donc décidé de conserver le premier modèle, de la forme :

$$N(t) = A \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) * t \text{ (éq. 3.1).}$$

Les données expérimentales ne nous permettent pas de déceler une modification significative des vitesses de doublement des bactéries en surface par rapport à lorsqu'elles sont en volume.

Dans la suite nous avons donc utilisé le modèle selon lequel la croissance en volume et la croissance en surface ont des temps caractéristiques identiques.

b. Résultats en Nomarski

La biocompatibilité de la chambre expérimentale a été étudiée en évaluant le temps de doublement de *L. monocytogenes* pendant les expériences, grâce à l'observation par le microscope de Nomarski. En effet, comme la microscopie de Nomarski a une profondeur de pénétration de plusieurs microns, le nombre de bactéries détectées par cette technique au cours du temps est une bonne évaluation de la croissance dans la solution.

Le temps de doublement a été évalué grâce à ces modélisations, pour les expériences de concentration initiale de 10^2 UFC/mL⁻¹, où les données à faible nombre de bactéries sont plus nombreuses. Nous obtenons un temps de doublement moyen de 46,2 min, avec une variance de 0,2 min au sein d'une même expérience, et de 3 min entre les deux expériences effectuées. Cette valeur de temps de doublement est cohérente par rapport aux données référencées dans la littérature [187], situées entre 40min et 4h.

Nous reportons dans le Tableau 3.2 les différents temps de doublements obtenus selon les différentes modélisations possibles que nous avons évoquées précédemment. Cela apporte un argument supplémentaire pour justifier notre choix de modélisation.

Modèle	Temps de doublement principal (min)	Variabilité au sein d'une expérience (N=4)	Variabilité totale (N=8)
$N(t) = A \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) \cdot t$	46,2	0,2	3,1
$N(t) = A \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right)$	40,5	2,7	3,9
$N(t) = A \exp\left(\frac{t}{\tau_1}\right) + B \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)$	41,4	1,2	4,3

Tableau 3.2 Récapitulatif de différents temps de doublement mesurés en microscopie de Nomarski pour les différentes modélisations

En effet, on peut voir qu'au sein d'une même expérience, la variance du temps de doublement est sensiblement plus faible pour la modélisation que nous avons choisi par rapport aux autres modélisations. Cette modélisation semble donc plus robuste, ce qui conforte notre choix.

Notre détermination du temps de doublement nous permet de dire que la cuve expérimentale permet une croissance bactérienne proche des conditions optimales.

Une analyse du temps de doublement a également été effectuée en se plaçant sur les deux types de plots d'anticorps positifs (Figure 3.10, page suivante), sans montrer de différence notable de temps de croissance entre les différentes zones. Pourtant, la densité surfacique de bactéries vues par plots d'anticorps à un instant donné est très différente selon le plot considéré. Pour l'expérience dont nous présentons les résultats Figure 3.10, le nombre des bactéries sur le plot d'anticorps LiM 16 est deux fois plus important que le nombre des bactéries vues sur l'anticorps LiM 14. Cette différence peut être due aux inhomogénéités possibles de la solution ou à la présence possible de défauts en surface qui favorisent l'accroche initiale de bactéries sur LiM 16. Cela peut simplement être à imputer au hasard de la répartition aléatoire des premières bactéries en surface qui vont ensuite influencer l'accroche de leurs homologues. Mais dans tous les cas, les temps de croissances à partir du moment où l'accroche en surface débute sont identiques, quelle que soit la zone visée.

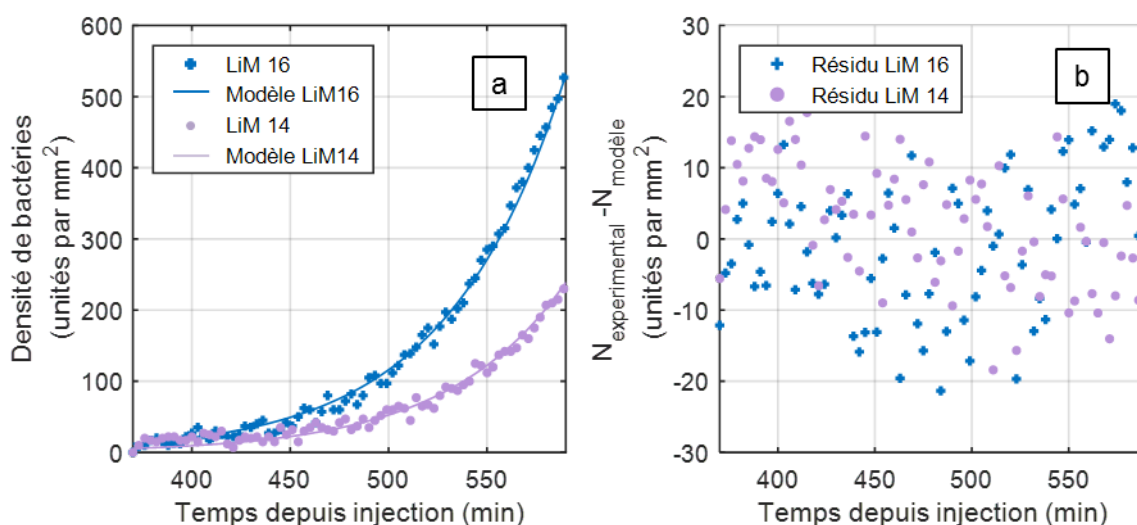


Figure 3.10 Modélisation de l'évolution du nombre de bactéries observées en microscopie Nomarski

- a. Modélisation en $A \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) * t$**
b. Résidus de la modélisation

c. Interprétation du temps de doublement calculés en SPRI HR

De la même manière que pour la microscopie de Nomarski, les analyses de comptage en SPRI HR ont été modélisées selon les trois modélisations possibles pour $N(t)$, en ajoutant une variable supplémentaire k (d'unité m^{-2}) par rapport aux modélisations précédentes telle que :

$$SPR(t) = N(t) - k \cdot \frac{N(t)^2}{2} \quad (\text{éq. 3.4 bis})$$

Cette fois-ci, les trois types de modélisations ont donné des résultats équivalents, comme représenté sur la Figure 3.11, page suivante.

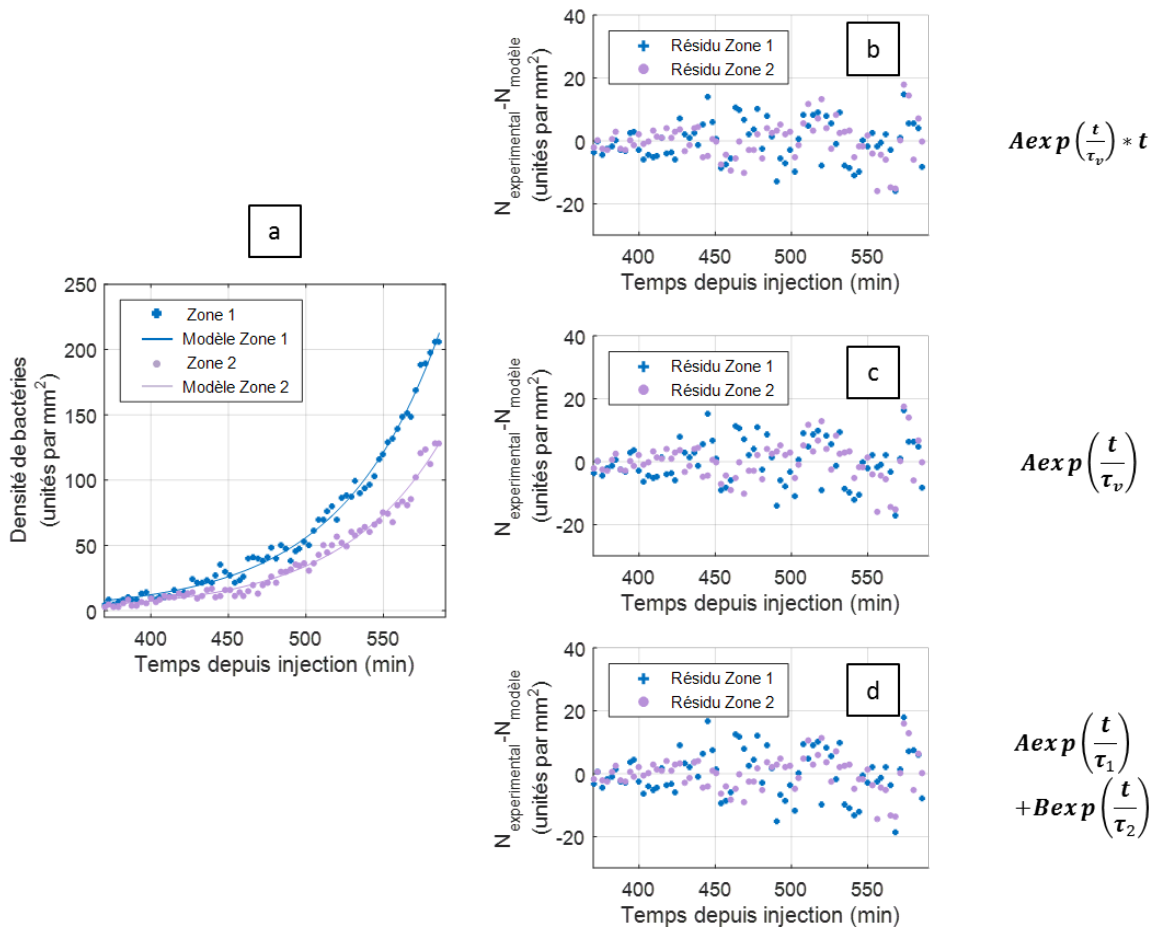


Figure 3.11 Comparaisons des résidus obtenus pour les trois modélisations de croissance sur les données de comptage de bactéries en SPRI HR

a. Modélisation de $SPR(t)$ en prenant $N(t) = A \exp\left(\frac{t}{\tau}\right)$

b. Résidu de la modélisation $A \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) * t$

c. Résidu de la modélisation $A \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right)$

**d. Résidu de la modélisation $A \exp\left(\frac{t}{\tau_1}\right) + B \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)$
- injection initiale 10^2 UFC.mL^{-1} -**

En effet, pour les trois modélisations, l'écart quadratique entre modèle et données expérimental est équivalent, et les résidus sont tous centrés. Il n'est donc pas possible de choisir une modélisation plutôt qu'une autre. Cela s'explique par le fait que, sur les images SPRI HR, à un temps donné de l'expérience, un moins grand nombre de bactéries est détecté en comparaison des images en microscopie de Nomarski. Par conséquent, la détermination du modèle théorique se base sur une statistique moins grande et perd donc en précision. Les trois modèles présentent alors des résultats équivalents. Même si ces modélisations sont moins précises, il est intéressant d'étudier les résultats obtenus, et de les comparer à ceux déterminés en microscopie de Nomarski (Tableau 3.2).

Les résultats d'intérêt en SPRI HR sont présentés dans le Tableau 3.3.

Les valeurs des paramètres k , obtenues dans la modélisation, obtenus pour chaque modélisation, sont plus faibles que la valeur théorique attendue. D'après les analyses effectuées en microscopie de Nomarski, le nombre de bactéries réellement en surface ne dépasse pas 600 dans l'intervalle de temps étudié, donc le terme correctif ne dépasse pas les 3% de correction du signal. Cela signifie que le second terme de l'expression 3.4 bis est plutôt négligeable, ce qui laisse penser que notre prise en compte de la dégradation de résolution en SPRI HR est inutile.

Modèle	Temps de doublement principal (min)	Variabilité au sein d'une expérience (N=4)	Variabilité totale (N=8)	Valeur du k
$N(t) = A \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right) \cdot t$	52,4	0,2	4	$< 10^{-8}$
$N(t) = A \exp\left(\frac{t}{\tau_v}\right)$	44,1	0,9	5	$< 10^{-6}$
$N(t) = A \exp\left(\frac{t}{\tau_1}\right) + B \exp\left(\frac{t}{\tau_2}\right)$	46,3	0,2	3,9	$< 10^{-6}$

Tableau 3.3 Récapitulatif de différents temps de doublement mesurés en imagerie SPR OR pour les différentes modélisations

Les temps de doublement calculés grâce aux images de SPRI HR, quel que soit la modélisation utilisée, sont plus importants que ceux déterminés grâce à la microscopie de Nomarski. Cela laisse donc penser que la perte de résolution en SPRI HR peut être modélisée par un temps de doublement augmenté. Cependant, cette observation n'est a priori pas justifiable simplement en utilisant des modélisations théoriques simples.

3.4 Détection précoce

L'étude des données de comptage en SPRI HR et en microscopie de Nomarski nous a permis jusqu'à présent, de quantifier les signaux observés lors des expériences de croissance bactériennes pour la détection. Nous allons maintenant appliquer nos analyses à la détection précoce de *Listeria*.

Pour chaque expérience, un traitement de type sensorgramme SPR et une analyse en comptage d'évènement par surface d'anticorps effective ont été effectués.

Nous présentons sur la Figure 3.12 une comparaison d'une analyse de type sensorgramme avec une analyse « en comptage » pour la détection de *L. monocytogenes* et de *L. innocua*, à la fois séparément (respectivement a, b et c, d) et simultanément (e et f), pour une injection initiale de 10^4 UCF.mL⁻¹ ±10 %.

Nous rappelons que Lis12 est un anticorps dirigé contre *L. innocua*, que LiM 14 et LiM 16 sont dirigés contre *L. monocytogenes*, et que KLH est un contrôle négatif.

Dans les analyses classiques, les données sont représentées en niveaux de gris, tandis que la majorité des expériences de SPRI classique ont des résultats exprimés en pourcentage de réflectivité. À titre de comparaison, dans nos expériences, une variation d'intensité de 100 niveaux de gris ($I - I_0 = 100$) correspond à une variation de réflectivité de 1 % environ ($\Delta\% R = 1\%$).

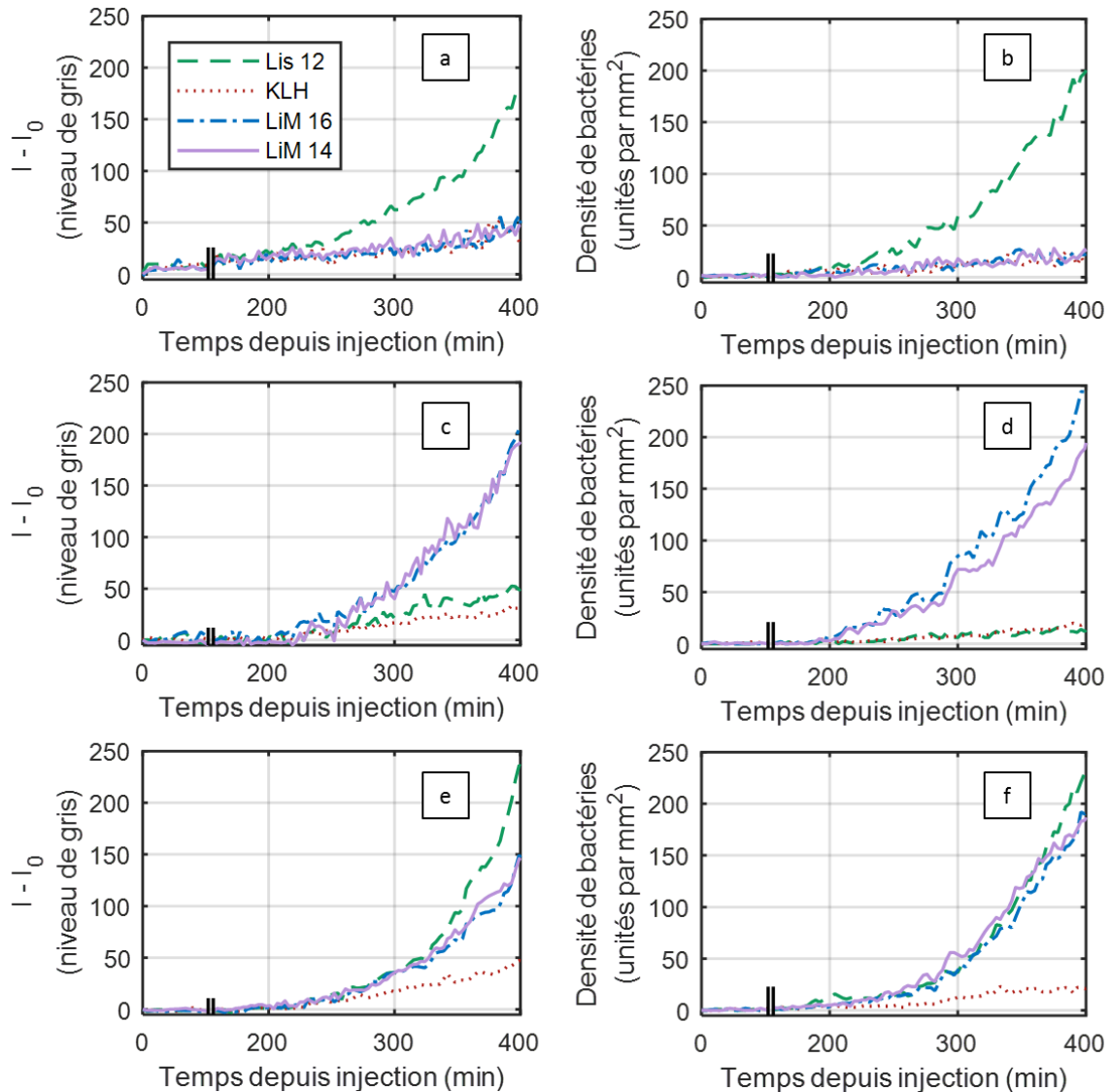


Figure 3.12 Détection de deux souches de *Listeria* par SPRI HR à prisme : Détection de *Listeria innocua* (a et b), *Listeria monocytogenes* (c et d) et détection multiplexe des deux souches (e et f) Comparaison d'une analyse de type sensorgramme (a, c, et e) avec une analyse par comptage d'évènements par plots d'anticorps (b, d et f)

Afin de comparer les deux types de détection dans la suite de la discussion, nous allons discuter des données en termes de pourcentage du signal positif (LiM 16 et LiM 14 pour *L. monocytogenes* et Lis 12 pour *L. innocua*) en fin d'expérience (400 min).

Sur les sensorgrammes (a, c et e), le contrôle négatif (KLH) présente une dérive de signal de l'ordre de 20 % après un délai de 400 min après l'injection, ce phénomène débutant à environ 200 min de l'injection. Pendant le même délai, le même plot de contrôle

présente une déviation de moins de 13 % en comptage. Ceci est directement lié aux différences entre les deux stratégies de détection. En effet, en analyse classique, la variation d'intensité mesurée sur la surface d'une région d'intérêt dépend de nombreux paramètres autres que l'accroche bactérienne. On peut citer le changement de composition en nutriment du milieu dû à la consommation par les bactéries, les variations de puissance de la source lumineuse, ou encore la température du milieu. À l'inverse, en détection d'évènements individuels, même si l'intensité moyenne du fond de l'image varie, l'accroche d'une bactérie unique va rester détectable. Par conséquent, les variations du milieu n'influencent pas la détection d'objets individuels, et l'analyse en comptage nous donne ici accès à une information sur la spécificité d'interaction entre la cible et les sondes uniquement, qui n'est plus modulée par les interactions avec le milieu.

Le bruit du signal a été défini comme le signal obtenu sur les contrôles négatifs, qui expriment à la fois les variations du milieu et les accroches non spécifiques possibles. Les temps de détection sont alors calculés comme étant les temps à partir desquels les rapports signaux sur bruits sont supérieurs à 3.

			Délai de détection(en min)					
Concentration Initiale (UFC.mL ⁻¹)	Souche	Nombre d'expériences	Sensorgrammes SPR			Comptage d'évènements		
			Lis12	LiM16	LiM14	Lis12	LiM16	LiM14
2.10 ²	<i>L. monocytogenes</i>	n=2	/	518	528	/	432	440
3.10 ⁴	<i>L. monocytogenes</i>	n=2	/	306	306	/	236	236
3.10 ⁴	<i>L. innocua</i>	n=2	312	/	/	246	/	/
3.10 ⁴	<i>L. monocytogenes</i> & <i>L. innocua</i>	n=1	318	316	312	247	247	243
3.10 ⁶	<i>L. monocytogenes</i>	n=1		20	20		20	20

Tableau 3.4 Délais de détection comparés pour différentes souches de *Listeria* pour différentes concentrations initiales selon les deux techniques de SPRI
– l'incertitude sur les résultats est majorée par la variabilité sur la concentration initiale, et est donc estimée à +/-10%

Pour chaque type d'expérience réalisée (voir Tableau 3.1), le délai de détection de l'espèce recherchée est résumé dans le Tableau 3.4.

Pour le traitement SPRI classique, les délais de détection sont d'environ 9 h pour une concentration initiale de 10² UFC.mL⁻¹, autour de 6 h pour une injection initiale de 10⁴ UFC.mL⁻¹, et de 20 min qui est le délai de réglage minimal de l'expérience, pour une injection à 10⁶ UFC.mL⁻¹. Ces données sont en accord avec la littérature [206].

Pour le comptage d'évènement, les délais de détections sont réduits d'au moins une heure en comparaison du traitement classique pour chaque expérience. Ces améliorations des temps de détection sont directement à imputer aux différences de sensibilité à un faible nombre de bactéries entre les deux méthodes.

L'adhésion de quelques bactéries en surfaces du plot crée une modification d'intensité sur quelques dizaines de microns au plus, sur une zone d'intérêt de plusieurs centaines de microns. En SPRI classique, à l'échelle du plot, ce signal est noyé et n'est pas différentiable du bruit. Ces modifications locales peuvent en revanche être identifiées comme des évènements d'adhésion uniques grâce à la SPRI HR, ce qui résulte en une détection précoce de la présence des pathogènes fixés.

Pour toutes les concentrations d'injection, les densités surfaciques de bactéries sont comprises entre 10 et 20 individus par mm^2 , avec une valeur moyenne de 15,5 bactéries par mm^2 , tandis que les concentrations en solution au moment de la détection sont évaluées à $5 \cdot 10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour une injection à 10^2 UFC.mL^{-1} , à $3 \cdot 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour une injection à 10^4 UFC.mL^{-1} , et à 10^6 UFC.mL^{-1} pour une injection à la même concentration.

Pour des injections à des concentrations faibles de 10^2 UFC.mL^{-1} , la concentration au moment de la détection est plus faible que pour les injections à 10^4 UFC.mL^{-1} . Cela est dû au temps plus long passé dans la cuve expérimentale par la solution, qui augmente la probabilité pour les bactéries en présence de rentrer en contact avec la surface.

On modélise la sédimentation d'une solution en croissance de bactéries non motiles de concentration initiale 10^2 UFC.mL^{-1} , dans notre cuve expérimentale de 2 mm de hauteur. Au moment où la concentration en solution atteint 10^4 UFC.mL^{-1} , une dizaine de bactéries par mm^2 a déjà touché la surface au cours de son existence par effet de la sédimentation (voir annexe 1). Cela ne signifie pas que toutes ces bactéries sont effectivement fixées, mais que la probabilité n'est pas nulle d'avoir au moins une de ces bactéries qui, en entrant en contact avec la surface, s'est fixée spécifiquement. Tous ces évènements d'accroche potentielle à la surface expliquent l'écart avec une situation où la sédimentation débute à 10^4 UFC.mL^{-1} .

Ce résultat montre que, pour reprendre les notions avancées dans l'introduction, la limite de détection en SPRI HR la plus pertinente pour caractériser le système s'exprime en nombre de bactéries par unités de surface, et que cette limite de détection est située en dessous de 20 bactéries par mm^2 , ce qui correspond à une couverture effective de la surface du capteur de moins 0,002 % (20 bactéries de $\sim 1 \mu\text{m}^2$ par mm^2).

3.5 Relation entre concentration en solution et densité surfacique

Il est assez difficile de coupler les connaissances sur la solution bactérienne et sur le nombre de bactéries en surfaces, car les techniques d'étude du comportement en surface (microscopie, biocapteurs, etc.) ne sont pas les mêmes que les techniques de quantification de la concentration (dénombrement sur géloses, spectroscopie, etc.).

Depuis le début de ce chapitre, nous avons vu dans la section 3.3 que la microscopie de Nomarski permet d'estimer le temps de doublement en solution. À partir de la connaissance de la concentration initiale, et de ce temps de croissance, il est donc possible d'évaluer la concentration en solution tout au long d'expérience.

D'autre part, nous avons vu dans la section précédente que la SPRI HR fournit la densité surfacique de bactéries sur la surface du biocapteur.

Il est donc possible de mettre à profit ces deux mesures pour relier le nombre de bactéries en surface à la concentration en solution.

3.5.1 Évaluation de la concentration en solution

À partir du temps de doublement et de la concentration initiale C_0 , il est possible d'évaluer la concentration en solution par l'équation $C(t) = C_0 e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}$, où τ est le temps caractéristique de la croissance bactérienne, déterminé expérimentalement dans la partie 3.3.3 t_0 est une constante de temps qui modélise le temps de latence suite à l'injection de la solution dans la cuve (voir paragraphe 1.2.2 b et plus précisément Figure 1.7). Dans le cas de nos expériences, les solutions injectées sont préparées en diluant une solution de TSB contenant des bactéries en forte concentration et en croissance, dans une solution de TSB pure. Le stress induit sur les populations microbiennes est donc minime, et par conséquent le temps de latence est négligeable. Pour confirmer cette hypothèse, au moment de l'injection de la solution testée dans la cuve de 200 μL , des aliquots de 200 μL ont été préparés en parallèle, à partir de la même solution. Ces aliquots ont été incubés à 37°C, température à laquelle se déroulent nos expériences. À intervalles réguliers, un aliquot incubé a été sorti, dilué, et étalé sur gélose, afin d'évaluer l'évolution de la concentration dans la solution injectée.

Sur la Figure 3.13, nous présentons l'évaluation de la concentration en solution en utilisant les données obtenues en microscopie de Nomarski (courbe en vert), et les résultats de dénombrements ponctuels effectués grâce aux aliquots de 200 μL (carrés pleins).

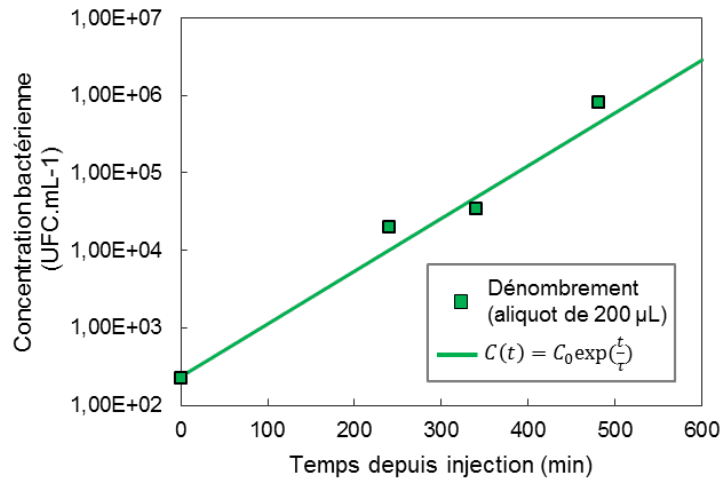


Figure 3.13 Évaluation de la concentration en solution
 – Pour l'expression mathématique de la concentration, les valeurs
 utilisées sont : $C_0 = 235 \text{ UFC.mL}^{-1}$ et $\tau = \frac{44,2}{\ln(2)}$

En plus de la bonne adéquation entre les deux types de résultats, cette analyse nous montre également que l'hypothèse d'absence de temps de latence est valide.

3.5.2 Comparaison concentration en solution vs densité surfacique

Il est donc maintenant possible de comparer les données de concentration en solution avec les données de densités surfaciques. Pour une expérience donnée, il est possible de représenter la densité surfacique en fonction de la concentration en solution.

Nous présentons, sur la Figure 3.14, la densité surfacique sur un plot d'anticorps spécifique LiM16 en fonction de la concentration en solution, pour deux concentrations d'injection différentes : 10^2 UFC.mL^{-1} et 10^4 UFC.mL^{-1} . Les résultats sont présentés en échelle linéaires (a) et logarithmiques (b).

L'interprétation de ces courbes fait écho à la discussion sur la détection à faible concentration d'injection que nous avons eue dans la section précédente. En effet, sur cette figure, on peut voir que pour une même concentration en solution estimée, il y a plus de bactéries en surface si l'injection a été effectuée à concentration plus faible, car la solution a séjourné dans la cuve pendant un temps plus grand.

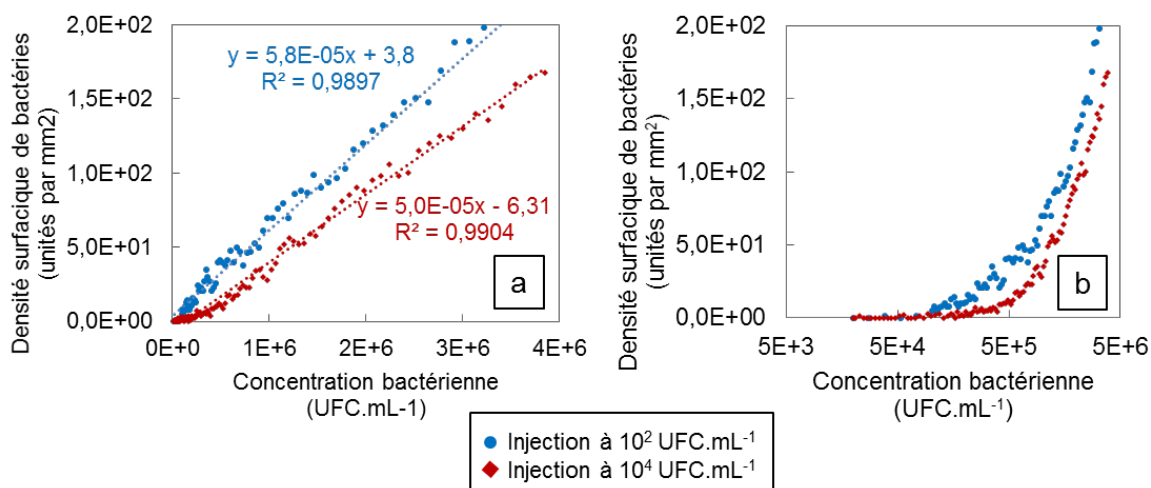


Figure 3.14 Densité surfacique de bactéries sur le plot d’anticorps LiM16 en fonction de la concentration évaluée en solution
a. Echelle linéaire avec courbes de tendance pour chaque expérience
b. Echelle logarithmique

Sur la représentation en échelle linéaire, nous pouvons également remarquer que la densité surfacique varie de manière linéaire en fonction de la concentration en solution, et que les coefficients des deux courbes sont sensiblement équivalents et ont une valeur de $5,4 \cdot 10^{-5} \pm 10\%$. Cette linéarité est en accord avec nos expressions théoriques développées dans la première partie de ce chapitre où en première approximation, la densité en surface est en effet proportionnelle à la concentration en volume.

3.6 Conclusion

Les expériences que nous avons analysées dans ce chapitre ne sont pas suffisamment nombreuses pour fournir une étude exhaustive sur la capacité de notre système à être utilisé pour de la détection précoce quantitative. Mais là n’est pas l’objectif du projet qui est présenté dans ce manuscrit.

Dans ce chapitre, nous avons en revanche caractérisé quantitativement pour la première fois l’observation de bactéries uniques en SPRI HR à prisme, et nous avons pu valider notre système expérimental, en ce qui concerne l’intérêt de l’observation couplée et la qualité de la croissance à l’intérieur de la cuve. Surtout, nous avons démontré la capacité de notre système à effectuer la détection précoce de *Listeria monocytogenes* en milieu modèle.

L’observation duale des échantillons à la fois en microscopie de Nomarski et en SPRI HR nous a permis de valider nos observations en SPRI HR, et d’affiner notre connaissance de notre montage expérimental.

À partir d’une approche théorique de l’évolution du nombre de bactéries en surface en fonction des conditions de croissance, nous avons pu caractériser les conditions de croissance dans notre système en tirant profit de la relativement grande profondeur de champs de la microscopie de Nomarski.

Grâce à l'analyse en dénombrement d'évènements uniques, nous avons pu repousser la limite de détection communément obtenue en SPRI classique d'une heure voire plus, ce qui est très prometteur pour des applications futures.

Finalement, en utilisant les informations sur la croissance mesurées grâce à la microscopie de Nomarski et les données de densités surfaciques de bactéries obtenues en SPRI HR, nous avons pu faire un lien entre la concentration en solution et le nombre de bactéries présentes sur un plot d'anticorps.

Tous les résultats présentés dans ce chapitre sont basés sur la même approche des données analysées : le comptage d'évènements bactériens. Nous avons globalement quantifié la taille d'une tache bactérienne selon les deux modalités, mais ensuite, nous avons résumé les données obtenues à une densité de bactéries par surface. Ceci étant, une analyse plus fine des images et des caractéristiques des évènements bactériens pourrait fournir de nombreuses informations sur le comportement des bactéries proche des surfaces, en particulier sur les images SPR. C'est l'objet du prochain chapitre.

4 LA SPRI RESOLUE SPATIALEMENT COMME METHODE D'ETUDE DU COMPORTEMENT BACTERIEN

Le comptage d'évènements bactériens discrets a montré ses avantages dans le chapitre précédent. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser plus en détail aux caractéristiques des évènements détectés. En effet, une analyse plus fine des signaux obtenus en SPRI HR pourrait fournir des outils d'étude du comportement bactérien proche des surfaces étudiées.

Les points d'intensité détectés en SPRI HR sont en effet le reflet de l'influence des bactéries sur le champ plasmon évanescent. Par conséquent, leurs signatures (dimension, intensité, etc.) peuvent porter des informations sur les caractéristiques de l'interaction entre les microorganismes et l'interface, tels que la distance qui les sépare ou leur affinité.

D'autre part, l'étude des aspects cinétiques peut également être source d'information. Par exemple, lorsqu'une bactérie est détectée sur une image N, il est intéressant de savoir si elle était déjà présente sur l'image N-1, voire sur les images précédentes encore. Plus une bactérie demeure longtemps sur une zone, plus elle a, à priori, d'affinité avec la surface dans cette localisation. Les images ne sont pas indépendantes les unes des autres, il y a donc un intérêt à étudier la persistance de bactéries individuelles au cours du temps.

Ces interrogations nous ont menés à développer des outils d'étude et d'analyse des signaux bactériens obtenus en SPRI HR. Nous allons donc dans un premier temps montrer les stratégies mises en place pour étudier le comportement bactérien, ainsi que les différents types d'analyses envisagés. Nous montrerons ensuite quelques exemples de résultats obtenus.

4.1 Méthode d'étude : stratégie et instrumentation

Dans cette courte introduction, nous avons parlé de *suivi de persistance bactérienne*, mais en réalité, nous l'avons vu dans le chapitre I, un grand nombre de souches bactériennes est motile. Nous avons donc voulu, de manière plus générale, mettre en place des expériences permettant de suivre le mouvement bactérien afin de pouvoir étudier les trajectoires individuelles à proximité des surfaces.

4.1.1 Types d'expériences effectuées

a. Souche bactérienne utilisée

Dans le chapitre précédent, l'étude a porté sur *Listeria*, car *Listeria monocytogenes* est un pathogène majeur dans les contaminations alimentaires, qui était donc pertinent pour

effectuer des expériences de détection. Cependant, *Listeria* n'est que très peu mobile (voir chapitre 1, paragraphe 1.1.3 b), et nécessite de nombreuses précautions expérimentales liées à sa classification comme pathogène de classe II. Nous avons donc stratégiquement choisi d'utiliser une nouvelle souche modèle plus adaptée.

