



HAL
open science

Détection à large spectre de pathogènes bactériens à l'aide de peptides antimicrobiens

Éric Pardoux

► **To cite this version:**

Éric Pardoux. Détection à large spectre de pathogènes bactériens à l'aide de peptides antimicrobiens. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV026 . tel-02464673

HAL Id: tel-02464673

<https://theses.hal.science/tel-02464673>

Submitted on 3 Feb 2020

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 COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Éric PARDOUX

Thèse dirigée par **Yoann ROUPIOZ**, Directeur de Recherche, CNRS,
et codirigée par **Didier BOTURYN**, Directeur de Recherche, CNRS

préparée au sein du **Laboratoire Systèmes Moléculaires et
nano Matériaux pour l'Énergie et la Santé**
ainsi que du **Département de Chimie Moléculaire**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Détection à large spectre de pathogènes bactériens à l'aide de peptides antimicrobiens

Wide-spectrum biosensors based on antimicrobial peptides for the detection of pathogenic bacteria

Thèse soutenue publiquement le **25 octobre 2019**,
devant le jury composé de :

Madame Souhir BOUJDAY

Professeure des Universités, Sorbonne Université, Rapporteur

Monsieur Thierry JOUENNE

Directeur de Recherche CNRS, Université de Rouen, Rapporteur

Monsieur Philippe BULET

Directeur de Recherche CNRS, Université Grenoble Alpes, Président

Madame Laurence PAGÈS MONTEIRO

Cadre scientifique, bioMérieux, Examinatrice

Monsieur Yoann ROUPIOZ

Directeur de Recherche CNRS, Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Monsieur Didier BOTURYN

Directeur de Recherche CNRS, Université Grenoble Alpes, Invité, codirecteur
de thèse



Remerciements

On peut être fier de ce qu'on a fait mais on devrait l'être encore plus de ce qu'on n'a pas fait. Cette fierté est à inventer.

E.M. CIORAN.

Des étapes de passage d'une thèse, la tradition veut que la dernière exécutée arrive en première dans le manuscrit : les remerciements. Exercice d'équilibriste au cours duquel le moindre oubli deviendrait crime de lèse-majesté, néanmoins l'heure est venue de s'y plier.

Tout d'abord, je tiens à chaleureusement exprimer ma gratitude aux membres de mon jury de thèse, à commencer par Mme Souhir Boujday et M. Thierry Jouenne, qui ont accepté de rapporter ce travail, ainsi que Mme Laurence Pagès Monteiro et M. Philippe Bulet, pour l'avoir examiné. Les échanges au cours de la soutenance ont permis de soulever des questions pertinentes et d'ouvrir de nouvelles pistes pour le futur de ces travaux.

C'est ensuite tout naturellement que je me dois de remercier grandement mes directeurs de thèse, Didier Boturyn et Yoann Roupioz, sans lesquels rien de tout ceci n'aurait pu voir le jour. Ces trois ans à la découverte des peptides antimicrobiens et des subtilités de la détection en milieu sanguin ont été riches scientifiquement, mais aussi humainement grâce à eux. Ces remerciements vont également vers toutes les personnes qui m'ont été indispensables à la paillasse : Raphaël Mathey pour son art pragmatique de la microbiologie, Christine Saint-Pierre pour sa bonne humeur et sa pédagogie autour des techniques analytiques et notamment du MALDI, Rémy Lartia pour avoir eu la patience de me faire découvrir la synthèse peptidique en partant de zéro et enfin Loïc Leroy pour les multiples échanges autour de problèmes (méta)physiques et expérimentaux. L'aide apportée par Vincent Humblot concernant la caractérisation de nos surfaces a également été très précieuse. Je lui adresse de sincères remerciements. Les échanges avec Sandrine Boisset m'auront permis d'appréhender concrètement les contraintes du diagnostic bactériologique, je lui en suis reconnaissant. Enfin, je n'aurais pas pu réaliser ces expériences sans l'EFS Grenoble que je remercie pour leur compréhension vis-à-vis des conditions de prélèvement.

Ma gratitude va également au labex ARCANÉ qui a financé ces travaux et m'a ainsi permis de découvrir le monde de la recherche.

Trois années passées dans un laboratoire ont certes été du travail, mais surtout elles ont permis de transformer des collègues en camarades et ami-e-s qu'il fera bon retrouver à l'avenir. Ainsi, j'aimerais personnellement remercier celles et ceux que j'ai pu côtoyer au CREAB, à I2BM et plus généralement à Grenoble : les co-bureaux de choc, les compagnons vacataires aux fortunes diverses, la *dream team* du squash, les musiciens, les anglophones à l'humour noir, les stagiaires au passage toujours trop court, les vieux de la vieille et les jeunes forces vives. C'est à toutes ces personnes – et sans doute plus ! – que je dois ce manuscrit.

Au-delà de Grenoble il me faut remercier les lyonnais qui m'auront grandement (et peut-être inconsciemment) aidé, transformant souvent des bas en hauts.

Last but not least, je dois une reconnaissance immense à ma famille, pour son soutien solide depuis des années, que ces simples mots ne sauraient pas suffisamment remercier.

Introduction générale

C'est au cours du XIX^e siècle, notamment grâce à Louis Pasteur et Robert Koch, que la bactériologie est apparue. Si le premier a notamment introduit la fameuse théorie des germes qui a mis fin à la croyance en la génération spontanée, c'est surtout au second que la bactériologie clinique doit ses débuts. Les postulats que Koch a énoncés, dans la continuité des travaux de Henle, ont longtemps été considérés comme les principes fondamentaux du diagnostic des maladies infectieuses. Ces postulats reposent sur la nécessité de pouvoir isoler et cultiver un micro-organisme lors d'une maladie afin de pouvoir déterminer le lien de cause à effet entre la présence du pathogène et l'état du patient. Certaines techniques de culture des micro-organismes alors introduites par Koch et son équipe, dont la fameuse boîte de Petri servant à obtenir des isolats bactériens, sont encore au cœur des méthodes actuelles de la microbiologie clinique. L'introduction des antibiotiques au milieu du XX^e siècle aurait pu laisser présager une fin des maladies infectieuses. L'apparition systématique de souches résistantes à chaque introduction de nouveaux antibiotiques a toutefois éloigné cet espoir. Les infections bactériennes du sang (les bactériémies), et notamment leurs complications dans le cadre de sepsis et de chocs septiques représentent ainsi encore aujourd'hui une cause de mortalité importante. Une détection et une identification rapide des pathogènes sont nécessaires pour pouvoir ajuster de la façon la plus rapide et efficace possible le traitement antibiotique de ces infections.

La faible concentration bactérienne contenue dans le sang impose une étape d'enrichissement afin de pouvoir détecter la présence des pathogènes. Cette étape, appelée hémoculture, est basée sur la croissance de la population bactérienne dans l'échantillon sanguin prélevé, elle impose de ce fait un délai long avant que les bactéries ne soient détectées. De plus, les étapes subséquentes d'identification et de tests de sensibilité aux antibiotiques nécessitent à leur tour également des temps longs d'incubation, retardant l'adaptation du traitement antibiotique. Pour diminuer la durée avant l'ajustement de l'antibiothérapie, de nombreuses méthodes alternatives de diagnostic sont à l'étude. Parmi elles, l'introduction de la spectrométrie de masse par MALDI-TOF ainsi que l'arrivée de méthodes moléculaires ont drastiquement amélioré le diagnostic clinique d'infections bactériennes. Cependant, une marge de progression existe encore, par exemple grâce aux développements des biocapteurs.

C'est cet axe de recherche qui est exploré depuis quelques années au sein de l'équipe de Chimie pour la Reconnaissance et l'Étude d'Assemblages Biologiques (CREAB), de l'unité mixte de recherche sur les Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Énergie et la Santé (SyMMES). Un capteur basé sur la détection de bactéries en croissance grâce à l'imagerie par résonance de plasmons de surface y a été développé. Il permet notamment la reconnaissance spécifique de pathogènes en matrice complexe (alimentaire, sang) grâce à des biopuces à anticorps. Le besoin de mettre en place une capacité de détection de large spectre a conduit à explorer l'utilisation de peptides antimicrobiens pour la détection. Ces travaux de thèse, financés par le Laboratoire d'Excellence ARCANE, marquent ainsi le début d'une collaboration avec l'équipe d'Ingénierie et Interactions BioMoléculaires (I2BM) du Département de Chimie Moléculaire (DCM), afin d'étudier et développer ces nouvelles sondes peptidiques. Enfin, le

Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble est le dernier partenaire de ce projet, notamment afin de développer le capteur en adéquation avec les exigences des laboratoires d'analyse médicale.

Ce manuscrit se propose dans un premier chapitre de dresser un état des lieux plus détaillé du contexte lié aux bactériémies : depuis leur impact clinique jusqu'aux avancées actuelles dans le domaine de leur diagnostic. Les perspectives liées à l'utilisation de biocapteurs pour cette application seront alors introduites, ce qui amènera à fixer un cadre aux travaux effectués au cours de cette thèse.

Le deuxième chapitre viendra présenter les peptides antimicrobiens (PAM) comme potentiels substituts aux sondes habituelles des biocapteurs ciblant les pathogènes. Une présentation générale des PAM sera donnée avant de s'attarder sur les occurrences préexistantes de l'utilisation de ces molécules comme éléments de capture dans des biocapteurs. Des résultats préliminaires démontrant l'emploi de ces peptides dans un milieu de culture simple seront alors exposés, ainsi que les critères de sélection de nouvelles sondes. La stratégie de synthèse et d'immobilisation de ces ligands à la surface du capteur est alors présentée.

Le troisième chapitre présentera l'emploi des nouvelles sondes synthétisées pour la détection de bactérie en milieu de culture simple. Des éléments caractérisant l'immobilisation des PAM sur la surface des capteurs seront également exposés.

L'adaptation du système ainsi développé aux milieux complexes, comme le plasma ou le sang, sera présentée en première partie du chapitre 4. Ces améliorations comprennent notamment le changement de la méthode de passivation avec l'introduction de molécules thiolées en lieu et place de la BSA traditionnellement utilisée sur ce type de biocapteur. Ensuite, la démonstration de la détection de pathogènes à faible concentration en milieu complexe est démontrée, avec dans un premier temps l'emploi du plasma puis du sang dilué au milieu d'hémoculture tel qu'employé en clinique. Ces expériences serviront de support à l'évaluation du potentiel d'identification du système, grâce à la mise en œuvre de méthodes d'analyse exploratoire de données.

Enfin, le chapitre de conclusions et perspectives viendra éclairer les axes de développement ouverts par ces travaux, ainsi que les futures applications et implications qu'ils pourront avoir.

Liste des abréviations

- ACP** : Analyse en composantes principales (**PCA** en anglais)
- ATCC** : *American Type Culture Collection*
- BSA** : Albumine sérique du bovin (*Bovine Serum Albumin*)
- CHCP** : Classification Hiérarchique sur Composantes Principales (**HCPC** en anglais)
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- CP** : Composante Principale
- D15G15** : Solvant de dépôt lors des fonctionnalisations :
15% de DMF ; 15% de glycérol ; 70% d'eau ultra-pure.
- DMF** : *N,N*-diméthylformamide
- DMSO** : diméthylsulfoxyde
- ESI-MS** : spectrométrie de masse *via* ionisation par électro-ébuliseur
(*electrospray ionisation – mass spectrometry*)
- FISH** : *Fluorescence in-situ hybridization*
- MALDI-TOF** : spectrométrie de masse *via* désorption et ionisation par source d'ionisation laser assistée
par une matrice , couplée à un analyseur à temps de vol
(*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*)
- MPA** : acide mercaptopropionique (*Mercapto-Propionic Acid*)
- NHS** : N-Hydroxysuccinimide
- PAM** : Peptide antimicrobien (ou **AMP** – *antimicrobial peptide*)
- PBS** : tampon de phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline*)
- PCR** : Réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*)
- PEG** : Polyéthylène glycol
- QCM** : Microbalance à quartz (*quartz crystal microbalance*)
- ROI** : région d'intérêt sur une image (*Region of interest*)
- SAM** : monocouches auto-assemblées (*self-assembled monolayers*)
- SAPE** : Streptavidine Phycoérythrine
- SARM** : *S. aureus* résistant à la méticilline (**MRSA** en anglais)
- SASM** : *S. aureus* sensible à la méticilline (**MSSA** en anglais)
- SCN** : Staphylocoque à coagulase négative
- SPPS** : Synthèse peptidique sur phase solide
- SPR** : Résonance de plasmons de surface (*Surface Plasmon Resonance*)
- SPRI** : Imagerie par résonance de plasmons de surface (*Surface Plasmon Resonance Imaging*)
- SPS** : polyanétholsulfonate de sodium (*Sodium Polyanthole Sulfonate*) : anticoagulant
- TSB** : bouillon digéré de soja-caséine (*Tryptic Soy Broth*) : tampon
- UFC** : Unité formant colonie
- XPS** : Spectrométrie photoélectronique X (*X-ray photoelectron spectroscopy*)

Table des matières

I	Bactéries, infections et détection	
I	Bactéries, infections et détection	17
1.1	Infections bactériennes : risques et bactéries concernées	17
1.1.1	Infections bactériennes	17
1.1.1.1	Bactériémie & sepsis : occurrences et incidences	17
1.1.1.2	Définition et épidémiologie du sepsis	19
1.1.2	Bactéries pathogènes : quelle flore est impliquée dans le cadre des sepsis ?	21
1.1.2.1	Les espèces pathogènes liées aux infections bactériennes	21
1.1.2.2	<i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> : pathogènes les plus récurrents	23
1.2	Les méthodes de diagnostic des bactériémies	26
1.2.1	L'hémoculture comme étape d'enrichissement	26
1.2.1.1	Les contraintes de la détection d'une bactériémie	26
1.2.1.2	Détection automatisée de la présence de pathogènes dans l'hémoculture	27
1.2.2	Méthodes cliniques conventionnelles d'identification des bactéries	28
1.2.2.1	Confirmation par microscopie optique et coloration de Gram	29
1.2.2.2	Méthodes basées sur la culture	30
1.2.2.3	Spectrométrie de masse	31
1.2.2.4	Méthodes moléculaires	33
1.2.2.5	Conclusions sur les méthodes conventionnelles de diagnostic	35
1.2.3	Évolutions futures et méthodes émergentes	36
1.2.3.1	Développements des méthodes existantes	36
1.2.3.2	Méthodes de séparation et concentration	38
1.3	Les biocapteurs pour la détection de bactéries	39
1.3.1	Principes généraux des biocapteurs	39
1.3.1.1	Définition conceptuelle	39
1.3.1.2	Principaux types de transducteurs pour les biocapteurs	40
1.3.1.3	Importance du choix des sondes selon le type de détection	42
1.3.1.4	Applications de biocapteurs à la détection de bactériémies	43
1.3.2	L'imagerie SPR pour la détection de bactéries en milieu complexe	45
1.3.2.1	La résonance de plasmons de surface (SPR) pour la détection	45
1.3.2.2	Mise en œuvre de la SPR en mode imagerie (SPRI)	46
1.3.2.3	La méthode « Culture–Capture–Mesure » pour la détection de pathogènes	47
1.4	Objectifs de la thèse	49

2	Sélection et synthèse de peptides antimicrobiens pour la détection bactérienne	53
2.1	Peptides antimicrobiens : propriétés et applications	53
2.1.1	Caractéristiques des peptides antimicrobiens (PAM)	53
2.1.1.1	Structures chimiques et classification des PAM	53
2.1.1.2	Interactions des PAM avec les bactéries	55
2.1.1.3	Recherche et développement dans le domaine des antibiotiques	57
2.1.1.4	Au-delà des néo-antibiotiques : autres applications des PAMs	59
2.1.2	La détection de bactéries avec les PAM	61
2.1.2.1	Les PAM comme sondes dans les biocapteurs : une histoire récente	61
2.1.2.2	Utilisations comme sondes pour les biocapteurs	65
2.2	Choix de peptides références depuis l'état de l'art	70
2.2.1	Évaluation de PAM extraits de l'état de l'art	70
2.2.1.1	Littérature de référence pour les sondes évaluées	70
2.2.1.2	Première mise en œuvre de biopuces à PAM pour la SPRI	73
2.2.2	Sélection de références parmi les PAM évalués	74
2.2.2.1	Résultats des suivis cinétiques	74
2.2.2.2	Choix des peptides étalons dans le premier jeu étudié	77
2.3	Critères de conception des sondes supplémentaires	77
2.3.1	Critères de choix des séquences	77
2.3.2	Jeu de peptides choisis	80
2.3.2.1	Bacténécine bovine	80
2.3.2.2	Cécropine-mélicitine 15 (CM15)	81
2.3.2.3	Pénétratine	82
2.3.2.4	Peptide à Caractère Hélicoïdal et Amphipathique	83
2.3.3	Technique d'immobilisation des peptides sur l'or	83
2.3.3.1	Intérêt de l'immobilisation par chimie thiol	83
2.3.3.2	Influence de l'espaceur et de l'orientation de l'ancrage	84
2.4	Synthèse des peptides antimicrobiens sélectionnés	85
2.4.1	Stratégie de synthèse	85
2.4.1.1	Synthèse peptidique Fmoc supportée sur résine	85
2.4.1.2	Voie de synthèse effectuée	86
2.4.1.3	Résultats de synthèse	87

III

Détection en milieu modèle

3	Biopuces à PAM pour la détection de pathogènes en milieu simple	91
3.1	Méthodologie de fonctionnalisation	91
3.1.1	Principes de fonctionnalisation des biopuces	91
3.1.1.1	Préparation des surfaces : plasma- O_2 et automate de dépôt	91
3.1.1.2	Méthodologie de révélation des spots par biotinylation post-fonctionnalisation	93
3.1.2	Optimisation du procédé de dépôt des peptides	93
3.1.2.1	Influence de la composition de la solution de dépôt sur le spotting	93
3.2	Mise en œuvre des biopuces à PAM pour la détection en milieu simple	97
3.2.1	Comparaison de cinétiques d'interaction en milieu simple	97
3.2.2	Approche alternative de fonctionnalisation	100
3.3	Caractérisation de la fonctionnalisation des puces par les peptides	102
3.3.1	Mesures d'angle de contact	102
3.3.2	Caractérisation de la densité de greffage par analyses XPS	103
3.3.2.1	Le cas des surfaces à 100% de peptide ou PEG	104
3.3.2.2	Surfaces mixtes peptides-PEG	105
3.4	Conclusions du chapitre	106

IV

Détection en milieu sanguin

4	Détection de pathogènes à faible concentration en milieu complexe	111
4.1	Adaptation de la stratégie de détection aux milieux complexes	111
4.1.1	Le milieu sanguin : composition et fonctions	111
4.1.2	Procédés de préparation et de culture des échantillons sanguins	112
4.1.2.1	Importance de l'anticoagulant dans les milieux d'hémoculture	113
4.1.2.2	Adaptation de la méthodologie aux besoins de la détection SPRI	115
4.1.3	Détection SPRI en milieu sanguin : la question de la passivation du biocapteur	116
4.1.3.1	La passivation en milieu complexe	116
4.1.3.2	Étude de solutions alternatives au PEG2000	118
4.2	Compatibilité de la méthode « Culture-Capture-Mesure » en plasma	120
4.2.1	Détection de <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline et <i>E. coli</i> O157 :H7	121
4.2.2	Vérification de la détection directe des cellules bactériennes par le capteur	124
4.2.2.1	Interactions des PAM avec un milieu conditionné par la croissance bactérienne	124
4.2.2.2	Seuil de concentration bactérienne pour la détection en plasma	126
4.2.3	Conclusions intermédiaires sur la détection en milieu complexe	127
4.3	Détection de pathogènes en sang total dilué	128
4.3.1	Influence du milieu sanguin sur la cinétique de croissance des pathogènes	128

4.3.2	Stabilité des peptides en milieu sanguin	129
4.3.2.1	Étude par MALDI-TOF	130
4.3.2.2	Approche ON/OFF par fluorescence	131
4.3.3	Expériences de détection à faible concentration en sang	133
4.3.3.1	Contrôle en l'absence de bactéries : effets de la matrice sanguine	133
4.3.3.2	Détection d' <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> en sang	134
4.3.3.3	Influence du positionnement des sondes sur la surface de la puce	137
4.3.4	Vers une possibilité d'identification par affinité croisée ?	140
4.3.4.1	Objectifs et théorie de l'analyse exploratoire de données	140
4.3.4.2	Principes de l'analyse de données pour l'identification dans les biocapteurs	142
4.3.4.3	Descripteurs pour la détection « Culture-Capture-Mesure » large spectre	142
4.3.4.4	Effets de la matrice sur l'extraction de descripteurs et lissage des données	144
4.3.4.5	Résultats des analyses multidimensionnelles	146
4.3.4.6	Discussion sur l'apport des analyses multivariées	148
4.4	Conclusions du chapitre	150

V

Conclusions et perspectives

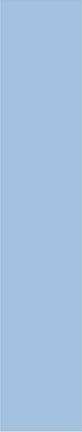
5	Conclusions et perspectives	153
5.1	Développement de nouvelles surfaces peptidiques pour la détection	154
5.2	Perspectives de développement instrumental	155
5.3	De « Culture-Capture-Mesure » à « Hémo-culture-Capture-Mesure »	156
5.4	Compréhension des mécanismes d'interaction entre peptides et bactéries	157
5.5	Conclusion générale	158

VI

Annexes

6	Matériels et méthodes	161
6.1	Matériel expérimental	161
6.1.1	Appareillages utilisés	161
6.1.2	Consommables	161
6.1.3	Réactifs et produits	162
6.1.4	Solvants, milieux de culture et tampons	162
6.1.5	Bactéries	162
6.1.6	Échantillons sanguins et extraction du plasma	162
6.1.7	Peptides	163
6.1.7.1	Principales caractéristiques des peptides étudiés	163
6.1.7.2	Résultats des synthèses de peptides	164

6.2	Protocoles	166
6.2.1	Synthèses peptidiques	166
6.2.1.1	Stratégie suivie pour la SPPS	166
6.2.1.2	Analyses	167
6.2.2	Fonctionnalisation de surfaces	167
6.2.2.1	Formation de monocouches auto-assemblées sur surfaces d'or	167
6.2.2.2	Biotinylation sur surface et révélation	168
6.2.3	Bactéries et suivis de détection en croissance	168
6.2.3.1	Conservation des bactéries	168
6.2.3.2	Cultures bactériennes en milieu liquide	168
6.2.3.3	Méthodologie de dilution et préparation de l' <i>inoculum</i> pour suivi SPRI	169
6.3	Traitement des données issues des suivis SPRI	169
6.3.1	Données cinétiques en représentation tuilée nuancée	170
6.3.2	L'analyse exploratoire de données	170
6.3.2.1	Analyse en Composantes Principales (ACP)	171
6.3.2.2	Classification Hiérarchique sur Composantes Principales (CHCP)	171
6.3.2.3	Classification « floue » (<i>fuzzy clustering</i>)	172
6.3.2.4	Implémentation de ces méthodes d'analyses grâce au langage R	173
	Bibliographie	175



Introduction : bactéries, infections et détection

1	Bactéries, infections et détection	17
1.1	Infections bactériennes : risques et bactéries concernées	
1.2	Les méthodes de diagnostic des bactériémies	
1.3	Les biocapteurs pour la détection de bactéries	
1.4	Objectifs de la thèse	

Chapitre 1

Bactéries, infections et détection

1.1 Infections bactériennes : risques et bactéries concernées

1.1.1 Infections bactériennes

Des nuages¹ à la fosse des Mariannes,² les bactéries ont colonisé la majeure partie des niches écologiques accessibles. Elles sont donc également constamment au contact avec l'être humain. Colonisant le tractus intestinal, la peau et la salive entre autres, les bactéries sont au moins aussi nombreuses que les cellules eucaryotes du soi.³ Ce microbiote représente de 500 à 1000 espèces différentes, avec une large déclinaison de souches pour chacune d'entre elles.⁴ Cette diversité provient de l'évolution et de l'adaptation des bactéries à leur environnement. La majorité de ces micro-organismes vivent en symbiose avec l'humain, jouant par exemple un rôle clef dans la digestion. On parle alors de mutualisme ou de commensalisme dans le dernier cas. Les bactéries commensales, présentes dans les intestins, participent ainsi au bon déroulement de la digestion. De plus, la présence de ces bactéries, *a priori* inoffensives, dans l'organisme permet également d'empêcher l'installation d'une flore qui serait, elle, pathogène.

Toutefois, lorsque certaines de ces bactéries commensales traversent les barrières naturelles de l'organisme, elles peuvent devenir pathogènes. C'est notamment le cas lorsqu'elles sont présentes dans des milieux théoriquement stériles, tels que l'urine ou le sang. On parle alors d'infection bactérienne. D'autres souches, intrinsèquement pathogènes, occasionnent une infection, quel que soit le foyer où elles sont présentes. Ces infections peuvent également survenir à la suite de plaies ou des épisodes d'affaiblissement du système immunitaire. De nombreux facteurs augmentent ainsi le risque de développer des infections : VIH, diabète, cancer⁵ en font entre autres partie. Les patients initialement hospitalisés pour une autre cause présentent une part croissante de ces infections alors dites nosocomiales.⁶⁻⁹

1.1.1.1 Bactériémie & sepsis : occurrences et incidences

Le sang est un milieu biologique normalement stérile. Lorsqu'il est infecté par des bactéries circulantes, on parle alors de bactériémie. Ces infections bactériennes se montrent souvent transitoires, car elles sont rapidement éliminées grâce à une réponse adaptée du système immunitaire. Ces contaminations passagères du sang, aussi appelées bactériémies physiologiques sont effectivement très fréquentes à l'occasion de la digestion ou bien de coupures qui ouvrent l'accès à la circulation sanguine. Le brossage de dents en est une cause récurrente par exemple.¹⁰ Cependant, il existe des cas où l'infection n'est pas passagère. La décharge des bactéries depuis un foyer infectieux établi vers le sang va entraîner ce que l'on appelle une bactériémie symptomatique. Des dispositifs médicaux invasifs ou des cathéters peuvent également constituer des foyers primaires d'infection. Lorsque celle-ci évolue jusqu'à induire la défaillance de certains organes, on parle alors de sepsis.