Nous avons choisi de travailler sur *E. coli* ATCC11775 qui est une souche reconnue pour être motile. De plus, cette souche est régulièrement étudiée comme modèle de micronageur dans les disciplines qui étudient les mouvements des micro-organismes [110], [207], [208]. La souche utilisée, *E. coli* ATCC 11775 était considérée de classe I au moment des expériences³ et ne nécessitait pas de précaution supplémentaire lors de sa manipulation. Cela a permis de mettre en place des protocoles simplifiés pour la manipulation des espèces bactériennes. En particulier, l'injection de la suspension étudiée dans la cuve expérimentale a pu être effectuée en dehors du local de confinement microbiologique L2, directement sur le banc optique, ce qui a permis d'effectuer un suivi dès l'injection.

Dans le cadre de ces expériences, l'objectif n'est pas d'effectuer la détection précoce de bactéries mais de faire la preuve de concept que des caractéristiques sur l'interaction entre bactéries et surfaces peuvent être déterminées grâce à la SPRI.

Afin de pouvoir étudier rapidement des événements bactériens en surface en SPRI HR, nous avons choisi de travailler à des concentrations proches des concentrations limites de détection trouvées dans la littérature en SPRI, soit entre 10^3 UFC.mL⁻¹ et 10^5 UFC.mL⁻¹ [167], [181].

b. Fonctionnalisation de surface

Comme pour les expériences de détection, nous avons choisi de travailler avec des anticorps spécifiques pour fonctionnaliser la surface. Les anticorps choisis sont un anticorps anti *E. coli*, spécifique de notre souche bactérienne, et un anticorps anti KLH, utilisé comme contrôle négatif.

Comme nous l'avons dit dans l'introduction, les expériences de microbiologie se sont effectuées sur deux sites : l'institut de pharmacologie à l'Université de Sherbrooke (Canada) et le laboratoire CREAB de l'UMR SyMMES au CEA Grenoble. Pour les deux sites, la mise en place de systèmes de SPRI HR pour l'étude des comportements bactériens a fait partie des objectifs du projet, et nous avons donc souhaité effectuer le même type de fonctionnalisation pour les deux sites.

Une première fonctionnalisation, basée sur le couplage des anticorps avec des thiols-NHS (voir paragraphe 2.4.1.b) a été envisagée et des expériences préliminaires concluantes ont été effectuées à Grenoble. Cependant, toutes les tentatives de réitérer cette fonctionnalisation à Sherbrooke se sont soldées par un échec. De nombreuses

³ *E. coli* ATCC 11775 a été classée en catégorie II suite à un rapport datant de 2016 (Voir Chapitre I paragraphe 1.1.3 a pour plus de détails)

possibilités ont été envisagées pour expliquer ces échecs, les réactifs ont été renouvelés, la température a été contrôlée, les concentrations vérifiées. Même, les solutions de rinçage et les solutions tampons ont été contrôlées et des bouteilles de différents stocks ont été testées, sans résultat.

La fonctionnalisation par électropolymérisation des groupements pyrrole nécessite un équipement d'électrochimie qui n'était pas directement disponible à Sherbrooke.

Nous avons donc réalisé une fonctionnalisation par dépôt direct d'anticorps à une concentration de 1 μM . Après 2 heures d'incubation en chambre humide les biopuces sont rincées avec du PBS puis sont directement insérées dans la chambre expérimentale (voir paragraphe 2.4.1.b)

Les biopuces ainsi fonctionnalisées sont peu stables, et nous avons pu observer que la spécificité du dépôt d'anticorps se dégrade en quelques jours. Cependant, pour les expériences que nous avons effectuées, les biopuces étaient préparées dans la journée et utilisées juste après fonctionnalisation et rinçage. De cette manière, nous avons pu garder une bonne spécificité des plots étudiés.

Dans les expériences de détection, la taille des plots devait être assez réduite afin de pouvoir observer quatre types d'anticorps différents sur l'image. Ici, pour maximiser l'observation des trajectoires, nous avons choisi de déposer des plots relativement gros afin d'avoir une zone d'analyse de trajectoire plus large. Les plots d'anticorps ont donc été déposés à la main, avec une micropipette contenant 0,5 μL de solution environ, et la goutte déposée ne contenait pas tout le volume contenu dans la micropipette. La taille des plots est ainsi de l'ordre de 1 mm de diamètre, et l'espacement entre plots d'environ 500 μm .

L'or non fonctionnalisé n'a pas été passivé, ce qui a pour conséquence que de l'accroche non spécifique peut advenir sur celui-ci.

De cette manière, nous avons pu observer sur une même image deux grandes zones fonctionnalisées. Un schéma de la situation observée est fourni sur la Figure 4.1 afin d'illustrer le propos et des images réelles seront présentées dans la suite (Figure 4.16).

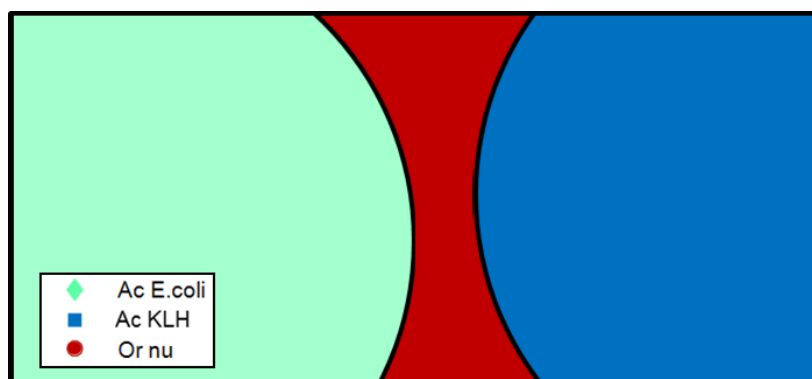


Figure 4.1 Fonctionnalisation des biopuces SPRI pour l'observation des trajectoires bactériennes

4.1.2 Instrumentation

Afin de pouvoir suivre des trajectoires bactériennes, plusieurs adaptations sur le système que nous avons décrit dans le chapitre 2 ont été effectuées. D'autre part, un montage de SPRI HR a été mis en place sur les deux sites du projet. Nous allons donc présenter ici les adaptations réalisées et les différences entre les deux montages.

Nous avons expliqué en détail le montage en balayage du plan image du CEA Grenoble (Chapitre 2), nous n'allons présenter ici que les modifications apportées à ce montage. Le montage de Sherbrooke est semblable à celui de Grenoble, nous allons donc également nous baser sur le chapitre 2 pour le présenter.

a. Choix de la fréquence d'acquisition

L'objectif des réglages à réaliser est de parvenir à observer des trajectoires bactériennes. Il faut donc connaître les temps caractéristiques et les vitesses des trajectoires qui vont être étudiées pour choisir des fréquences d'acquisition adaptées.

Nous avons donc évalué la fréquence minimale nécessaire pour réussir à reconstruire les trajectoires d'*E. coli*.

Dans la littérature il est établi qu'*E. coli*, ainsi que toutes les bactéries motiles possédant des moteurs moléculaires dirigeant un flagelle, ont des trajectoires circulaires à proximité des surfaces [209]. Cela est dû aux interactions hydrodynamiques entre les moteurs moléculaires qui ont une rotation dans le sens antihoraire, le corps de la bactérie qui tourne dans le sens horaire, et la surface. Le rayon de courbure de cette trajectoire dépend des expériences réalisées, et les mesures référencées sont effectuées exclusivement sur une surface de verre. Pour autant, ces valeurs peuvent nous servir de référence pour l'analyse des trajectoires observées. Ainsi, Berg et Turner évaluent le rayon de courbure de la trajectoire à 25 μm [210], Maeda *et al.* mesurent un rayon variant de 10 à 50 μm en fonction de la température [211], et plus récemment de rayon était évalué à 13 μm [212], [213]. Ces données nous permettent d'évaluer l'amplitude des trajectoires attendues, mais ne nous renseignent pas sur la fréquence d'acquisition à adopter.

Une étude plus détaillée publiée en 2006 par Lauga *et al.* [207] présente une étude de la variabilité des rayons de courbure d'*E. coli* mesurés en microscopie de contraste de phase avec une acquisition à 30 images par secondes. Quelques résultats obtenus dans cet article sont adaptés sur la Figure 4.2.

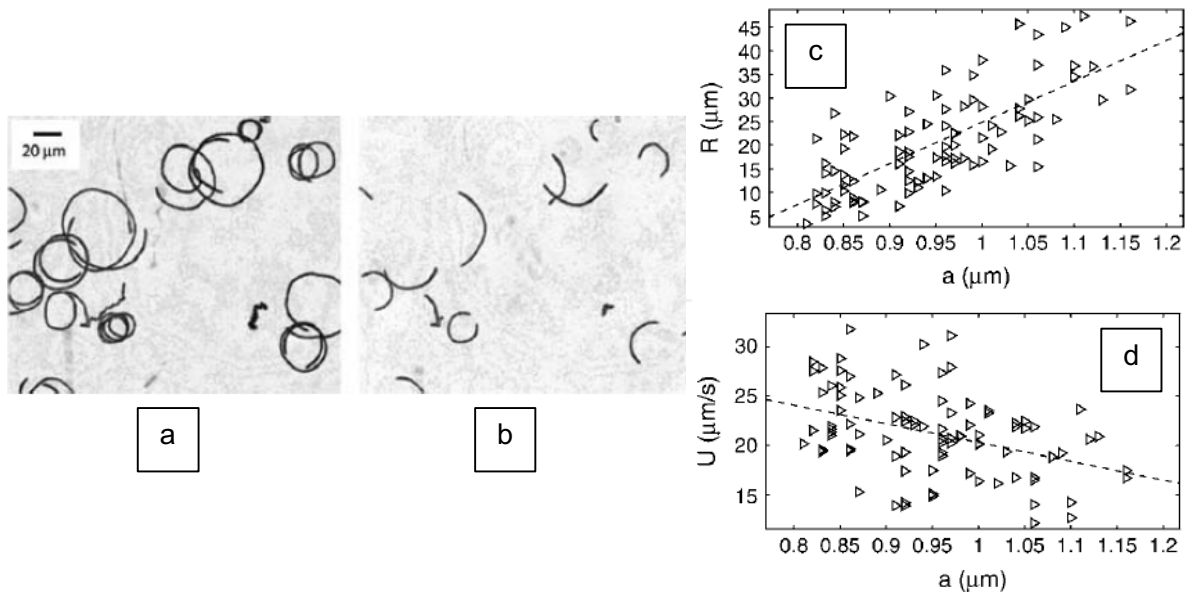


Figure 4.2 Caractérisation des trajectoires d'*E. coli* en surface grâce aux travaux de Lauga *et al.*
a. Images de microscopies de contraste de phase superposées sur 8s
b. Images de microscopies de contraste de phase superposées sur 2s
c et d. Détermination expérimentale des rayons de courbure (c) et des vitesses (d) en fonction du rayon équivalent, mesurées à partir des images superposées de 2s
 – Images adaptées de Lauga *et al.* [207]

Cette analyse montre une répartition des rayons calculés entre 5 μm et 50 μm , et des vitesses de quelques dizaines de micromètres par secondes.

À partir de ces données, on peut donc estimer qu'idéalement, une fréquence d'acquisition d'une dizaine d'images par seconde serait adaptée pour suivre les trajectoires étudiées.

b. Compromis sur le montage de SPRI à prisme OR du CEA Grenoble

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, pour obtenir des images résolues sur tout le champ imagé, il est nécessaire de balayer le plan image en effectuant des translations de la caméra avec un moteur piloté grâce à une interface LabVIEW. Ce balayage mécanique limite fortement la fréquence d'acquisition possible du système.

Des solutions existent pour s'affranchir du balayage mécanique. On peut citer l'utilisation de lentille à focale variable [214] ou encore l'imagerie plénoptique [215]. Cependant, avant d'implémenter ce type de solutions plus complexe sur notre système, il nous a semblé nécessaire de prouver l'intérêt de ce type d'analyse sur le système existant.

Par conséquent, au lieu de modifier la méthode de balayage, nous avons décidé simplement de ne pas effectuer de balayage du plan image. Cela a pour effet de créer une inhomogénéité de netteté sur les images. Pour limiter ce phénomène, nous avons choisi de restreindre la zone d'analyse à la partie de l'image ayant une résolution suffisante, en diminuant par trois le champ d'observation dans la direction de propagation.

En n'effectuant plus de balayage, la limitation en fréquence d'acquisition diminue drastiquement, pouvant atteindre plusieurs centaines d'images par seconde. Cependant, afin de ne pas surcharger les analyses, nous nous sommes restreints à un maximum de 10 images par secondes.

c. Le montage SPRI de Sherbrooke

Le montage de l'université de Sherbrooke consiste en un montage SPRI assez semblable à celui présenté dans l'état de l'art (partie 2.1), avec la spécificité de ne pas avoir de polariseur au niveau de la source lumineuse, mais un séparateur de polarisation (CCM1-PBS251, Thorlabs, New Jersey, USA) en sortie du prisme permettant d'acquérir simultanément les polarisations TM et TE sur deux caméras placées orthogonalement l'une par rapport à l'autre, comme représenté sur le schéma Figure 4.3. La position de ces caméras par rapport au plan image est réglable à la main, mais il n'est pas possible d'effectuer de balayage piloté du plan image au cours d'une expérience.

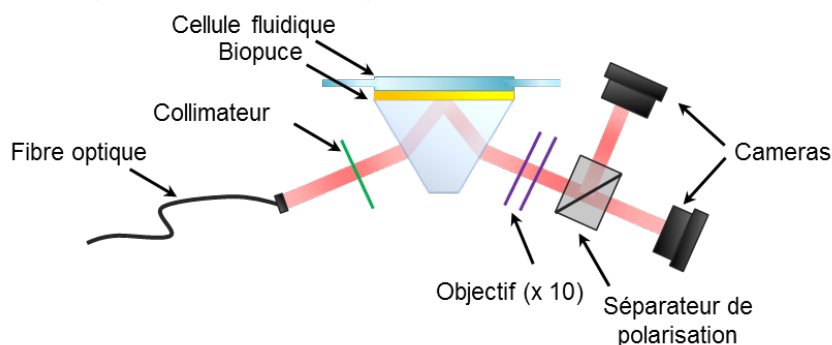


Figure 4.3 Schéma du montage de SPRI de Sherbrooke

Le montage initial a été conçu par Vincent Chabot et Yannick Miron [10], puis a été modifié par Thomas Söllradl et Kévin Chabot qui ont remplacé les photodétecteurs initialement utilisés comme capteurs lumineux par des caméras Mako Allied Vision (Stemmer Imaging, Puchheim, Allemagne).

Afin de mettre en place des expériences de microbiologie sur ce système, des cuves similaires à celles présentées dans le chapitre 2 ont également été fabriquées sur place, et un objectif 10X commercial a été implémenté.

Les prismes utilisés étaient des prismes de SF10 équilatéraux, non optimisés pour la haute résolution. Des lames de verre de même indices, recouvertes de 3 nm de chrome et de 50 nm d'or (même procédé que les prismes dans le chapitre 2, voir 2.2.2 a) étaient mise en contact avec les prismes grâce à une huile d'indice (Cargille, Cedar Grove, USA) de même indice que le verre. De premiers tests effectués avec ces prismes et une DEL fibrée de longueur d'onde 735nm (M735F1, Thorlabs, Newton, New Jersey, USA) ont montré que la résolution atteinte grâce à ce montage, avec des tailles de bactéries de l'ordre de $4 \times 11 \mu\text{m}$, était satisfaisante pour des études dynamiques du comportement bactérien. Les expériences présentées dans la suite, effectuées à Sherbrooke, ont donc également été réalisées avec des prismes équilatéraux en SF10.

Les images acquises en polarisation TE n'ont pas été utilisées dans les analyses, et la fréquence d'acquisition pour les suivis de trajectoires a été fixée à 10 images par secondes également.

Il n'y a donc plus de balayage du plan image : les systèmes de Sherbrooke et de Grenoble sont utilisés de manière assez équivalente. Cependant l'utilisation du terme SPRI HR ne se réfère plus à la même définition de la notion de haute résolution. Ici, la bonne résolution repose exclusivement sur l'utilisation d'un objectif de grandissement important permettant de sur-échantillonner les événements bactériens, et ainsi d'avoir une résolution non plus limitée par les pixels, mais par les aberrations optiques induites par le prisme. Par soucis d'exactitude, nous allons donc changer le nom de notre type de système, qui n'est donc plus de la SPRI HR, mais uniquement de la SPRI sur-échantillonnée spatialement (SE) : on parlera donc à partir de maintenant de SPRI SE.

4.2 Traitement des données

Pour extraire les trajectoires et les informations caractéristiques des points d'intensité à partir des images acquises à une fréquence de 10 Hz, un traitement de données est nécessaire. La première partie du traitement de données consiste à effectuer le même traitement que celui que nous avons expliqué dans le chapitre 2, qui permet d'obtenir les coordonnées des différents points situés sur les différentes images du suivi cinétique.

4.2.1 Suivi de trajectoires

La mise en évidence des trajectoires constitue une étape supplémentaire dans l'analyse avec Trackmate [216] que nous avons expliqué dans le chapitre 2. Après avoir détecté des points image par image (Figure 4.4.a), il est possible de créer une matrice des coûts qui relie un point situé en (X, Y) d'une image N aux points d'une image $N+1$ situés à proximité de la position (X,Y) .

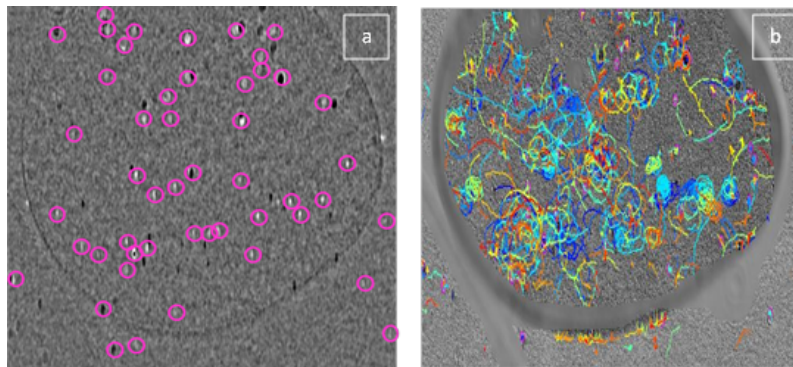


Figure 4.4 De la détection d'évènement à la définition de trajectoire grâce à Trackmate
a. Détection de point
b. Définition de trajectoires

La matrice des coûts est paramétrée en précisant une distance maximale D_{max} (voir Figure 4.5) parcourue par la bactérie entre deux images. Cette distance maximale est fixée grâce aux travaux présentés plus haut (Figure 4.2), et correspond à une distance réelle de $3 \mu\text{m}$, soit, en majorant légèrement, 5 pixels sur le montage de Sherbrooke et 10 pixels sur celui de Grenoble.

La procédure de détection de point n'est pas parfaite, et on peut également imaginer que la distance entre la bactérie et la surface n'est pas constante, ce qui va se traduire par un clignotement de la bactérie si un mouvement de va-et-vient fait ponctuellement sortir la bactérie du champ évanescent.

Pour ces raisons, Trackmate permet aux trajectoires reconstituées d'avoir des

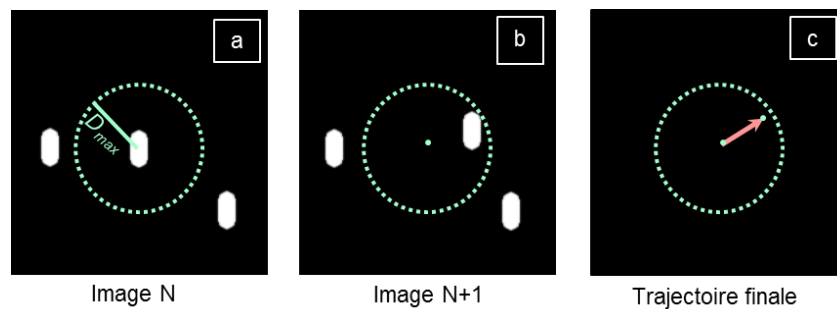


Figure 4.5 Distance maximale que la bactérie est autorisée à parcourir entre deux images

lacunes. Pour paramétrer cette idée, il est nécessaire de préciser le nombre d'images successives maximal $N_{gp,max}$ sur lequel peut disparaître la bactérie, et sur quelle distance maximale $D_{gp,max}$ nous l'autorisons à avoir bougé pendant cette disparition momentanée. Ces deux quantités sont nommées les paramètres de *gap closing*, qui peut se traduire en français par « fermeture de brèche » dans la trajectoire.

La difficulté, avec cette option, est de s'assurer que la bactérie que l'on détecte à nouveau, après $N_{gp,max}$ images, est bien la même bactérie que celle détectée avant la brèche. Plus les paramètres $N_{gp,max}$ et $D_{gp,max}$ sont grands, plus il est probable de parvenir à continuer la trajectoire en trouvant un candidat dans les $N_{gp,max}$ images suivantes, situé à moins de $D_{gp,max}$ de la bactérie précédente. Mais le risque est alors grand de lier des bactéries différentes au sein d'une même trajectoire.

Nous avons donc choisi de contraindre le *gap closing* en limitant fortement la dérive spatiale autorisée. Nous avons fixé $D_{gp,max}$ aux mêmes valeurs que D_{max} , la distance autorisée entre deux images consécutives. Des tests avec différentes valeurs de $N_{gp,max}$ ont été effectués, et des résultats comparables ont été trouvés pour $N_{gp,max}$ compris entre 20 et 40 images. Cela nous porte à croire que la restriction sur $D_{gp,max}$ est adaptée pour ne pas lier des bactéries différentes. Dans la suite, le $N_{gp,max}$ est fixé à 20 images, correspondant à une disparition des bactéries sur un intervalle de 1,9 s.

Pour reprendre l'explication à partir d'un point détecté à l'image N en (X,Y), les points d'intensité des $N_{gp,max}$ images suivantes situés à une distance de (X,Y) inférieur à $D_{gp,max}$ sont ajoutés dans la matrice des couts.

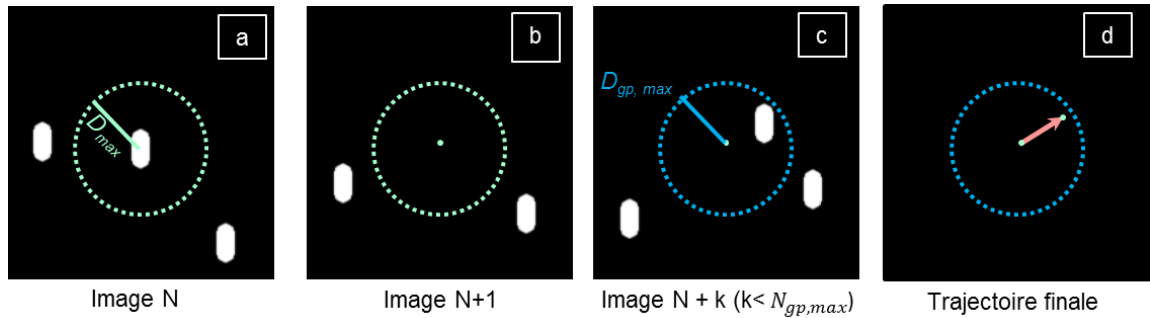


Figure 4.6 Schéma de la procédure de création des trajectoires pour le *gap closing*

Les trajectoires sont alors créées en minimisant cette matrice (méthode des moindres carrés). On obtient alors une liste contenant l'ensemble des points d'intensité détectés, leurs positions, l'image sur laquelle ils sont situés, ainsi que la trajectoire à laquelle ils appartiennent.

C'est à partir de cette liste que toute l'analyse de données s'effectue. Tous les paramètres et traitements qui sont explicités dans la suite sont calculés grâce à Matlab.

4.2.2 Analyse des données

a. Données statiques sur les points d'intensité

En connaissant les coordonnées des différents évènements détectés, il est possible d'extraire de nombreuses caractéristiques des points d'intensité en effectuant des analyses automatiques sur les images différentielles.

La taille de la tache bactérienne peut être évaluée en déterminant les dimensions de l'ellipse E qui permet de maximiser le contraste C , défini comme : $C = \frac{I_{in} - I_{out}}{I_{in} + I_{out}}$, où I_{in} est l'intensité moyenne à l'intérieur de l'ellipse, et I_{out} l'intensité dans l'anneau elliptique entourant E et de dimension double de celle de E. La dimension du petit axe de l'ellipse est

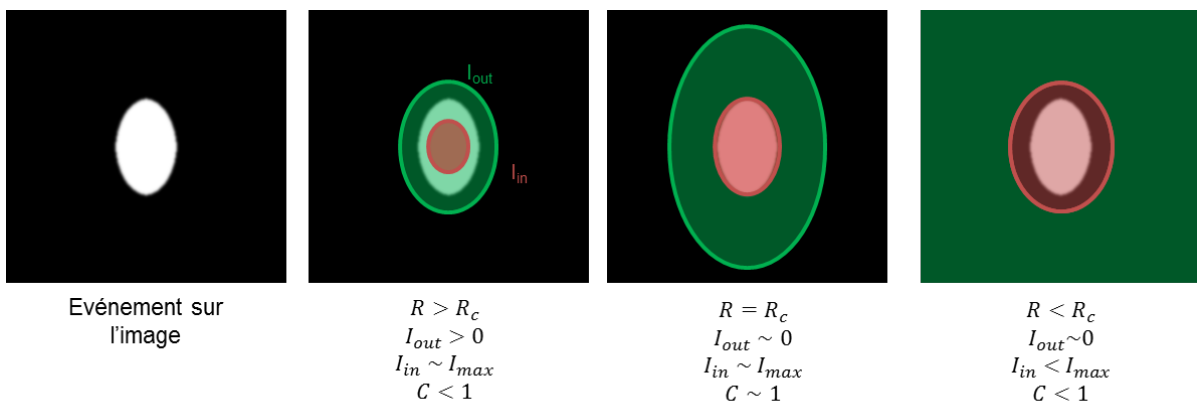


Figure 4.7 Définition du paramètre R_C maximisant le contraste

appelé R_C . Un schéma illustratif de la détermination de R_C et de représentation de l'ellipse et de l'anneau elliptique est présenté ci-dessous Figure 4.7.

Une fois la dimension de la tache déterminée, nous calculons les données statistiques sur l'intensité de la tache (valeur minimale, maximale, moyenne, et écart-type). Ces données statistiques sont aussi évaluées en utilisant une zone statistique de taille constante pour tous les évènements et égale à un disque de rayon R_{blob} . On rappelle que R_{blob} est la grandeur fournie à Trackmate pour effectuer la détection de point d'intensité (voir chapitre 2 paragraphe 2.5.2 b).

Toutes les grandeurs caractéristiques calculées sont résumées dans le Tableau 4.1.

Nom du paramètre	Symbole	Calcul
Rayon maximisant le contraste	R_C	
Contraste	C	$\frac{I_{in}-I_{out}}{I_{in}+I_{out}}$ où I_{out} est l'intensité moyenne dans l'anneau de largeur R_C autour du spot de largeur R_C
Intensité moyenne sur R_{blob} ou R_C	I_{blob} ou C	$\frac{1}{n_{pixels\ blob\ ou\ réel}} \sum_{n_{pixels\ blob\ ou\ réel}} I_{pixel}$
Intensité minimale sur R_{blob} ou R_C	$I_{min,blob}$ ou C	$\min_{n_{pixels\ blob\ ou\ réel}} I_{pixel}$
Intensité maximale sur R_{blob} ou R_C	$I_{max,blob}$ ou C	$\max_{n_{pixels\ blob\ ou\ réel}} I_{pixel}$
Ecart-type des intensités sur R_{blob} ou R_C	$I_{STD,blob}$ ou C	$\sqrt{\frac{1}{n_{pixels\ blob\ ou\ réel} - 1} \sum_{n_{pixels\ blob\ ou\ réel}} [I_{pixel} - I_{blob\ ou\ C}]^2}$

Tableau 4.1 Définition des différents paramètres d'intérêt pour l'analyse des points d'intensité observés en SPRI SE

Sur la Figure 4.8 (page suivante) est présenté un exemple d'image différentielle obtenue en SPRI SE suite à l'injection dans la cuve expérimentale d'une solution de bactéries *E. coli*, sur le système de Grenoble. L'image présentée a déjà été tronquée de ces parties extrémales (parties hautes et basses de l'image). Sur la portion d'image fournie, on peut observer la variation de la taille d'un évènement bactérien de part et d'autre de la ligne de focalisation, aussi appelée bande de netteté. Cette variation de taille fausse en partie l'analyse des résultats sur la taille des évènements bactériens.

Pour limiter les effets de cette déformation visible lors de l'utilisation d'un prisme OR, il est possible d'évaluer la déformation en fonction de la distance à la ligne de netteté et de normaliser les résultats à partir de cette évaluation.

Pour évaluer l'effet de la déformation, nous avons supposé que les évènements bactériens se produisant en dehors des plots spécifiques (or non fonctionnalisés ou passifs) étaient équivalents entre eux, et que les différences de caractéristiques entre les différentes hauteurs d'images étaient dues à la déformation du prisme uniquement. Ainsi, en normalisant par les caractéristiques moyennes des points d'intensité hors plot spécifique, il

est possible de s'affranchir, dans une certaine mesure, de l'effet de déformation du prisme. Ce terme correctif est appliqué aux valeurs calculées de R_C .

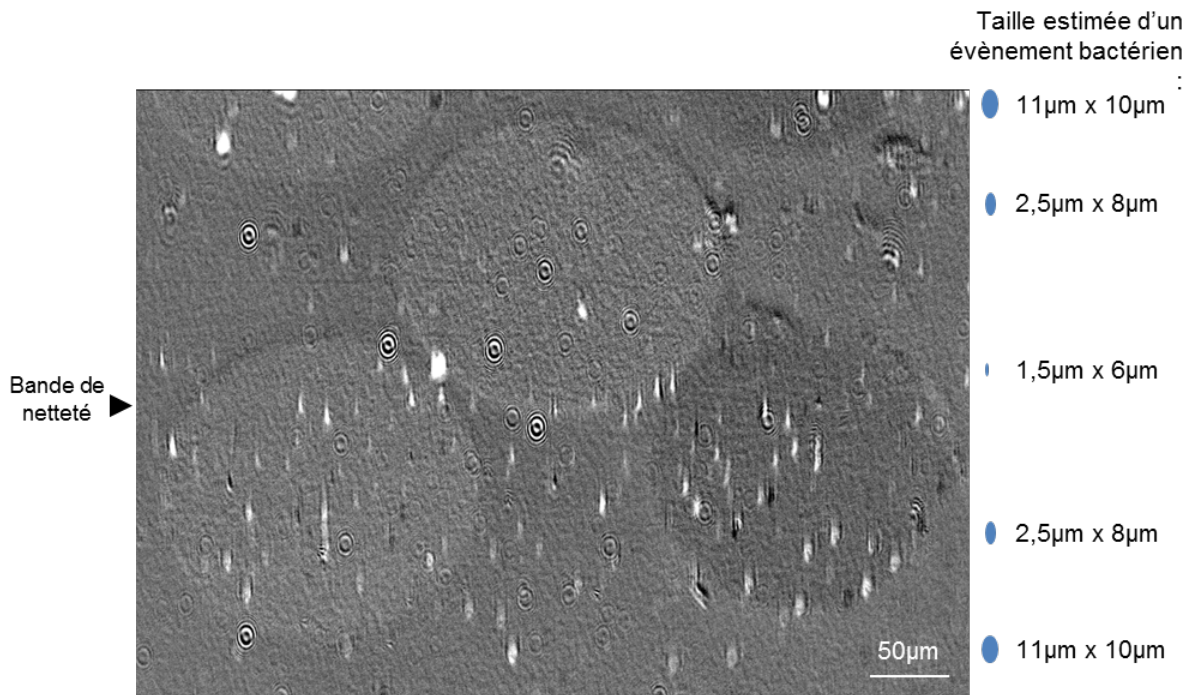


Figure 4.8 Hétérogénéité de la taille des événements bactériens en fonction de la position sur l'image
- Image SPRI à prisme OR différentielle avec bande de netteté centrée au milieu et évaluation de la taille de l'évènement bactérien

a. Données par trajectoires

À partir des coordonnées des points appartenant à chaque trajectoire, on peut également calculer des grandeurs caractéristiques des mouvements bactériens comme la vitesse du mouvement, son amplitude, que l'on appellera le déplacement, le rayon de courbure moyen et la variabilité des points qui la constituent.

Ces données sont résumées dans le Tableau 4.2, page suivante.

Nom du paramètre	Symbole	Calcul
Nombre de points	N_{pts}	nombre de points qui composent la trajectoire
Nombre de lacunes	N_{gap}	Nombres d'images non consécutives dans la trajectoire
Durée de la trajectoire	T_{traj}	Δt *(Dernière image - Première image) d'une trajectoire où Δt est l'intervalle de temps entre l'acquisition de deux images
Temps d'arrêt	$T_{arrêt}$	Δt x (Nombre d'intervalles pendant lesquels la bactérie a bougé d'au plus 1 pixels)
Vitesse moyenne « curviligne »	V_{curv}	$\frac{1}{N_{trajectoire}} \sum_{N_{trajectoire}} V_{curv,i}$
Minimum des vitesses « curvilignes »	$V_{min,curv}$	$\min_{N_{trajectoire}} V_{curv,i}$
Maximum des vitesses « curvilignes »	$V_{max,curv}$	$\max_{N_{trajectoire}} V_{curv,i}$
Ecart-type des vitesses « curvilignes » sur a points	$V_{STD,curv}$	$\sqrt{\frac{1}{N_{trajectoire} - 1} \sum_{N_{trajectoire}} [V_{curv} - V_{curv,i}]^2}$
Déplacement total max	Δ_{max}	$\sqrt{(X_{max} - X_{min})^2 + (Y_{max} - Y_{min})^2}$
Rayon de courbure	$R_{courbure}$	$\frac{T''(x)}{(1+T'^2(x))^{3/2}}$ où $T(x)$ est une modélisation polynomiale de la trajectoire sur 5 points
Ecart-type des intensités	$\sigma_{D,trajectoire}$	Ecart-type des intensités moyennes des points qui constituent la trajectoire
Ecart-type des rayons	R_{STC}	Ecart-type des rayons des points qui constituent la trajectoire

Tableau 4.2 Définition des différents paramètres d'intérêt pour l'analyse de trajectoires bactériennes observées en SPRI SE

$$\text{où } V_{curv,i} = \sqrt{\sum_{i=0}^{a-1} (X_{n-i} - X_{n-i-1})^2 + (Y_{n-i} - Y_{n-i-1})^2} / a \cdot \Delta t$$

4.2.3 Présentation des résultats

Suite à l'analyse des images, nous nous retrouvons donc avec un grand nombre de paramètres à étudier, et la présentation des résultats demande une certaine réflexion afin de mettre en place des représentations à la fois pertinentes et facilement interprétables.