Avant de présenter la dernière définition consensuelle en date du sepsis, il convient de préciser sous quelle forme se déclare une bactériémie. Cette dernière est la condition nécessaire à tout diagnostic

de sepsis, quelle que soit sa sévérité. Les bactéries présentes dans la circulation sanguine lors d'une bactériémie peuvent prendre plusieurs formes : planctoniques, encapsulées, de forme L, ou encore comme des fragments de biofilms.¹¹

Les bactéries sous forme planctonique sont généralement rapidement éliminées, notamment par oxydation au contact des érythrocytes.¹² Les souches de bactéries pathogènes causant des sepsis ont évolué pour résister à ce mécanisme. Elles forment par exemple souvent des pores à la surface des globules rouges grâce aux hémolysines.^{11,13,14} Cela permet à ces bactéries de coloniser l'intérieur des érythrocytes, formant ainsi un réservoir infectieux pouvant se disséminer dans la circulation sanguine.

Les bactéries de forme L ont été isolées en 1935 pour la première fois par KLIENEGER^{15,16} du *Lister Institute*, ainsi nommées d'après son laboratoire. Elles sont caractérisées par une paroi cellulaire absente ou quasi inexistante.¹⁷ Dans le cas de bactéries à Gram positif, elles peuvent aussi être appelées protoplastes, tandis qu'elles seront nommées parfois sphéroplastes pour les bactéries à Gram négatif. Cependant, quel que soit le Gram d'origine de la bactérie, sa coloration sera toujours négative sous cette forme. Leur formation peut dériver par exemple d'une atteinte au mécanisme de synthèse des parois cellulaires à cause d'antibiotiques. Sous cette forme, les bactéries ne provoquent pas de réaction du système immunitaire,¹⁸ et peuvent persister longtemps dans l'organisme.¹⁹ La forme encapsulée des bactéries, souvent caractérisée par la présence d'une épaisse paroi polysaccharidique, leur confère une grande résistance aux antibiotiques et aux attaques du système immunitaire.²⁰ Cette forme est avant tout un moyen de dissémination depuis un foyer d'infection primaire. Bien que sous cette forme les bactéries ne contribuent généralement pas directement à la virulence bactérienne, elles y participent tout de même indirectement.²¹

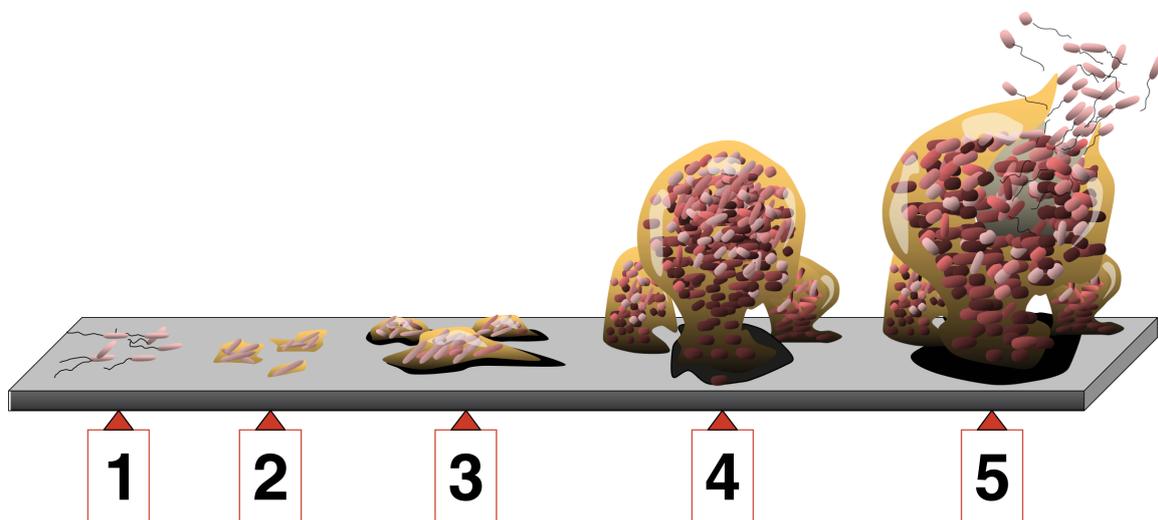


Figure 1.1 – Processus d'établissement et de vieillissement d'un biofilm. 1 – Adhésion initiale réversible de bactéries planctoniques; 2 – Adhésion irréversible en amas; 3 – Apparition de microcolonies; 4 – Maturation; 5 – Détachement partiel pour former de nouveaux biofilms. Chaque étape est illustrée par une microphotographie d'un biofilm de *P. aeruginosa*. D'après MONROE.²²

Toutefois les bactéries sous ces formes ne peuvent que difficilement se multiplier au sein du sang circulant.¹² La présence de foyers d'infection est donc primordiale pour provoquer une bactériémie symptomatique. Les biofilms jouent un rôle prépondérant en tant que source de bactéries circulantes dans

le sang, que ce soit des cellules uniques ou des fragments de biofilm.²³ Si les définitions sont multiples dans la littérature, une définition générale peut être donnée en caractérisant les biofilms comme un assemblage de micro-organismes localisé à une interface (liquide/air, liquide/solide ou solide/air).²⁴ L'assemblage s'effectue le plus souvent sous la forme d'une matrice extracellulaire polymérique. Ce mode de croissance est le plus fréquent dans la nature.²⁵ Il constitue pour les bactéries un moyen de défense et de survie très efficace dans des milieux hostiles,²⁶⁻²⁸ diminuant notamment l'effet des antibiotiques sur les matrices ainsi formées.²⁹ La figure 1.1 donne les étapes principales du développement d'un biofilm. L'établissement de ces colonies dans des tissus de l'organisme ou au sein de dispositifs médicaux est donc une des sources principales d'infection.³⁰ D'après les *National Institutes of Health*, 80% des infections microbiennes chroniques et 65% des infections bactériennes au total sont liées à la présence de biofilms.^{31,32}

Ce qu'il convient de retirer de ces constats, c'est avant tout la diversité des formes que peuvent prendre les bactéries circulant dans le sang lors d'une bactériémie.

1.1.1.2 Définition et épidémiologie du sepsis

Le consensus autour d'une première définition du sepsis en 1991³³ a permis de mener des études épidémiologiques rigoureuses autour de cette affection connue depuis l'antiquité.³⁴ Le sepsis a ainsi pu être reconnu comme une cause majeure de décès, notamment lors de séjours hospitaliers.^{35,36} De façon plus large, ce serait la septième cause de décès en Europe et en Amérique du Nord.³⁷ En fonction des sources et des estimations, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que les cas annuels reportés iraient de 15 à 55 millions,³⁸ dont environ 5 à 6 millions mèneraient à la mort.³⁹ D'après une méta-analyse de FLEISCHMANN et al., dans les pays à haut revenu (Amérique du Nord, Europe et Australie), il y a eu en moyenne 436 cas annuels pour 100 000 personnes sur les quarante dernières années.⁴⁰ En prenant en compte uniquement la dernière décennie, cette moyenne monte à 707 cas par an. De telles études à l'échelle de la population n'existent pas pour les pays à moyen ou bas revenu, toutefois il faut estimer que les incidences du sepsis y sont supérieures à celles évoquées ici.⁴¹ La mortalité varie elle aussi grandement en fonction de la zone géographique. Elle est aujourd'hui évaluée entre 15 et 35% dans les pays à haut revenu.⁴¹ Cependant, dans les pays aux ressources limitées, celle-ci est encore de l'ordre de 80%.⁴² En plus des facteurs de comorbidité déjà évoqués (cancer, VIH), d'autres rentrent en jeu. L'âge est un des principaux facteurs de risque d'infection bactérienne et donc du sepsis. En effet, les nouveau-nés présentent un système immunitaire encore fragile,⁴³ tandis que le vieillissement entraîne l'affaiblissement de ce dernier, par le processus appelé immunosénescence.⁴⁴ Notamment dans les pays industrialisés, l'âge marque une différence importante dans les populations touchées par le sepsis : l'incidence y est de 95 cas pour 100 000 personnes en dessous de 65 ans, contre 1220 cas pour les plus de 65 ans.⁴⁵ À noter par ailleurs qu'il existe une légère dissemblance entre les sexes, les hommes étant plus prompts à contracter un sepsis.⁴⁶

La compréhension du sepsis est en progression constante sur les dernières décennies.⁴⁷ Sa dernière définition consensuelle, dénommée « Sepsis-3 », a été adoptée en 2016 par un groupe de travail international de 19 experts en soins intensifs issus de l'*European Society of Intensive Care Medicine* et de la *Society of Critical Care Medicine*.⁴⁸ Le « pré-requis » à tout épisode de sepsis reste la bactériémie. Le sepsis est déclaré lorsque l'infection bactérienne entraîne le dysfonctionnement d'un organe jusqu'à

menacer le pronostic vital d'un patient, tout en étant lié à une réponse dysrégulée du système immunitaire de l'hôte.⁴⁸ Le dysfonctionnement d'un organe est alors évalué selon le score SOFA (*Sepsis-related Organ Failure Assessment*), qui fournit une échelle de 0 à 4 avec des critères différant en fonction des organes.⁴⁹ Les systèmes respiratoire, cardiovasculaire, hépatique, rénal, neurologique et coagulant sont tous pris en compte dans ce score. Un organe présentant un score supérieur ou égal à 2 est considéré comme défaillant. L'introduction de l'utilisation de ce score vient remplacer la notion de syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS). Les signes liés au SRIS (température anormale, fréquences cardiaque et respiratoire élevées, etc.) sont toujours retrouvés dans le cadre de sepsis, mais peuvent persister une fois l'infection soignée, d'où l'abandon de leur utilisation pour déclencher un diagnostic de sepsis. À noter qu'en cas d'impossibilité d'évaluer le score SOFA, il existe un test appelé *quickSOFA*, utilisable en urgence.⁴⁸ Celui-ci est basé sur trois constats cliniques chez le patient suspecté d'infection : l'hypotension artérielle, une respiration à fréquence élevée et une altération de la conscience. La présence de ces critères est suffisante pour déclencher la recherche de pathogènes dans le sang du patient.

Les cas graves de sepsis correspondent à la notion de choc septique. Cela se traduit alors soit par des anomalies métaboliques soit avec le dysfonctionnement du système circulatoire. Le choc septique est ainsi déclaré lorsque plusieurs symptômes sont réunis chez le patient. Tout d'abord, la concentration de lactate dans le sang est alors supérieure à 2 mmol.l^{-1} . Ensuite, le patient doit présenter une hypotension artérielle telle qu'il est nécessaire de prescrire des vasopresseurs pour la maintenir supérieure à 65 mmHg . Enfin, ces constats doivent être réalisés alors que le volume sanguin du patient n'a pas varié. Le choc septique est alors déclaré. Il entraîne généralement une mortalité plus élevée que celle du sepsis, supérieure à 40%.⁴⁸ Par ailleurs, il faut noter que la notion de *sepsis sévère*, quoique théoriquement évacuée par la définition de 2016, se retrouve toujours dans certains articles. Les définitions consensuelles précédentes à celle de 2016 définissaient le *sepsis sévère* comme un intermédiaire entre sepsis et choc septique. Son utilisation dans la littérature rend ce terme parfois substituable au terme de choc septique.

Le tableau 1.1 résume les définitions des bactériémies, sepsis et chocs septiques.

Diagnostic	Définition et symptômes
Bactériémie	Présence continue ou transitoire de bactéries dans le sang.
Sepsis	Infection (bactériémie par exemple) entraînant un dysfonctionnement d'un ou plusieurs organes, à cause de la réponse dérégulée du système immunitaire (peut être identifié par un score SOFA ⁴⁹ supérieur ou égal à 2)
Choc septique	Sepsis accompagné d'anomalies métaboliques. Se caractérise notamment par le besoin de prescrire des vasopresseurs pour maintenir la pression sanguine, ainsi qu'une lactatémie supérieure à 2 mmol.l^{-1}

Tableau 1.1 – Définition de bactériémie d'après le référentiel en microbiologie médicale français.⁵⁰
Définitions consensuelles « Sepsis-3 », d'après SINGER et al..⁴⁸

L'augmentation de la taille des populations à risque, notamment grâce aux progrès de la médecine qui prolongent la durée de vie, fait du sepsis un risque de plus en plus marqué.⁵¹ Par ailleurs, l'incidence toujours plus grande des bactéries résistantes aux antibiotiques vient également augmenter la mortalité de

ces épisodes.⁵²⁻⁵⁴ Certaines projections estiment que l'augmentation des décès liés à l'antibiorésistance mènera à 10 millions de décès par an en 2050.⁵⁵ Il reste toutefois délicat de réellement estimer l'évolution de la mortalité liée à ce phénomène, les projections étant soumises à nombre d'aléas.⁵⁶

Au-delà de la mortalité immédiatement liée au sepsis, les conséquences à long terme sur les survivants sont par ailleurs très lourdes.⁵⁷⁻⁵⁹ Six mois après un épisode de sepsis sévère, 41,6% des patients ne peuvent plus vivre sans aide à la personne.⁵⁹ La mortalité sur ce groupe s'élève à plus de 45% un an après l'infection.⁵⁹ Les épisodes de sepsis sont également souvent liés à l'apparition de troubles cognitifs persistants chez les survivants.⁵⁷ La conséquence principale est donc une augmentation de la mortalité de 22% par rapport aux populations d'âge similaire non hospitalisées.⁵⁸ De plus, économiquement les conséquences sont lourdes : en France en 2005, le traitement du sepsis coûtait en moyenne 22800€ par patient.⁶⁰ En l'an 2000 au Canada ou en Europe, le coût d'une journée d'hospitalisation d'un patient atteint de sepsis représentait entre 710€ et 1033€. ³⁸ En 2007, à l'échelle de l'Union Européenne, le coût total des infections liées aux bactéries multi résistantes seules est estimé à plus d'1,5 milliard d'euros.⁶¹ Le diagnostic et l'administration rapides d'un traitement adapté permettent de réduire ces couts.⁶²

En réaction à ces constats, l'Organisation Mondiale de la Santé a adopté en 2017 une résolution reconnaissant le sepsis comme une priorité pour la santé à l'échelle mondiale.^{38,63} Cette initiative rejoint des mouvements préexistants, initiés par les professionnels de la santé, telle que la campagne « *Surviving Sepsis* ». ^{64,65} Bien que les recommandations à suivre notamment concernant l'application de l'antibiothérapie soient sujettes à débat,⁶⁶⁻⁶⁸ l'intérêt d'un diagnostic rapide et fiable est reconnu comme indispensable.^{62,69-71}

1.1.2 Bactéries pathogènes : quelle flore est impliquée dans le cadre des sepsis ?

1.1.2.1 Les espèces pathogènes liées aux infections bactériennes

Quelle que soit la définition ou la sévérité d'un épisode de sepsis, les prémices passent nécessairement par une infection du patient par des micro-organismes. Mener à bien le diagnostic nécessite d'identifier les pathogènes causant la bactériémie. Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons uniquement sur la détection des sepsis liés aux bactériémies et éliminons donc les incidences liées à des levures (*Candida* généralement) ou des parasites. Avant toute chose, il faut rappeler que les façons de rapporter les infections et les particularités locales entraînent des différences marquées d'une région à l'autre.^{56,61,69} Deux études sont donc présentées ici pour témoigner de la variété de la flore bactérienne rencontrée dans les bactériémies en général ou lors de sepsis plus précisément.

Le tableau 1.2 présente les épisodes de bactériémie rapportés en Angleterre sur deux années (2004 et 2008) . Ces résultats, basés sur des méthodes identifiant un spectre large de pathogènes, permettent de constater les espèces couramment rencontrées. À noter que les staphylocoques à coagulase négative, bactéries commensales présentes sur la peau sont généralement des contaminants et donc des faux-positifs lors des hémocultures.

Toutefois, nous l'avons vu, une bactériémie n'entraîne pas nécessairement un sepsis. Le tableau 1.3 présente l'évolution de l'incidence des sepsis bactériens pour 5 pathogènes majeurs à l'échelle européenne. Par ailleurs, les incidences d'*E. coli* et *S. aureus* sont en proportions très supérieures à celles des autres pathogènes rencontrés. Elles représentent ici respectivement 47% et 28% des sepsis causés par les cinq

Pathogène	2004		2008	
	Nombre de cas	%	Nombre de cas	%
<i>E. coli</i>	12 579	18,8	16 663	23,3
SCN*	9086	13,5	10 165	14,2
<i>S. aureus</i>	11 370	17,0	8660	12,1
<i>Enterococcus</i> spp.	4980	8,1	4531	6,3
<i>Klebsiella</i> spp.	3739	5,6	4274	6,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3616	5,4	3415	4,8
<i>Pseudomonas</i> spp.	2290	3,4	2829	4,0
Proteus	1859	2,7	2101	2,4
<i>Enterobacter</i> spp.	1812	2,4	1653	2,3
<i>Streptococcus</i> groupe B	879	1,3	1135	1,6
<i>Bacteroides</i> spp.	909	1,4	978	1,4
<i>Streptococcus</i> (groupe <i>mitis</i>)	864	1,4	818	1,1
Sous-total	53 983	80,9	57 222	80,1
Autres pathogènes	12 704	19,1	14 246	19,9
Total	66 687	100	71 468	100

*. SCN = staphylocoques à coagulase négative

Tableau 1.2 – Nombre de cas et proportions des pathogènes rencontrés lors de bactériémies en Angleterre en 2004 et 2008. Les données proviennent de 137 laboratoires différents.⁷²

pathogènes majeurs. Il convient évidemment de rappeler que chacune de ces espèces peut recouvrir un nombre très large de souches et phénotypes. En outre, certaines espèces telles que *Pseudomonas* ou *Klebsiella* sont absentes de ces données, car bien que présentes lors de bactériémies (tab. 1.2), l'infection due à ces pathogènes est généralement localisée dans le système respiratoire et ne provoque ainsi pas nécessairement un sepsis.

Pathogène	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
<i>E. coli</i>	20 151	22 620	24 371	27 328	29 543	30 931	32 194
<i>S. aureus</i>	15 422	17 325	17 550	18 003	18 210	18 665	18 894
<i>S. pneumoniae</i>	5725	6674	6721	7458	7041	7421	7555
<i>E. faecalis</i>	3679	4309	4625	5201	5837	6012	6105
<i>E. faecium</i>	1118	1374	1563	2091	2541	2938	3128

Tableau 1.3 – Nombre total d'infections rapportées par le système européen de surveillance de la résistance antimicrobienne entre 2002 et 2008. Données collectées auprès de 136 laboratoires européens, issus de 12 pays différents.⁷³

De plus, il faut noter qu'environ 10% des bactériémies sont liées à la présence simultanée de plusieurs souches.⁷⁴ Ces dernières entraînent une mortalité environ deux à trois fois plus élevée.^{75,76} La présence

concomitante de plusieurs espèces rend leur identification plus complexe, notamment pour les automates.⁷⁷

Les différentes données présentées dans ces tableaux confirment ce qui a déjà été évoqué : l'incidence du sepsis augmente au court du temps. Un des facteurs majeurs de cette évolution est la résistance aux antibiotiques.⁷³ Celle-ci complique grandement le traitement des infections bactériennes.^{73,78,79} Cette résistance est partiellement liée à la mise en place d'une antibiothérapie inadaptée, car à large spectre, notamment en début de traitement.⁶⁹ Dans le cadre du réseau EUROACT, les résultats montrent par exemple qu'une moitié des souches isolées étaient multi résistantes et 22% extrêmement résistantes (sur un total de 1156 isolats).⁶⁹ Si le constat que seules 5 souches étaient pan résistantes, soit 0,43% des patients touchés, peut être rassurant, il reste que les antibiotiques de seconde ligne alors utilisés sont généralement plus chers ou difficiles d'accès.⁸⁰

La situation telle que décrite peut ainsi faire craindre un retour à un monde dépourvu d'antibiotiques efficaces.⁵⁵ Toutefois, il faut souligner que d'une part de nombreuses alternatives aux antibiotiques sont en développement⁸¹ et d'autre part, le constat est possiblement faussement alarmiste.⁵⁶ Néanmoins, tout effort orienté vers la diminution de la pression de sélection exercée par les antibiotiques sera bénéfique pour conserver leur efficacité et limiter la progression de l'antibiorésistance. Un processus rapide de détection des bactéries dans le sang, lié à une identification des souches et des résistances afin de confirmer l'antibiothérapie appliquée, est ainsi une voie intéressante.

1.1.2.2 *E. coli* et *S. aureus* : pathogènes les plus récurrents

Escherichia coli et *Staphylococcus aureus* sont, comme on l'a vu auparavant, les deux pathogènes les plus souvent rencontrés lors des épisodes de sepsis.^{36,82,83} Ils seront pris comme cas d'étude dans le cadre de cette thèse.

Escherichia coli

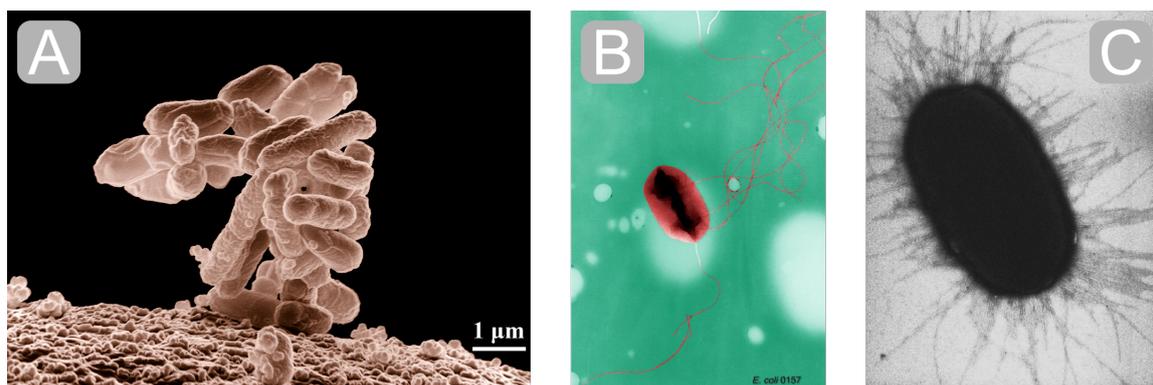


Figure 1.2 – A – Micrographie d'*E. coli* sous forme de microcolonie, magnifiée 10 000 fois, on remarque la forme de bacille caractéristique et l'absence de flagelles dans cet état. B – Micrographie électronique colorisée d'une bactérie d'*E. coli* O157:H7, obtenue par la technique de pseudo-réplique, les flagelles sont clairement visibles sur cette bactérie planctonique. C – Micrographie électronique d'une cellule d'*E. coli* accrochée en surface par ses fimbriae (ou pili).*

*. A – Image par E. Erbe et C. Pooley (USDA, ARS, EMU) : accessible sur commons.wikimedia.org/wiki/File:E_coli_at_10000x,_original.jpg. B – Image par E. H. White, fournie par P. S. Hayes : accessible sur phil.cdc.gov/details.aspx?pid=9995. C – Image par M. Forero : accessible sur doi.org/10.1371/journal.pbio.0040314.g001; dernière consultation le 19 août 2019

E. coli O1:K1:H7 et *E. coli* O157:H7. Cette dernière est une des souches les plus virulentes dans le cadre d'infections alimentaires.⁹⁵ Il s'agit d'une souche dite entérohémorragique, produisant des shigatoxines responsables notamment de colites hémorragiques et de très fortes douleurs abdominales. *E. coli* O1:K1:H7 est considérée en tant que souche type, prise comme référence pour la description de nouveaux isolats. Initialement isolée depuis l'urine, elle est depuis octobre 2016 classée par l'ATCC en tant que pathogène de classe 2.⁹⁶

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus est un coque à Gram positif, dont le diamètre est généralement compris entre 0,7 et 1,2 micromètre. Il se présente sous la forme d'amas de plusieurs cellules en grappes de raisin (voir figure 1.4–A). *S. aureus* n'est ainsi pas une bactérie motile, ses déplacements seront donc dépendants du mouvement brownien et de la diffusion en milieu statique. Le staphylocoque doré se retrouve fréquemment dans la population : environ la moitié est colonisée de façon transitoire ou permanente.⁹⁷ Le site préférentiel d'établissement pour *S. aureus* est la cavité nasale. Il se retrouve également parfois sur la peau ou d'autres muqueuses.⁹⁸ Sa persistance se fait alors en symbiose de manière asymptomatique.