Des analyses, usuelles, de types histogramme ou diagramme de points vont être utilisées, mais nous avons également choisi trois autres types de présentations qui vont être explicités dans cette section : les trajectoires paramétriques, les cartes topologiques, et les analyses en composantes principales.

a. Trajectoires paramétriques

Pour mettre en évidence les données concernant les trajectoires de manière visuelle, nous avons donc choisi de représenter les différentes trajectoires en 2D, comme sur les images, mais avec une information supplémentaire codée par la couleur des trajectoires représentées. Un exemple est donné sur la Figure 4.9

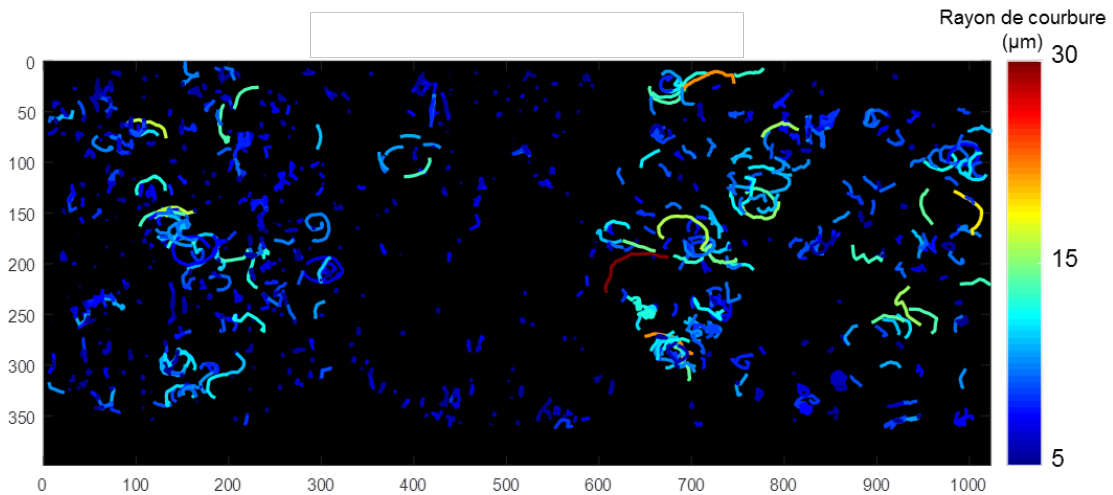


Figure 4.9 Représentation paramétrique des trajectoires en fonction du rayon de courbure

Ce type de représentation est très visuel et sera utilisé dans certains cas pour présenter les résultats. Son inconvénient principal est la possible visibilité excessive de certaines trajectoires par rapport à d'autres, qui empêche d'avoir une vision globale des trajectoires présentes dans une zone. Ainsi sur la Figure 4.9, il y a en réalité plus de deux fois plus de trajectoires sur le côté gauche de l'image en comparaison au côté droit, mais comme les valeurs de rayon de courbure élevées sont réparties de manière assez équivalentes sur l'image, la perception de ce type de représentation peut être trompeuse.

b. Cartes topologiques

Pour pallier ce problème, un deuxième type de représentation a été pensé, que nous allons appeler une représentation topologique.

Dans cette représentation, on divise l'image en zones de tailles égales, et on associe à la chaque zone la valeur moyenne des caractéristiques des points et/ou des trajectoires qui sont inclus à l'intérieur de cette zone. On obtient ainsi une topologie du comportement bactérien selon les différentes zones de l'image. Un schéma de principe de cette représentation est proposée ci-dessous, Figure 4.10.

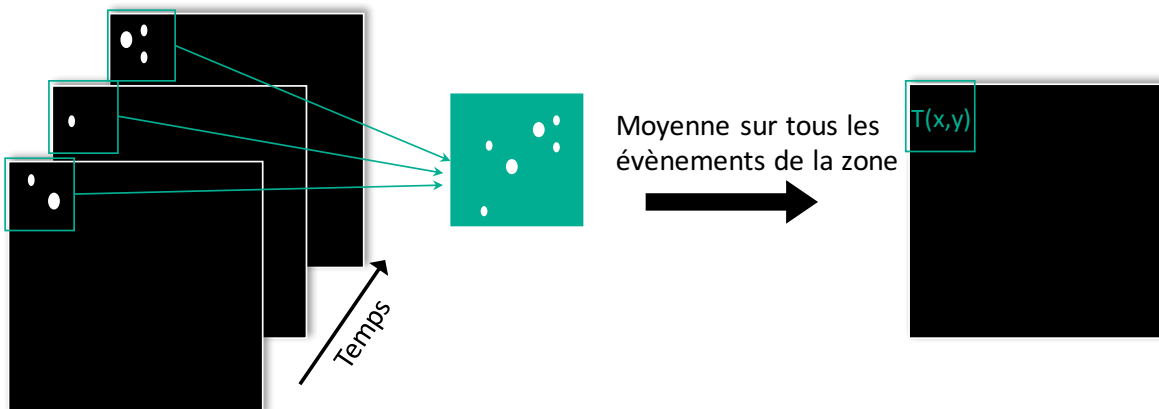


Figure 4.10 Représentation schématique de la représentation topologique

De cette manière on s'affranchit de la variabilité du nombre de bactéries selon les zones pour se concentrer uniquement sur les différences de comportement en fonction de la nature des anticorps présents en surface. Ce type de représentation est adapté aussi bien pour les représentations des données sur les points d'intensité que pour celles concernant les trajectoires.

Grâce à ce type de représentations, **même si les comportements non spécifiques sont équitablement répartis sur l'image, sur un plot particulier, il est probable que le pourcentage de comportements singuliers dans cette zone soit non négligeable et influence la valeur moyenne de certains paramètres dans la zone.**

Un exemple de ce type de représentation est donné sur la Figure 4.11.

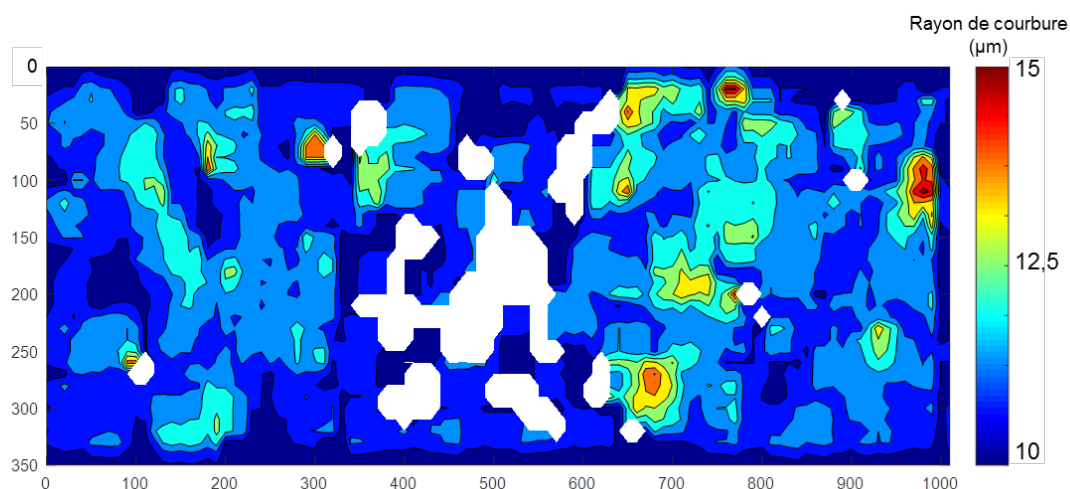


Figure 4.11 Carte topologique du rayon de courbure d'*E. coli* en fonction des différentes zones de l'image

Nous avons choisi de présenter le même paramètre que dans le paragraphe précédent, pour montrer les avantages de cette représentation. Ici, il est visible que dans la zone droite, les trajectoires présentes ont plus tendance à avoir un rayon de courbure élevé qu'à gauche de l'image.

Les zones blanches dans ce type de représentation correspondent à une absence de données dans la zone géographique. Cela peut être dû à une absence réelle de bactéries visibles dans cette zone ou bien à une zone neutralisée artificiellement lors du traitement de données, car contenant trop d'imperfection. Dans le deuxième cas, l'utilisation d'un filtre de moyennage spatial pour empêcher la détection des imperfections dégrade également la netteté des points d'intensité qui deviennent alors indétectables. Différents filtres (transformée de Fourier, filtre gaussien, moyennage spatial, etc.) ont été utilisés pour tenter d'atténuer les imperfections de la surface sans atténuer les points d'intensité. Ces tentatives ont été sans succès, car les deux signaux ont des caractéristiques de taille et d'intensité trop proches.

c. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Lorsqu'on étudie un nombre important de variables quantitatives, il devient difficile de les représenter en un graphique global. La difficulté vient du fait que les individus étudiés ne sont plus caractérisés par deux paramètres, représentables dans un plan, mais dans un espace de dimension plus importante. L'objectif de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) est précisément de revenir à un espace de dimension réduit en trouvant des paramètres qui résument le plus pertinemment possible les données initiales [217].

D'un point de vue mathématique, une ACP revient à décomposer un jeu de données en valeurs propres et vecteurs propres, que l'on appelle Composantes Principales (CP). L'ACP a pour effet de maximiser la variance du nuage de données sur un minimum de dimensions. En décomposant le jeu de données sur les N composantes principales ayant les valeurs propres les plus grandes, on concentre en quelque sorte l'information initiale sur un domaine de dimension N. Il en résulte une perte d'information puisque l'on néglige des dimensions, mais on parle de perte de dimension contrôlée, et si l'ACP est efficace, l'information est tellement concentrée sur les N premières dimensions que la perte d'information est négligeable.

On peut évaluer la qualité de l'ACP en observant la répartition des variances sur les différentes composantes principales. Si la variance est concentrée sur quelques composantes, l'analyse en ACP est efficace, sinon elle n'est pas utile, et cela signifie que l'ensemble des données sont pertinentes et qu'il n'est pas possible de réduire le nombre de dimensions.

Prenons un exemple très simple pour montrer l'intérêt de maximiser la variance d'un jeu de données, avec seulement 4 dimensions de données. Considérons une population d'objet, représentée Figure 4.12.a, dont nous avons les caractéristiques suivantes disponibles : une forme, une couleur, un chiffre et une lettre. Pour décrire la variabilité de cette population, la couleur n'est pas très adaptée, car cette caractéristique ne permet de séparer la population qu'en deux groupes, de taille très déséquilibrée (1 VS 14). D'autre

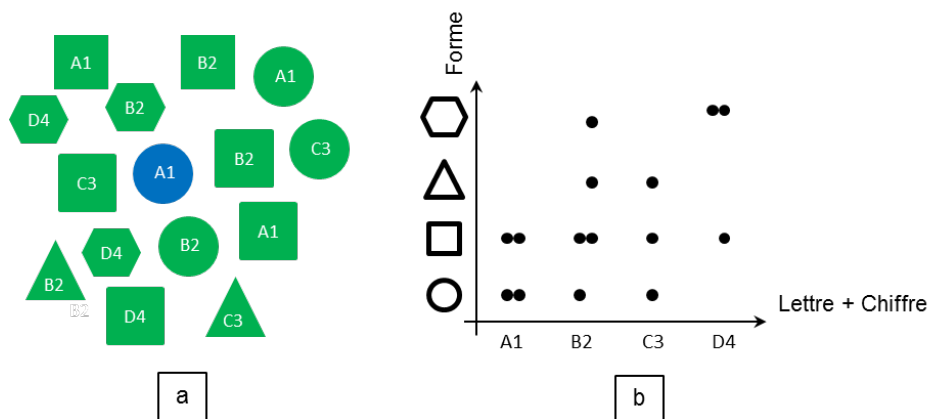


Figure 4.12 Exemple concret de maximisation de la variance sur un cas très simple

part, on peut voir qu'il y a redondance entre les caractéristiques « lettres » et les caractéristiques « chiffres ». Ces deux données peuvent donc être résumées en une seule caractéristique « lettre + chiffre » sans perte d'information. Pour cette population, une représentation en deux dimensions pertinentes revient donc à représenter la variation de la forme (CP2) en fonction de la composante principale « lettre + chiffre » (CP1). On obtient ainsi le graphique Figure 4.12.b. Ce graphique est optimisé en variance, car les données sont étalées sur une zone 4 x 4, alors que si l'on avait utilisé les paramètres « couleurs en fonction des formes » la taille serait de 2 x 4, et elle serait de 1 x 4 pour les paramètres « lettres en fonction des couleurs », car les données seraient résumées sur une diagonale. D'autre part, utiliser uniquement le paramètre « Chiffre » ou le paramètre « Lettre » en abscisse fait perdre de l'information sur la population représentée.

Cet exemple très simple permet de comprendre le but d'une ACP, qui est de trouver les combinaisons linéaires des différents paramètres initiaux qui vont permettre de maximiser la variance des données. Mais dans ce cas particulier, il n'y a pas réellement besoin de traitement mathématique automatisé pour trouver les critères pertinents, car le jeu de donnée est assez restreint. Dans notre cas au contraire, nos données ont au minimum dix dimensions, et une taille de plusieurs milliers de points. Il est donc impossible d'évaluer visuellement quelles sont les caractéristiques d'intérêt, et c'est là que l'ACP en tant que traitement mathématique automatisé trouve son intérêt.

Dans des cas concrets, l'ACP est utilisée pour mettre en évidence des groupes séparés présentant des caractéristiques proches. Un exemple encore une fois simple est présenté en Figure 4.13

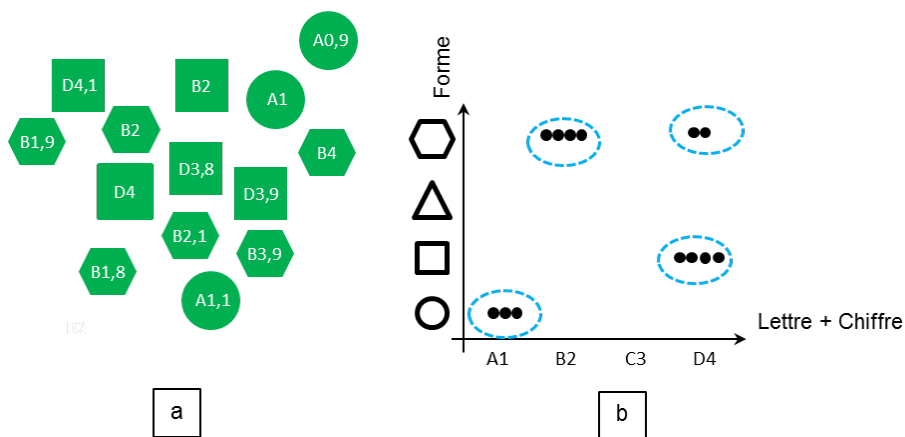


Figure 4.13 Utilité de l'ACP sur un cas simple

Afin d'évaluer la pertinence de l'ACP dans notre cas, nous représentons sur la Figure 4.14 la répartition de la variance selon les différentes composantes principales issues de l'ACP des données d'une expérience particulière.

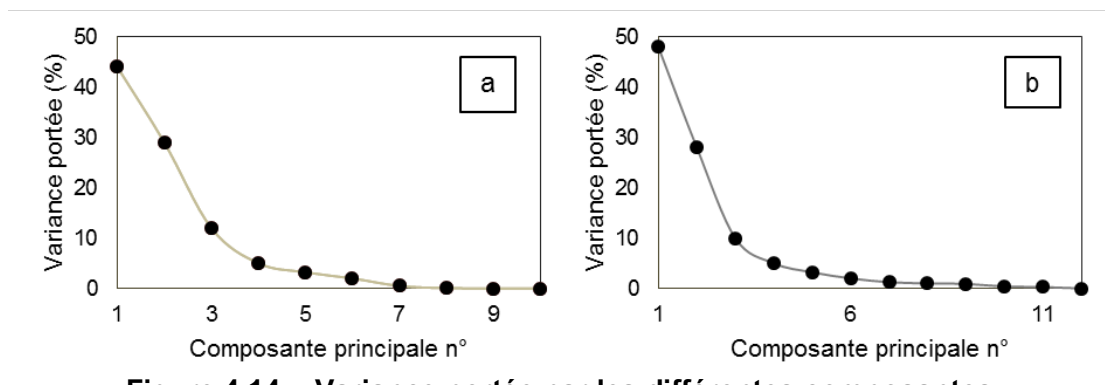


Figure 4.14 Variance portée par les différentes composantes principales pour les analyses des données :
a. sur les points d'intensité
b. sur les statistiques des trajectoires

Dans les deux cas, nous pouvons voir que près de 80% de la variance est portée par les trois premières CP et que les autres CP représentent moins de 5% de la variance chacune. Cela montre que l'ACP est pertinente sur notre jeu de données. Une représentation graphique des données selon les 12 composantes principales obtenues pour les données de trajectoire est fournie en Figure 4.15 afin d'illustrer concrètement la chute brutale de l'étalement des données dès la quatrième CP décrite sur la Figure 4.15. Afin de donner un poids comparable à tous les paramètres utilisés dans l'ACP, les données analysées sont centrées (i.e. la moyenne est soustraite) et réduites (i.e. ont toute la même variance initiale).

Cette analyse a été effectuée pour les différentes expériences réalisées avec *E. coli* et donne des résultats similaires. Les résultats seront discutés dans la partie suivante (0).

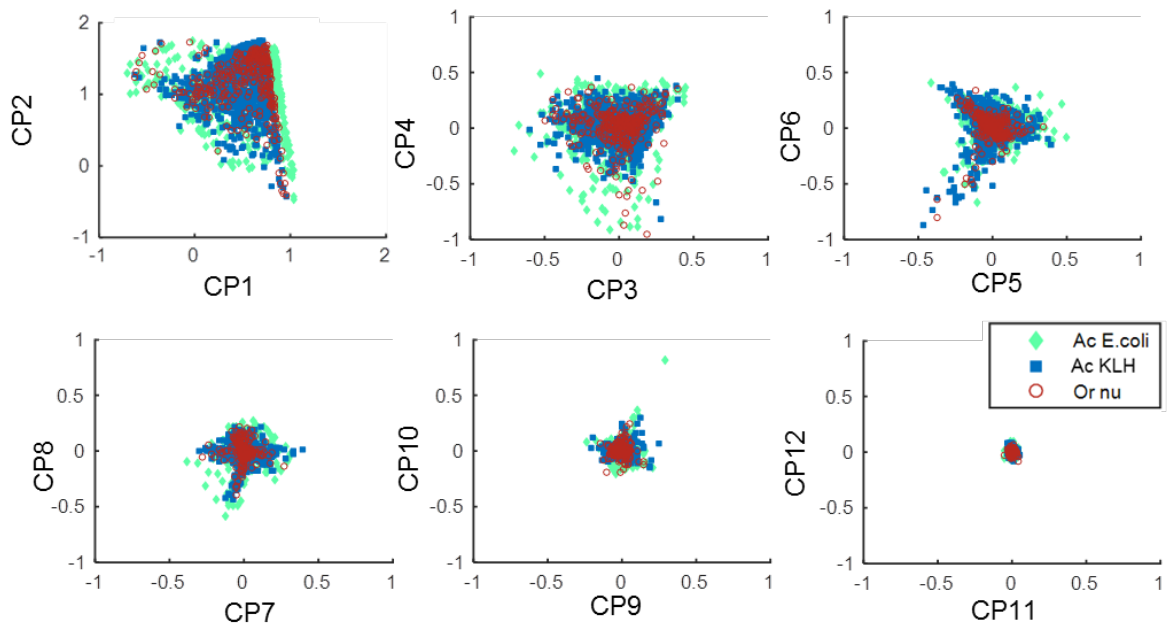


Figure 4.15 Représentation en composante principale des résultats de trajectoires sur *E. coli*
 – *Remarque : l'échelle de représentation est différente pour la première figure pour des raisons de visibilité*

Cette partie nous a permis de présenter les différentes présentations des résultats et les procédures d'obtention de ces représentations. Les bases sont désormais posées pour pouvoir discuter des résultats obtenus.

4.3 Résultats et discussion sur les expériences de suivi de trajectoire d'*E. coli* ATCC 11775

Pour discuter des résultats obtenus sur l'étude d'*E. coli*, nous allons ici présenter en parallèle, quand cela est pertinent, les résultats obtenus à Sherbrooke et à Grenoble.

Pour les représentations topologiques, il est utile de présenter au préalable l'organisation des zones de la biopuce imagée. Nous fournissons donc, sur la Figure 4.16 une image brute de chaque expérience réalisée légendée par les différentes zones visibles.

Pour la suite, il est important de remarquer qu'à droite, en bleu sont présents les plots d'anticorps de contrôle KLH, que les anticorps spécifiques anti *E. coli* sont situés à gauche.

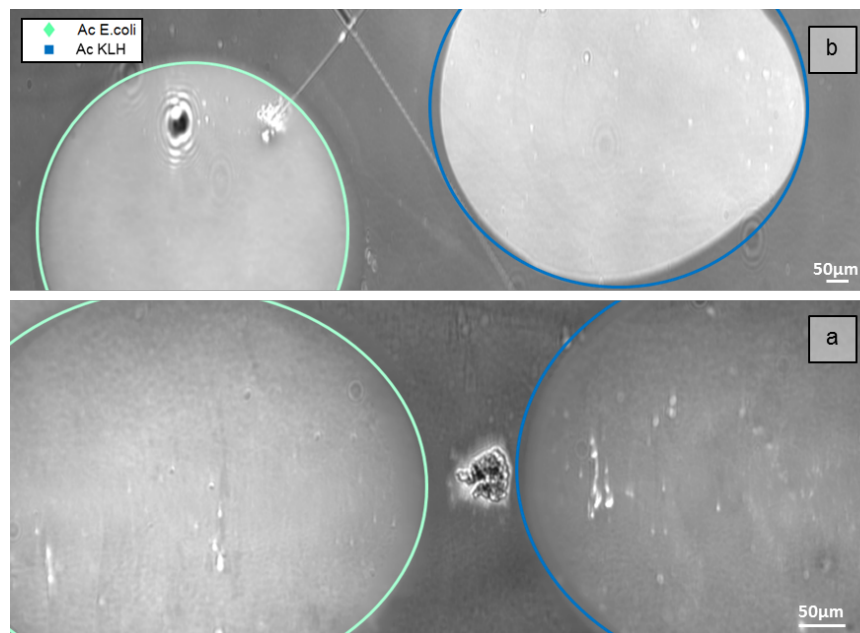


Figure 4.16 Images SPR brutes commentées de deux expériences types de SPRI SE pour l'étude d'*E. coli*
a. Expérience réalisée à Sherbrooke
b. Expérience réalisée à Grenoble

4.3.1 Résultats sur les points d'intensité

Dans le déroulement du projet, l'étude des caractéristiques des points d'intensité n'a pas été immédiate, car le suivi de trajectoires semblait plus prometteur. Pourtant, les données sur les intensités et la taille des taches signalant la présence de bactéries individuelles peuvent être riches d'information.

a. Histogrammes et représentation topologique

Nous allons ici présenter les résultats concernant les deux paramètres les plus représentatifs des caractéristiques de comportements selon les zones, à savoir le « rayon maximisant le contraste », R_c et « intensité moyenne sur le rayon maximisant le contraste », I_c . En Figure 4.17 sont représentés les histogrammes de répartition des valeurs des rayons et intensités moyennes pour chacune des expériences.

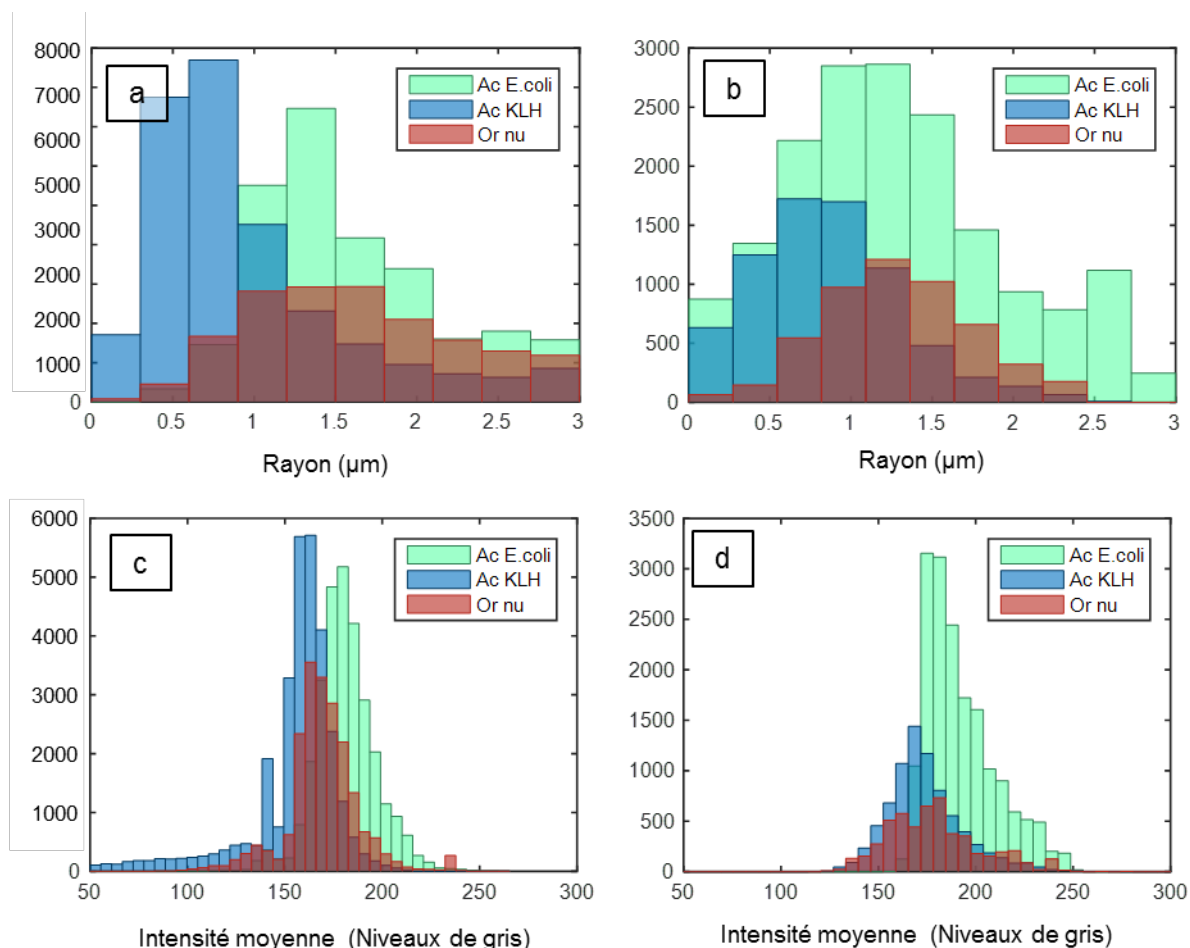


Figure 4.17 Histogrammes des paramètres d'intérêt Rayon (a et b) et Intensité moyennes (c et d) selon la zone fonctionnalisée
a et c : Expérience de Sherbrooke
b et d : Expérience de Grenoble

L'interprétation de ces histogrammes est rendue compliquée par le fait que le nombre total de bactéries observées sur chacune des zones est très différent. Il peut y avoir un facteur cinq entre les populations des différentes localisations. Cependant, nous pouvons observer que les rayons des points (Figure 4.17 a et b) situés sur l'anticorps anti *E. coli* et sur l'or nu sont plus élevés que sur la plot anti KLH. De même, l'intensité est plus importante sur les plots d'anticorps anti *E. coli*.

Les visualisations des expériences de Sherbrooke représentent la synthèse d'une prise d'image sur trois minutes, 30 min après injection tandis que celles de Grenoble s'étalent sur deux minutes et sont prises seulement 20 min après injection. Cette différence

de temps se manifeste en une différence importante de nombre de point total détecté sur la Figure 4.17.

Pour s'affranchir de la variation du nombre de points entre expériences et entre zones, nous représentons des cartes topologiques des deux paramètres étudiés en Figure 4.18 pour le rayon maximisant le contraste et Figure 4.19 pour l'intensité moyenne.

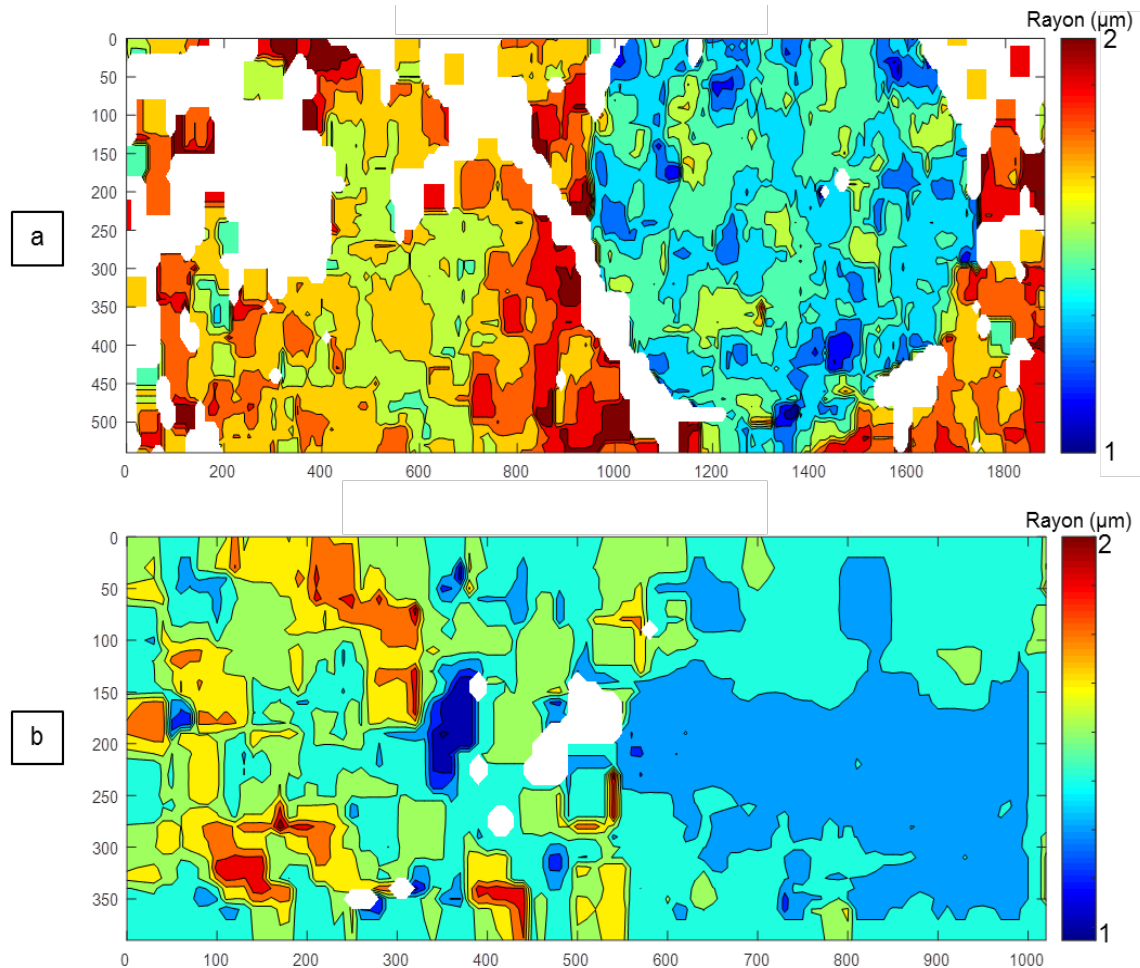


Figure 4.18 Topologie selon le rayon maximisant le contraste –
a. Expérience effectuée à Sherbrooke – injection à 10^5 UFC.mL⁻¹ – Résultat d'une prise de 3 min, 30 min après injection
b. Expérience effectuée à Grenoble – injection à 10^5 UFC.mL⁻¹ – Résultat d'une prise de 2 min, 20 min après injection

Les cartes topologiques en (a) de la Figure 4.18 et de la Figure 4.19 paraissent plus détaillées que les cartes positionnées en (b) car le nombre de points détectés sur l'expérience de Sherbrooke est plus important étant donné la cinétique s'étend sur trois minutes. Cela permet de choisir un pas plus faible pour représenter les cartes topologiques et d'avoir ainsi un meilleur détail.

Sur les données de Sherbrooke, la ligne blanche traversant l'image et la tache relativement circulaire sur la gauche du dessin sont des imperfections de la surface (rayure et irrégularité sur la surface) qui ont dû être neutralisées lors du traitement d'image pour ne pas être faussement détectés comme des points lumineux multiples. Il en est de même pour la tache centrale présente sur les représentations des expériences de Grenoble.

L'interprétation qualitative des résultats représentés est relativement simple : **les interactions entre antigènes de la bactérie et anticorps spécifiques fixés en surface (côté gauche de l'image) retiennent les bactéries à une plus grande proximité de la surface que ne le font les interactions non spécifiques avec l'anticorps non adapté (zone droite de l'image).**

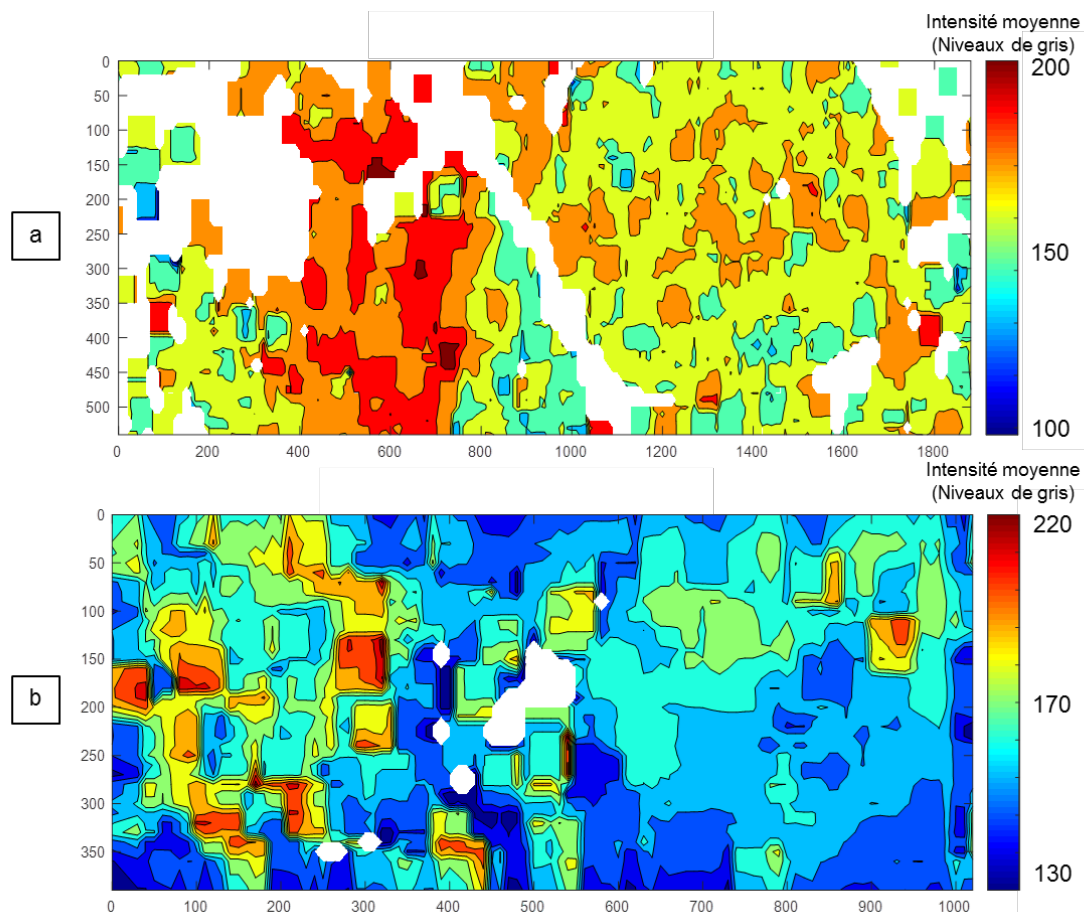


Figure 4.19 Topologie selon l'intensité moyenne du point d'intensité
a. Expérience effectuée à Sherbrooke – injection à 10^5 UFC.mL⁻¹ –
Résultat d'une prise de 3 min, 30 min après injection
b. Expérience effectuée à Grenoble – injection à 10^5 UFC.mL⁻¹ – Résultat
d'une prise de 2 min, 30 min après injection

D'autre part, il est relativement connu dans la littérature [131], [218], [219] que les bactéries ont une bonne affinité avec l'or nu (c'est-à-dire non fonctionnalisé). Ce comportement est également observé ici en ce qui concerne les rayons estimés sur la Figure 4.18. Cette topologie montre que sur l'or nu, les points d'intensité ont en moyenne un rayon comparable à ceux sur l'anticorps spécifique. Sur les cartes d'intensité, en revanche, les zones d'or nu ne sont pas synonymes d'intensité élevée. Cela est probablement dû au fait que le réglage de la sensibilité en SPR est effectué sur les zones fonctionnalisées et non sur l'or nu. La zone d'or nu est donc moins sensible à des perturbations, ce qui implique que pour un même phénomène d'adhésion le signal sera plus faible. Ce résultat est donc logique.