Toutefois, il s'agit d'un pathogène opportuniste redoutable. Comme le montre la figure 1.3, en plus de son implication lors de bactériémies, il s'agit aussi de la bactérie la plus fréquemment isolée lors des infections de la peau et du système respiratoire. Les bactériémies dues à *S. aureus* culminent le plus souvent dans la formation d'abcès.⁹⁹ La présence d'agglutinines en surface de *S. aureus* lui permet effectivement de se fixer à la fibrine (voir figure 1.4–B) qui aura polymérisé suite à la coagulation, menant ainsi aux abcès. De plus, *S. aureus* sécrète des coagulases qui vont également entraîner la cascade de coagulation du plasma sanguin. Ces deux mécanismes sont parmi les principaux facteurs de virulence expliquant la pathogénicité élevée du staphylocoque doré.

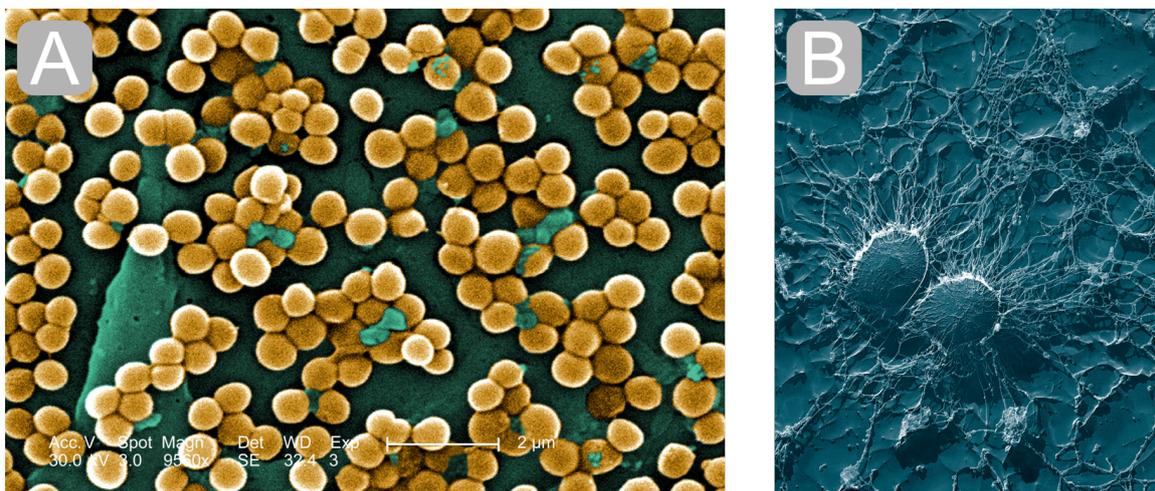


Figure 1.4 – A – Image colorisée obtenue au microscope électronique à balayage de grappes de *S. aureus* résistant à la méticilline, magnifiée 9560 fois. B – Image au microscope électronique en transmission de deux cellules de *S. aureus* partiellement encapsulées dans la fibrine suite à leur accroche sur une surface, magnifiée 50 000 fois, obtenue par cryofracture.*

*. A – Image par J. H. Carr (CDC) : accessible sur commons.wikimedia.org/wiki/File:CDC-10046-MRSA.jpg. B – Image par E. Erbe et C. Pooley (USDA, ARS, EMU) : accessible sur commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus,_50,000x,_USDA,_ARS,_EMU.jpg ; dernière consultation le 19 août 2019.

Cliniquement, deux sous-familles principales sont distinguées, en fonction de la résistance ou non des souches à la méticilline. On parle donc de *S. aureus* sensible ou résistant à la méticilline, soit SASM et SARM. Cette résistance se retrouve dans environ 10 à 30 % des cas rapportés.¹⁰⁰⁻¹⁰² Il faut toutefois signaler qu'il existe des différences régionales très marquées dans la répartition de cette souche résistante, qui peut alternativement remplacer partiellement voire totalement le SASM.¹⁰⁰ Enfin, grâce aux contrôles systématiques effectués sur les patients entrant dans les établissements hospitaliers,¹⁰³ la présence du SARM est en diminution.^{92,104} Cependant, le coût de ce dépistage pose question,¹⁰⁵ tout comme le fait qu'il ne permette pas de diminuer l'incidence globale des bactériémies à *S. aureus*. Toutefois, il ne faut pas sous-estimer la mortalité du SASM.¹⁰⁶ Pour ces raisons, deux souches seront incluses dans les travaux à venir : une sensible à la méticilline et l'autre résistante.

1.2 Les méthodes de diagnostic des bactériémies

1.2.1 L'hémoculture comme étape d'enrichissement

1.2.1.1 Les contraintes de la détection d'une bactériémie

Quel que soit le pathogène en cause lors d'une bactériémie, la concentration de bactéries cultivables dans le sang reste toujours très faible, notamment chez les adultes. Celle-ci dépasse en effet rarement quelques bactéries par millilitre de sang et peut descendre à moins d'une bactérie viable pour dix millilitres.¹⁰⁷ Dans le cadre de bactériémies survenant lors des premiers mois de la vie, cette concentration peut alors s'avérer plus élevée, atteignant quelques centaines voire milliers d'UFC.ml⁻¹. Ceci permet de réduire le volume de sang prélevé chez les nourrissons, des préconisations concernant le volume optimal en fonction du poids de l'enfant existent à cette fin.⁵⁰ Le sang est en effet un milieu par essence antibiotique¹² et cette résistance du système immunitaire passe aussi par l'acquisition de nouvelles défenses au cours du développement. Cela explique pourquoi les bactériémies infantiles montrent généralement des concentrations plus élevées.

Nous allons le voir, cette faible concentration, liée à la complexité du milieu sanguin, explique en grande partie pourquoi la détection des bactéries dans le sang pose problème. En effet, dans le cadre clinique, aucune méthode à l'heure actuelle ne permet de diagnostiquer en quelques heures une bactériémie à partir d'un échantillon sanguin. Une étape d'enrichissement bactérien est inévitable pour parvenir à obtenir un nombre de bactéries permettant la détection. Ce étape d'enrichissement est assurée par la mise en culture du sang, plus couramment nommée hémoculture. La stratégie optimale de mise en place d'un tel procédé est sensible à de nombreux facteurs. D'une part le volume prélevé doit être suffisamment élevé pour contenir au moins une bactérie unique viable. Or, la concentration bactérienne dans le sang du patient varie au cours du temps.¹⁰⁷ Le volume prélevé doit donc être suffisamment élevé pour maximiser la probabilité de présence d'au moins une unité formant colonie dans l'échantillon, afin d'éviter d'aboutir à un faux-positif à l'issue de l'enrichissement – c'est-à-dire l'absence de bactéries alors qu'il y en a à concentration faible dans le sang du patient.

Au-delà du volume prélevé, les conditions de prélèvement et de culture vont également importer. Tout d'abord, des recommandations existent sur le moment optimal auquel prélever le sang, afin de maximiser la concentration bactérienne obtenue. Une poussée de fièvre, de la tachycardie ou des frissons peuvent

ainsi être des marqueurs. En plus du volume, le nombre de prélèvements effectués a son importance. Les recommandations se tournent vers le prélèvement de quatre fois 20 millilitres, répartis dans deux bouteilles différentes, afin de mener parallèlement des cultures aérobie et anaérobies.^{108,109} Par ailleurs, le nombre de prélèvements effectués sur une période de 24 heures permet aussi d'augmenter la probabilité d'un diagnostic correct.⁵⁰ Cependant ces prélèvements peuvent être simultanés, afin de diminuer l'inconfort du patient. Enfin, la composition du milieu de culture, ainsi que le ratio entre le volume de celui-ci et le volume de sang prélevé, ont évidemment une grande importance. La partie 4.1.2 permettra d'aborder plus en détail ce point. Il faut souligner qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas au niveau international de protocole standardisé concernant les prélèvements sanguins et l'hémoculture qui s'en suit. Chaque solution de diagnostic proposée par un industriel va ainsi suivre une méthodologie différente de ses concurrents, que ce soit dans la composition du milieu, la méthode de détection ou encore le volume prélevé sur le patient. La suite de ce chapitre va permettre de présenter les solutions actuellement employées en routine.

1.2.1.2 Détection automatisée de la présence de pathogènes dans l'hémoculture

La mise en place d'une hémoculture adéquate peut permettre de détecter la présence anormale de pathogènes dans le sang et ainsi confirmer la bactériémie. En ce sens, le diagnostic microbiologique moderne reste en cohérence avec les premiers postulats établis par Robert Koch en 1890 : un pathogène doit pouvoir être isolé afin de traiter efficacement la maladie qu'il cause. Bien évidemment, la compréhension du vivant et les méthodes ont depuis évolué,^{110,111} mais dans le cadre des bactériémies, l'hémoculture conduisant à un ou plusieurs isolats reste la méthode étalon.

Une fois les échantillons prélevés dans différents flacons, l'incubation de ces derniers est réalisée dans des automates spécialisés. Ils maintiennent la culture à 35°C et dans les conditions d'agitation optimales. Trois types d'automates commerciaux occupent la majorité du marché à l'heure actuelle : les systèmes BACT/ALERT (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), VersaTREK (TREK diagnostics systems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, États-Unis d'Amérique) et BD BACTEC (Becton Dickinson, le Pont de Claix, France).⁸³ Ce sont ces automates qui permettent de détecter de façon indirecte la présence de bactéries en surveillant l'activité respiratoire liée à leur croissance lors de l'hémoculture. En effet, du dioxyde de carbone est rejeté par les pathogènes en croissance, ce qui va provoquer une acidification du milieu.¹¹² Ainsi, deux voies principales sont utilisées pour la détection : soit un capteur de pH soit un capteur qui détecte des changements de pression. Les flacons d'hémoculture BACTEC et BACT/ALERT sont tous deux basés sur la variation de pH, par le biais d'un capteur colorimétrique en fond de bouteille, qui sera lu toutes les 10 minutes. Le système VersaTREK est lui basé sur les variations des différents gaz liés à la respiration – notamment la consommation du O_2 et la production du CO_2 .

Le fait que la présence des pathogènes soit détectée grâce au suivi des variations de différents paramètres physico-chimiques explique pourquoi il n'est pas recommandé de pré-incuber à 35°C les flacons dès le prélèvement.⁵⁰ En effet, les automates sont encombrants et de fait seuls les laboratoires de microbiologie clinique en sont équipés. Lors de prélèvements sanguins réalisés dans des centres médicaux dépourvus de telles installations, il faut acheminer les flacons jusqu'à un automate. Pré-incuber les échantillons peut donc potentiellement faire saturer les capteurs, qui n'observeront alors aucune variation de signal, causant ainsi un faux-négatif.

Pour les pathogènes les plus courants, la détection est réalisée en moins de deux jours dans la majorité des cas (figure 1.5). Les hémoculture sont toutefois poursuivies pour 5 jours *a minima*, afin de détecter des levures comme *Candida*, voire plus si le clinicien suspecte la présence d'un micro-organisme à croissance lente comme des champignons par exemple.⁵⁰ Quoi qu'il en soit, pour les pathogènes les plus courants, la détection est réalisée en moins de deux jours dans une majorité des cas (figure 1.5).

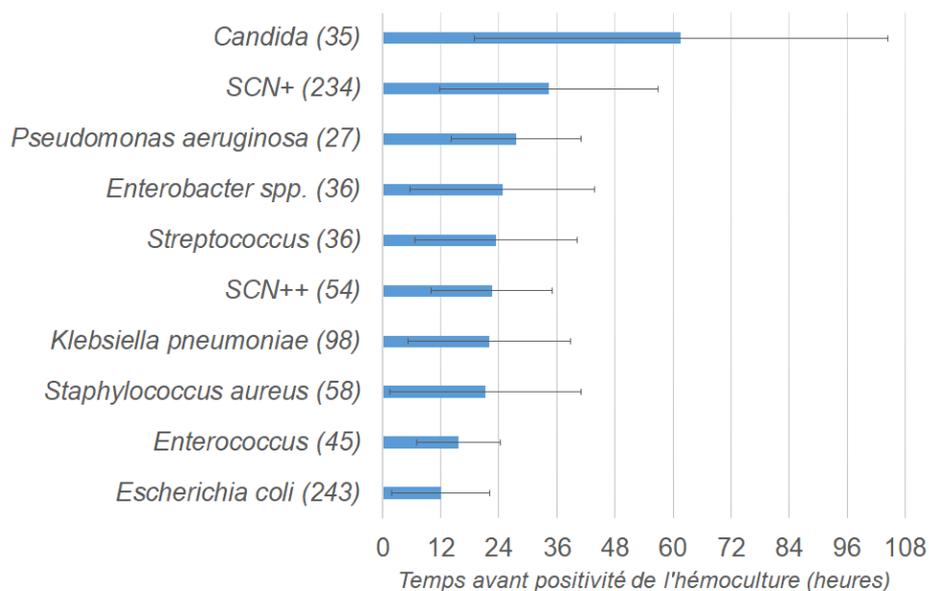


Figure 1.5 – Temps moyens avant positivité de l'hémoculture pour des pathogènes communs. Les temps sont pris pour chaque patient sur la culture la plus précoce entre l'aérobie et l'anaérobie. Les barres d'erreur représentent deux fois l'écart-type. Le nombre de cas recensés pour chaque micro-organisme est précisée entre parenthèses. SCN+ et SCN++ correspondent aux staphylocoques à coagulase négative respectivement simple ou multiple. Données d'après NING et al..¹¹³

L'étape d'hémoculture permet donc d'enrichir l'échantillon sanguin, pour confirmer ou non la présence de pathogènes. En cas de positivité, la concentration bactérienne atteinte lors de la détection est de l'ordre de 10^7 à 10^8 UFC.ml⁻¹.¹¹⁴ Cependant, d'autres étapes seront nécessaires pour ajuster le traitement fourni au patient et parvenir à son rétablissement. Ces principales étapes sont l'identification du pathogène en cause, ainsi que la réalisation d'un antibiogramme. Les techniques majeures d'identification seront présentées ultérieurement. L'antibiogramme sert à déterminer la sensibilité du pathogène incriminé aux antibiotiques disponibles afin d'adapter au mieux le traitement du patient.

1.2.2 Méthodes cliniques conventionnelles d'identification des bactéries

L'arrivée ces dernières années de techniques moléculaires ainsi que de la spectrométrie de masse a changé la donne dans le diagnostic en microbiologie. Toutefois, les méthodes classiques, basées sur la culture, les colorations ou l'identification biochimique sont encore largement utilisées. Tout comme on l'a vu pour la détection de la croissance lors de l'hémoculture, la mise en œuvre de ces techniques classiques est également facilitée grâce à l'automatisation.

1.2.2.1 Confirmation par microscopie optique et coloration de Gram

Après avoir eu un signal positif des automates d'hémoculture, l'étape suivante consiste à extraire une partie de l'échantillon sanguin enrichi, pour confirmer la présence de bactéries par microscopie. L'observation de la morphologie des bactéries, ainsi qu'une coloration de Gram permettent donc de progresser dans l'identification du pathogène présent. La coloration de Gram consiste à fixer l'échantillon sur une lame, puis à colorer les cytoplasmes à l'aide du violet de gentiane, autrement appelé colorant de Gram. C'est la différence de composition des membranes qui permet une différenciation dans la coloration (voir figure 1.6). Le rinçage des lames à l'alcool vient ensuite décolorer les membranes des bactéries à Gram négatif, dont la paroi majoritairement lipidique est perméable à l'alcool. Les bactéries à Gram positif, au contraire, retiennent le colorant à cause de leur composition membranaire riche en peptidoglycane. Afin de pouvoir observer les bactéries à Gram négatif plus aisément, il est possible de procéder à une autre coloration, par exemple à la safranine, afin de les faire apparaître en rose au microscope.

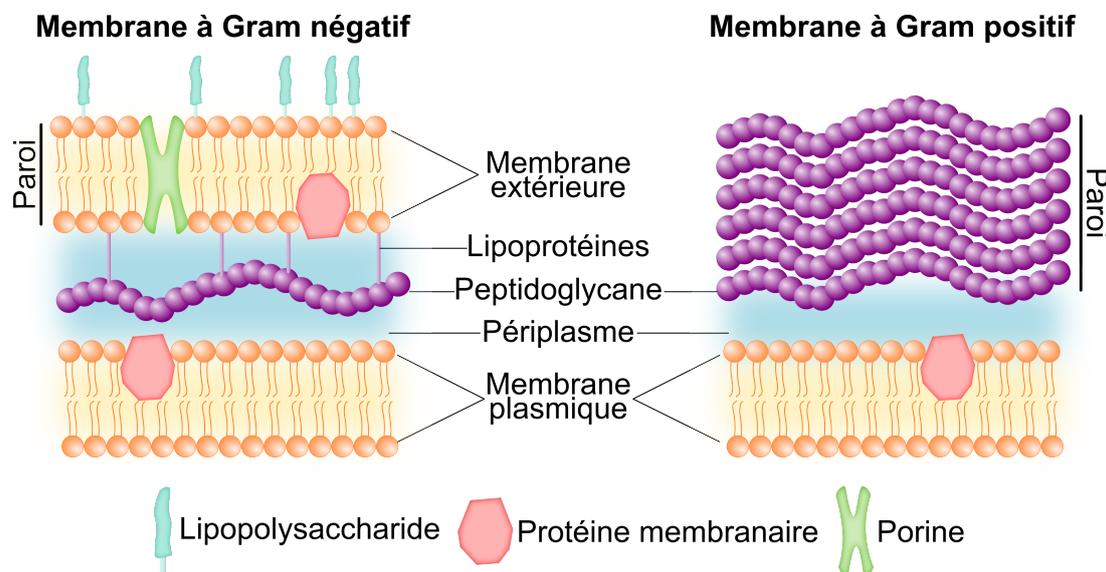


Figure 1.6 – Composition schématique des membranes bactériennes en fonction de leur coloration de Gram.

Cette coloration, en plus de l'observation la morphologie des bactéries (coques, bacilles ou hélicoïdales) vient donc confirmer le diagnostic positif d'une bactériémie et évite des faux-positifs. De plus, il s'agit d'un premier pas vers l'identification permettant de préciser le type d'antibiotiques à utiliser. Si le test de Gram est relativement rapide à effectuer, en quelques dizaines de minutes, il requiert d'être effectué par un opérateur qualifié ou bien par un automate dédié. Ces automates ne sont toutefois pas répandus, bien qu'ils pourraient permettre de réaliser les colorations de Gram en dehors des heures de routine de laboratoire.¹¹⁵ De plus, dans la moitié des cas environ, la coloration de Gram permet de corriger l'antibiothérapie empirique avant de réaliser les tests de sensibilité aux antibiotiques.¹¹⁵ Toutefois, une identification plus précise du pathogène reste nécessaire, la coloration de Gram n'étant qu'intermédiaire avant une identification complète.

1.2.2.2 Méthodes basées sur la culture : isolement, milieux sélectifs et caractères biochimiques

En plus de la microscopie optique et de la coloration de Gram, une autre aliquote du flacon d'hémoculture positive est étalée sur gélose solide pour procéder à l'isolement. D'une part, cela permet de déterminer si la bactériémie est mono ou polymicrobienne. En effet, dans les 10% des hémocultures qui contiennent plusieurs type de micro-organismes, les isoler permet donc de les caractériser individuellement. D'autre part, l'emploi de milieux solides sélectifs permet une identification plus précise des caractéristiques des pathogènes en cause. Cette étape requiert cependant à nouveau un temps d'attente lié à la croissance des bactéries, nécessaire pour obtenir des colonies sur gélose. Ceci peut prendre 12 à 24 heures supplémentaires d'incubation à 35°C pour des pathogènes à croissance rapide et plus de 72 heures dans les cas moins favorables.

Plusieurs compositions de milieux sont employables en fonction de la première identification qui a pu être faite.¹¹⁶ Tout d'abord, il s'agit souvent de milieux enrichis, par exemple avec du sang de mouton à 5%. Une première sélectivité peut être introduite par la variation de la composition du milieu : par exemple l'inclusion de sels à forte concentration va permettre uniquement aux coques à Gram positif de se développer. Cela peut être une première manière d'isoler les pathogènes, ce qui est notamment utile en cas d'infection polymicrobienne. La résistance aux antibiotiques courants peut également être décelée en les incorporant dans les géloses de culture ou en utilisant des indicateurs colorés. Ensuite, les milieux peuvent montrer une sélectivité envers certaines activités métaboliques. Dans ce cas, ce sont des substrats enzymatiques colorés spécifiques de certaines activités qui sont intégrés dans le milieu, on parle alors de milieu chromogènes. La digestion de ces substrats entraînera alors une coloration des colonies isolées. Commercialement, plusieurs gammes de géloses permettent l'identification de pathogènes courant directement par ce biais : chromID (bioMérieux) ou CHROMagar (Becton Dickinson) peuvent notamment être cités. Cependant, leur emploi n'est pas encore validé pour toutes les souches ciblées. Ces milieux chromogènes restent cependant intéressants pour procéder à l'isolement après une hémoculture positive, tout en obtenant des renseignements supplémentaires. Ils ne sont donc pas suffisants, mais restent des outils précieux à l'usage.¹¹⁷

Après ces étapes de croissance sur milieu solide, même chromogène, l'identification n'est pas encore totale. Il faut ensuite procéder à une mise en évidence de caractéristiques biochimiques précises pour connaître le genre et l'espèce des différents isolats obtenus. Cela passe notamment par la vérification de différentes activités enzymatiques mais également par le suivi de leur capacité à pousser sur une gamme précise de substrats. Longtemps effectués manuellement, ces tests sont apparus de façon automatisée au cours des années 70 avec le développement par bioMérieux des galeries API (pour *analytical profile index*). Celles-ci ont rendu ces tests miniatures mais surtout automatisés à la fois dans la préparation et la lecture des résultats. Le marché est occupé par trois principaux automates : Vitek 2 (bioMérieux), BD Phoenix (Becton Dickinson) et Micro-Scan WalkAway (Beckham Coulter). Ces automates fonctionnent à l'aide de cartes d'identification qui contiennent plusieurs dizaines de puits réactionnels, à l'intérieur desquels sont présents des substrats séchés (voir exemple en figure 1.7–C). Différentes cartes sont employables en

*. Les images A et B sont disponibles sur www.chromagar.com/products-chromagar-stec-focus-on-stec-e-coli-51.html. L'image C provient de http://academic.uprm.edu/~lrios/3725/Ejercicio%209_2017.pdf. Dernières consultations le 19 août 2019.

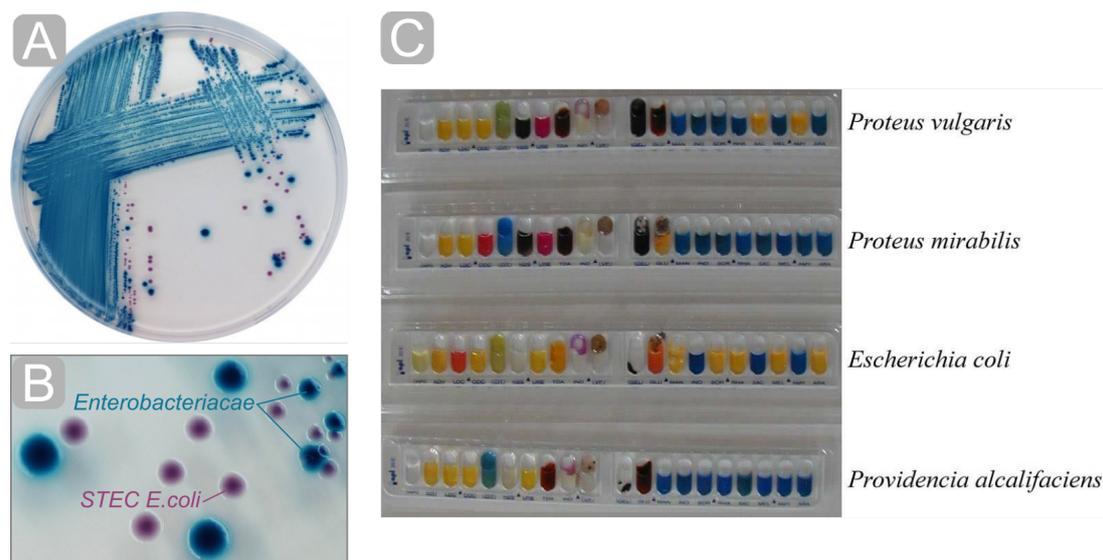


Figure 1.7 – Techniques d'identification basées sur la culture. A – Exemple d'un milieu chromogène : le CHROMagar STEC qui distingue les entérobactéries classiques des *E. coli* productrices de shigatoxines. B – Détail de la coloration obtenue sur le milieu CHROMagar STEC. C – Résultats obtenus sur la galerie API 20E pour quatre entérobactéries différentes.*

fonction des observations qui auront déjà été menées sur les isolats. L'introduction des isolats resuspendus dans une solution saline (généralement à une concentration de 0,5 McFarland, soit environ $1,5 \cdot 10^8$ UFC.ml⁻¹) vient resolubiliser ces substrats. L'automate lit ensuite optiquement la carte pour observer des changements de couleur ou de turbidité. Les performances de ces différents automates ont été largement comparées et commentées cliniquement et quelques heures suffisent alors à totalement identifier les pathogènes les plus courants. Cependant des pathogènes plus rares conduisent à une identification plus incertaine.¹¹⁸

1.2.2.3 Spectrométrie de masse

L'arrivée de la spectrométrie de masse depuis deux décennies a marqué un tournant dans la manière d'aborder le diagnostic microbiologique en laboratoire. L'emploi des spectromètres MALDI-TOF (« *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-Of-Flight* »), dont l'utilisation en microbiologie est représentée en figure 1.8, a en effet drastiquement facilité l'identification des souches de pathogènes à partir d'hémocultures positives.