À partir de ces interprétations qualitatives, un traitement plus quantitatif serait souhaitable, comme une estimation chiffrée des différences de distance entre bactéries et surfaces selon la zone sur laquelle elles se situent.

Cependant, une telle évaluation quantitative est difficile. Certes, si l'on suppose que les bactéries ont la même forme quelle que soit la zone de l'image que l'intensité observée, une évaluation quantitative est envisageable. L'intensité mesurée dépend de l'interaction du volume de la bactérie avec le champ évanescent, on obtient que l'intensité observée pour une bactérie à une distance h de l'interface s'exprime : $I(h) = I_0 \exp(-2 \frac{h}{L_p})$, où I_0 est une constante qui dépend de la morphologie de la bactérie et de l'intensité du champ évanescent, L_p est la profondeur de pénétration du plasmon. Il est alors possible de relier la variation du signal à la variation de distance à l'interface. On considère deux points lumineux 1 et 2, d'intensités respectives I_1 et I_2 . On a : $\frac{I_2}{I_1} = \exp(\frac{\Delta h}{L_p})$ où Δh est la différence entre la distance à l'interface de chaque bactérie à l'origine de chaque point lumineux. Par conséquent, on obtient : $\Delta h = L_p \ln(\frac{I_2}{I_1})$.

Des travaux [220] ressemblant à ceux que nous présentons ici ont été effectués pour étudier l'approche de deux souches différentes de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* sur une surface d'or en utilisant des microbalances à cristal de quartz avec surveillance de la dissipation, plus connu sous leurs acronymes anglais QCM-D et de la microscopie TIRF (pour plus de détails, voir la section 1.3.2). Cette technique est également basée sur l'interaction entre un champ évanescent et les particules étudiées, et il en découle la même linéarité entre la distance à l'interface h et le logarithme naturel de l'intensité ($h(t) \propto \ln(I(t))$). Pourtant, ils ne déduisent pas de données quantitatives de leur analyse, car dans leur cas également, ils estiment que la variation d'intensité ne peut être imputée à la variation de distance seulement mais que la déformation des bactéries a son rôle à jouer et est difficile à appréhender.

En effet, le problème du raisonnement sur l'intensité que nous avons tenu plus haut est qu'il est basé sur une hypothèse irréaliste. En effet, de nombreux travaux [221], [222] s'accordent sur le fait que l'adhésion de bactéries à des substrats s'accompagne de déformation importantes du corps de la cellule. Il est très difficile de connaître l'influence de la surface et des anticorps qui y sont greffés sur la morphologie réelle des bactéries. Or cette morphologie influence grandement la perturbation que le microorganisme va induire dans le champ évanescent. À l'heure actuelle, les techniques quantitatives que nous avons pu référencer pour la détermination directe de la déformation impliquent le séchage de l'échantillon et l'utilisation d'une pointe d'AFM [223] ou d'un échantillon, métallisé et fixé, observé au microscope électronique à balayage [221]. Ces techniques sont peu adaptées à notre situation en milieu aqueux et où la surface en question est un tapis d'anticorps.

Une technique de calibration [224] inspirée du domaine de la microscopie TIRP pourrait être intéressante à mettre en place sur notre système. Ce point sera discuté dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

L'étude des intensités relatives entre différentes zones de la surface imagée ont permis de caractériser les différences d'interaction entre les bactéries et le champ plasmon évanescent et ainsi évaluer qualitativement les éloignements et les déformations relatifs entre les différentes localisations.

b. ACP

Nous nous sommes jusqu'à présent intéressés à caractériser de manière globale le comportement moyen des bactéries sur les différentes zones. Nous allons ici tenter de mettre en évidence des comportements individuels particuliers grâce à l'ACP

La représentation des points d'intensité selon les quatre premières composantes principales est donnée Figure 4.20.

Sur cette représentation, nous pouvons voir que l'ACP ne permet pas de séparer clairement les populations selon la zone de la biopuce sur laquelle elles se trouvent.

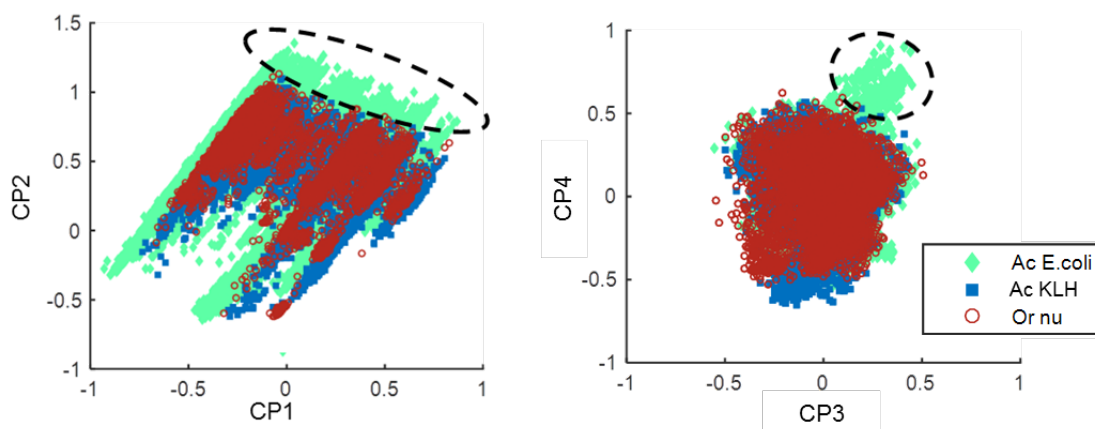


Figure 4.20 Analyse en composante principale des données sur les points d'intensité pour une expérience avec *E. coli*

Ce résultat n'est pas surprenant. En effet, **en raison de la concentration élevée des bactéries en solution, il y a d'une part une probabilité élevée d'interaction non spécifique ponctuelle sur toute la surface, indépendamment de la nature chimique de l'interface. D'autre part, la quantité de bactéries présentes dans le volume sondé en SPR mais sans contact avec la surface n'est pas nul et augmente au fil du temps par sédimentation** (voir annexe 1). Par conséquent, la majorité des points d'intensité détectés correspondent vraisemblablement à des phénomènes d'interaction faibles et non spécifiques entre la surface et les bactéries en solution. De plus, étant donné que la prise d'images ne dure que trois minutes, l'accumulation de bactéries accrochées spécifiquement aux anticorps anti *E. coli* n'a pas le temps de devenir un phénomène prépondérant par rapport à la quantité de bactéries proches de la surface sans interaction spécifique.

Cette remarque montre que l'ACP est limitée pour l'étude de nos données dans le sens où elle ne permet pas de mettre en évidence des groupes distincts de caractéristiques spécifiques (voir explication de l'ACP en 4.2.3.c). Pour autant, la Figure 4.20 montre qu'il existe des zones sur les diagrammes (CP1 – CP2) et (CP3 – CP4) où seuls des points d'intensité situés sur les anticorps anti *E. coli* sont présents. Ces zones sont entourées en pointillés sur la Figure 4.20. La présence de ces zones laisse penser que même si la totalité des bactéries détectées sur une zone ne présente pas un comportement spécifique, la présence de quelques individus présentant les caractéristiques des zones pointillées est la signature d'un comportement d'interaction spécifique avec un anticorps et mérite donc qu'on s'y intéresse plus en détail.

Pour comprendre quelles sont les spécificités de ces points d'intensité ayant un comportement spécifique, il faut s'intéresser aux paramètres exprimés par les composantes qui les décrivent le mieux. Les composantes principales qui délimitent le plus la spécificité des points situés sur l'anticorps anti *E. coli* sont la CP1, la CP2 et la CP4. Nous avons donc regardé quelles caractéristiques étaient portées par ces deux composantes principales.

Ainsi, sur le diagramme Figure 4.20.a, les points spécifiques sur anticorps anti *E. coli* ont pour caractéristique d'avoir à la fois une intensité moyenne grande (CP1) et un contraste important (CP2).

Sur le diagramme Figure 4.20.b, les points spécifiques possèdent principalement un rayon élevé et une intensité moyenne élevée (CP4). Sur ce diagramme, il semble même que les points ayant des valeurs de CP4 faibles soient exclusivement situés sur l'anticorps anti *S. epidermidis*.

4.3.2 Résultats sur les trajectoires

L'étude des trajectoires bactérienne traduit assez peu l'interaction entre bactérie et onde évanescente. Certes, les bactéries dont nous étudions la trajectoire sont nécessairement situées dans la zone de sensibilité du champ plasmon, mais en dehors de cette condition inhérente à l'existence de la trajectoire, les informations à tirer de l'analyse des trajectoires sont à trouver ailleurs.

a. Histogrammes et topologie

Pour la comparaison entre histogramme et carte topologique du comportement, nous allons ici nous intéresser au paramètre « vitesse moyenne ».

Sur la Figure 4.24 sont représentés les histogrammes de vitesse moyenne des trajectoires selon les différentes zones sur lesquelles elles se situent. Sur ces représentations l'axe des ordonnées représente le nombre de bactéries dans un plot donnée possédant les caractéristiques définies par l'abscisse.

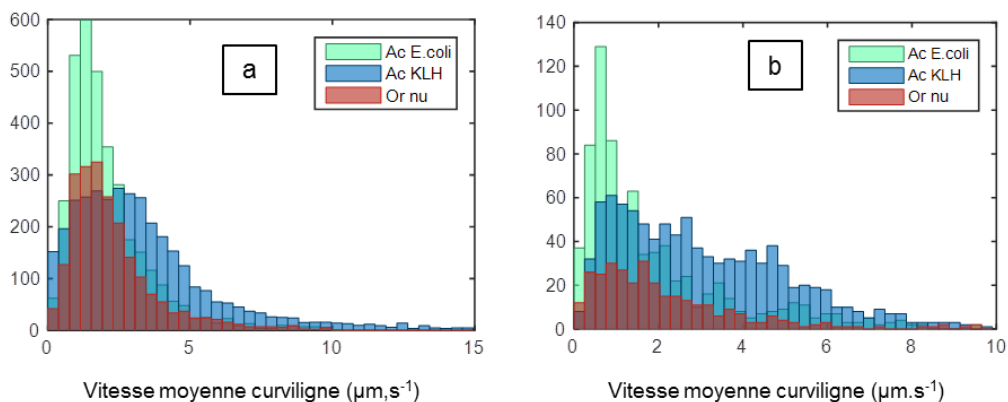


Figure 4.21 Histogramme des vitesses moyennes obtenues pour les deux expériences pour différentes zones fonctionnalisées
a. Expérience de Sherbrooke
b. Expérience de Grenoble

Sur ces représentations, on peut voir que le nombre de trajectoires sur le plot anti KLH semble comparable à celui sur le plot anti *E. coli*, tandis que nous avons vu plus haut qu'il y a plus de points d'intensité sur le plot anti *E. coli*. Cela est simplement dû au fait que les trajectoires sur le plot anti *E. coli* sont plus longues et moins morcelées que celles se situant sur le plot anti KLH.

Ces histogrammes montrent que la vitesse moyenne sur le plot anti KLH est plus importante que sur le plot anti *E. coli* aussi bien que sur l'or nu.

Finalement, les représentations topologiques vont nous permettre de mettre en visualiser ces comportements statistiques différents selon les zones. Sur la Figure 4.22, page suivante, est représentée la topologie de la vitesse moyenne des trajectoires selon leur position géographique.

Sur ces cartes, il est également visible que **les bactéries ont en moyenne une vitesse plus grande sur le plot de KLH que sur le plot anti *E. coli*. Ce point est vrai, mais la réalité est surtout que toute trajectoire située sur l'anti KLH observe un comportement non spécifique et ponctuel, tandis qu'une proportion non négligeable des bactéries situées sur l'anticorps anti *E. coli* a un comportement spécifique et est freiné, ce qui diminue la vitesse moyenne sur ce plot.**

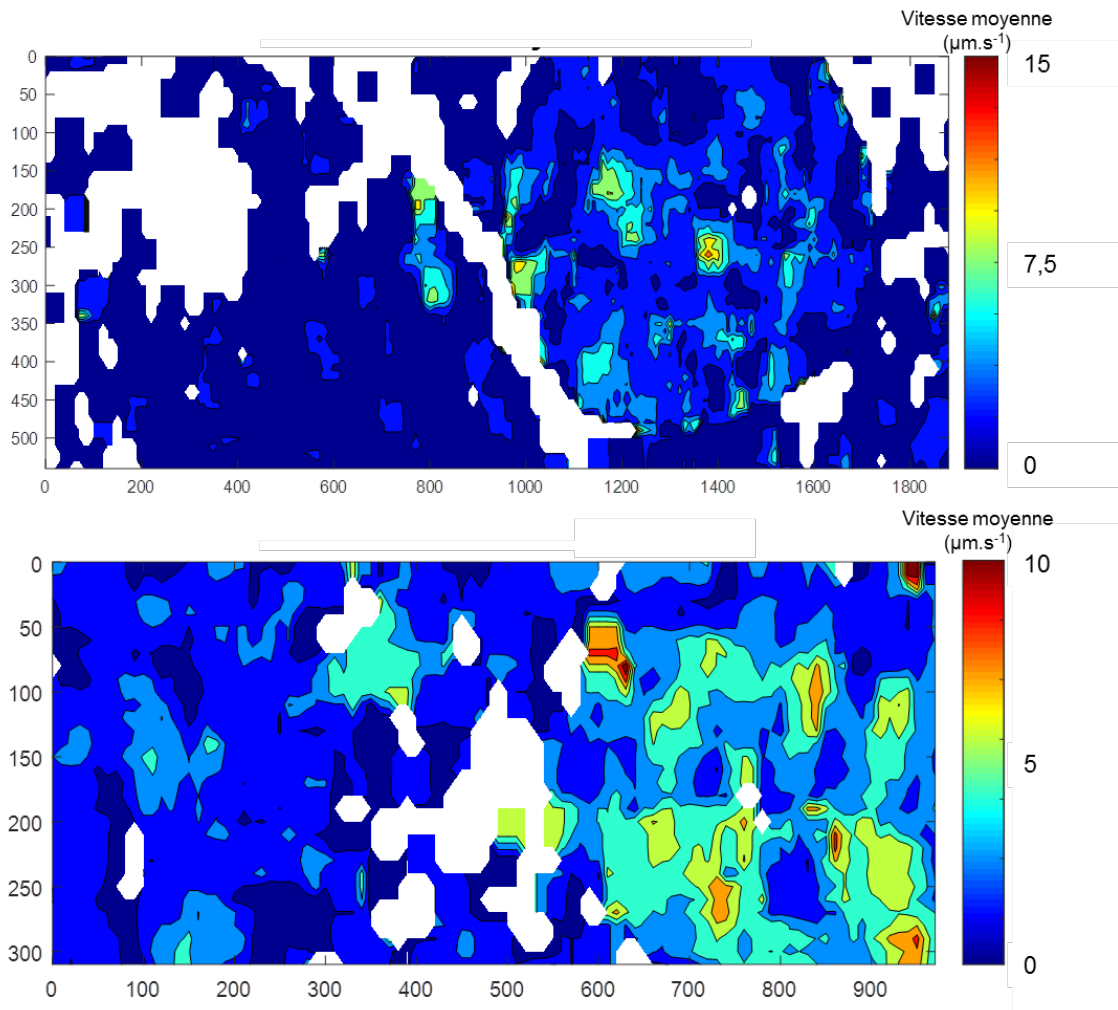


Figure 4.22 Topologie selon la vitesse moyenne des trajectoires
a. Expérience effectuée à Sherbrooke – injection à 10^5 UFC.mL⁻¹ –
Résultat d'une prise de 3 min, 30 min après injection
b. Expérience effectuée à Grenoble – injection à 10^5 UFC.mL⁻¹ – Résultat
d'une prise de 3 min, 30 min après injection

b. Trajectoires paramétriques

Nous présentons en Figure 4.23 une représentation paramétrique des trajectoires en fonction du temps pendant lequel chaque trajectoire est estimée immobile : le temps d'arrêt.

Les trajectoires paramétriques en fonction du temps d'arrêt mettent en évidence la présence de trajectoires très ramassées, quasiment immobiles sur l'anticorps anti *E. coli* mais également sur l'or nu. Ainsi, **les anticorps spécifiques bloquent réellement le mouvement des bactéries avec lesquelles ils sont en interaction spécifique**. En revanche on peut aussi voir que ces trajectoires caractéristiques sont très minoritaires par rapport au reste des trajectoires, et un tel comportement spécifique n'aurait pas pu être visualisable avec les représentations topologiques comme précédemment.

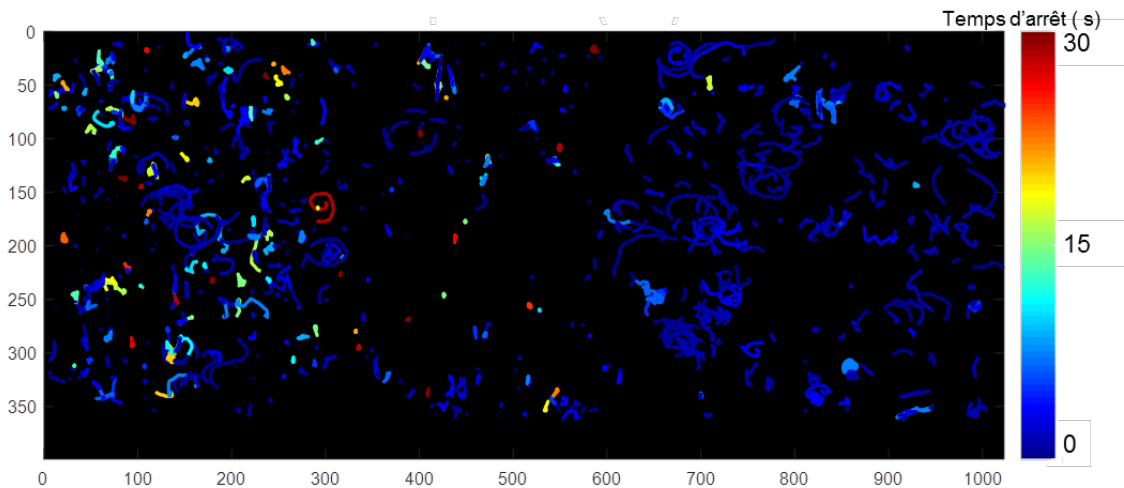


Figure 4.23 Représentation paramétrique des trajectoires en fonction du temps d'arrêt

c. Analyse en composante principale

L'analyse en composante principale des données sur les trajectoires, fournie dans sa totalité en exemple dans la partie explicative (Figure 4.15) est plus difficile à interpréter que celle obtenue pour les données statiques. En effet, la zone du diagramme correspondant à des caractéristiques spécifiques de la zone fonctionnalisée en anticorps anti *E. coli* (zone entourée en pointillée sur la Figure 4.24) est très limitée. La zone de valeurs de CP2 élevées semble ne contenir que des trajectoires de bactéries situées sur l'anticorps KLH, mais cette zone est encore plus limitée que la précédente.

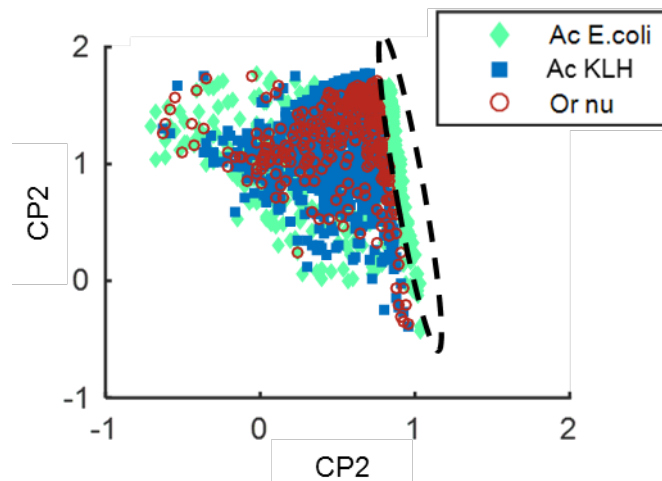


Figure 4.24 Analyse en composante principale des trajectoires

Pour donner un sens physique aux paramètres CP1 et CP2, nous avons encore une fois cherché quels étaient les paramètres principaux composants les CP. La CP1 est composée majoritairement du temps d'arrêt et de la durée de la trajectoire, tandis que la CP2 dépend du déplacement et de la vitesse moyenne.

Nous avons donc décidé de tenter de représenter simplement les points dans un diagramme représentant les caractéristiques en termes de temps d'arrêt et de déplacement de chaque trajectoire. Ce diagramme est présenté sur la Figure 4.25.

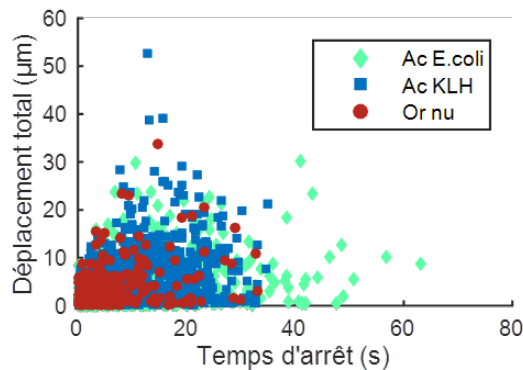


Figure 4.25 Répartition des trajectoires en fonction du déplacement total et du temps d'arrêt

Cette représentation montre qu'il existe bien des comportements spécifiques individuels sur l'anticorps anti *E. coli*. Uniquement sur cette zone, certaines bactéries présentent une absence de mobilité, quantifiée par un temps d'arrêt de plus de 40 s cumulé. Les quelques déplacements particulièrement larges sur l'anticorps KLH ne sont en revanche pas suffisamment nombreux pour en tirer des conclusions réelles.

Nous avons donc pu montrer dans cette partie l'intérêt de l'étude des signaux précis obtenus en SPRI SE, aussi bien concernant les points d'intensité que la reconstruction de trajectoires bactériennes. Nous avons ici étudié un cas modèle, d'une bactérie mobile modèle en interaction avec une surface modèle d'anticorps.

Pour nous confronter à des cas offrant des perspectives plus grandes en termes d'applications, nous allons maintenant étudier des bactéries pathogènes.

4.4 Retour sur les expériences avec *Listeria*

Les expériences du chapitre précédent ont fourni un grand nombre de données, de dynamique modérée certes, puisque la fréquence d'obtention d'image était d'une image par minute, mais une bibliothèque d'image de points d'intensité suffisamment fournie pour nous permettre de faire une analyse quantitative des caractéristiques des points d'intensité sur les expériences réalisées. Encore une fois, nous ne présentons ici qu'un exemple d'analyse d'expérience.

4.4.1 Comment obtenir des points d'intensité sur les zones non spécifiques ?

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, *Listeria* montre une très grande spécificité pour les anticorps qui lui sont destinés, et dans les temps d'analyse qui étaient utiles pour la détection, nous avons pu voir qu'il n'y avait que très peu d'accroche non

spécifique sur les autres zones (une dizaine de bactéries au bout de sept heures d'incubation en contact avec la surface). Cela limite à priori fortement les zones analysables si l'on ne peut observer de bactéries uniques que sur les plots positifs.

En réalité, tout est une question d'échelle de temps. Si en sept heures après une injection à 10^2 UFC.mL⁻¹, il n'y a en effet quasiment aucune accroche non spécifique, il y en a après plus de douze heures d'incubation. Ces temps longs d'analyse étaient inutiles pour la détection car à ce moment de l'expérience les plots d'anticorps spécifique sont saturés. Mais pour effectuer une cartographie du comportement bactérien, cela peut être pertinent.

Sur la Figure 4.26 sont représentées deux portions d'images différentielles prises à deux instants différents de l'expérience.

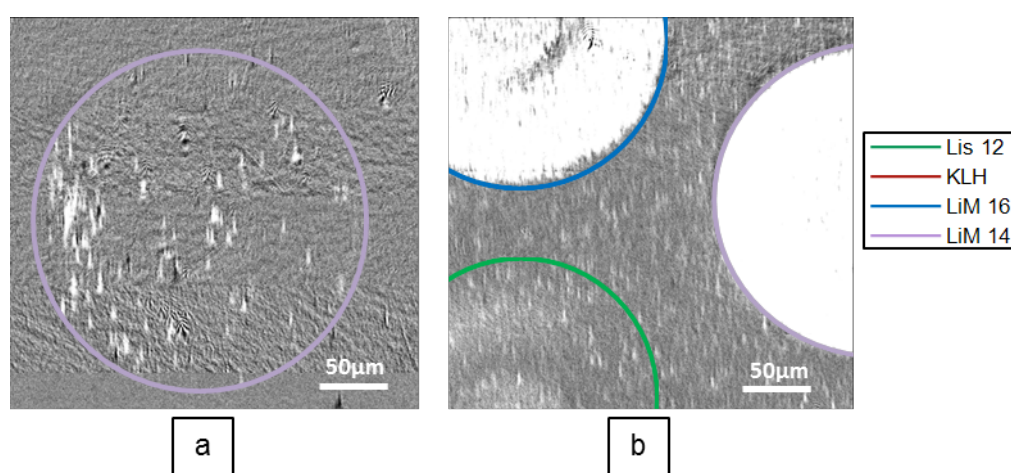


Figure 4.26 Comparaison des aspects d'évènements uniques
a. Sur plot d'anticorps spécifique LiM 14, 472 min après injection
b. Sur plot d'anticorps non spécifique et sur or passivé 793 min après injection – injection à 10^2 UFC.mL⁻²

Sur les deux images, l'anticorps LiM 14, c'est-à-dire la zone entourée en violet, correspond au même plot. En a, à un peu moins de 8h après l'injection, quelques dizaines d'évènements bactériens sont comptables et très intenses sur le plot de LiM16, mais rien n'est observable autour du plot. Après plus de 12h d'incubation, les plots de LiM16 et de LiM14 sont entièrement saturés et on ne peut plus détecter d'évènement unique sur ces plots, tandis on peut observer de nombreux points individuels sur la zone entre les plots et sur les plots de Lis12.

4.4.2 Résultats

Grace à ces deux temps permettant d'observer des évènements individuels sur des plots différents, on peut reconstituer la cartographie des caractéristiques des points d'intensité selon leur position sur l'image. De plus, ici les images sont reconstruites pour avoir une netteté homogène sur toute l'image, donc il est possible d'analyser un champ trois fois plus large que dans les images obtenues lors des expériences avec *E. coli* ATCC 11775.

Sur ces cartes topologiques, deux observations principales peuvent être faites.

Tout d'abord, la présence de zones sans données statistiques sur les plots de KLH montre que ce contrôle négatif est très efficace pour *Listeria* dans les conditions de détection. La différence de comportement entre *E. coli* observé précédemment et *Listeria* par rapport au plot de KLH peut être simplement dû à des morphologies différentes (*Listeria* n'a ni pili ni flagelle à la température expérimentale). Il est également possible que le temps caractéristique d'interaction de la bactérie pathogène avec le contrôle négatif soit trop court par rapport au temps d'exposition des images, qui est de plusieurs dizaines de millisecondes. Dans ce cas, le signal intégré sur le temps d'exposition ne permet pas de voir ces signaux fugaces.

Concernant l'intensité moyenne des points d'intensité, il est marquant que les anticorps spécifiques LiM14 et LiM16 sont des surfaces où les points d'intensité sont particulièrement intenses. L'explication est similaire à celle que nous avons effectuée dans précédemment. Les anticorps spécifiques ont des interactions importantes avec la bactérie étudiée ce qui à la fois rapproche la bactérie de la surface et en même déforme la morphologie de la cellule. Ces deux phénomènes accentuent la perturbation du champ plasmon ce qui explique la forte intensité observée. Cette fois, contrairement aux expériences sur *E. coli*, la surface d'or a été passivée et la carte topologique des intensités montre bien que le comportement bactérien sur l'or se manifeste par une intensité de ponts faibles, signifiant une faible interaction avec la surface.

En revanche, l'analyse de la topologie des rayons des points d'intensité offre un résultat surprenant. Ici, les points d'intensité situés sur les plots d'anticorps spécifiques ont des rayons plus faibles qu'ailleurs sur l'image. Le raisonnement sur la déformation des bactéries en fonction de la force des interactions avec la surface ne peut pas justifier cette observation.

Pour trouver une possible explication à cette observation, il faut encore une fois raisonner sur le temps d'exposition. Ici, les plots de Lis12 et les zones d'or passivées ont une interaction non spécifique avec les bactéries : celles-ci demeurent donc plus mobiles que sur les plots spécifiques. Les points d'intensité relativement gros sont donc vraisemblablement dus à un flou de mouvement des bactéries pendant la période d'intégration du signal.

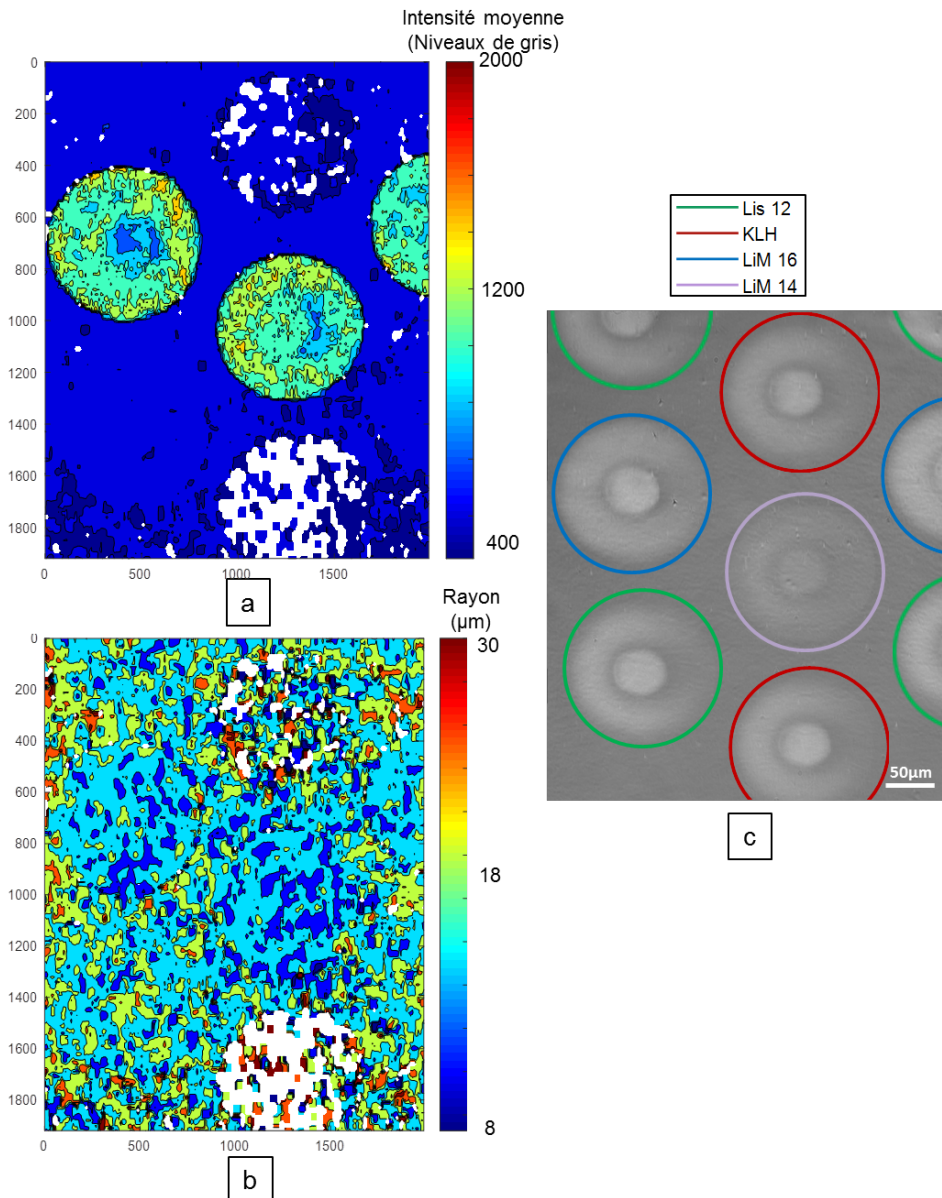


Figure 4.27 Étude de l'accroche spécifique de *Listeria monocytogenes* sur des plots spécifiques d'anticorps
a. Topologie des plots d'anticorps anti *Listeria* en fonction du rayon estimé maximisant le contraste des points d'intensité détectés
b. Topologie des plots d'anticorps anti *Listeria* en fonction de l'intensité moyenne des points d'intensité détectés
c. Image brute reconstruite de la zone étudiée montrant les hétérogénéités de surface au niveau des plots d'anticorps

Cet exemple d'application de notre traitement du signal à un cas de bactéries pathogènes a permis d'approfondir les analyses de détection de pathogènes que nous avons vues dans le chapitre précédent.

Mais pour montrer l'intérêt de notre technique pour l'étude de l'interaction entre bactéries et surfaces spécifiques, il serait intéressant de s'atteler à un cas moins traditionnel que les surfaces d'anticorps, qui sont très efficaces mais donnent des résultats assez prévisibles puisque les interactions entre antigènes et anticorps sont étudiées depuis des dizaines d'années [225].

4.5 Résultats sur les peptides anti microbiens (PAM)

Grace au caractère pluridisciplinaire du laboratoire de Grenoble, il a été possible de prendre part à un autre projet, portant sur les perspectives des peptides anti microbiens pour la détection de bactéries en SPRI. L'objectif de ce projet porte sur le développement d'un biocapteur pour la détection de la présence de bactéries dans le sang. Le sang est normalement un milieu stérile, et sa contamination par des bactéries peut provoquer une réponse inflammatoire grave qu'on appelle sepsis.

Cette collaboration a été vue comme un moyen d'avoir des précisions sur les observations effectuées en SPRI commerciale d'une part, et d'autre part de notre point de vue, de pouvoir participer à des projets de développements plus ciblés en microbiologie.

4.5.1 Les peptides antimicrobiens et la SPRI classique

a. Quelques notions sur les peptides antimicrobiens

Pour comprendre l'intérêt du projet auquel nous avons ponctuellement pris part, il nous faut d'abord présenter les peptides anti microbiens.

Les PAM sont des petits peptides, de 12 à 50 acides aminés [226], présents aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes, capables de défendre leurs hôte face aux agressions de microorganismes extérieurs. Ces molécules sont l'un des piliers du système immunitaire inné servant à la défense des organismes multicellulaires. La majorité de ces peptides présentent des propriétés amphiphiles et cationiques essentielles à leur action antimicrobienne [227] car elles leur permettent d'interagir aisément avec la membrane cytoplasmique des bactéries, aussi bien à coloration de Gram positive ou négative, pour la dégrader.

La détection universelle de bactéries en milieu sanguin nécessite le développement d'un jeu de sondes capable de détecter une très grande variété de cibles bactériennes membranaires. En ce sens, l'immobilisation des PAM sur surface afin de mettre en œuvre la détection de bactéries par SPRI semble prometteuse.

Sept peptides ont été testés en SPRI commerciale (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq), sur de nombreuses souches bactériennes pathogènes. Pour étudier plus en détail les résultats obtenus à l'issue de ces expériences, nous avons effectué des expériences de SPRI SE avec deux PAM particuliers : la magainine-1 et la leucocine-A⁴ (Smart Bioscience, Saint Egrève, France).

Les magainines ont une activité bactéricide rapide : elles se fixent sur les membranes riches en phospholipides et perméabilisent la membrane lipidique [227]. Leur spectre d'activité est très large, couvrant les bactéries à gram positif ou négatif, les champignons voire même certains parasites comme des amibes [228], [229].

⁴ Il s'agit en réalité d'un fragment de 24 des 37 acides aminés de la séquence de leucocine A, portant la même activité antimicrobienne que la séquence entière

Le mécanisme d'action des leucocines est comparable à celui de la magainine, mais son activité bactéricide est principalement dirigée contre les bactéries à Gram positif (*E. coli* est une Gram négatif).

Ces deux peptides sont déjà référencés pour une utilisation après avoir été greffé sur une surface spécifique par un groupement thiol [230]–[233], ce qui assure à priori que leur propriétés antimicrobiennes sont conservées après ce type de fonctionnalisation.

Les séquences des peptides fonctionnalisés utilisées pour ces expériences sont présentées en Figure 4.28. Un troisième peptide a été utilisé en tant que contrôle, correspondant à un peptide de même séquence que la leucocine, organisée dans un ordre différent. Chacune de ces séquences contient un acide aminé de type cystéine (C) en bout de chaîne, qui contient naturellement un groupement thiol (voir Figure 4.28.c) permettant une fonctionnalisation de la surface d'or.

Nous allons présenter rapidement les résultats obtenus dans le projet en SPRI commerciale pour introduire les problématiques auxquelles nous avons tenté de répondre.

Nom	Séquence
Leucocine A 24	C-aeaa-SVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW-OH
Contrôle	GVLSNVIGYLKKLGTGALNAVLKQ-aeaa-C-NH ₂
Magainine	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-aeaa-C-NH ₂



Figure 4.28 Séquences des peptides anti microbiens fonctionnalisés utilisés
a. Séquence brute d'acides aminés
b. Formule de l'espaceur aeaa utilisé dans les séquences en a.
c. Formule de l'acide aminé Cystéine

b. Résultats obtenus en SPRI commerciale sur les PAM d'intérêt

Nous présentons en Figure 4.29 une cinétique de suivi de détection d'*E. coli* ATCC 11775 sur les deux peptides antimicrobiens d'intérêt. Ces travaux ont été effectués par Eric Pardoux dans le cadre de son projet de doctorat.

Sur ce graphique, nous pouvons voir que les trois plots réagissent à la présence de la souche bactérienne. La leucocine présente un saut de réflectivité plus important et plus précoce que les deux autres peptides. Le plot de magainine présente une variation de réflectivité légèrement plus tôt que le contrôle, mais la variation de réflectivité atteinte à la stabilisation du signal est comparable.

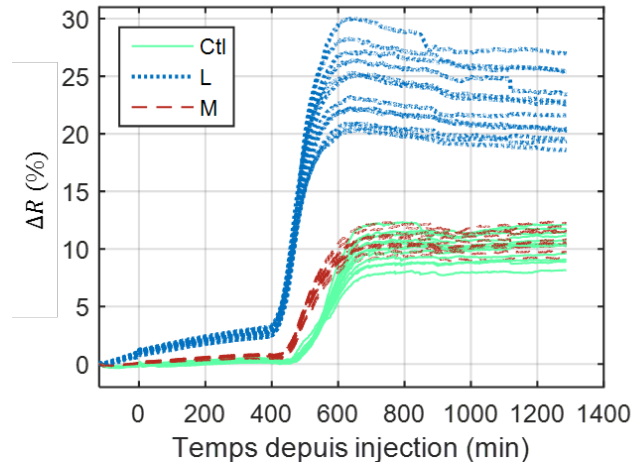


Figure 4.29 Cinétique en SPRI commerciale d'une injection de *E. coli* ATCC 11775 à 97+/-8 UFC.mL⁻¹ sur plots de peptides antimicrobiens – Ctl : séquence de la leucocine randomisée – L : leucocine – M : magainine

Il est important de noter que le montage de SPRI commercial est pivoté de 90° par rapport au montage de SPRI SE, et par rapport à tous les schémas que nous avons pu présenter jusqu'à présent. De cette manière, la biopuce ne voit pas les bactéries et les potentiels dépôts de matières organiques qui tombent du fait de la gravité, mais uniquement les bactéries qui arrivent en surface du biocapteur par diffusion. Les réactions de chaque plot de peptide n'est donc pas un artefact de détection de produits de la gravité car ces produits ne tombent pas sur la biopuce. Ce type de modification de montage afin de

Il est difficile de relier les observations effectuées au caractère supposément bactéricide de la magainine, car le signal obtenu sur celle-ci montre un comportement assez semblable au plot de contrôle supposément inerte. La forte réactivité du plot de leucocine est également difficilement conciliable avec le fait que ce peptide ne cible pas les bactéries Gram négatifs.

Pour obtenir des informations plus précises, nous avons donc décidé d'étudier ces trois peptides avec notre système de SPRI SE.

c. Comparaison entre SPRI commerciale et SPRI classique

Dans cette partie, nous nous appuyons directement sur les questionnements sur les résultats obtenus en SPRI commerciale pour tenter d'apporter des réponses grâce à la SPRI SE. Il est donc ici particulièrement adapté de présenter les différences entre les expériences de SPRI SE et celles en SPRI commerciale. Une comparaison des images brutes obtenues par chaque technique est présentée en Figure 4.30.

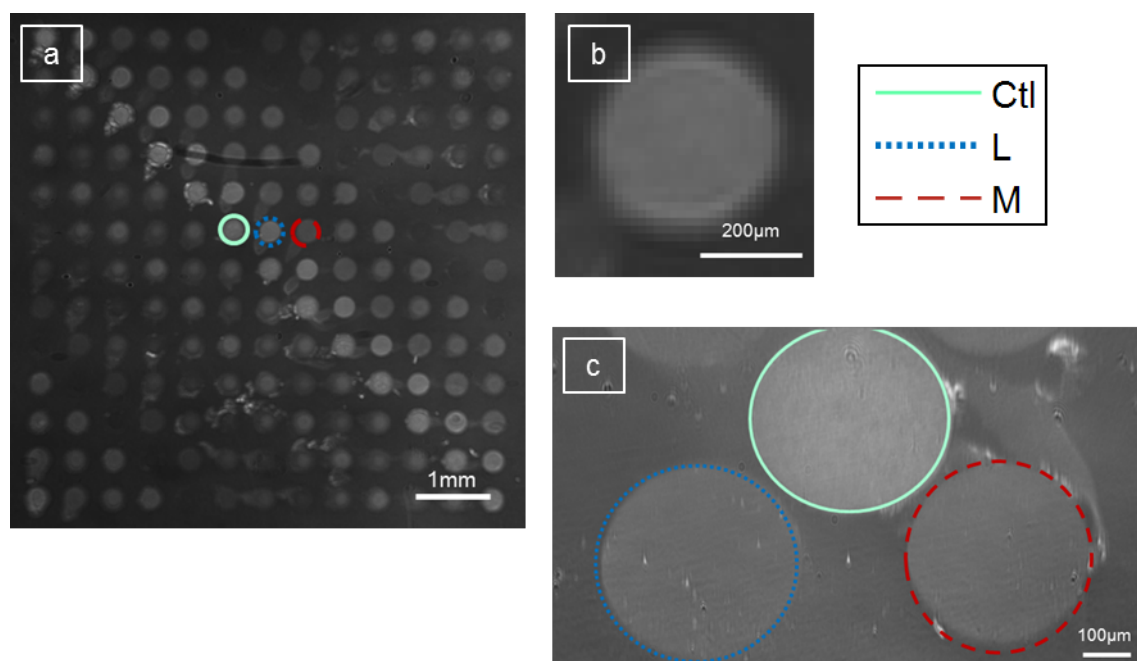


Figure 4.30 Images brutes prises en différentes SPRI
a. Image brute de la biopuce en SPRI commerciale avant injection
b. Zoom de l'image a se focalisant sur le plot de contrôle entouré sur l'image a.
c. Image brute tronquée sur la zone nette en SPRI SE

Cette comparaison d'image permet de mettre en évidence les avantages de chaque technique : la SPRI commerciale permet de multiplier le nombre de surfaces fonctionnalisées pour effectuer un criblage de la solution avec un grand nombre de sonde (Figure 4.30.a.), mais il n'est pas possible d'observer en détail les évènements individuels qui ont lieu à la surface car la résolution est trop faible pour voir avec précision les détails à l'intérieur d'un plot (Figure 4.30.b.). À l'opposé, la SPRI SE ne permet de voir que quelques plots, mais l'échantillonnage de chaque plot en termes de pixels est suffisant pour pouvoir décrire avec une certaine précision les évènements individuels qui s'y déroulent. (Figure 4.30.c.).

4.5.2 Résultats en SPRI SE

a. Description des expériences de SPRI SE

Les expériences réalisées en SPRI SE ont utilisé la même fonctionnalisation de surface que les expériences utilisées en SPRI commerciale, soit l'adsorption directe de

peptides possédant des groupements thiols et la passivation par des polymères PEG 800kDa eux-mêmes thiolés (voir paragraphe 2.4.1 b).

Une différence notable entre les deux types d'expérience est que dans les expériences que nous avons effectuées, nous n'avons pas mis en place de régulation de la température, ce qui implique entre autres que le temps de croissance dans la cuve a été allongé. Il est possible de l'estimer autour de 35 minutes tandis que les conditions optimales de croissance à 37°C sont plutôt de 20 minutes.

Afin de travailler dans des conditions proches des expériences de référence effectuées en milieu de culture (TSB) en SPRI commerciale, nous avons utilisé une concentration initiale entre 10^2 UFC.mL⁻¹ et 10^3 UFC.mL⁻¹.

Pour ces expériences, le suivi cinétique global s'est déroulé avec une fréquence d'acquisition de 0,2 Hz (1 image toutes les 5 secondes).

Afin d'effectuer un suivi cinétique rapide pour étudier les trajectoires, le suivi global de plusieurs expériences a été entrecoupé de suivi rapide à 1Hz. Selon la bibliographie que nous avons effectuée plus haut, cette fréquence est à priori légèrement faible pour effectuer un suivi précis des trajectoires, pourtant nous allons voir que cette fréquence a été suffisante.

Pour cette expérience longue, il était en effet nécessaire de faire des choix sur la fréquence d'acquisition car les images acquises ont une taille de 8 Mo. Ainsi, une acquisition de 3 minutes à 10Hz occupe une place de 14Go, il n'est donc pas possible de faire plus de quelques prises de ce type. Hors plus la concentration initiale est faible, plus il y a de variabilité sur la cinétique d'étude des points individuels. Nous avons donc préféré faire plusieurs prises à 1Hz de 3 minutes, d'une taille de 1,4Go, au risque de perdre une partie de notre capacité à reconstruire les trajectoires.

Les problématiques auxquelles nous avons tenté d'apporter des éléments de réponses sont les suivantes : peut-on mettre en évidence différentes interactions entre les bactéries et les différents plots ? Peut-on identifier des indicateurs de lyse de bactéries en surface de la magainine ?

Pour apporter des points de réponses, nous avons analysé à la fois les points d'intensité, les trajectoires, mais également l'évolution de l'intensité du fond de puce, c'est-à-dire l'intensité détectée sur les plots dans les zones où il y a absence de bactéries.

b. Analyse de la variation de réflectivité des plots hors bactéries

L'idée de détecter des potentielles lyses de bactéries nous a poussés à étudier si l'intensité à l'échelle d'un plot varie globalement en dehors des bactéries. En effet, les lyses de bactéries vont s'accompagner de relargage de déchets cellulaires dans la solution. Si les PAM répondent à un dépôt bactérien de type bactéries lysées ou autre, ce ne sont pas des points lumineux qui pourraient être détectés mais une modification homogène de la surface qui voit sa composition varier à la suite d'adsorption moléculaire.

Ainsi, en sélectionnant plusieurs zones d'un plot de quelques centaines de pixels chacune, il est possible de suivre l'évolution de la réflectivité en enlevant les points d'intensité dus à l'accroche de bactéries. Ce même traitement effectué sur le plot de contrôle négatif permet de mesurer en parallèle les modifications globales de l'indice du milieu. Un tel suivi des trois plots et de l'or passivé au PEG est présenté Figure 4.31. Pour

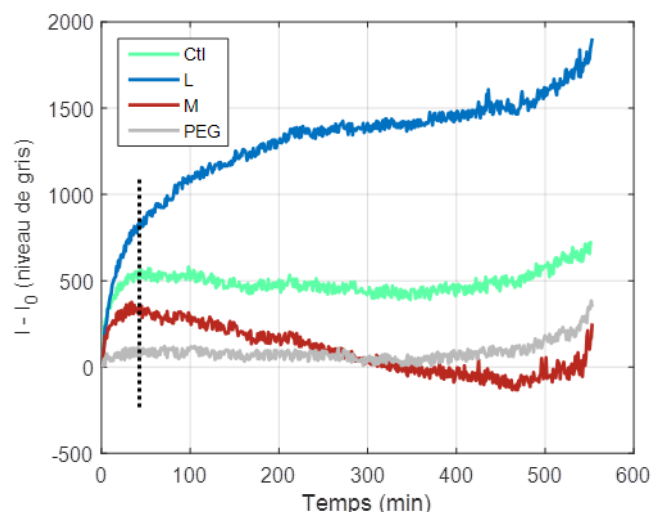


Figure 4.31 Cinétique d'évolution de l'intensité sur le fond de plot – le temps initial du graphique correspond à quelques secondes après l'injection – A titre informatif, la valeur moyenne d'intensité sur image brute est de 25 000

une zone d'une taille environ 10 fois supérieure à la taille d'une bactérie, et pour un nombre d'évènement bactérien suffisamment faible (avant 7h pour une injection à 10^2 UFC.mL⁻¹) le passage d'une bactérie dans la zone provoque un changement d'intensité suffisamment grand pour faire un point aberrant dans le suivi et peut donc être rejeté. Après 7h, le nombre de bactéries qui traversent la zone observée est trop important pour rejeter les points aberrant et on voit le signal se bruyé fortement (après 500 min sur la Figure 4.31).

Cette figure permet de montrer qu'il y a un comportement différent entre les différents peptides. Pour comparer les signaux sur cette figure, nous allons raisonner en termes de variation de l'intensité en pourcentage de l'intensité moyenne brute, qui a une valeur d'environ 25 000. Sur le contrôle (vert) et sur le PEG (gris), il y a globalement stabilité du signal quelques minutes après injection (après la barre noire pointillée sur la Figure 4.31) avec une variabilité du signal à moins de 0.8% du signal moyen. En revanche, il y a un vrai comportement spécifique sur les deux PAM étudiés : après la hausse initiale des premières minutes, probablement due à l'injection de la concentration de bactérie ayant une composition légèrement différente de la solution initiale, il y a une baisse du signal autour de 2% pendant les 6 premières heures pour la magainine et au contraire augmentation du signal de 2% pour la leucocine.

Pour la leucocine, le résultat semble assez facile à interpréter : le PAM interagit avec la solution ou une partie de ses composants, des molécules se déposent en surface de manière homogène. Le fait que cette accroche ait lieu uniquement sur les plots de leucine

nous laisse penser qu'il s'agit d'interaction spécifique, possiblement des composants de bactéries issus de lyse de cellules en solution.

En revanche pour la magainine, le résultat est difficile à expliquer : la baisse de signal signifie normalement une perte de masse en surface. L'explication la plus simple serait qu'il s'agisse d'un appauvrissement sur milieu, car il est vrai que cette baisse est visible dans une moindre mesure sur le plot de contrôle négatif. Cependant, il n'est pas possible d'expliquer l'absence de baisse sur le plot de PEG.

c. Résultats sur les analyses des points d'intensité

L'analyse des intensités relatives des points lumineux a été faussée par la dérive du fond des plots de leucocine et de magainine qui ont modifié le positionnement de la sensibilité pour chaque plot et rendu impossible une interprétation précise des répartitions spatiales des intensités moyennes, ainsi que du contraste.

D'autre part, l'analyse de la taille des rayons des points d'intensité montre que les tailles des points sont réparties de manière homogène sur toute la zone.

L'analyse des points d'intensité n'a donc pas permis de tirer des conclusions supplémentaires.

d. Résultats sur les trajectoires

La suite de l'étude des interactions entre *E. coli* ATCC11775 et les PAM en surface consiste à étudier les trajectoires de la bactérie selon les zones sur laquelle elle se déplace.

L'analyse en composante principale des données obtenues a été assez peu concluante, car il n'a pas été possible de mettre en évidence une tendance aux temps d'arrêts longs sur une quelconque zone de l'image.

Dans l'expérience illustrée ici, les plots fonctionnalisés n'étaient pas positionnés en quinconce comme sur l'image Figure 4.30.c et il a fallu effectuer deux suivis cinétiques indépendants pour suivre les trajectoires bactériennes sur chaque type de plot. Deux doublets de plots sont donc représentés sur chaque image de la Figure 4.32.

Sur ces deux représentations, il n'est pas possible de distinguer un comportement spécifique sur une quelconque zone d'une des images. Les trajectoires ont des dimensions similaires, il y a un nombre équivalent de trajectoires sur chaque zone, et même les vitesses moyennes des trajectoires sont comparables.

Les trajectoires ne permettent donc pas de montrer une spécificité d'*E. coli* pour un plot de peptide particulier. Il semble donc les mécanismes d'action des différents peptides fixés en surface n'influencent pas le mouvement bactérien de manière spécifique sur l'échelle de temps étudiée.

D'autre part, les trajectoires obtenues sur ces expériences à la fréquence de 1Hz sont semblables en termes de rayon et de vitesse, aux trajectoires trouvées dans la littérature et à celles que nous avons-nous même trouvées dans les expériences

précédentes. Cela semble donc montrer qu'une fréquence d'acquisition plus faible est envisageable pour le suivi bactérien.

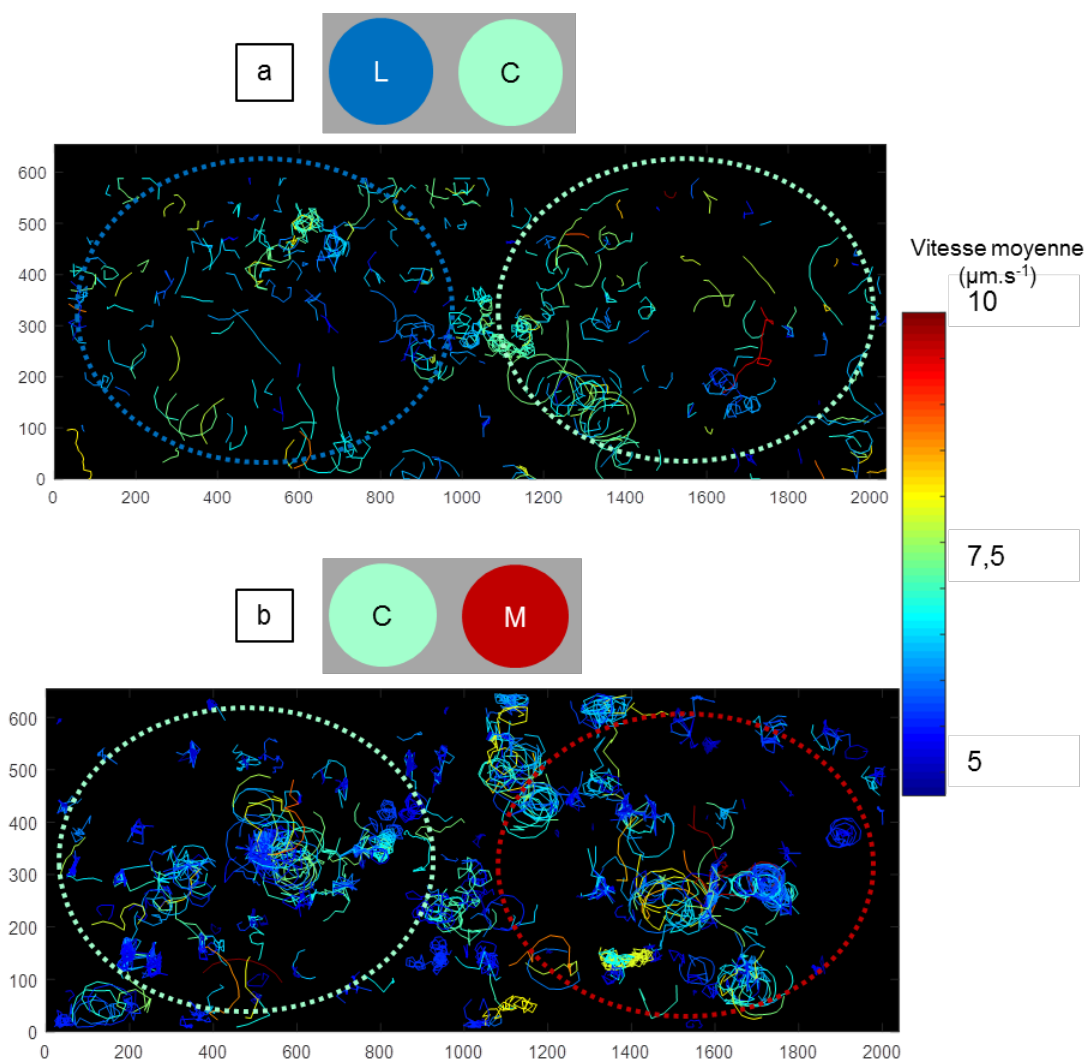


Figure 4.32 Trajectoires paramétriques d'*E. coli* ATCC 11775 en fonction de la vitesse moyenne sur différents plots de peptides après une injection à 10^2 UFC.mL⁻¹

- a. Plots de leucocine (L) et de contrôle (C)
- b. Plots de contrôle (C) et de magainine (M)

4.6 Conclusion

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés aux caractéristiques des points d'intensité détectés en SPRI SE : leurs tailles, leur répartition d'intensité, leur position géographique et leur localisation temporelle. L'analyse statistique de cette quantité de données importantes nous a menés à développer des outils de traitement et de présentation des résultats adaptés : l'ACP, la représentation paramétrique des trajectoires, et les cartes de topologies des paramètres.

Chaque point d'intensité révélant la présence d'une bactérie possède une taille et une intensité particulière qui portent des informations sur l'interaction de la bactérie avec le champ plasmon. L'étude statistique des points d'intensité nous a permis une étude qualitative des comportements d'*E. coli* et de *Listeria monocytogenes* sur des plots d'anticorps particuliers, et en particulier de montrer que les anticorps spécifiques entraînent une perturbation plus importante du champ plasmon, liée à la fois à la déformation de la morphologie bactérienne et à la plus grande proximité à la surface induite par les interactions importantes entre anticorps et antigènes.

Un point d'intensité se situe sur une image particulière et à une position géographique particulière d'un suivi en imagerie. Il est donc possible d'étudier l'évolution spatiale et temporelle des points d'intensité en réalisant un suivi des trajectoires bactériennes. L'analyse statistique de ces données a permis de montrer encore une fois un comportement spécifique différent sur plot d'anticorps spécifique, où les bactéries ont tendance à rester bloquées et arrêtées, tandis qu'elles ont une vitesse moyenne plus importante sur les anticorps non adaptés.

Plusieurs types de surfaces et de souches bactériennes ont pu être testés pour montrer l'intérêt de notre système pour l'étude des comportements bactériens. Nous avons ainsi pu caractériser les différences et les ressemblances comportementales d'*E. coli* sur différentes espèces chimiques, des anticorps et des PAM. Les résultats actuels sont encore assez préliminaires, mais fournissent des perspectives prometteuses pour la poursuite du projet tant l'analyse statistique et individuelle des événements détectés en SPRI SE sont riches en information.

5 TRAVAUX PROSPECTIFS ET PERSPECTIVES

Les résultats que nous avons présentés jusqu'ici ouvrent de nombreuses perspectives. Cette partie va être consacrée à une discussion sur les développements envisagés dans la continuité de ces travaux ainsi qu'à la présentation de certains résultats préliminaires obtenus dans ce sens.

5.1 Travaux prospectifs : étudier l'interaction entre bactéries et surfaces structurées

5.1.1 Intérêt de l'étude de surfaces structurées

Au sein de la littérature relativement fournie concernant les stratégies pour contrer la formation des biofilms, les techniques basées sur la structuration de surface ont une part importante. Dans la perspective de rendre plus générale l'utilisation de notre système pour l'étude des interactions entre bactéries et surfaces spécifiques, il nous a donc semblé pertinent de développer des techniques de structuration de surface compatibles avec notre système.

D'autre part, dans les expériences réalisées pour l'étude de l'accroche des bactéries à des surfaces fonctionnalisées chimiquement (voir chapitre 4), certains phénomènes d'hétérogénéité ont été observés. En effet, à la fois sur les expériences de détection de *Listeria monocytogenes* sur plot d'anticorps que sur les expériences sur les PAM, nous avons pu observer des cas de surpopulation locale. Deux tendances inverses apparaissent. Sur les plots d'anticorps spécifiques, un plus grand nombre de bactéries semble présent en périphérie du plot plutôt qu'en son centre. À l'inverse, sur les plots de peptide de contrôle, qui ont tendance à repousser l'accroche bactérienne, nous constatons une surpopulation d'évènements bactériens sur les limites extérieures des plots. Ces observations sont illustrées sur la Figure 5.1 où est représentée la densité cumulée d'évènements bactériens détectés par unités de surface. Les zones où ces phénomènes sont observés ont une largeur de l'ordre de 20 μm .

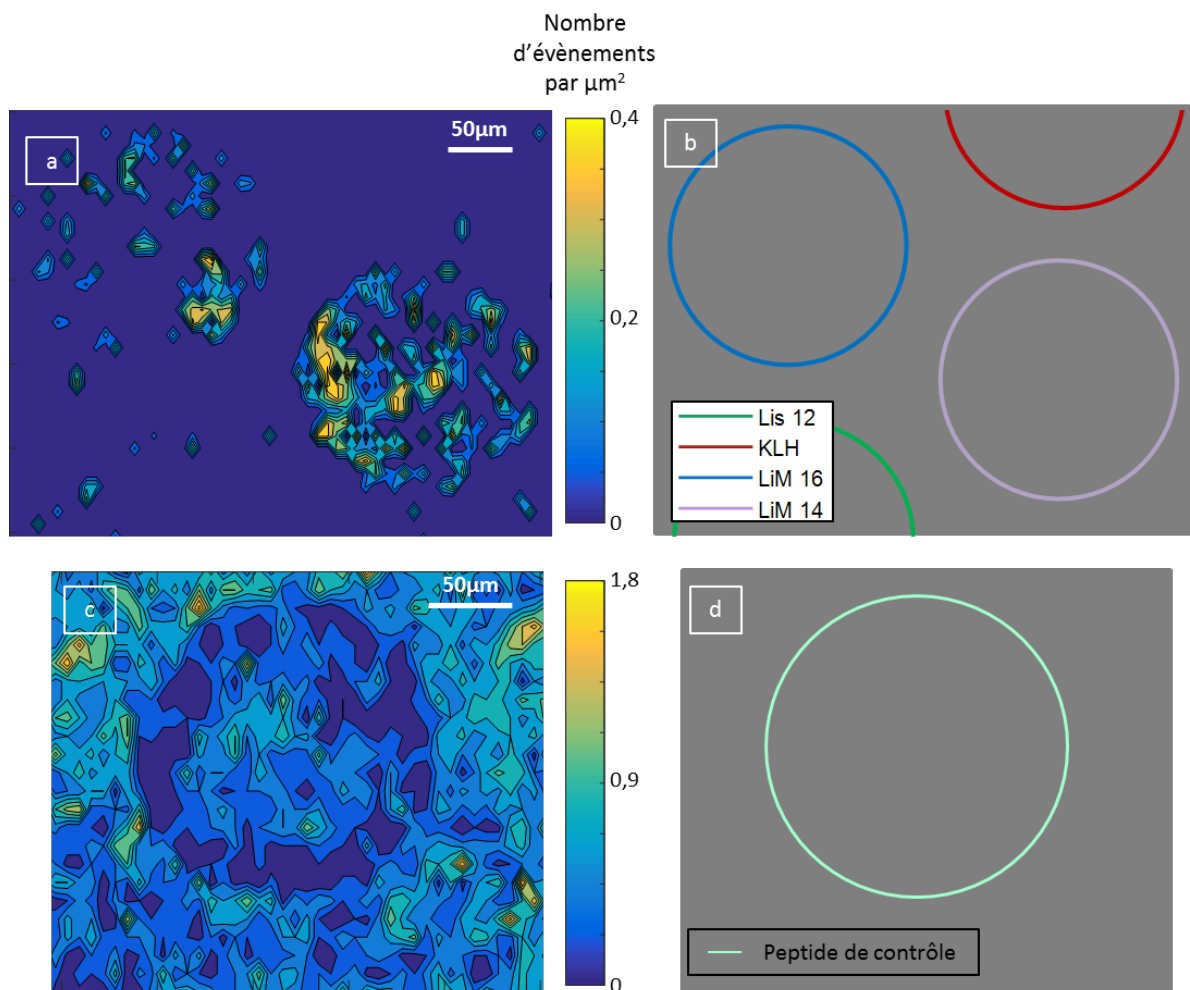


Figure 5.1 Déplétion et surpopulation localisées à la limite d'un plot observées dans des expériences variées :

- a. Répartition de la population d'évènements bactériens détectés sur les images entre $t_0+400\text{min}$ et $t_0+550\text{min}$ pour une expérience de détection de *Listeria monocytogenes* - injection à t_0 à 10^2 UCF.mL^{-2}**
- b. Schéma du champ d'observation de a.**
- c. Répartition de la population d'évènements bactériens détectés sur les images entre $t_0+45\text{min}$ et $t_0+ 3\text{h}$ pour une expérience d'étude du comportement d'*E. coli* ATCC11775 sur plots de PAM - injection à t_0 à 10^2 UCF.mL^{-2}**
- d. Schéma du champ d'observation de c.**

Ces surpopulations locales s'expliquent probablement par le fait que lorsque les bactéries se trouvent sur une surface avec laquelle elles ont peu d'affinité (ici l'or passivé pour *L. monocytogenes* pour la Figure 5.1.a et le peptide de contrôle pour *E. coli* sur la Figure 5.1.b), elles vont rester proches de la surface par interaction hydrodynamique, mais continuer d'explorer celle-ci sous l'effet du mouvement brownien. Les zones situées sur une surface ayant une bonne affinité avec les bactéries et localisées proches d'une zone de faible affinité (les bords des plots de LiM14 et LiM16 sur la Figure 5.1.a, ou l'or passivé au PEG sur la Figure 5.1.b) vont alors avoir une probabilité plus grande d'être explorées par des bactéries que les zones de même affinité mais situées loin des bords.

Ce phénomène est illustré sur la Figure 5.2 dans le cas d'un plot d'anticorps spécifiques et d'un voisinage de plot anti adhérent.

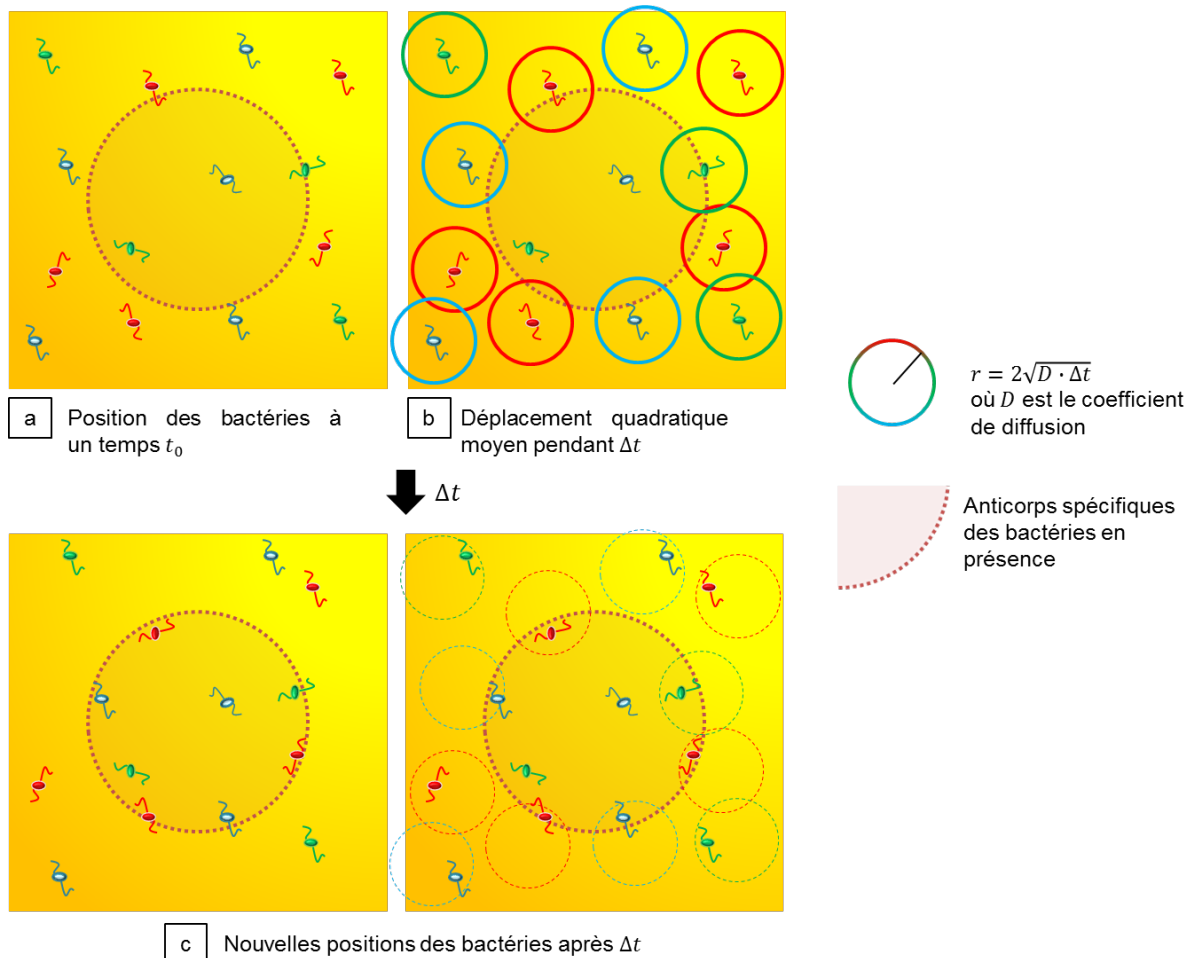


Figure 5.2 Surpopulation locale en périphérie interne des plots d'anticorps spécifiques due à la diffusion 2D en surface
a. Position initiale des individus
b. Déplacement admissible pendant Δt
c. Position des individus après Δt
 – les différentes couleurs de bactéries ont pour unique fonction de différencier plus facilement les individus

L'observation de cette surpopulation offre des perspectives intéressantes pour le développement de nouvelles surfaces permettant une détection plus rapide, en supposant que la juxtaposition d'une zone « anti-adhérentes » et d'une zone spécifique puisse permettre l'accumulation sur les zones spécifiques. Le confinement localisé pourrait améliorer la détection en limitant les surfaces où l'on recherche les accroches bactériennes, tout en gardant une surface de détection assez large, car les zones « anti-adhérentes » effectuent leur rôle de capteur de bactéries mobiles en volumes. En arrivant près des surfaces, les bactéries explorent la surface et sont détectées sur les zones spécifiques.