L'analyse en spectrométrie de masse requiert d'avoir isolé une colonie, soit par culture solide soit par centrifugation d'une partie de l'hémoculture par exemple. Cet isolat est alors lysé, soit par contact avec la matrice soit avant d'être déposée sur la cible. L'analyse en MALDI-TOF donne alors une identification de l'échantillon, avec un niveau de confiance associé. Un score élevé signifie que l'identification est à la fois plus précise (à l'espèce) et plus probable. Des scores intermédiaires peuvent permettre d'identifier le pathogène au niveau de son genre par exemple, mais avec une probabilité plus faible. Enfin un score faible peut signifier soit qu'il s'agit d'une bactérie inconnue, soit que la lyse ne s'est pas produite, ce qui n'a pas libéré les éléments utiles à l'identification. Dans ce dernier cas, l'utilisateur en est informé et l'analyse peut être répétée ou bien d'autres méthodes sont alors employées. Ainsi, un protocole d'extraction, bien qu'il rallonge la durée de l'analyse, permet tout de même d'augmenter la probabilité d'une identification

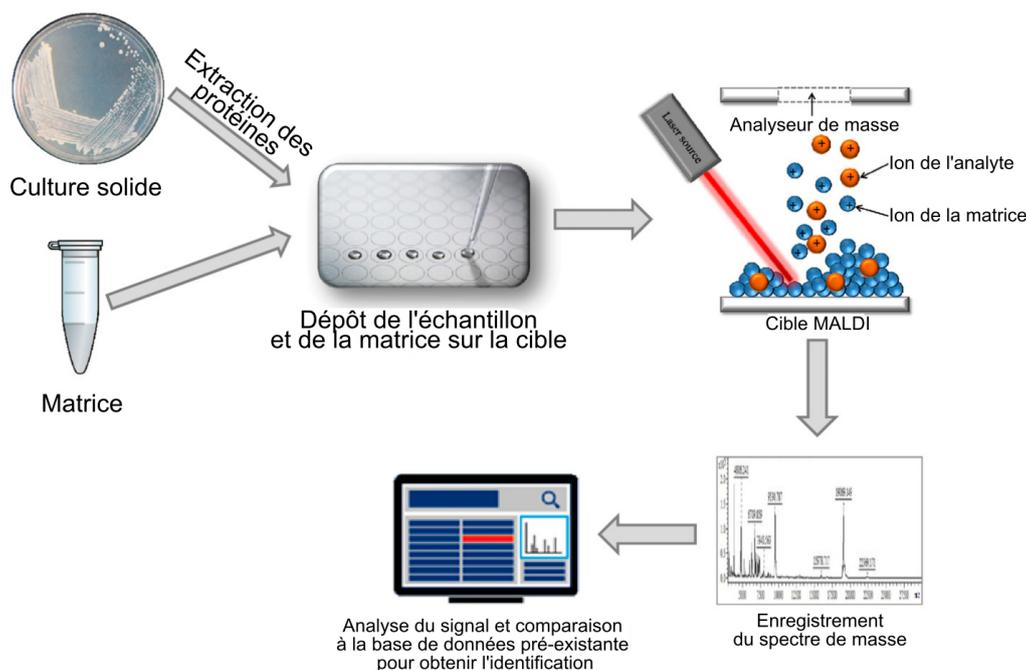


Figure 1.8 – Principe de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF en microbiologie. L'échantillon est obtenu à partir d'isolats de la culture solide, qui sont lysés pour en extraire les protéines. Ces lysats sont déposés sur la cible MALDI en présence de matrice. Le laser vient bombarder cette cible afin de désorber les éléments que renferme la matrice co-cristallisée avec l'échantillon. Les éléments désorbés sont alors chargés du fait de la matrice d'acides organiques utilisée. Le champ électrique qui entraîne les différents ions ainsi formé vers le récepteur au travers d'un vide. Le temps mis pour atteindre la cible dépend de la masse des éléments, les plus légers arrivant en premier. Le récepteur fournit alors un spectre de masse en ratio de masse sur charge (m/z), avec une intensité de pic variable selon l'abondance des éléments. L'identification se fait alors soit par lecture de la masse, soit par similarité avec une base de données pré-existante. Schéma traduit d'après BUSZEWSKI *et al.*¹¹⁹

fiable. L'utilisation de cette méthode en milieu clinique depuis maintenant une vingtaine d'années alimente une base de données de plus en plus large, ce qui vient réduire les erreurs d'identification, même sur les souches les plus rares. Deux principaux appareils se partagent le marché : le Vitek MS (bioMérieux) et le MicroFlex LT (Bruker Daltonics).

La méthode d'extraction des éléments constitutifs des bactéries, soit à partir de l'hémoculture, soit après culture solide, est l'élément clef pour améliorer la technique. La durée associée à ces cultures est le principal facteur limitant dans la mise en œuvre de l'analyse MALDI-TOF, qui se déroule en seulement quelques minutes. Il est communément admis que 10^5 à 10^6 UFC sont requises pour obtenir des spectres de qualité suffisante.^{120,121} Nous l'avons vu, un flacon d'hémoculture positive contient généralement 10^8 UFC.ml⁻¹, ce qui est donc suffisant pour éviter une culture sur gélose. Il est ainsi possible de prélever une partie de l'hémoculture positive afin qu'elle soit lysée et ensuite centrifugée ou filtrée pour récupérer les éléments nécessaires à l'analyse. Cette méthode fournit un résultat similaire à ceux obtenus en utilisant une colonie sur gélose dans environ 90% des cas.^{121,122} Au-delà de ça, la présence d'infections polymicrobiennes est de nouveau un problème. L'emploi de cultures solides reste donc pour le moment un moyen sûr d'obtenir un résultat fiable. De plus, cette phase de culture solide reste aussi nécessaire pour procéder par la suite aux antibiogrammes automatisés qui nécessitent une resuspension en

milieu salin des colonies. De façon intéressante, des systèmes ont été développés pour détecter sur gélose l'apparition des micro-colonies afin de pouvoir les prélever dès que possible et donc réduire le temps entre la fin de l'hémoculture, l'analyse MALDI-TOF et les tests d'antibiosensibilité. Par ailleurs, des approches pour évaluer la résistance aux antibiotiques grâce aux profils MALDI-TOF sont à l'étude.^{123,124} Cependant, dans un contexte clinique réel il n'est pas possible, à ce jour, d'identifier avec certitude des marqueurs de résistance par spectrométrie de masse.

L'emploi des spectromètres MALDI-TOF a donc diminué largement le temps entre la fin de l'hémoculture et l'identification des pathogènes, tout en accélérant le recours à une antibiothérapie adaptée.¹²⁵ Sans compter les économies qu'elle engendre, que ce soit par la diminution des consommables ou encore le coût faible de chaque analyse (moins de 1€). Ce sont autant de critères qui expliquent l'adoption massive de la spectrométrie de masse dans les laboratoires d'analyse clinique.¹²⁶ La connaissance croissante du protéome bactérien va également permettre un typage plus précis, peut-être jusqu'à la souche près.¹²⁷ Le domaine reste donc en développement constant.^{128,129} Toutefois, les spectromètres MALDI-TOF ne permettent pas d'obtenir une identification sans passer par une phase initiale d'enrichissement, le plus souvent en deux temps avec une hémoculture suivie d'un isolement sur gélose.

1.2.2.4 Méthodes moléculaires

La seconde « révolution » dans l'analyse microbiologique est arrivée avec l'émergence des méthodes de test basées sur l'analyse moléculaire. Leur émergence, parallèle à celle de la génomique, a donc mené à un nouveau paradigme dans l'identification de micro-organismes.¹¹⁰ Deux méthodes majeures existent, en fonction de leur emploi ou non de l'amplification de l'ADN bactérien présent dans l'hémoculture.

Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et puces à ADN

Ces techniques peuvent s'utiliser directement à partir d'une hémoculture positive et nécessitent un volume réduit d'échantillon, de l'ordre de quelques centaines de microlitres. Elles sont basées sur l'emploi de sondes qui vont se fixer spécifiquement sur des séquences particulières d'acides nucléiques. Le choix des sondes dépendra donc des informations dont le clinicien est déjà en possession, afin d'obtenir l'identification la plus précise possible. Selon les cas, il s'agit donc de déterminer par exemple l'espèce ou bien la présence d'un gène lié à un facteur de virulence ou de résistance aux antibiotiques.

Dans le cadre des tests FISH, les sondes fluorescentes employées vont cibler des séquences de 18 à 25 paires de base sur l'ARN ribosomal. L'échantillon issu de l'hémoculture est donc fixé sur une lame de microscopie conventionnelle, après quoi l'hybridation avec les cibles se fait avant de rincer l'excès. L'observation est alors menée au microscope de fluorescence. Cette méthode est généralement utilisée après avoir eu confirmation de la positivité de l'hémoculture. L'avantage de l'observation au microscope est qu'elle permet d'analyser un échantillon polymicrobien sans nécessairement requérir d'isolats. Une revue récente reprend les principales applications de la technique FISH,¹³⁰ nous n'entrerons pas plus dans les détails. Le principal avantage est de pouvoir l'employer directement à partir de l'hémoculture, sans temps d'enrichissement supplémentaire. Dans d'autres applications, comme la détection des foyers d'infection, elle permet également de facilement localiser la présence de pathogènes dans les tissus. Au niveau des systèmes commerciaux, deux entreprises occupent ce secteur : Miacom Diagnostics (Allemagne) avec hemoFISH et AdvanDx (Danemark) avec QuickFISH et XpressFISH. Ce dernier test est intéressant du

fait qu'il cible spécifiquement le gène *mecA*, responsable de la résistance à la pénicilline et méticilline, notamment chez *S. aureus*.

Le test Verigene, produit par Luminex Corporations est lui basé sur le principe des puces à ADN. Un micro-réseau d'oligonucléotides immobilisés va être exposé à l'échantillon sanguin issu de l'hémoculture positive. La réponse du système est alors obtenue en quelques heures seulement avec à la fois des informations sur le genre et l'espèce mais également la résistance (gène *mecA* à nouveau par exemple¹³¹). L'identification est alors obtenue généralement en quelques heures, ce qui procure un gain temps de 31 à 42 heures par rapport aux techniques phénotypiques classiques. Pour ce qui est de déterminer la sensibilité aux antibiotiques, ce gain est estimé être de 41 à 50 heures. D'autres tests basés sur des puces à ADN existent, comme le Prove-it sepsis de Mobidiag ou FilmArray de BioFire Diagnostics (bioMérieux). Cependant ceux-ci nécessitent une amplification préalable par PCR.

Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La PCR est un procédé permettant d'amplifier certaines séquences d'acides nucléiques présents dans un échantillon. Brièvement dans une séquence d'analyse, on trouvera les étapes suivantes : lyse des cellules de l'échantillon, puis purification et extraction des acides nucléiques constituent les étapes préparatoires. Ensuite, l'amplification des séquences d'intérêt reconnues par les amorces spécifiques et la détection des amplicons ainsi obtenus sont les étapes proprement liées à la PCR. La détection est basée sur le suivi des courbes de fusion liée à la séquence ciblée. Cela implique donc des cycles de variation de température.

Partant du constat que les tests PCR sont de nature spécifiques aux séquences nucléotidiques ciblées, la conception des amorces permet de faire varier les caractéristiques identifiables. Il est ainsi possible que ces systèmes ne reconnaissent qu'un seul pathogène ou bien plusieurs dizaines. Dans le cadre de l'identification d'un pathogène inconnu, ce sont ces derniers tests qui seront employés. Ils peuvent être appliqués à deux moments différents dans le processus de diagnostic : soit directement sur l'échantillon sanguin, soit à partir d'une hémoculture positive. Dans le premier cas, les technologies dominantes sont le LightCycler SeptiFast (Roche Diagnostics), le SepsiTtest (Molzym), VYOO (SIRS Lab), le MagicPlex sepsis real-time (Seegene) et l'IRDICA (Abbott Molecular). Dans le cas d'une détection après hémoculture, on peut citer des systèmes tels que FilmArray (bioMérieux), Verigene ou Prove-it Sepsis déjà cités. Ces différents systèmes ont été comparés dans une revue par GUIDO et al..¹³²

Généralement, les tests effectués directement depuis l'échantillon sanguin sont plus longs : de 6 à 12 heures contre moins de 3 heures lorsque réalisés après l'hémoculture. Par contre, le fait de travailler directement depuis l'échantillon sanguin implique de forts risques de faux-positifs, à cause de signaux provenant par exemple de fragments d'ADN issus de bactéries déjà lysées dans le sang. A l'inverse, plusieurs facteurs peuvent engendrer des faux-négatifs, tels que la présence en trop faible quantité de l'ADN ciblé, ou bien des molécules qui vont inhiber la réaction de PCR, comme les immunoglobulines ou les ions Fer.⁸³ Par exemple, il a été démontré que pour des concentrations de l'ordre de 1 UFC.ml⁻¹, ce qui est proche des cas cliniques, la détection directe sur le sang échoue dans 25 à 50 % des cas.¹³³ Les nombreux résultats contradictoires, lorsque la PCR est comparée aux autres méthodes, soulèvent toutefois la question de la pertinence de cette méthode. Le recours à cette technique peut rester intéressant,

notamment dans le cadre de bactériémies où les micro-organismes en cause sont à croissance lente, voire sont non cultivables. Toutefois, il existe un risque élevé de faux-positifs, notamment à cause de la présence d'acides nucléiques résiduels dans le sang. Ces derniers, issus de la lyse bactérienne suite à l'activité bactéricide du sang, sont tout de même amplifiées, bien que les bactéries aient disparu de la circulation sanguine.