Nous avons donc souhaité développer des techniques de structuration de surface dans la perspective d'étudier ces phénomènes de surpopulation locale dans un premier temps. L'idée est de mettre en place un protocole de structuration possiblement utilisable

pour de nombreuses structures, mais réaliser les preuves de principes sur des structures particulières qui pourraient ici permettre d'étudier le phénomène de surpopulation locale.

5.1.2 Types de structures envisagées

Les structures référencées dans la littérature montrant une bonne capacité à empêcher la formation des biofilms ont en général une taille caractéristique entre le nanomètre et le micromètre [234]. Nous pouvons citer par exemple le dépôt de métal par faisceau d'électrons [235] qui crée des rugosités à l'échelle nanométrique, le greffage de nanoparticules d'hydroxyapatite [236], la structuration en bande à l'échelle de quelques dizaines de nanomètres [97], [237], des nids-d'abeilles nanostructurés [238], des piliers de taille inférieure au micromètre [239] ou des nanotrous [240].

À l'échelle du micromètre ou de quelques micromètres, il est possible de structurer le dépôt bactérien à l'individu prêt [241] ou de réaliser des structures contenant deux ou trois bactéries [242]. Ce type de structuration est particulièrement prometteur : des structurations à des dimensions comparables à celles d'une bactérie pourraient être envisagées afin de construire un damier de zones de détection spécifique pour permettre d'effectuer un comptage de points dont la position est prédéterminée, dans des applications de type biologie digitale. Cela pourrait également permettre d'étudier finement les interactions entre différents individus bactériens en surfaces en fonction de la distance qui les sépare.

Au-delà de quelques micromètres, les études se font plus rares, et les cas de structurations de surfaces sont effectués dans le but de structurer le dépôt de bactéries en lui-même à des échelles dépassant la dizaine de micromètres [238], [243], et allant jusqu'à 50 μm [241]. Ainsi, au-delà du micromètre, il semble que la structuration n'empêche pas l'adhésion.

Dans notre cas, certaines contraintes s'imposent pour pouvoir utiliser les échantillons réalisés dans notre système de SPRI. Tout d'abord, les substrats doivent recouvertes d'une couche d'or, afin de permettre le couplage plasmon dans des conditions compatibles avec notre montage. Ensuite, afin de permettre au plasmon de se former et de se propager, et pour faciliter la lecture des images, nous avons souhaité ne structurer la surface que dans une seule dimension, dans la direction orthogonale à la propagation du plasmon. Nous avons donc choisi de réaliser des structurations en bande, de taille variant de 10 μm à 50 μm , séparées par des interstices de même ordre de taille. Ces dimensions sont ainsi du même ordre de grandeur que le rayon de déplacement des bactéries en surfaces.

La manière habituelle d'obtenir les échantillons fonctionnalisés non structurés se réalise, rappelons-le, en deux étapes : tout d'abord une première étape consiste à effectuer les dépôts de métal (3 nm de chrome et 50 nm d'or) par évaporation (voir paragraphe 2.2.2 a). Cette étape s'effectue en salle blanche. Ensuite, l'étape de fonctionnalisation chimique

s'effectue à l'air libre et en atmosphère humide (cloche contenant une solution aqueuse saturée en sel de KNO_3).

Pour effectuer les structurations en bandes dont nous avons parlé, nous avons donc envisagé deux types de structuration, représentées sur la Figure 5.3.

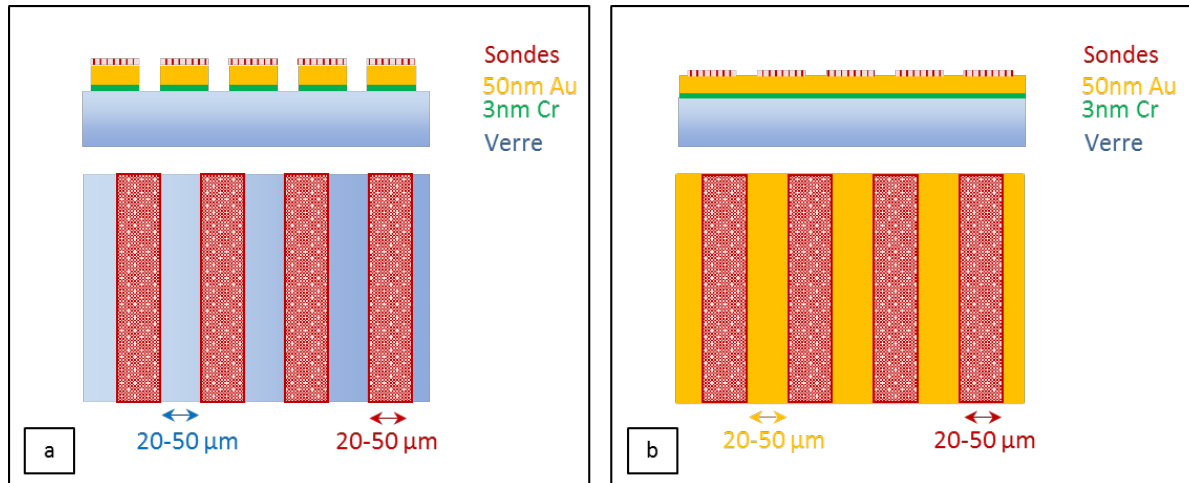


Figure 5.3 Structurations de surfaces recherchées
a. Structuration du dépôt métallique conditionnant la structuration du tapis de sonde
b. Structuration du tapis de sonde uniquement

La première technique, Figure 5.3.a consiste à structurer directement les dépôts métalliques, ce qui va structurer ensuite la fonctionnalisation chimique si celle-ci est conçue pour se fixer spécifiquement sur l'or et non sur le verre. La seconde stratégie consiste à structurer uniquement la fonctionnalisation chimique en ayant un dépôt d'or homogène, comme illustré sur la Figure 5.3.b.

Des stratégies différentes ont été mises en place pour réaliser ces deux types de fonctionnalisations.

5.1.3 Fabrication des structures

Nous allons présenter dans cette section les deux types de protocoles mis en place pour réaliser chacune des deux structures, ainsi que les tests préliminaires effectués pour s'assurer du bon déroulé de la fonctionnalisation.

a. Photolithographie : structuration du dépôt métallique

Devant la difficulté que nous avons rencontrée à mettre en place des protocoles de chimie (voir chapitre précédent, paragraphe 4.1.1 b) la première stratégie à laquelle nous nous sommes intéressés consiste à structurer directement le dépôt métallique en utilisant les techniques de photolithographie. Les techniques de photolithographie consistent à utiliser des résines thermosensibles pour transférer une image, aussi appelée masque, sur un substrat. L'utilisation de procédés optique pour réticuler la résine permet d'obtenir une bonne résolution de reproduction du masque. Les protocoles de photolithographie pour effectuer des structurations à l'échelle micrométrique s'effectuent en salle blanche.

Un procédé de photolithographie a donc été optimisé pour être utilisé sur des échantillons de verre (SF10 ou BK7) et pour donner des résultats satisfaisants à $\pm 1\mu\text{m}$ sur les structures. Le protocole est présenté sur la Figure 5.4.

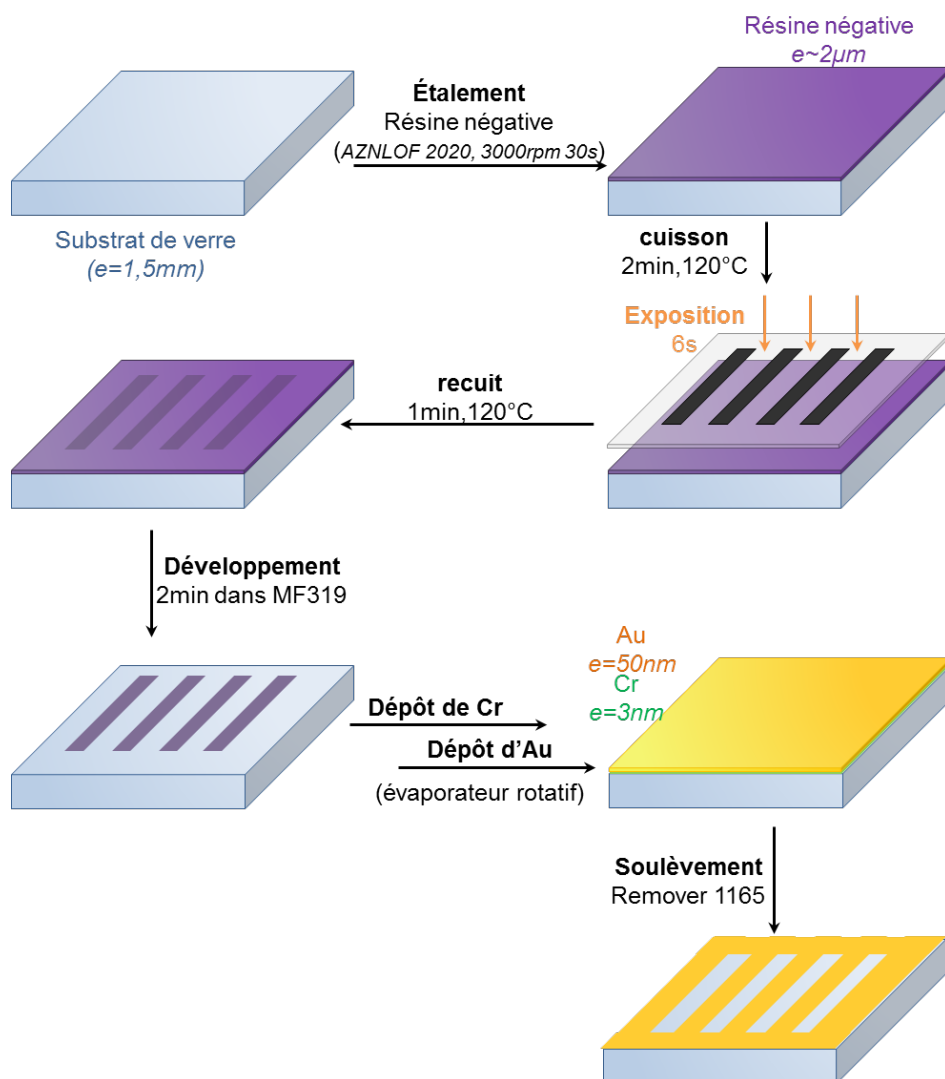


Figure 5.4 Principe du procédé de photolithographie

Un exemple de structures obtenues est présenté en Figure 5.5.

L'observation de ces structures en SPRI pose cependant des problèmes liés au contraste important entre les bandes dorées et les bandes de verres. En effet, les premières bandes ont une intensité réfléchie qui varie selon le phénomène de résonance plasmonique de surface, tandis que les bandes en verre présentent une intensité qui dépend uniquement du phénomène de réflexion totale. Nous avons donc tenté de réaliser le second type de structuration où la différence de contrastes entre deux zones est a priori plus faible car uniquement due à une différence de fonctionnalisation chimique.

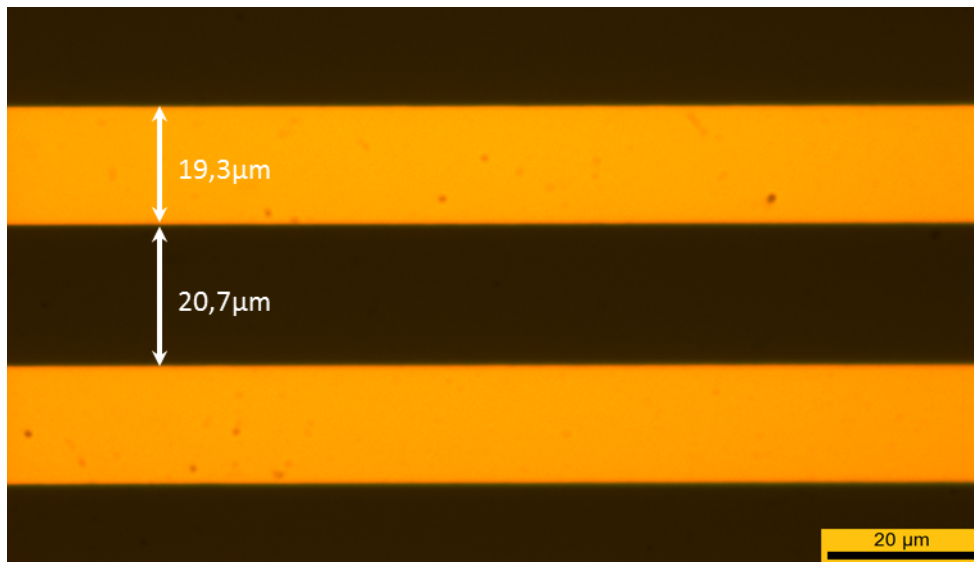


Figure 5.5 Image prise au microscope 50X de la lame d'or structurée

– *Masque utilisé : bandes de 20 μm x 5 mm séparées par des interstices de 20 μm*

b. Déprotection laser : structuration de la fonctionnalisation chimique uniquement

Une technique développée au laboratoire de Grenoble basée sur une déprotection laser a été utilisée pour effectuer une structuration de la fonctionnalisation chimique uniquement. Les travaux réalisés concernant le développement de cette technique sont en cours d'écriture pour publication.

Le principe de cette technique, résumé en Figure 5.6, se déroule en trois étapes.

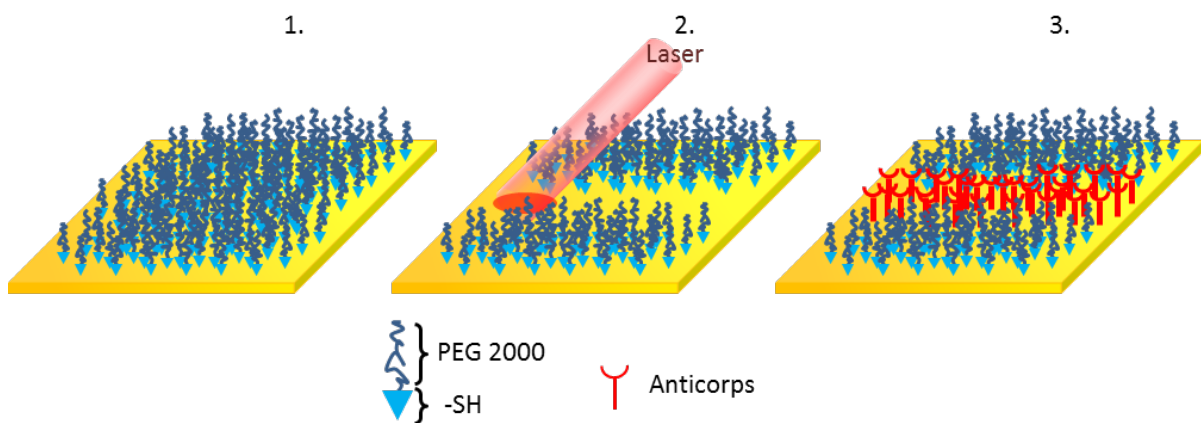


Figure 5.6 Principe de la déprotection laser

La première est de passiver entièrement la surface d'or avec une monocouche autoassemblée de polymères PEG 2000 fonctionnalisés avec un groupement thiol. La seconde étape consiste à déprotéger les zones que l'on souhaite fonctionnaliser spécifiquement en dégradant les polymères présents en surface par passage d'un laser argon (puissance maximale de 100 mW, largeur à mi-hauteur du faisceau de 3 à 5 μm, balayages multiples d'une zone de 600 μm x 300 μm pendant 30 s). Finalement, une fois

le motif dessiné au laser, la surface est recouverte de l'espèce chimique que l'on souhaite fixer, et la puce est incubée en atmosphère saturée en humidité pendant 2 h, puis rincée pour retirer l'excès de molécules.

Le motif choisi pour les tests consiste en des bandes de $50 \times 600 \mu\text{m}^2$ (Figure 5.7), séparés par des interstices de même taille. Ces motifs sont obtenus en utilisant une puissance laser de 50%. Pour former des marques de références visible en microscopie classique sur les échantillons, des lignes formées par le passage du laser avec une puissance de 100% sont également réalisées sur l'échantillon. Nous avons ainsi réalisé la fonctionnalisation de bandes d'anticorps anti *E. coli*.

Pour s'assurer de la fonctionnalisation structurée, une observation au microscope avec un marquage par un anticorps secondaire fluorescent est réalisée (Figure 5.7.b). Sur celle-ci on peut voir que la fonctionnalisation structurée est réussie, mais que les anticorps anti *E. coli* sont également présents sur les zones non déprotégées ayant été en contact avec la goutte d'anticorps. Cela signifie que les anticorps anti-*E. coli* s'accrochent également de façon non spécifique sur le PEG 2000. Les zones déprotégées par le laser, mais n'ayant pas été en contact avec les anticorps anti *E. coli*, sont également

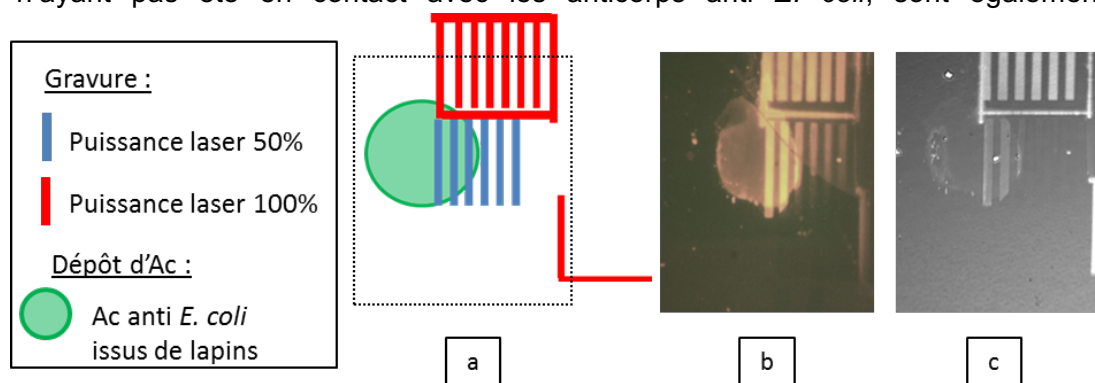


Figure 5.7 Fonctionnalisation structurée d'anticorps anti *E. coli* par déprotection laser

a. Schéma de la structuration

b. Image de microscopie de fluorescence de la zone fonctionnalisée marquée par un anticorps secondaire anti lapin

c. Image SPR des structures réalisées

fluorescentes, mais dans une moindre mesure, car les anticorps secondaires peuvent s'accrocher à l'or nu (voir chapitre 2 section 2.4.1).

L'accroche hors surface déprotégée a été attribuée à une passivation insuffisante de la surface d'or, et nous avons donc augmenté le temps d'incubation de la première étape du protocole, en la faisant passer d'une heure à toute une nuit. Cette fois, les observations en microscopie ont été satisfaisantes et les structures ont donc été testées en conditions réelles d'accroche spécifique de bactéries *E. coli*.

Nous présentons en Figure 5.8 un schéma de la seconde structuration présentée (a.) et une image SPR de celle-ci. L'image de microscopie de Nomarski des structures après incubation avec *E. coli* et rinçage montre la grande spécificité de l'accroche bactérienne aux surfaces d'intérêt.

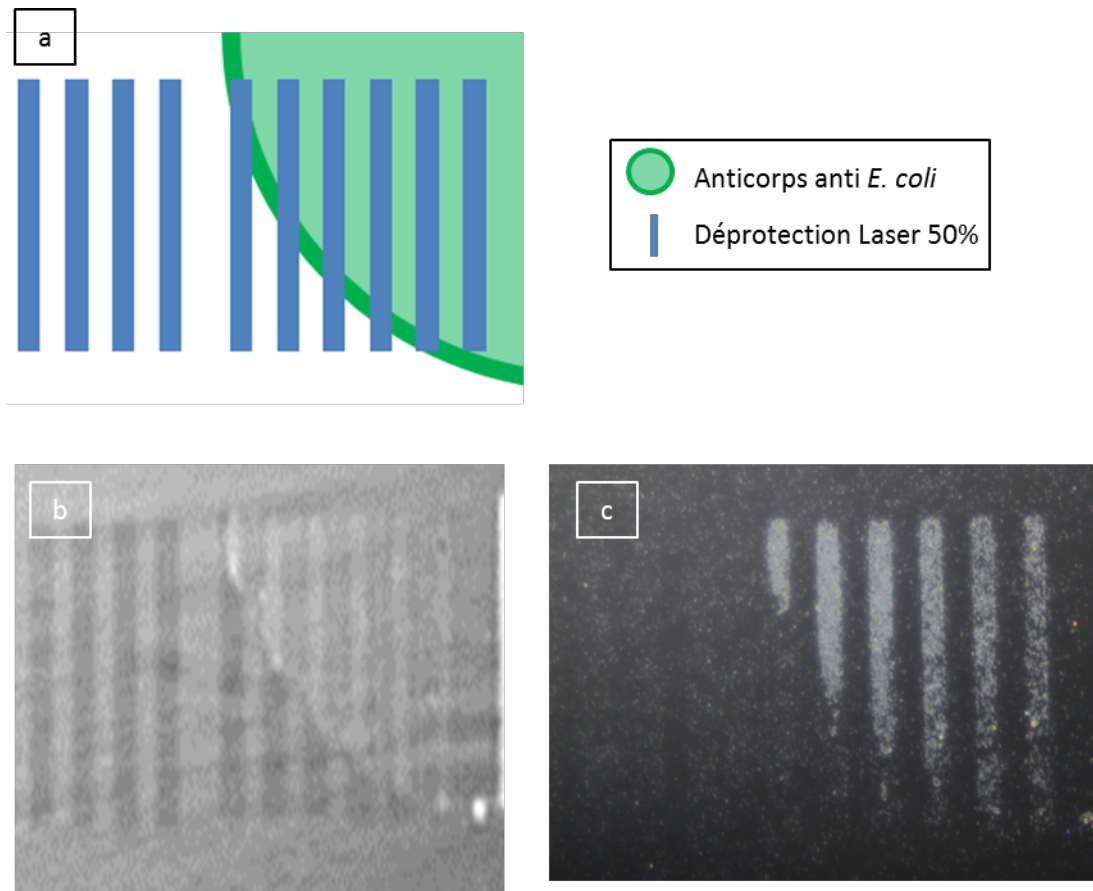


Figure 5.8 Déprotection laser de PEG 2000, adsorption d'anticorps spécifique et adhésion structurée d'*E. coli*
a. Schéma de l'échantillon
b. Image SPR de l'échantillon avant réaction
c. Image en microscopie de Nomarski après une nuit d'incubation avec *E. coli* et après rinçage

Ces structurations sont donc très prometteuses pour de futures analyses du comportement sur surface structurées.

5.2 Perspectives pour améliorer le dispositif en tant que méthode d'étude de l'interaction entre bactéries et surfaces

Les caractérisations d'interaction que nous avons pu effectuer dans le chapitre précédent concernant les comparaisons de distance à l'interface gagneraient à devenir plus quantitatives. La difficulté principale de chiffrer cette distance est que l'approche de la surface par des bactéries s'accompagne à priori par des déformations morphologiques de celles-ci et ces modifications influencent également le signal obtenu.

Une manière intéressante de quantifier la proximité à la surface indépendamment de la déformation des corps biologiques serait d'utiliser des objets non déformables, tels que des microbilles. C'est ce qu'on fait l'équipe de Li et ses collaborateurs [224] dans une

étude visant à quantifier la déformation des parois bactériennes en microscopie de fluorescence amplifiée en surface (SEF).

Comme nous l'avons évoqué plus tôt dans ce manuscrit, les techniques de microscopie amplifiées en surface ont des propriétés assez similaires à la SPRI en cela qu'elles sondent uniquement un volume d'épaisseur de quelques dizaines de nanomètres au-delà de la surface. Ceci est lié au fait que l'amplification de surface repose sur l'utilisation d'un champ évanescent.

Dans cette étude, des surfaces recouvertes de couches auto-assemblées de polymères d'épaisseurs connues sont utilisées pour étalonner le signal obtenu par la présence de microsphères fluorescentes à leur surface. Cette mesure permet de connaître l'influence de la distance à l'interface des objets sur le signal obtenu. Ensuite, une deuxième étape consiste à effectuer les mêmes expériences avec les bactéries réelles, qui sont ici différentes souches de staphylocoques dorés fluorescents, qui sont des bactéries sphériques. Les différences de signaux entre les deux types d'objets mesurés sont attribuées à la déformation des cellules et à l'influence de la sécrétion de matrice extracellulaire.

Ce type d'expérience serait très intéressant à mettre en place dans notre système, et ne nécessite à priori pas d'adaptation de montage. L'interprétation des résultats serait différente de ceux obtenus dans l'expérience que nous avons décrite, en SEF, la matrice extracellulaire n'émet à priori pas de signal fluorescent, la fluorescence est liée au corps de la bactérie. Par conséquent, la mesure indique uniquement la déformation. En revanche dans notre cas, tout matériel présent dans le champ sensible va influencer le signal. Cela n'est pas particulièrement pénalisant, il est juste nécessaire de prendre ces paramètres en compte dans l'analyse des résultats.

5.4 Perspectives pour passer d'un dispositif de laboratoire à l'expérimentation en conditions réelles

Dans le chapitre 3 sur la détection de bactéries pathogènes, nous avons montré que notre système, dans les conditions expérimentales utilisées, présentait une densité surfacique à la détection de moins de 20 bactéries par mm^2 , ce qui est très prometteur.

En revanche, les concentrations initiales les plus faibles que nous avons utilisées et détectées sont de 10^2 UFC.mL⁻², ce qui est bien loin de ce qui est requis par les normes sanitaires qui requièrent la détection d'une bactérie dans 250 mL.

Dans les conditions actuelles, nous n'avons pas pu descendre en dessous de cette concentration, car la cuve de 200 μL contient déjà seulement une vingtaine d'individus lorsque l'on injecte à cette concentration, et descendre plus bas ferait courir le risque de ne plus avoir de bactéries dans notre volume de cuve. Pour permettre des expérimentations plus réalistes, certaines modifications doivent donc être réalisées.

5.4.1 Se rapprocher du cas réel : travail en milieu complexe et en grand volume

En réalité, nous pouvons nous affranchir de la limitation en volume que nous nous sommes fixé. Si l'on souhaite développer l'aspect détecteur de notre système, il est tout à fait possible de ne plus utiliser de technique couplée d'imagerie, et d'utiliser uniquement la SPRI HR. Dans ce cas, la cuve n'a plus à être mince pour être compatible avec la microscopie de Nomarski, et il est possible de travailler avec des volumes bien plus conséquents.

Les perspectives qu'ouvre la possibilité de travailler en volumes plus grands sont nombreuses. Tout d'abord, cela permet de tester les performances du système avec des échantillons complexes réels, qui est une étape indispensable pour démontrer l'efficacité réelle de notre système pour des applications dans le diagnostic médical ou dans la sécurité alimentaire. Certes les techniques basées sur la SPR sont reconnues pour leurs bonnes performances en milieux complexes, mais nous ne pouvons pas nous affranchir de démontrer que notre système ne fait pas exception à la règle.

L'utilisation de volumes plus grands permettra également de travailler à des concentrations initiales plus faibles, ce qui rejoint l'idée du paragraphe précédent de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation.

D'autre part, en SPRI classique, certains travaux [244] ont démontré une linéarité entre le délai de détection et la concentration initiale en pathogènes. Cette linéarité permet de connaître la concentration initiale à partir du temps de détection, ce qui apporte une information supplémentaire quantitative pour le diagnostic. Dans notre cas, nous n'avons pu travailler qu'avec une gamme de concentration restreinte pour la détection de *Listeria monocytogenes*, car il n'était pas possible de descendre à des concentrations plus faibles. Il serait donc intéressant de travailler avec de plus grands volumes pour utiliser des

concentrations plus faibles afin de vérifier si de telles observations s'appliquent en SPRI optimisée en résolution.

5.4.2 Augmenter le taux de couverture spécifique de la surface

La limite actuelle du nombre de bactéries par unité de surface, d'une vingtaine de bactéries, est directement limitée par la taille des plots d'anticorps. En effet, en termes de nombre de bactéries par plots d'anticorps, la limite de détection est de 3 ou 4 bactéries par plots, en considérant un bruit de plus ou moins une bactérie sur les plots de contrôle. C'est la taille actuelle des plots qui traduit ce nombre en une densité surfacique aussi élevée.

Si l'on souhaite diminuer au maximum la limite de détection, augmenter la taille des plots et optimiser le recouvrement de la surface serait astucieux. Les applications industrielles pourraient être limitées, car l'augmentation de la taille des plots se solderait probablement par la diminution du nombre de plots différents observables simultanément, ce qui diminue les contrôles et les répliques.

Actuellement, les plots sont circulaires, ce qui permet un recouvrement maximal de la surface de 91% en condition optimale où les plots sont en contact bord à bord. Ce recouvrement n'est donc pas idéal. Il serait envisageable de réaliser des pavages plus optimaux de la surface, en imaginant des plots de formes carrées, triangulaires ou hexagonales afin de réaliser des organisations compactes en surface. A l'heure actuelle, nous ne nous sommes pas tournés vers cette solution, même si la technique de déprotection laser pourrait permettre ce genre de pavage. À l'heure actuelle cependant, la taille des surfaces à considérer et le nombre d'étapes nécessaires semble démesuré étant donné l'état du développement actuel de la technique.

5.4.3 Pour aller vers des dispositifs commerciaux

L'objectif du projet présenté dans ce manuscrit n'était pas de fabriquer des outils utilisables en routine mais de tester les limites accessibles en SPR sur la détection et l'analyse bactériennes. Néanmoins, il est pertinent de se demander quelles parties du travail pourraient être transposables et selon quelles conditions. Nous allons donc nous interroger sur les aménagements à effectuer sur notre méthodologie pour qu'elles puissent être adaptées aux exigences de l'industrie et du milieu médical.

Dans la partie sur l'évaluation des techniques de détection (1.2.2) nous avons omis ce critère, mais le coût d'achat et le prix des consommables sont en réalité des paramètres primordiaux si l'on considère la commercialisation d'une technique de détection. C'est en réalité principalement pour cette raison que les techniques standards basées sur les dénombrements sur boîtes de Pétri gélosées restent encore aujourd'hui très largement utilisés dans la plupart des milieux de contrôle sanitaire : cette méthode est très peu coûteuse et très simple à mettre en place.

Dans notre cas, plusieurs éléments coûteux pourraient être remplacés par des alternatives potentiellement moins efficaces, mais satisfaisantes.

a. Compromis sur la résolution et l'échantillonnage

Pour se mettre dans les conditions les plus favorables lors de nos expériences, nous avons utilisé deux éléments particulièrement contraignants. D'un côté nous avons mis en place un objectif de fort grossissement afin de permettre un sur-échantillonnage des taches bactériennes. Nous avons également utilisé une caméra ayant une grande dynamique (16 bits) et un faible bruit pour faciliter l'identification et l'étude dynamique des événements bactériens. Ces deux éléments ont trois inconvénients : le coût d'achat, la complexité du dispositif, et le relativement faible champ d'analyse.

Les expériences effectuées ont permis de mieux connaître les caractéristiques des signaux obtenus, il est donc maintenant possible de relâcher les contraintes technologiques pour proposer des solutions économiquement plus réalistes.

Nous avons vu dans le chapitre 2 que le signal induit par l'accroche d'une bactérie correspond à une variation de réflectivité de l'ordre de 1% à 740 nm. Par conséquent, une dynamique de caméra de 8 bits serait suffisante.

D'autre part, dans notre système, nous effectuons un sur-échantillonnage des événements bactériens, car nous avons quelques dizaines de pixels par tache bactérienne. Ce sur-échantillonnage peut être diminué pour n'obtenir que quelques pixels par tache bactérienne, comme représenté sur la Figure 5.9 page suivante. Les pixels sur les caméras ont généralement une taille autour de 4-6 μm , et les événements bactériens ont une taille de 2,7 μm par 7,9 μm ce qui signifie qu'un grossissement minimal de 2 pourrait être suffisant pour effectuer du comptage d'événements individuels.

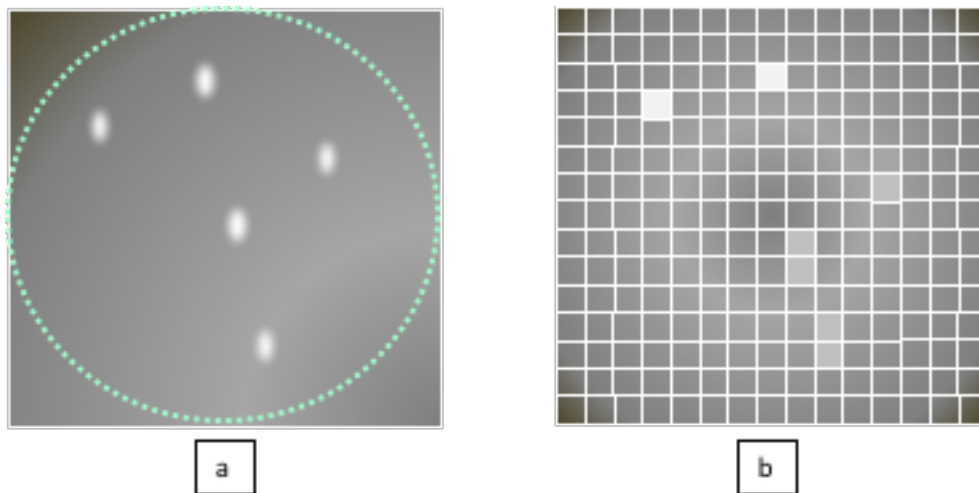


Figure 5.9 **Compromis sur la détection d'évènement : détection d'hétérogénéité**
a. Schéma d'une image SPR obtenue sur notre système
b. Schéma d'une zone équivalente obtenue avec un système proposant un compromis de détection d'inhomogénéité

b. Adapter le temps d'exposition

L'utilisation de temps d'exposition courts de quelques millisecondes pour des signaux d'intensité lumineuse relativement modérée était nécessaire pour pouvoir avoir une bonne dynamique de suivi temporel.

Mais nous avons vu que sur les plots non spécifiques, les bactéries sont plus mobiles que sur les plots spécifiques où elles semblent freinées. Une solution relativement simple pour à la fois diminuer les coûts de la caméra et pour augmenter la spécificité de détection serait donc d'augmenter les temps d'exposition du capteur et/ou de faire des sommes d'images. De cette manière, les bactéries non fixées deviendront floues et ainsi non détectables, tandis que les bactéries fixées verront leur intensité intégrée sur un temps long et resteront visibles sur le capteur.

5.4.4 Association de la SPRI HR avec d'autres techniques pour améliorer le dispositif de détection

La limitation principale du temps de détection de notre système est la probabilité pour les bactéries en présence en solution d'entrer en contact avec la surface.

Dans le projet, nous nous sommes jusqu'à maintenant cantonnés à des études sans flux, sans mécanisme actif de mélange. Toutes les expériences présentées ont consisté à injecter la solution d'intérêt, puis à laisser la suspension évoluer par sédimentation et diffusion. Cependant, comme nous l'avons en introduction, l'un des intérêts des biocapteurs SPR est qu'ils sont compatibles avec de nombreuses optimisations indépendantes de son fonctionnement, tels que l'utilisation de systèmes de fluidique ou de phénomènes de transport de matières actifs.

Parmi les techniques les plus faciles à implémenter, la première est la mise en place de flux dans la cuve. L'utilisation d'une pompe péristaltique ou de pousses seringues serait ainsi des solutions rapides à mettre en place et facilement contrôlables. Des optimisations sur la cuve pourraient alors être pertinentes pour veiller à contrôler l'homogénéité du flux [245]

De même, les systèmes de tri actif par utilisation de micropilliers pour effectuer des déplacements latéraux déterministes [80].

Un autre type de transport actif possible consiste à utiliser une différence de potentiel électrique pour concentrer les bactéries à une électrode [246]. Ici, la surface sensible étant une couche d'or, celle-ci peut également servir d'électrode. Les adaptations à mettre en place pour ce genre de systèmes est plus important que les systèmes de fluidiques, mais sont envisageables.

Les bactéries étant des objets diélectriques, des procédés de concentration par diélectrophorèse sont également envisageables et un système dual SPRI-diélectrophorèse a déjà démontré son efficacité [247]. Il pourrait être également intéressant d'implémenter un mécanisme de concentration magnétique basé sur des nanoparticules magnétiques

fonctionnalisées permettant de diriger activement des particules vers des nano-aimants [248], [249].

5.5 Bilan des avancées et des perspectives

Résultats obtenus	Limitations	Perspectives
Système d'imagerie SPR présentant une résolution de 2,7 x 7,9 μm	Champ limité	Adapter le grossissement à la taille des objets étudiées
	Cout du dispositif	Utiliser une caméra ayant une dynamique de 8bits
Caractérisation de signaux individuels de bactéries en interaction avec la surface	Variété des surfaces étudiables limitée	Mise en place d'un protocole de structuration pour permettre d'étudier des surfaces structurées
	Analyse peu quantitative	Expériences d'étalonnage avec des micro-objets indéformables
Détection précoce de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>innocua</i>	Injection à 10^2 UFC.mL ⁻¹ minimum	Augmenter le volume de la cuve
	Milieu modèle uniquement	Mise en place d'expériences en milieu complexe
	Arrivée des bactéries en surface par diffusion passive	Couplage avec d'autres techniques pour forcer les bactéries en surface
Détection à 15 bactéries par mm ²	Taille des plots limite le nombre de bactéries par plots	Pavage compact de la surface avec des plots de formes géométriques adaptées

Tableau 5.1 Bilan des perspectives en fonction des avancées principales obtenues dans le projet

CONCLUSION GENERALE

Les bactéries sont omniprésentes dans notre environnement. Il est donc fondamental de comprendre leur comportement et également nécessaire de détecter les espèces bactériennes qui nous sont dommageables. De nombreuses techniques, plus ou moins conventionnelles, existent pour répondre à ces deux enjeux. Les techniques de détection commerciales actuelles nécessitent un délai important qui peut être délétère pour le patient ou le consommateur. Pour pallier ce problème, des méthodes alternatives ont été développées, participant en particulier à l'essor des biocapteurs. Parmi ceux-ci, les techniques basées sur une transduction optique, tels que les biocapteurs SPR, sont particulièrement attrayants car ils peuvent être de petite taille, sensibles, faciles d'utilisation, versatiles, et compatibles avec de nombreuses optimisations. Au sein des méthodes d'étude du comportement bactérien proche des surfaces, les techniques d'imagerie basées sur la réflexion totale interne et l'utilisation d'un champ évanescent, comme la résonance des plasmons de surface, fournissent des informations ciblées sur les objets d'intérêt.

Dans ce projet, nous avons donc développé un système d'imagerie SPR amélioré en résolution pour des applications en microbiologie. Notre dispositif repose sur l'utilisation d'un prisme optimisé en résolution, sur le balayage mécanique du plan image par la caméra ainsi que sur la reconstruction d'images. Ces optimisations permettent d'obtenir une résolution de 2,7 μm dans le sens orthogonal à la propagation et de 7,9 μm dans le sens de propagation. Notre système d'imagerie a été couplé à un système de microscopie de Nomarski pour valider et compléter les observations. Afin de permettre l'expérimentation avec notre appareil sur une souche bactérienne de classe II en conditions de croissance, nous avons également développé une cuve transparente, étanche, régulée en température, biocompatible et de faible coût.

Dans un premier temps, ce montage nous a permis de caractériser quantitativement pour la première fois l'observation de bactéries uniques en SPRI à prisme. Nous avons pu valider notre système expérimental, concernant l'intérêt de l'observation couplée et la qualité de la croissance à l'intérieur de la cuve. Surtout, nous avons démontré la capacité de notre système à effectuer la détection précoce de *Listeria monocytogenes* en milieu modèle. Grâce à l'analyse en dénombrement d'évènements uniques, nous avons diminué la limite de détection communément obtenue en SPRI classique d'une heure voire plus selon les conditions d'injections.

En utilisant les informations sur la croissance mesurées grâce à la microscopie de Nomarski et les données de densités surfaciques de bactéries obtenues en SPRI, nous avons pu caractériser les conditions de croissance dans notre système et faire un lien entre la concentration en solution et le nombre de bactéries présentes sur un plot d'anticorps en surface.

Une analyse plus approfondie des signaux de bactéries individuelles et de leur dynamique nous a permis dans un second temps de réaliser une caractérisation des comportements d'*E. coli* et de *Listeria monocytogenes* sur des plots d'anticorps particuliers. Certaines caractéristiques notables ont pu être mises en évidence. Nous avons ainsi montré que les anticorps spécifiques, comparativement aux anticorps qui ne ciblent pas la souche étudiée, entraînent une perturbation plus importante du champ plasmon, liée à une interaction robuste entre anticorps spécifiques et antigènes en surface des bactéries. De même, ces anticorps spécifiques modifient le comportement dynamique des individus car ils forment des zones où les bactéries ont tendance à rester bloquées et arrêtées, tandis qu'elles ont une vitesse moyenne plus importante sur les anticorps non adaptés.

L'outil de SPRI optimisé en résolution, porté par les résultats que nous avons obtenus dans ce projet ouvre de nombreuses perspectives. Nous avons notamment développé des protocoles de structuration pour élargir la variété des surfaces d'interaction étudiables en SPRI (optimisée en résolution ou sur-échantillonnée)). L'objectif à terme est de caractériser les différents facteurs impliqués dans l'adhésion de bactéries à un substrat pour pouvoir les moduler.

Les travaux à venir concernent à la fois l'amélioration du système de détection et l'étalonnage de l'outil d'étude. Pour développer les performances du dispositif en tant que méthode de détection, il serait possible de travailler avec des volumes d'échantillon plus conséquents et plus complexes, de maximiser la taille de la zone spécifique, ou d'ajuster les paramètres d'acquisition. Par ailleurs, il serait souhaitable d'utiliser des procédés actifs de concentration en surface des bactéries en solution, comme l'utilisation de flux ou de diélectrophorèse.

Enfin, il serait souhaitable de rendre plus quantitatives les analyses concernant les distances entre individus et interface, et la déformation des cellules. Des expériences avec des micro-objets non déformables et des tapis de polymères de tailles connues pourraient servir d'expérience étalon pour permettre de quantifier la séparation et la modification morphologique.

Les méthodologies développées dans ce manuscrit complètent l'arsenal des techniques d'étude des bactéries. Les preuves de concept, allant de l'identification rapide de bactérie à l'analyse quantitative des interactions entre bactéries et surfaces, en passant par l'analyse de la dynamique de ces interactions, ouvrent de nombreuses perspectives. Dans le domaine de l'étude des modulations de comportements des bactéries proches des surfaces, il serait notamment pertinent d'enrichir les études par la structuration de la surface étudiée. La généralisation de notre technique pour l'étude de situations d'interactions variées donne de bons espoirs pour la continuation du projet.

ANNEXES

Annexe 1 : Aspects diffusifs dans l'accroche bactérienne

Mouvement brownien :

Température	Viscosité de l'eau	Rayon d'un plot	Temps de doublement	Concentration initiale	Longueur d'une bactérie	Largeur d'une bactérie
37°C	$1,0 \cdot 10^{-3}$ Pa.s	220 μm	30 min	1 cfu/mL	2 μm	0,5 μm

Tableau A. 1 Valeurs pertinentes pour l'évaluation de l'effet du mouvement brownien sur l'accroche bactérienne à un spot d'anticorps

La valeur de D est obtenue par la formule de Berg [250] : $D = \frac{kT}{6\pi\eta a_b} \ln\left(\frac{2a_b}{b_b}\right) = 6,3 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

Étant donné le temps de doublement de population, on obtient une expression de la concentration en solution en fonction du temps : $C(t) = C_0 e^{kt}$ avec $k = \frac{\ln 2}{1800}$ où t exprimé en seconde et C_0 la concentration bactérienne initiale.

Pour la marche aléatoire en trois dimensions, le déplacement quadratique moyen est exprimé selon : $\langle X^2 \rangle = 6Dt$. Cela signifie que statistiquement, toutes les bactéries qui se situent à une distance inférieure ou égale à $\sqrt{6Dt}$ de la surface vont toucher la surface, et y rester si la surface est spécifiquement traitée. Le nombre de bactéries ayant atteint la surface après un temps t s'exprime donc : $N(t) = C_0 S e^{kt} \sqrt{6Dt}$

Temps en h depuis injection	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de bactéries par plot de rayon 220 μm	0	0	0	0	0	0	0,03	0,66	2,84

Tableau A. 2 de rayon 220 μm par mouvement brownien en fonction du délai depuis injection et pour une concentration initiale de 1 cfu/mL

L'étude analytique de cette équation (**Erreur ! Nous n'avons pas trouvé la source du renvoi.**), avec une concentration initiale de 1 bactérie/mL donne comme résultats qu'il faut *plus de 7 h* pour avoir au moins une bactérie en surface.

Si on considère des bactéries mobiles, possédant des flagelles, le coefficient de diffusion est bien plus élevé ($1,1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [251]) et on obtient ainsi 48 fois plus de bactéries par plot que dans le cas du mouvement brownien simple, ce qui induit qu'il faut *moins de 6h* pour avoir au moins un bactérie en surface

Gravité

Viscosité de l'eau	Rayon d'un plot	Temps de doublement	Concentration initiale	Rayon d'une bactérie	Masse volumique de l'eau	Masse volumique d'une bactérie
$1,0 \cdot 10^{-3}$ Pa.s	220 μm	30 min	1 cfu/mL	1 μm	$1,0 \cdot 10^3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$	$1,3 \cdot 10^3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$

Tableau A. 3 Valeurs pertinentes pour l'évaluation de l'influence de la gravité sur l'accroche bactérienne à un spot d'anticorps

Si on prend en compte l'effet de la gravité uniquement, on calcule une vitesse de sédimentation en régime stationnaire, dû à l'équilibre entre les forces de frottement fluide

et le poids d'une bactérie. On obtient : $v = \frac{4}{3}r^2 \frac{(\rho_b - \rho_s)}{\eta} g$. Le nombre de bactéries ayant atteint la surface après un temps t s'exprime donc : $N(t) = C(t) \times S \times vt$.

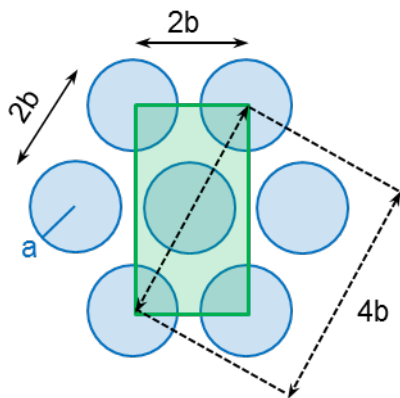
Temps en h depuis injection	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre de bactéries par plot de rayon 220 μ m	0	0	0,06	0,4	2,2	11,0	52,8	246,3	1126,2

Tableau A. 4 Effet de la diffusion - Nombre de bactéries atteignant un plot de rayon 220 μ m par mouvement brownien en fonction du délai depuis injection et pour une concentration initiale de 1 cfu/mL

L'étude analytique de cette équation, avec une concentration initiale de 1 bactérie/mL, montre qu'il faut moins de 5 h pour qu'au moins une bactérie atteigne la surface d'un plot.

La sédimentation est donc le phénomène prépondérant pour la capacité des bactéries à atteindre la surface du biocapteur.

Annexe 2 : Taux de couverture de la surface par des plots circulaires ordonnés



$$S_{rect} = 2b * 2\sqrt{3}b$$

$$S_{plots \text{ dans rectangle}} = \pi a^2 + 4 \left[\frac{1}{4} \cdot \pi a^2 \right]$$

$$\%_{recouvrement} = \frac{S_{plots \text{ dans rectangle}}}{S_{rect}}$$

$$= \frac{2\pi a^2}{4\sqrt{3}b^2}$$

$$\%_{recouvrement} \approx \frac{a^2}{b^2} \cdot 90\%$$

Figure A. 1 Calcul du pourcentage de recouvrement de la surface par des plots répartis de manière optimale

BIBLIOGRAPHIE

- [1] « SPRi - OpenPleX - HORIBA ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.horiba.com/en_en/products/detail/action/show/Product/spri-openplex-1543/. [Consulté le: 21-déc-2018].
- [2] L. Laplatine, « Spatial resolution of prism-based surface plasmon resonance microscopy », 2014.
- [3] RAISIN, « Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, France, mai-juin 2012. Résultats », 2013.
- [4] Ifremer, « Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) - Evolution des déclarations », 2013.
- [5] C. Lietard, B. Lejeune, M. Rothan-Tondeur, M. H. Metzger, J. M. Thiolet, et B. Coignard, « Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales. Résultats dans la population des sujets de 65 ans et plus, France, 2006 », *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, n° 31-32, p. 344-348, 2009.
- [6] E. Scallan *et al.*, « Foodborne Illness Acquired in the United States — Major Pathogens », *Emerging Infectious Diseases journal*, vol. 17, n° 1, p. 1-21, 2011.
- [7] H. Raether, *Surface Plasmon on smooth and rough surfaces and on grating*, Springer. Berlin, 1988.
- [8] Prestodiag, « Informations about the detection kits comercialized by Prestodiag© », *SalmoPrestoPE*, 2016. .
- [9] L. Laplatine *et al.*, « Spatial resolution in prism-based surface plasmon resonance microscopy », *Optics Express*, vol. Vol. 22, n° 19, p. 22771-22785, 2014.
- [10] V. Chabot, Y. Miron, M. Grandbois, et P. G. Charette, « Long range surface plasmon resonance for increased sensitivity in living cell biosensing through greater probing depth », *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2012.

- [11] A. W. Peterson, M. Halter, A. Tona, et A. L. Plant, « High resolution surface plasmon resonance imaging for single cells », *BMC Cell Biology*, vol. 15, n° 35, p. 1–14, 2014.
- [12] W. B. Whitman, D. C. Coleman, et W. J. Wiebe, « Prokaryotes: The unseen majority », *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 95, n° 12, p. 6578, juin 1998.
- [13] J. C. Venter *et al.*, « Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea », *Science*, vol. 304, n° 5667, p. 66, avr. 2004.
- [14] N. Fierer et R. B. Jackson, « The diversity and biogeography of soil bacterial communities », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, n° 3, p. 626, janv. 2006.
- [15] J. Verran, R. L. Taylor, et G. C. Lees, « Bacterial adhesion to inert thermoplastic surfaces », *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 7, n° 10, p. 597–601, 1996.
- [16] V. Torsvik, L. Øvreås, et T. F. Thingstad, « Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors », *Science*, vol. 296, n° 5570, p. 1064, mai 2002.
- [17] M. Hill, « Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis », *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, vol. 6 Suppl 1, p. S43-5, mars 1997.
- [18] M. J. Albert, V. I. Mathan, et S. J. Baker, « Vitamin B12 synthesis by human small intestinal bacteria », *Nature*, vol. 283, p. 781, févr. 1980.
- [19] T. D. Luckey, « Introduction to intestinal microecology », *Am J Clin Nutr*, vol. 25, n° 12, p. 1292-1294, déc. 1972.
- [20] L. A. Mermel *et al.*, « Guidelines for the Management of Intravascular Catheter-Related Infections », *Infection Control & Hospital Epidemiology*, vol. 22, n° 4, p. 222-242, 2001.
- [21] « Infections nosocomiales », *Inserm - La science pour la santé*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales>. [Consulté le: 11-déc-2018].

- [22] RAISIN et INVS, « Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, France, mai-juin 2012. Résultats », 2013.
- [23] A. Al-Ahmad *et al.*, « In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials », *Archives of Oral Biology*, vol. 58, n° 9, p. 1139-1147, sept. 2013.
- [24] M. M. Tunney, G. Ramage, S. Patrick, J. R. Nixon, P. G. Murphy, et S. P. Gorman, « Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Orthopedic Implants following Revision Hip Surgery », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, n° 11, p. 3002, nov. 1998.
- [25] C. Wagner, S. Aytac, et G. M. Hänsch, « Biofilm Growth on Implants: Bacteria Prefer Plasma Coats », *The International Journal of Artificial Organs*, vol. 34, n° 9, p. 811-817, sept. 2011.
- [26] G. K. Adak, S. M. Meakins, H. Yip, B. A. Lopman, et S. J. O'Brien, « Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000 », *Emerging Infect. Dis.*, vol. 11, n° 3, p. 365-372, mars 2005.
- [27] M. D. Kirk *et al.*, « Foodborne Disease in Australia : The OzFoodNet Experience », *Clinical Infectious Diseases: Oxford Journals*, vol. 47, n° 3, p. 392 – 400, 2008.
- [28] E. C. D. Todd, « Costs of acute bacterial foodborne disease in Canada and the United States », *International Journal of Food Microbiology*, vol. 9, n° 4, p. 313-326, déc. 1989.
- [29] W. G. Scott, H. M. Scott, R. J. Lake, et M. G. Baker, « Economic cost to New Zealand of foodborne infectious disease », *The New Zealand Medical Journal*, vol. 113, n° 1113, p. 281 – 284, 2000.
- [30] M. W. Hahn *et al.*, « Isolation of Novel Ultramicrobacteria Classified as Actinobacteria from Five Freshwater Habitats in Europe and Asia », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, n° 3, p. 1442, mars 2003.

- [31] « Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “Cronobacter spp.” - avril 2011 | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-cronobacter-spp-0>. [Consulté le: 26-sept-2018].
- [32] ANSES, *Fiche de description des dangers biologiques transmissibles par les aliments / Listeria monocytogenes*. ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation), 2011.
- [33] R. H. Orsi et M. Wiedmann, « Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009 », *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, n° 12, p. 5273-5287, juin 2016.
- [34] « Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/les-escherichia-coli-ent%C3%A9roh%C3%A9morragiques-ehec>. [Consulté le: 26-sept-2018].
- [35] American Society for Microbiology., A. S. for Microbiology, D. H. Bergey, et R. S. Breed, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th ed. Baltimore, : Williams & Wilkins Co., 1957.
- [36] « Gélose Mac Conkey - Milieux de culture - Milieux de culture bactério. - Dominique DUTSCHER - Matériel de laboratoire ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.dutscher.com/frontoffice/product?produitId=0ZAGA-01-55>. [Consulté le: 07-janv-2019].
- [37] « Milieu chromogénique pour la détection d'E.coli O157:H7 », *bioMérieux France*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/microbiologie-industrielle/agroalimentaire/milieu-chromogenique-pour-la-detection-decoli-o157h7>. [Consulté le: 11-déc-2018].
- [38] G. J. Hucker et H. J. Conn, « METHODS OF GRAM STAINING », *New York Agricultural Experiment Station*, n° 93, p. 38, 1923.

- [39] G. O. Aspinall, M. A. Monteiro, H. Pang, E. J. Walsh, et A. P. Moran, « Lipopolysaccharide of the *Helicobacter pylori* Type Strain NCTC 11637 (ATCC 43504): Structure of the O Antigen Chain and Core Oligosaccharide Regions », *Biochemistry*, vol. 35, n° 7, p. 2489-2497, janv. 1996.
- [40] R. Prager, U. Strutz, A. Fruth, et H. Tschape, « Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus fliC polymorphisms », *International journal of medical microbiology*, vol. 292, n° 7/8, p. 477, 2003.
- [41] C. Fraser, W. P. Hanage, et B. G. Spratt, « Recombination and the Nature of Bacterial Speciation », *Science*, vol. 315, n° 5811, p. 476, janv. 2007.
- [42] C. Buchrieser, C. Rusniok, The Listeria Consortium, F. Kunst, P. Cossart, et P. Glaser, « Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity », *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 35, n° 3, p. 207-213, avr. 2003.
- [43] « Code du travail - Article R4421-3 | Legifrance ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072050&idArticle=LEGIARTI000018490790&dateTexte=&categorieLien=cid>. [Consulté le: 07-janv-2019].
- [44] M. Godin *et al.*, « Using buoyant mass to measure the growth of single cells », *Nature Methods*, vol. 7, p. 387, avr. 2010.
- [45] « *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers ATCC ® 11775&tra ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/11775.aspx?geo_country=fr. [Consulté le: 11-déc-2018].
- [46] K. P. Lemon, D. E. Higgins, et R. Kolter, « Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation », *Journal of bacteriology*, vol. 189, n° 12, p. 4418-4424, juin 2007.
- [47] J. M. Farber et P. I. Peterkin, « *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen », *Microbiological reviews*, vol. 55, n° 3, p. 476-511, sept. 1991.

- [48] S. Kathariou, C. Mizumoto, R. Kanenaka, R. D. Allen, et A. K. Fok, « Repression of motility and flagellin production at 37 °C is stronger in *Listeria monocytogenes* than in the nonpathogenic species *Listeria innocua* », *Can. J. Microbiol.*, vol. 41, n° 7, p. 572-577, juill. 1995.
- [49] K.-M. Lee, M. Runyon, T. J. Herrman, R. Phillips, et J. Hsieh, « Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety », *Food Control*, vol. 47, p. 264-276, janv. 2015.
- [50] F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, et G. Palleschi, « A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis », *Analytica Chimica Acta*, vol. 605, n° 2, p. 111-129, déc. 2007.
- [51] H. Sharma et R. Mutharasan, « Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 183, p. 535-549, juill. 2013.
- [52] N. Durán et P. D. Marcato, « Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review », *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 48, n° 6, p. 1127-1134, déc. 2012.
- [53] J. L. Young et D. E. Soper, « Urinalysis and Urinary Tract Infection: Update for Clinicians », *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2001. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/idog/2001/151546/abs/>. [Consulté le: 11-déc-2018].
- [54] J. A. Simerville, W. C. Maxted, et J. J. Pahira, « Urinalysis: A Comprehensive Review », *AFP*, vol. 71, n° 6, p. 1153-1162, mars 2005.
- [55] A. L. Flores-Mireles, J. N. Walker, M. Caparon, et S. J. Hultgren, « Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options », *Nature reviews. Microbiology*, vol. 13, n° 5, p. 269-284, mai 2015.
- [56] S. Artault, J. L. Blind, J. Delaval, Y. Dureau, et N. Gaillard, « Detecting *Listeria monocytogenes* in food », *International Food Hygiene*, vol. 12, p. 23, 2001.

- [57] V. I. Trukhachev, O. V. Sycheva, N. Z. Zlydnev, et P. N. Mitkalov, « Milking technology and milk quality », *Russian Agricultural Sciences*, vol. 34, n° 5, p. 348-349, oct. 2008.
- [58] « DENDRIDIAG® UPW », *GL Biocontrol*. .
- [59] J. A. Hudson, R. J. Lake, M. G. Savill, P. Scholes, et R. E. McCormick, « Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction », *Journal of Applied Microbiology*, vol. 90, n° 4, p. 614-621, déc. 2001.
- [60] K. Hibi *et al.*, « Combination of immunomagnetic separation with flow cytometry for detection of *Listeria monocytogenes* », *Analytica Chimica Acta*, vol. 573-574, p. 158–163, 2006.
- [61] C. G. Leon-Velarde, L. Zosherafatein, et J. A. Odumeru, « Application of an automated immunomagnetic separation-enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* from poultry environmental swabs », *Journal of Microbiological Methods*, 2009.
- [62] L. G. Goeller et M. R. Riley, « Discrimination of Bacteria and Bacteriophages by Raman Spectroscopy and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy », *Applied Spectroscopy*, vol. 61, n° 7, p. 679-685, 2007.
- [63] J.-W. Choi, Y.-K. Kim, et B.-K. Oh, « The development of protein chip using protein G for the simultaneous detection of various pathogens », *Ultramicroscopy*, 2008.
- [64] A. Touron, T. Berthe, B. Pawlak, et F. Petit, « Detection of *Salmonella* in environmental water and sediment by a nested-multiplex polymerase chain reaction assay », *Research in Microbiology*, 2005.
- [65] G. M. Matar, P. S. Hayes, W. F. Bibb, et B. Swaminathan, « Listeriolysin O-Based Latex Agglutination Test for the Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods ».

- [66] P. T. Feldsine, A. H. Lienau, R. L. Forgey, et R. D. Calhoun, « Visual immunoprecipitate assay (VIP) for *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* species detection in selected foods: collaborative study. », *Journal of AOAC International*, vol. 80, n° 4, p. 791-805, 1997.
- [67] S. Perelle, F. Dilasser, B. Malorny, J. Grout, J. Hoorfar, et P. Fach, « Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples », *Molecular and Cellular Probes*, vol. 18, n° 6, p. 409–420, 2004.
- [68] K. A. Stevens et L.-A. Jaykus, « Bacterial Separation and Concentration from Complex Sample Matrices: A Review », *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 30, n° 1, p. 7-24, janv. 2004.
- [69] L. C. Clarck et C. Lyons, « Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery », *Annals of the New York Academy of sciences*, vol. 192, n° 1, p. 29-45, 1962.
- [70] V. Templier, A. Roux, Y. Roupioz, et T. Livache, « Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors : A review », *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 79, p. 71-79, 2016.
- [71] I. Palchetti et M. Mascini, « Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection », *Anal Bioanal Chem*, vol. 391, n° 2, p. 455-471, mai 2008.
- [72] O. Lazcka, F. J. D. Campo, et F. X. Muñoz, « Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, n° 7, p. 1205-1217, févr. 2007.
- [73] E. Howe et G. Harding, « A comparison of protocols for the optimisation of detection of bacteria using a surface acoustic wave (SAW) biosensor », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 15, p. 641–649, 2000.

- [74] G. A. Campbell, J. Uknalis, S.-I. Tu, et R. Mutharasan, « Detect of Escherichia coli O157:H7 in ground beef samples using piezoelectric excited millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, n° 7, p. 1296-1302, févr. 2007.
- [75] G. A. Campbell et R. Mutharasan, « Detection of pathogen Escherichia coli O157:H7 using self-excited PZT-glass microcantilevers », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, n° 3, p. 462-473, sept. 2005.
- [76] B. L. Weeks, J. Camarero, A. Noy, A. E. Miller, J. J. D. Yoreo, et L. Stanker, « A microcantilever-based pathogen detector », *Scanning*, vol. 25, n° 6, p. 297-299, nov. 2003.
- [77] D. MARALDO et R. MUTHARASAN, « 10-Minute Assay for Detecting Escherichia coli O157:H7 in Ground Beef Samples Using Piezoelectric-Excited Millimeter-Size Cantilever Sensors », *Journal of Food Protection*, vol. 70, n° 7, p. 1670-1677, juill. 2007.
- [78] M. Varshney, Y. Li, B. Srinivasan, et S. Tung, « A label-free , microfluidics and interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor in combination with nanoparticles immunoseparation for detection of Escherichia coli O157 : H7 in food samples », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 128, p. 99–107, 2007.
- [79] D. A. Boehm, P. A. Gottlieb, et S. Z. Hua, « On-chip microfluidic biosensor for bacterial detection and identification », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 126, n° 2, p. 508-514, oct. 2007.
- [80] E. Pariset *et al.*, « Separation of Biological Particles in a Modular Platform of Cascaded Deterministic Lateral Displacement Modules », *Scientific Reports*, vol. 8, n° 1, p. 17762, déc. 2018.
- [81] D. Puchberger-Enengl, S. Podszun, H. Heinz, C. Hermann, P. Vulto, et G. A. Urban, « Microfluidic concentration of bacteria by on-chip electrophoresis », *Biomicrofluidics*, vol. 5, n° 4, p. 044111-044111-10, déc. 2011.

- [82] W. M. Hassen, H. Sanyal, M. Hammood, K. Moumanis, E. H. Frost, et J. J. Dubowski, « Chemotaxis for enhanced immobilization of *Escherichia coli* and *Legionella pneumophila* on biofunctionalized surfaces of GaAs », *Biointerphases*, vol. 11, n° 2, 2016.
- [83] V. Templier, A. Roux, Y. Roupioz, et T. Livache, « Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 79, p. 71-79, mai 2016.
- [84] Y. Jung, J. Young Jeong, et B. Hyun Chung, « Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports », *Analyst*, vol. 133, n° 6, p. 697-701, 2008.
- [85] A. K. Trilling, J. Beekwilder, et H. Zuilhof, « Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview », *Analyst*, vol. 138, n° 6, p. 1619-1627, 2013.
- [86] B. Byrne, E. Stack, N. Gilmartin, et R. O'Kennedy, « Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins », *Sensors*, vol. 9, n° 6, p. 4407-4445, 2009.
- [87] J. B. Fasoli et R. M. Corn, « Surface Enzyme Chemistries for Ultrasensitive Microarray Biosensing with SPR Imaging », *Langmuir*, vol. 31, n° 35, p. 9527-9536, sept. 2015.
- [88] C.-J. Huang, J. Dostalek, A. Sessitsch, et W. Knoll, « Long-Range Surface Plasmon-Enhanced Fluorescence Spectroscopy Biosensor for Ultrasensitive Detection of *E. coli* O157:H7 », *Anal. Chem.*, vol. 83, n° 3, p. 674-677, févr. 2011.
- [89] Y. Wang, W. Knoll, et J. Dostalek, « Bacterial Pathogen Surface Plasmon Resonance Biosensor Advanced by Long Range Surface Plasmons and Magnetic Nanoparticle Assays », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 19, p. 8345-8350, oct. 2012.
- [90] H. J. Lee, A. W. Wark, et R. M. Corn, « Creating Advanced Multifunctional Biosensors with Surface Enzymatic Transformations », *Langmuir*, vol. 22, n° 12, p. 5241-5250, juin 2006.

- [91] E. Karunakaran, J. Mukherjee, B. Ramalingam, et C. A. Biggs, « “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms », *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 90, n° 6, p. 1869-1881, juin 2011.
- [92] F. Ahimou, M. J. Semmens, G. Haugstad, et P. J. Novak, « Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness », *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, n° 9, p. 2905-2910, mai 2007.
- [93] R. Singh, D. Paul, et R. K. Jain, « Biofilms: implications in bioremediation », *Trends in Microbiology*, vol. 14, n° 9, p. 389-397, sept. 2006.
- [94] T. Mattila-sandholm et G. Wirtanen, « Biofilm formation in the industry: A review », *Food Reviews International*, vol. 84, p. 573–603, 1992.
- [95] G. Cheng, Z. Zhang, S. Chen, J. D. Bryers, et S. Jiang, « Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces », *Biomaterials*, vol. 28, n° 29, p. 4192-4199, oct. 2007.
- [96] J. Palmer, S. Flint, et J. Brooks, « Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm », *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 34, n° 9, p. 577-588, sept. 2007.
- [97] C. Díaz, P. L. Schilardi, R. C. Salvarezza, et M. F. L. De Mele, « Nano/microscale order affects the early stages of biofilm formation on metal surfaces », *Langmuir*, vol. 23, n° 22, p. 11206–11210, 2007.
- [98] H. Gu et D. Ren, « Materials and surface engineering to control bacterial adhesion and biofilm formation: A review of recent advances », *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, vol. 8, n° 1, p. 20–33, mars 2014.
- [99] L. Ploux, S. Beckendorff, M. Nardin, et S. Neunlist, « Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 57, n° 2, p. 174–181, 2007.
- [100] K. M. Yeater *et al.*, « Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development », *Microbiology*, vol. 153, n° 8, p. 2373-2385, 2007.

- [101] H. Gu, S. Hou, C. Yongyat, S. De Tore, et D. Ren, « Patterned Biofilm Formation Reveals a Mechanism for Structural Heterogeneity in Bacterial Biofilms », *Langmuir*, vol. 29, n° 35, p. 11145-11153, sept. 2013.
- [102] C. Dorel, O. Vidal, C. Prigent-Combaret, I. Vallet, et P. Lejeune, « Involvement of the Cpx signal transduction pathway of E. coli in biofilm formation », *FEMS Microbiology Letters*, vol. 178, n° 1, p. 169-175, sept. 1999.
- [103] C. Prigent-Combaret, O. Vidal, C. Dorel, et P. Lejeune, « Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in Escherichia coli. », *Journal of bacteriology*, vol. 181, n° 19, p. 5993–6002, oct. 1999.
- [104] C. Prigent-Combaret *et al.*, « Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in Escherichia coli via Regulation of the csgD Gene », *J. Bacteriol.*, vol. 183, n° 24, p. 7213-7223, déc. 2001.
- [105] J. C. Conrad *et al.*, « Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in P. aeruginosa », *Biophysical Journal*, 2011.
- [106] R. S. Friedlander, H. Vlamakis, P. Kim, M. Khan, R. Kolter, et J. Aizenberg, « Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, n° 14, p. 5624–9, avr. 2013.
- [107] A. J. de Kerchove et M. Elimelech, « Impact of Alginate Conditioning Film on Deposition Kinetics of Motile and Nonmotile Pseudomonas aeruginosa Strains », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, n° 16, p. 5227-5234, août 2007.
- [108] D. G. Davies et G. G. Geesey, « Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in Pseudomonas aeruginosa during biofilm development in continuous culture. », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, n° 3, p. 860, mars 1995.
- [109] J. Elgeti et G. Gompper, « Microswimmers near surfaces », *The European Physical Journal Special Topics*, vol. 225, n° 11-12, p. 2333–2352, nov. 2016.

- [110] G. Li et J. X. Tang, « Accumulation of microswimmers near a surface mediated by collision and rotational Brownian motion », *Physical Review Letters*, 2009.
- [111] G. Li *et al.*, « Accumulation of swimming bacteria near a solid surface », *Physical Review E*, vol. 84, n° 4, oct. 2011.
- [112] P. Sartori *et al.*, « Wall accumulation of bacteria with different motility patterns », *Phys. Rev. E*, vol. 97, n° 2, p. 022610, févr. 2018.
- [113] M. Fletcher, « The Application of Interference Reflection Microscopy to the Study of Bacterial Adhesion to Solid Surfaces », in *Biodeterioration 7*, D. R. Houghton, R. N. Smith, et H. O. W. Egging, Éd. Dordrecht: Springer Netherlands, 1988, p. 31-35.
- [114] P. A. Marshall, « Response of Microbial Adhesives and Biofilm Matrix Polymers to Chemical Treatments as Determined by Interference Reflection Microscopy and Light Section Microscopy », *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, vol. 55, n° 11, p. 2827-2831, 1989.
- [115] K. K. W. Wong, A. L. J. Olsson, B. Asadishad, B. van der Bruggen, et N. Tufenkji, « Role of Cell Appendages in Initial Attachment and Stability of *E. coli* on Silica Monitored by Nondestructive TIRF Microscopy », *Langmuir*, vol. 33, n° 16, p. 4066-4075, avr. 2017.
- [116] R.-Y. He *et al.*, « Enhanced live cell membrane imaging using surface plasmon-enhanced total internal reflection fluorescence microscopy », *Optics Express*, vol. 14, n° 20, p. 9307–9316, 2006.
- [117] P. N. Abadian, N. Tandogan, J. J. Jamieson, et E. D. Goluch, « Using surface plasmon resonance imaging to study bacterial biofilms », *Biomicrofluidics*, vol. 8, n° 2, p. 021804, mars 2014.
- [118] J. Homola, « Electromagnetic Theory of Surface Plasmons », *Springer Ser Chem Sens Biosens*, vol. 4, p. 3–44, 2006.
- [119] M. Born et E. Wolf, *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*, 7^e éd. Cambridge University Press, 1999.

- [120] « Refractive index of H₂O, D₂O (Water, heavy water, ice) - Hale ». [En ligne]. Disponible sur: <https://refractiveindex.info/?shelf=main&book=H2O&page=Hale>. [Consulté le: 28-sept-2018].
- [121] « OSA | Optical constants and structural properties of thin gold films ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.osapublishing.org/oe/fulltext.cfm?uri=oe-25-21-25574&id=375083>. [Consulté le: 27-sept-2018].
- [122] A. Otto, « A new method for exciting non-radioactive surface plasma oscillations », *Physica Status Solidi*, p. 99-101, 1968.
- [123] E. Kretschmann et H. Raether, « Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light », 1968.
- [124] B. K. Singh et A. C. Hillier, « Surface Plasmon Resonance Imaging of Biomolecular Interactions on a Grating-Based Sensor Array », *Analytical Chemistry*, vol. 78, n° 6, p. 2009-2018, mars 2006.
- [125] C. Hu, « Surface plasmon resonance sensor based on diffraction grating with high sensitivity and high resolution », *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, vol. 122, n° 21, p. 1881-1884, nov. 2011.
- [126] J. Homola, I. Koudela, et S. S. Yee, « Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison », *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 1999.
- [127] G. Marusov *et al.*, « A Microarray Biosensor for Multiplexed Detection of Microbes Using Grating-Coupled Surface Plasmon Resonance Imaging », *Environ Sci Technol*, vol. 46, n° 1, p. 348-359, janv. 2012.
- [128] J. Dostálek et J. Homola, « Surface plasmon resonance sensor based on an array of diffraction gratings for highly parallelized observation of biomolecular interactions », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 129, n° 1, p. 303-310, janv. 2008.

- [129] S. Moon *et al.*, « Grating-based surface plasmon resonance detection of core-shell nanoparticle mediated DNA hybridization », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 32, n° 1, p. 141-147, févr. 2012.
- [130] A. Sereda, J. Moreau, M. Canva, et E. Maillart, « High performance multi-spectral interrogation for surface plasmon resonance imaging sensors », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 54, p. 175–180, 2014.
- [131] P. N. Abadian et E. D. Goluch, « Surface plasmon resonance imaging (SPRi) for multiplexed evaluation of bacterial adhesion onto surface coatings », *Anal. Methods*, vol. 7, n° 1, p. 115–122, 2015.
- [132] V. Chabot, « Plate-formes de microscopie et fluorescence par résonance de plasmons de surface appliquées à l'imagerie cellulaire », 2013.
- [133] E. Suraniti *et al.*, « Real-time detection of lymphocytes binding on an antibody chip using SPR imaging », *Lab on a Chip*, vol. 7, n° 9, p. 1206-1208, 2007.
- [134] R. Bombera, L. Leroy, T. Livache, et Y. Roupioz, « DNA-directed capture of primary cells from a complex mixture and controlled orthogonal release monitored by SPR imaging », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 33, n° 1, p. 10–16, 2012.
- [135] T. Söllradl, F. A. Banville, V. Chabot, M. Canva, M. Grandbois, et P. G. Charette, « Metal clad waveguide (MCWG) based imaging using a high numerical aperture microscope objective », *Optics Express*, vol. 25, n° 3, p. 1666, févr. 2017.
- [136] F. Bardin, A. Bellemain, G. Roger, et M. Canva, « Surface plasmon resonance spectro-imaging sensor for biomolecular surface interaction characterization », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, n° 7, p. 2100–2105, 2009.
- [137] A. Sereda, J. Moreau, M. Boulade, A. Olivéro, M. Canva, et E. Maillart, « Compact 5-LEDs illumination system for multi-spectral surface plasmon resonance sensing », *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 209, p. 208–211, 2015.
- [138] D. Habauzit, J. Chopineau, et B. Roig, « SPR-based biosensors: a tool for biodetection of hormonal compounds », *Anal Bioanal Chem*, vol. 387, n° 4, p. 1215-1223, févr. 2007.

- [139] J. Guo, P. D. Keathley, et J. T. Hastings, « Dual-mode surface-plasmon-resonance sensors using angular interrogation », p. 3.
- [140] N. J. Wittenberg *et al.*, « Applications of Surface Plasmon Resonance for Characterization of Molecules Important in the Pathogenesis and Treatment of Neurodegenerative Diseases », *Expert review of neurotherapeutics*, vol. 14, n° 4, p. 449-463, avr. 2014.
- [141] K. House-Pompeo, J. Oakley Boles, et M. Höök, « Characterization of Bacterial Adhesin Interactions with Extracellular Matrix Components Utilizing Biosensor Technology », *Methods*, vol. 6, n° 2, p. 134-142, juin 1994.
- [142] C. J. Day, L. E. Hartley-Tassell, et V. Korolik, « Identification of Ligand-Receptor Interactions: Ligand Molecular Arrays, SPR and NMR Methodologies », in *Campylobacter jejuni: Methods and Protocols*, J. Butcher et A. Stintzi, Éd. New York, NY: Springer New York, 2017, p. 51-63.
- [143] A. Amano *et al.*, « Molecular Interactions of Porphyromonas gingivalis Fimbriae with Host Proteins: Kinetic Analyses Based on Surface Plasmon Resonance », *Infect. Immun.*, vol. 67, n° 5, p. 2399, mai 1999.
- [144] T. N. Tun, P. J. Cameron, et A. T. A. Jenkins, « Sensing of pathogenic bacteria based on their interaction with supported bilayer membranes studied by impedance spectroscopy and surface plasmon resonance », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 28, n° 1, p. 227-231, oct. 2011.
- [145] S. D. Holmes, K. May, V. Johansson, F. Markey, et I. A. Critchley, « Studies on the interaction of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis with fibronectin using surface plasmon resonance (BIAcore) », *Journal of Microbiological Methods*, vol. 28, n° 1, p. 77-84, janv. 1997.
- [146] M. B. Medina, L. V. Houten, P. H. Cooke, et S. I. Tu, « Real-time analysis of antibody binding interactions with immobilized E. coli O157:H7 cells using the BIAcore », *Biotechnology Techniques*, vol. 11, n° 3, p. 173-176, 1997.

- [147] M. Kawashima, N. Hanada, T. Hamada, J. Tagami, et H. Senpuku, « Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components », *Oral Microbiology and Immunology*, vol. 18, n° 4, p. 220-225, août 2003.
- [148] P. Subramanian, F. Barka-Bouaifel, J. Bouckaert, N. Yamakawa, R. Boukherroub, et S. Szunerits, « Graphene-Coated Surface Plasmon Resonance Interfaces for Studying the Interactions between Bacteria and Surfaces », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, n° 8, p. 5422-5431, avr. 2014.
- [149] A. T. A. Jenkins, R. Ffrench-Constant, A. Buckling, D. J. Clarke, et K. Jarvis, « Study of the Attachment of *Pseudomonas aeruginosa* on Gold and Modified Gold Surfaces Using Surface Plasmon Resonance », *Biotechnology Progress*, vol. 20, n° 4, p. 1233-1236, janv. 2004.
- [150] S. S. Nakka, J. Lönn, C. S. Johansson, T. Bengtsson, et F. Nayeri, « Antibodies produced in vitro in the detection of periodontal bacteria by using surface plasmon resonance analysis », *Clinical and Experimental Dental Research*, vol. 1, n° 1, p. 32-44, oct. 2015.
- [151] M. B. Medina, « Binding of collagen I to *Escherichia coli* O157:H7 and inhibition by carrageenans », *International Journal of Food Microbiology*, vol. 69, n° 3, p. 199-208, sept. 2001.
- [152] M. W. Oli, W. P. McArthur, et L. J. Brady, « A whole cell BIAcore assay to evaluate P1-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to human salivary agglutinin and inhibition by specific antibodies », *Journal of Microbiological Methods*, 2006.
- [153] C. G. Kelly *et al.*, « A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent », *Nature Biotechnology*, vol. 17, p. 42, janv. 1999.
- [154] A. M. Foudeh, J. T. Daoud, S. P. Faucher, T. Veres, et M. Tabrizian, « Sub-femtomole detection of 16s rRNA from *Legionella pneumophila* using surface plasmon resonance imaging », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 52, p. 129-135, févr. 2014.

- [155] F. Melaine, M. Saad, S. Faucher, et M. Tabrizian, « Selective and High Dynamic Range Assay Format for Multiplex Detection of Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* RNAs Using Surface Plasmon Resonance Imaging », *Analytical Chemistry*.
- [156] A. M. Aura, R. D'Agata, et G. Spoto, « Ultrasensitive Detection of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* Genomic DNA by Nanoparticle-Enhanced Surface Plasmon Resonance Imaging », *Chemistry Select*, vol. 2, p. 7024, 2017.
- [157] M. B. Medina, « Detection of Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) with Surface Plasmon Resonance Sensor », *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, vol. 11, n° 3, p. 225-243, mai 2007.
- [158] P. Leonard, S. Hearty, J. Quinn, et R. O'Kennedy, « A generic approach for the detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface plasmon resonance », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, p. 1331–1335, 2004.
- [159] P. Leonard, S. Hearty, G. Wyatt, J. Quinn, et R. O'Kennedy, « Development of a Surface Plasmon Resonance–Based Immunoassay for *Listeria monocytogenes* », *Journal of Food Protection*, vol. 68, n° 4, p. 728-735, avr. 2005.
- [160] A. D. Taylor, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, et S. Jiang, « Comparison of *E. coli* O157:H7 preparation methods used for detection with surface plasmon resonance sensor », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 107, n° 1, p. 202-208, mai 2005.
- [161] Y. Wang, Z. Ye, C. Si, et Y. Ying, « Subtractive Inhibition Assay for the Detection of *E. coli* O157:H7 Using Surface Plasmon Resonance », *Sensors (Basel)*, vol. 11, n° 3, p. 2728-2739, mars 2011.
- [162] V. Koubová *et al.*, « Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 74, n° 1, p. 100-105, avr. 2001.

- [163] Y. M. Bae, B.-K. Oh, W. Lee, W. H. Lee, et J.-W. Choi, « Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* based on imaging ellipsometry », *Materials Science and Engineering C*, vol. 24, n° 1-2, p. 61–64, 2004.
- [164] J.-Y. Jyoung, S. Hong, W. Lee, et J.-W. Choi, « Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, n° 12, p. 2315-2319, juin 2006.
- [165] H. Baccar, M. B. Mejri, I. Hafaiedh, T. Ktari, M. Aouni, et A. Abdelghani, « Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection », *Talanta*, vol. 82, n° 2, p. 810–814, 2010.
- [166] F. C. Dudak et İ. H. Boyacı, « Development of an immunosensor based on surface plasmon resonance for enumeration of *Escherichia coli* in water samples », *Food Research International*, vol. 40, n° 7, p. 803-807, août 2007.
- [167] J. Waswa, J. Irudayaraj, et C. Debroy, « Direct detection of *E. Coli* O157 : H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor », *Society of Food Science and Technology*, vol. 40, p. 187–192, 2007.
- [168] Y. Lan, S. Wang, Y. Yin, W. C. Hoffmann, et X. Zheng, « Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Detection of *Salmonella Typhimurium* in Chicken Carcass », *Journal of Bionic Engineering*, vol. 5, n° 3, p. 239-246, sept. 2008.
- [169] M. Vala, S. Etheridge, J. A. Roach, et J. Homola, « Long-range surface plasmons for sensitive detection of bacterial analytes », *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2009.
- [170] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, et G. M. Whitesides, « Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology », 2005.
- [171] S. K. Bhatia *et al.*, « Use of thiol-terminal silanes and heterobifunctional crosslinkers for immobilization of antibodies on silica surfaces », *Analytical Biochemistry*, vol. 178, n° 2, p. 408-413, 1989.

- [172] S. Balasubramanian, I. B. Sorokulova, V. J. Vodyanoy, et 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*, vol. 22, n° 6, p. 948-955, janv. 2007.
- [173] N. Tawil, E. Sacher, R. Mandeville, et M. Meunier, « Surface plasmon resonance detection of *E. coli* and methicillin-resistant *S. aureus* using bacteriophages », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 37, n° 1, p. 24-29, août 2012.
- [174] A. Singh, D. Arutyunov, M. T. McDermott, C. M. Szymanski, et S. Evoy, « Specific detection of *Campylobacter jejuni* using the bacteriophage NCTC 12673 receptor binding protein as a probe », *Analyst*, vol. 136, n° 22, p. 4780-4786, 2011.
- [175] J.-Y. Ahn *et al.*, « Surface Plasmon Resonance Aptamer Biosensor for Discriminating Pathogenic Bacteria *Vibrio parahaemolyticus* », mars-2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jnn/2018/00000018/00000003/art00011>. [Consulté le: 03-oct-2018].
- [176] S. M. Yoo, D.-K. Kim, et S. Y. Lee, « Aptamer-functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species », *Talanta*, vol. 132, p. 112-117, janv. 2015.
- [177] J. G. Quinn *et al.*, « Development and Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell–Ligand Interactions », *Analytical Biochemistry*, vol. 281, n° 2, p. 135-143, juin 2000.
- [178] C. Zhou, H. Zou, M. Li, C. Sun, D. Ren, et Y. Li, « Fiber optic surface plasmon resonance sensor for detection of *E. coli* O157:H7 based on antimicrobial peptides and AgNPs-rGO », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 117, p. 347-353, oct. 2018.
- [179] Ö. Torun, İ. Hakkı Boyacı, E. Temür, et U. Tamer, « Comparison of sensing strategies in SPR biosensor for rapid and sensitive enumeration of bacteria », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 37, n° 1, p. 53-60, août 2012.

- [180] A. Subramanian, J. Irudayaraj, et T. Ryan, « A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of E. coli O157:H7 », *Biosensors and Bioelectronics*, 2006.
- [181] P. M. Fratamico, T. P. Strobaugh, M. B. Medina, et A. G. Gehring, « Detection of Escherichia coli O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor », *Biotechnology Techniques*, vol. 12, n° 7, p. 571-576, juill. 1998.
- [182] G. C. A. M. Bokken, R. J. Corbee, F. Van Knapen, et A. A. Bergwerff, « Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor », *FEMS Microbiol Lett*, vol. 222, n° 1, p. 75-82, mai 2003.
- [183] S. Bouguelia *et al.*, « On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria », *Lab on a Chip*, vol. 13, n° 20, p. 4024, 2013.
- [184] S. Nakano *et al.*, « Evaluation of a surface plasmon resonance imaging-based multiplex O-antigen serogrouping for Escherichia coli using eleven major serotypes of Shiga -toxin-producing E. coli », *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 24, p. 443-448, 2018.
- [185] K. F. Giebel *et al.*, « Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy », *Biophysical Journal*, vol. 76, n° 1, p. 509–516, 1999.
- [186] « Refractive index of SCHOTT - SF (Dense flint) - N-SF66 ». [En ligne]. Disponible sur: <https://refractiveindex.info/?shelf=glass&book=SCHOTT-SF&page=N-SF66>. [Consulté le: 21-janv-2019].
- [187] J.-C. Augustin et V. Carlier, « Mathematical modelling of the growth rate and lag time for Listeria monocytogenes », *International Journal of Food Microbiology*, vol. 56, n° 1, p. 29-51, mai 2000.

- [188] M. H. Zwietering, J. T. de Koos, B. E. Hasenack, J. C. de Witt, et K. van't Riet, « Modeling of bacterial growth as a function of temperature. », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, n° 4, p. 1094-1101, janv. 1991.
- [189] D. A. Ratkowsky, J. Olley, T. A. McMEEKIN, et A. Ball, « Relationship Between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures », *J. BACTERIOL.*, vol. 149, p. 5, 1982.
- [190] M. Bélanger et Y. Marois, « Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: A review », *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 58, n° 5, p. 467-477, juill. 2002.
- [191] C. S. Moreira, A. M. N. Lima, H. Neff, et C. Thirstrup, « Temperature-dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold-water interface », *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 134, n° 2, p. 854–862, 2008.
- [192] K. Özdemir et G. Turhan-Sayan, « Temperature Effects on Surface Plasmon Resonance: Design Considerations for an Optical Temperature Sensor », *Journal of Lightwave Technology*, vol. 21, n° 3, p. 805-814, 2003.
- [193] A. Morlay, « Développement d'une méthode de détection multiplexe de bactéries pathogènes en matrice alimentaire se basant sur l'imagerie par résonance des plasmons de surface (SPRi) », 2016.
- [194] R. B. M. Schasfoort et A. J. Tudos, Éd., *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 1 edition. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2008.
- [195] A. D. Jewell, H. L. Tierney, et E. C. H. Sykes, « Gently lifting gold's herringbone reconstruction: Trimethylphosphine on Au(111) », *Phys. Rev. B*, vol. 82, n° 20, p. 205401, nov. 2010.
- [196] D. V. Leff, L. Brandt, et J. R. Heath, « Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines », *Langmuir*, vol. 12, n° 20, p. 4723-4730, janv. 1996.

- [197] S. Kim, L. K. Jang, H. S. Park, et J. Y. Lee, « Electrochemical deposition of conductive and adhesive polypyrrole-dopamine films », *Scientific Reports*, vol. 6, p. 30475, juill. 2016.
- [198] T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, et R. Teoule, « Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group », *Nucleic Acids Research*, vol. 22, n° 15, p. 2915–2921, 1994.
- [199] Y. Roupiez *et al.*, « Individual Blood-Cell Capture and 2D Organization on Microarrays », *Small*, vol. 5, n° 13, p. 1493-1497, mars 2009.
- [200] M. Wahlgren et T. Arnebrant, « Protein adsorption to solid surfaces », *Trends in Biotechnology*, vol. 9, n° 1, p. 201-208, janv. 1991.
- [201] E. T. Gedig, « Surface Chemistry in SPR Technology », in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, Royal Society of Chemistry, p. 171-254.
- [202] A.-L. Välimaa, A. Tilsala-Timisjärvi, et E. Virtanen, « Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – A review », *Food Control*, vol. 55, p. 103-114, sept. 2015.
- [203] V. Nanduri, A. K. Bhunia, S.-I. Tu, G. C. Paoli, et J. D. Brewster, « SPR biosensor for the detection of *L. monocytogenes* using phage-displayed antibody », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, n° 2, p. 248-252, sept. 2007.
- [204] A. D. Taylor, J. Ladd, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, et S. Jiang, « Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, n° 5, p. 752-758, déc. 2006.
- [205] T. M. Squires, R. J. Messinger, et S. R. Manalis, « Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors », *Nature Biotechnology*, vol. 26, n° 4, p. 417–426, 2008.
- [206] A. Morlay *et al.*, « Label-free immuno-sensors for the fast detection of *Listeria* in food », *Measurement*, vol. 98, p. 305-310, févr. 2017.

- [207] E. Lauga, W. R. DiLuzio, G. M. Whitesides, et H. A. Stone, « Swimming in Circles: Motion of Bacteria near Solid Boundaries », *Biophysical Journal*, vol. 90, n° 2, p. 400-412, janv. 2006.
- [208] R. Di Leonardo, D. Dell'Arciprete, L. Angelani, et V. Iebba, « Swimming with an image », *Physical Review Letters*, 2011.
- [209] H. C. Berg, *Random walk in biology*. Princeton University Press, 1993.
- [210] H. C. Berg et L. Turner, « Chemotaxis of bacteria in glass capillary arrays. *Escherichia coli*, motility, microchannel plate, and light scattering », *Biophysical Journal*, vol. 58, n° 4, p. 919-930, oct. 1990.
- [211] K. Maeda, Y. Imae, J. I. Shioi, et F. Oosawa, « Effect of temperature on motility and chemotaxis of *Escherichia coli*. », *J. Bacteriol.*, vol. 127, n° 3, p. 1039, sept. 1976.
- [212] P. D. Frymier, R. M. Ford, H. C. Berg, et P. T. Cummings, « Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 92, p. 6195 – 6199, 1995.
- [213] P. D. Frymier et R. M. Ford, « Analysis of bacterial swimming speed approaching a solid–liquid interface », *AIChE Journal*, vol. 43, n° 5, p. 1341-1347, juin 2004.
- [214] « Focus tunable lenses ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.optotune.com/products/focus-tunable-lenses>. [Consulté le: 27-nov-2018].
- [215] T. G. Georgiev, « Plenoptic camera with large depth of field », US7949252B1, 24-mai-2011.
- [216] J.-Y. Tinevez *et al.*, « TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking », *Methods*, vol. 115, p. 80-90, févr. 2017.
- [217] I. Jolliffe, « Principal Component Analysis », in *International Encyclopedia of Statistical Science*, M. Lovric, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 1094-1096.

- [218] J. P. Busalmen et S. R. De Sánchez, « Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to Nonpolarized and Polarized Thin Films of Gold », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, n° 7, p. 3188–3194, 2001.
- [219] R. G. Chapman *et al.*, « Polymeric Thin Films That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacteria », *Langmuir*, vol. 17, n° 4, p. 1225-1233, févr. 2001.
- [220] I. M. Marcus, M. Herzberg, S. L. Walker, et V. Freger, « *Pseudomonas aeruginosa* Attachment on QCM-D Sensors: The Role of Cell and Surface Hydrophobicities », *Langmuir*, vol. 28, n° 15, p. 6396-6402, avr. 2012.
- [221] J. Gu, A. Valdevit, T.-M. Chou, et M. Libera, « Substrate effects on cell-envelope deformation during early-stage *Staphylococcus aureus* biofilm formation », *Soft Matter*, vol. 13, n° 16, p. 2967-2976, 2017.
- [222] Y. Chen, A. K. Harapanahalli, H. J. Busscher, W. Norde, et H. C. van der Mei, « Nanoscale Cell Wall Deformation Impacts Long-Range Bacterial Adhesion Forces on Surfaces », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, n° 2, p. 637-643, janv. 2014.
- [223] Y. Chen, W. Norde, H. C. van der Mei, et H. J. Busscher, « Bacterial Cell Surface Deformation under External Loading », *mBio*, vol. 3, n° 6, p. e00378-12, déc. 2012.
- [224] J. Li *et al.*, « Residence-time dependent cell wall deformation of different *Staphylococcus aureus* strains on gold measured using surface-enhanced-fluorescence », *Soft Matter*, vol. 10, n° 38, p. 7638-7646, 2014.
- [225] C. Delisi, *Antigen Antibody Interactions*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [226] Y. Lai et R. L. Gallo, « AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense », *Trends in Immunology*, vol. 30, n° 3, p. 131-141, mars 2009.
- [227] E. Andrès et J.-L. Dimarcq, « Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development. Up date », *Medecine et maladies infectieuses*, vol. 37, n° 4, p. 194—199, avr. 2007.

- [228] M. ZASLOFF, « Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor », *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, p. 5, 1987.
- [229] M. Zasloff, « Antimicrobial peptides of multicellular organisms », *Nature*, vol. 415, n° 6870, p. 389-395, janv. 2002.
- [230] N. V. Kulagina, M. E. Lassman, F. S. Ligler, et C. R. Taitt, « Antimicrobial Peptides for Detection of Bacteria in Biosensor Assays », *Analytical Chemistry*, vol. 77, n° 19, p. 6504-6508, oct. 2005.
- [231] N. V. Kulagina, K. M. Shaffer, G. P. Anderson, F. S. Ligler, et C. R. Taitt, « Antimicrobial peptide-based array for *Escherichia coli* and *Salmonella* screening », *Analytica Chimica Acta*, vol. 575, n° 1, p. 9-15, août 2006.
- [232] H. Etayash, L. Norman, T. Thundat, M. Stiles, et K. Kaur, « Surface-Conjugated Antimicrobial Peptide Leucocin A Displays High Binding to Pathogenic Gram-Positive Bacteria », *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 6, n° 2, p. 1131-1138, janv. 2014.
- [233] H. Etayash, L. Norman, T. Thundat, et K. Kaur, « Peptide-Bacteria Interactions using Engineered Surface-Immobilized Peptides from Class IIa Bacteriocins », *Langmuir*, vol. 29, n° 12, p. 4048-4056, mars 2013.
- [234] K. Anselme, P. Davidson, A. M. Popa, M. Giazzon, M. Liley, et L. Ploux, « The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale », 2010.
- [235] S. D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, et T. J. Webster, « The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment », *Biomaterials*, vol. 31, n° 4, p. 706–713, 2010.
- [236] E. Westas, M. Gillstedt, J. Lönn-Stensrud, E. Bruzell, et M. Andersson, « Biofilm formation on nanostructured hydroxyapatite-coated titanium », *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 102, n° 4, p. 1063–1070, avr. 2014.

- [237] C. Díaz, R. C. Salvarezza, L. de M. Fernández, A. Mónica, et P. L. Schilardi, « Organization of *Pseudomonas fluorescens* on Chemically Different Nano/Microstructured Surfaces », *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 2, n° 9, p. 2530–2539, sept. 2010.
- [238] M. Yang, Y. Ding, X. Ge, et Y. Leng, « Control of bacterial adhesion and growth on honeycomb-like patterned surfaces », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 135, p. 549–555, 2015.
- [239] X. Ge *et al.*, « Bacterial responses to periodic micropillar array », *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 103, n° 1, p. 384–396, janv. 2015.
- [240] R. Helbig, D. Günther, J. Friedrichs, F. Röls sler, A. Lasagni, et C. Werner, « The impact of structure dimensions on initial bacterial adhesion », *Biomater. Sci.*, vol. 4, n° 7, p. 1074–1078, 2016.
- [241] Brooke Rowan, and M. A. Wheeler, et R. M. Crooks*, « Patterning Bacteria within Hyperbranched Polymer Film Templates », 2002.
- [242] I. Wong, X. Ding, C. Wu, et C.-M. Ho, « Accurate and effective live bacteria microarray patterning on thick polycationic polymer layers co-patterned with HMDS », *RSC Advances*, vol. 2, n° 20, p. 7673-7676, 2012.
- [243] R. Hansen, K. Shubert, J. Morrell-Falvey, B. Lokitz, M. Doktycz, et S. Retterer, « Microstructured Block Copolymer Surfaces for Control of Microbe Adhesion and Aggregation », *Biosensors*, vol. 4, n° 1, p. 63–75, mars 2014.
- [244] S. Bouguelia, « Développement de biopuces dédiée a la détection de bactériespatho ene a faibles taux ».
- [245] C.-L. Azzopardi *et al.*, « A Fluidic Interface with High Flow Uniformity for Reusable Large Area Resonant Biosensors », *Micromachines*, vol. 8, n° 10, 2017.
- [246] D. Puchberger-Enengl, S. Podszun, H. Heinz, C. Hermann, P. Vulto, et G. A. Urban, « Microfluidic concentration of bacteria by on-chip electrophoresis », *Biomicrofluidics*, vol. 5, n° 4, p. 44111-4411110, déc. 2011.

- [247] Quentin Avenas *et al.*, « Improvement in the performances of a plasmonic sensor using a combination of electrohydrodynamical effects », présenté à Dielectrophoresis, Surrey, UK, 2018.
- [248] S. Delshadi *et al.*, « Rapid immunoassay exploiting nanoparticles and micromagnets: proof-of-concept using ovalbumin model », *Bioanalysis*, vol. 9, n° 6, p. 517-526, févr. 2017.
- [249] « US20150355174A1 - Method for capturing, method for detecting and kit for capturing a molecule in a sample - Google Patents ». [En ligne]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US20150355174A1/en>. [Consulté le: 07-janv-2019].
- [250] H. C. Berg, *Random walk in biology*. Princeton University Press, 1993.
- [251] R. M. Ford, B. R. Phillips, J. A. Quinn, et A. Douglas, « Measurement of Bacterial Random Motility and Chemotaxis Coefficients : 1 . Stopped-Flow Diffusion Chamber Assay », *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 37, p. 647-660, 1991.

LABORATOIRES IMPLIQUES

Ce projet s'est déroulé en cotutelle entre l'Université Grenoble Alpes (UGA) et l'Université de Sherbrooke.

Physiquement, le doctorat a été réalisé au sein de trois laboratoires :

- **Le Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude d'Assemblages Biologiques (CREAB)** de l'Unité Mixte de Recherche SYstèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé (SyMMES, UMR 5819), au sein de l'Institut Nanoscience et Cryogénie (INAC) du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA). L'adresse du laboratoire est la suivante :

Laboratoire CREAB, bâtiment C5,
17 avenue des Martyrs,
38040 Grenoble, France

- **L'institut Interdisciplinaire d'Innovation et de Technologie (3IT)** au sein de l'Unité Mixte Internationale Laboratoire Nanoscience et Nanotechnologies (LN2, UMI 3463). L'adresse du laboratoire est la suivante :

3IT, pavillon P2,
3000 boulevard de l'université,
Sherbrooke, QC J1K0A5, Canada

- **Le laboratoire de Michel Grandbois au sein de l'institut de pharmacologie** de l'Université de Sherbrooke, faisant partie de l'UMI LN2. L'adresse est la suivante :

Institut de pharmacologie,
3001 12^e Avenue Nord,
Sherbrooke, J1H5N4, Canada

REMERCIEMENTS

Remercier toutes les personnes qui ont rendu possible ce doctorat va être difficile tant elles sont nombreuses, et la cotutelle ne facilite pas la chose puisqu'elle m'a permis de travailler sur deux continents différents, au sein de trois laboratoires incroyables. Je vais pourtant ici tenter de ne léser personne.

Je voudrais bien sur commencer par remercier Franz Bruckert, Jan Dubowski, Marie Frénéa Robin, et Thérèse Leblois pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens ensuite à dire mille mercis à mes quatre encadrants de thèse Michaël Canva, Paul Charrette, Loïc Leroy et Thierry Livache pour m'avoir permis d'effectuer ce projet de doctorat. Merci Michael de m'avoir le premier fait confiance pour cette thèse et pour les conversations que nous avons eu qui dépassaient très souvent le cadre de mon projet de recherche. Je remercie Paul d'avoir été compréhensif et réactif en toute circonstance et d'avoir souvent été l'alter ego réaliste de Michaël ! Loïc, c'est toi qui a été le plus présent au jour le jour, et je te remercie pour tous tes conseils et ton aide jusqu'aux dernières minutes avant la soutenance : mon opiniâtreté à mener à bien cette thèse n'aurait sûrement pas été aussi tenace si tu n'avais pas été là presque quotidiennement. Thierry enfin merci de m'avoir toujours aidé à prendre de la distance sur mon sujet et de m'avoir encadré malgré les nombreuses contraintes.

Je remercie personnellement toutes les personnes qui m'ont formée et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : Alexandra Morlay, Ulrike Froehlich, Kévin Chabot, Eric Pardoux, Raphael Mathey, Cloé Desmet, Clément Colin, Mikel Bravo, ...

Merci également à Yoann Roupioz et Michel Grandbois pour les discussions que nous avons pu avoir aussi bien en microbiologie qu'en chimie.

Même s'il n'a pas eu grande part dans mon doctorat, je tiens également à remercier Julien Moreau pour son dynamisme contagieux, pour m'avoir fait découvrir la SPR, et pour m'avoir fait confiance pour deux stages sans quoi je n'aurais jamais fait ce doctorat.

Je tiens également à remercier le personnel administratif et financier pour son efficacité et sa bienveillance tout au long du labyrinthe administratif qu'a été quelquefois la cotutelle.

La thèse est bien sur un travail de recherche, mais ce sont aussi trois ans de vie avec des hauts et des bas, et j'ai toujours pu compter sur des amis et une famille infatigables pour me soutenir tout au long de ce parcours.

Je dois donc remercier tout ce beau monde en commençant par les autres étudiants et employés de chacun des trois laboratoires où j'ai séjourné : la petite équipe du laboratoire à l'institut de pharmacologie, les membres de l'équipe biophotonique au 3IT, et même plus généralement tout le 3IT et en particulier le CASS, et bien sur tous les gens du CREAB à Grenoble. Merci pour le soutien, les rires et le partage d'innombrables pintes d'IPA, et un merci particulier à mes partenaires de courses, c'est-à-dire les Mamies En Baskets (MEB), et d'escalade.

Je remercie également mes colloques français et québécois pour tous les bons moments passés ensemble et pour le soutien moral, en particulier Thomas, Manon, Cindy et Fred.

Merci à ma famille pour son soutien inébranlable malgré la distance qui a varié de 500km à 5000km selon les moments de la thèse.

Et finalement, et surtout, merci à Matthieu pour m'avoir supporté tous les jours pendant plus de trois ans, malgré la distance, les coups de blues et mon (mauvais) caractère. Ta présence et ton soutien ont été essentiels dans mon quotidien. Merci !

RESUME

L'étude, la détection et l'identification de pathogènes est une problématique majeure pour la sécurité alimentaire et la médecine. Cependant, les pathogènes bactériens présents à de faibles concentrations nécessitent souvent une période de plus de 36h pour être identifiés par les méthodes standards. Ce délai est extrêmement contraignant pour des domaines où la rapidité du diagnostic est un facteur clé. Il y a donc une forte demande pour le développement d'outils pour mieux comprendre le comportement bactérien et ainsi développer des techniques de détection plus rapides et plus performantes.

Les systèmes d'imagerie SPR sont largement utilisés pour l'analyse d'interactions moléculaires, car ils permettent une mesure en parallèle, en temps réel et sans marquage, tout en étant faciles d'utilisation et compatibles avec des milieux complexes. Cette technique a montré son efficacité pour l'étude et la détection de bactéries en utilisant les interactions moléculaires avec les anticorps, mais les délais de détection restent pénalisants.

Dans ce contexte, un nouveau système d'imagerie permettant l'étude et la détection spécifique de pathogènes bactériens performant est développé en mettant à profit les avancées récentes en imagerie SPR optimisée en résolution. Notre système permet d'améliorer les temps de détection de pathogènes en milieux modèles grâce à sa capacité à détecter des bactéries individuelles. Il peut également être utilisé pour l'étude de l'interaction entre bactéries et surfaces spécifiques. Des premiers tests montrent que notre instrument est capable de caractériser le comportement bactérien de plusieurs souches bactériennes en interaction avec des surfaces fonctionnalisées par des espèces chimiques différentes.

Mots clés : *biocapteurs, détection de pathogènes, traitement d'image, bactéries, SPR*

ABSTRACT

The study, detection and identification of pathogens is a major issue for food safety and medicine. However, bacterial pathogens present at low concentrations often require a period of more than 36 hours to be identified by standard methods. This delay is extremely constraining for areas where rapid diagnosis is a key factor. There is therefore a strong demand for the development of tools to better understand bacterial behavior and thus develop faster and more efficient detection techniques.

SPR imaging systems are widely used for the analysis of molecular interactions, as they allow parallel, real-time and unlabeled measurement, while being easy to use and compatible with complex media. This technique has proven effective in the study and detection of bacteria using molecular interactions with antibodies, but detection times remain penalizing.

In this context, a new imaging system allowing the study and specific detection of high-performance bacterial pathogens is being developed, taking advantage of recent advances in SPR imaging optimized in resolution. Our system improves pathogen detection times in model environments through its ability to detect individual bacteria. It can also be used to study the interaction between bacteria and specific surfaces. Initial tests show that our instrument is capable of characterizing the bacterial behaviour of several bacterial strains in interaction with surfaces functionalized by different chemical species.

Key words : *biosensors, pathogen detection, image processing, bacteria, SPR*