Ces systèmes restent toutefois assez encombrants tout en nécessitant souvent plusieurs étapes ainsi qu'un contrôle précis de la température des réactions. La question de leur coût est également non négligeable. C'est pour ces raisons que des méthodes alternatives sont développées dernièrement pour procéder à des réactions d'amplification de l'ADN dans des contextes plus limités en ressources. L'utilisation de méthodes isothermes d'amplification pourra amener une solution à ce souci. D'autant plus que les brevets protégeant les diverses techniques de ce type (LAMP, NASBA, HDA ou RPA) ont expiré ou le feront d'ici 2023.¹³⁴

Cependant, comme toute méthode utilisant des sondes spécifiques, le développement du FISH comme de la PCR reste limité à l'heure actuelle aux pathogènes les plus communs. Dans le futur, ce constat pourrait notamment changer grâce à la connaissance accrue à la fois du génome mais aussi du protéome des bactéries, ce qui permettra de mieux cibler les séquences spécifiques d'intérêt pour les sondes ou les amorces. De plus, concernant la sensibilité aux antibiotiques, posséder un gène de résistance ou non n'informe pas sur la concentration minimale inhibitrice qui sera liée au pathogène. Toutefois, les méthodes d'amplification restent un complément très intéressant à la méthode culturale, d'autant plus qu'elles peuvent aisément être miniaturisées pour être intégrées dans d'autres dispositifs, voire même être mises en œuvre au chevet du patient.

1.2.2.5 Conclusions sur les méthodes conventionnelles de diagnostic

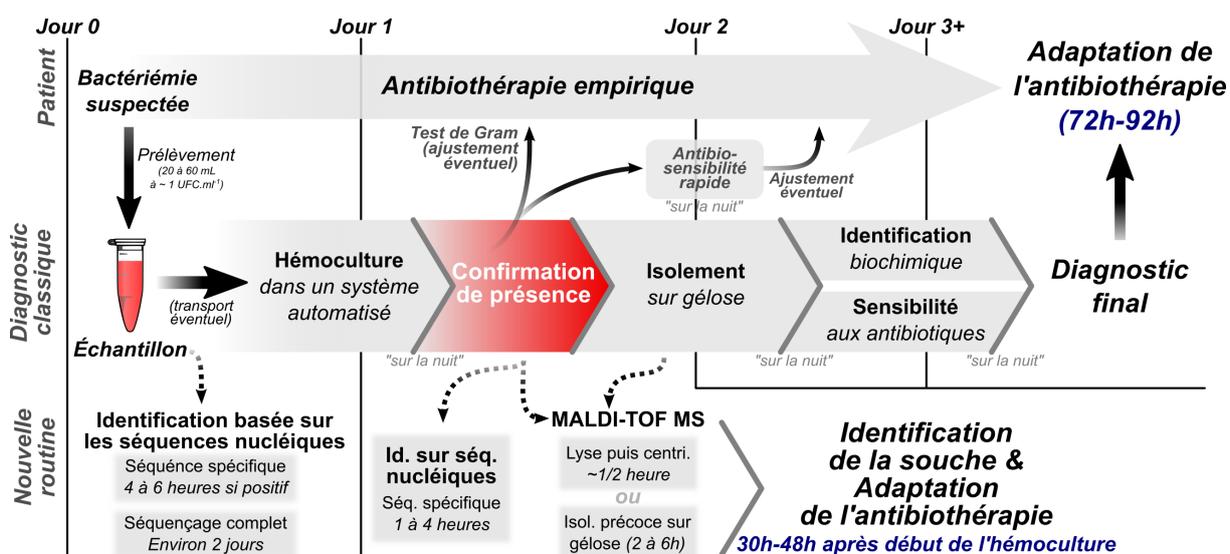


Figure 1.9 – Étapes et temps associés pour un diagnostic de bactériémie, par la voie classique, basée sur le trio hémoculture / isolement / identification ou bien par les nouvelles techniques arrivant en routine dans les laboratoires cliniques, basées sur les acides nucléiques ou la spectrométrie de masse. Nota bene : les temps indiqués correspondent à des conditions de croissance optimales pour les pathogènes en cause.

Inspiré notamment de IDELEVICH *et al.*¹³⁵

L'arrivée dans les dernières décennies des méthodes moléculaires et de la spectrométrie de masse a été un grand bond en avant dans le diagnostic microbiologique. L'identification des pathogènes est ainsi devenue plus rapide, accélérant l'adaptation du traitement antibiotique des patients. L'antibiothérapie empirique, qui pouvait auparavant durer plusieurs jours, peut aujourd'hui être adaptée après moins de 48 heures dans les cas les plus favorables. Cependant, l'hémoculture reste un préalable incontournable pour la majorité des techniques présentées ici. Les techniques moléculaires directement applicables au sang total non enrichi restent encore soumises à un risque élevé d'identification faussée du fait des contaminations.¹³⁶

Concernant les tests de sensibilité aux antibiotiques, ceux-ci ne sont pas encore remplaçables par les méthodes moléculaires. La présence ou non d'un gène de résistance ne renseigne en effet pas sur la dose nécessaire à l'inhibition de la croissance des bactéries (CMI ou Concentration Minimale Inhibitrice). Or, les automates qui permettent d'évaluer ces CMI nécessitent d'avoir une culture enrichie en pathogènes, afin de les re-suspendre ou ré-étaler. L'adaptation accélérée de l'antibiothérapie grâce aux techniques moléculaires ou à la spectrométrie de masse ne marque donc pas la dernière étape du processus de diagnostic.

Ces constats font de l'hémoculture une étape toujours inévitable dans le diagnostic d'une bactériémie. Certaines des alternatives à l'étude vont donc chercher à tirer profit de ce cadre préexistant (présenté en figure 1.9) pour y intégrer des techniques fournissant les informations d'identification ou de sensibilité plus rapidement. D'autres vont être des extensions des alternatives déjà présentées ici, en cherchant à réduire leurs désavantages.

1.2.3 Évolutions futures et méthodes émergentes

Les méthodes à disposition du clinicien pour établir un diagnostic dans le cadre d'une suspicion de bactériémie sont donc multiples. Au-delà des critères de spécificité, sensibilité ou encore de temps pour obtenir le diagnostic, d'autres aspects entrent en ligne de compte. Le prix de l'équipement, des consommables pour chaque test, le besoin ou non de former des opérateurs et autres critères pratiques sont tout autant de choses à considérer.¹³⁷⁻¹³⁹ Le développement de nouvelles méthodes de diagnostic passe donc par l'amélioration de ces différents paramètres. La recherche se divise donc entre le développement d'améliorations des méthodes existantes d'une part, et la recherche de nouvelles technologies de rupture d'autre part. De plus, comme on l'a vu, les différentes solutions déjà évoquées sont très largement employées en complément les unes des autres. Au-delà des temps d'identification améliorés, cela amène également une robustesse supérieure au diagnostic.

Nous allons donc présenter dans un premier quelques pistes d'évolution des techniques actuelles, avant d'introduire des méthodes émergentes complémentaires.

1.2.3.1 Développements des méthodes existantes

Au-delà du développement de nouvelles méthodes pour utiliser la spectrométrie de masse directement depuis l'échantillon issu de l'hémoculture, qui a déjà été évoqué, le couplage à la PCR est une autre piste prometteuse.^{140,141} Dans ce cas-là, une PCR à large spectre est effectuée, l'ADN répliqué issu de cette amplification est alors digéré enzymatiquement puis analysé par ESI-MS (*electron-spray ionization*

mass spectrometry). Les données de spectrométrie de masse issues de cette analyse sont utilisées pour déterminer la composition en bases nucléiques de chaque amplicon obtenu. L'identification se fait alors au regard d'une base de données contenant des séquences représentatives des pathogènes. L'avantage principal de cette technique est son application directe sur l'échantillon sanguin, sans besoin de culture. Cette technique donne un résultat en 6 à 8 heures, pour une concordance avec l'hémoculture de 77¹⁴⁰ à 86%.¹⁴¹ En plus de la réponse rapide obtenue, l'intérêt réside également dans la possibilité de détecter des pathogènes difficilement cultivables, dans environ 7 à 8% des cas.¹⁴⁰

Une telle technique se rapproche d'une identification par séquençage total de l'échantillon. L'identification ainsi menée pourrait se faire directement à partir de l'échantillon sanguin. Le principe repose sur la recherche soit de motifs ou bien de gènes complets associés à certains pathogènes.¹⁴²⁻¹⁴⁵ L'accroissement de la vitesse de séquençage, en parallèle de l'automatisation et de la miniaturisation des séquenceurs rend cette solution particulièrement attrayante à terme. Toutefois, les obstacles déjà rencontrés par la PCR restent valables, notamment concernant les multiples sources possibles de contamination pouvant fausser les résultats.¹³⁶ En réaction à ce défaut, la PCR en « vase clos » est développée, avec une technique telle que la résonance magnétique T2, mise en œuvre dans le système T2Dx, développé par T2Biotechnologies.^{146,147} Brièvement, cette technologie, totalement automatisée, suit les étapes suivantes : lyse de l'échantillon sanguin, amplification dans le lysat des séquences ciblées, puis hybridation des amplicons avec les acides nucléiques sondes, immobilisés sur des nanoparticules superparamagnétiques. Ces dernières s'agrègent en cas d'hybridation, ce qui vient modifier le temps de relaxation transversale T2, propriété magnétique qui peut être mesurée par un capteur.¹⁴⁸ Principalement explorée pour les candidémies (équivalent des bactériémies pour *Candida* spp.), cette méthode permet d'obtenir un résultat directement à partir du sang en approximativement trois heures, comparé aux plusieurs jours nécessaires à une détection par automate.¹⁴⁹ De façon intéressante, elle permet surtout un temps très faible avant diagnostic négatif, de l'ordre de 6 heures.¹⁵⁰ Une telle performance peut permettre d'arrêter rapidement un traitement antibiotique empirique inadéquat. Cependant, il existe peu de commentaires dans la littérature sur les temps nécessaires aux autres systèmes pour parvenir à une confirmation d'absence d'infection.

Dans une même idée que le séquençage, des approches basées sur le profilage (*fingerprinting*), que ce soit génétique ou protéomique sont également développées, se basant sur la PCR tout autant que sur la spectrométrie de masse.^{127,151-153}

Des changements de méthodologie sont également à l'étude. Ainsi, IDELEVICH et al. ont proposé à plusieurs reprises des preuves de concept de mise en culture directe après centrifugation du sang.^{123,154} Brièvement, leur idée repose sur le fait d'étaler le culot de l'échantillon sanguin centrifugé directement sur l'agar. Ils obtiennent ainsi des colonies isolées permettant l'identification en MALDI-TOF avant même la fin de l'hémoculture.¹⁵⁴ Dans un autre registre, PUTTASWAMY et al. ont également pu proposer par exemple de changer le paramètre surveillé lors de l'hémoculture, en remplaçant la mesure indirecte du dioxyde de carbone par celle de la conductivité de l'échantillon.¹⁵⁵ Ils obtiennent alors une limite de détection de l'ordre de 10⁴ UFC.ml⁻¹ au lieu de 10⁸. Cependant, ces approches restent à l'heure actuelle uniquement étudiées sur des échantillons inoculés artificiellement et non en milieu clinique.

Il reste que le foisonnement de techniques alternatives empêche d'établir des critères de comparaisons précis, notamment du fait de l'absence de données suffisamment robustes pour chaque technique.^{135,143}

En effet, la comparaison se fait systématiquement au regard des performances de l'hémoculture, dont on a pu voir la variabilité en fonction des conditions de réalisation. Toutefois, en plus des développements des techniques actuellement employées, il existe tout un pan de recherche encore fondamentale autour de la détection de bactériémies. Quelques exemples vont être évoqués par la suite, notamment pour appréhender les stratégies explorées pour surmonter les obstacles évoqués.

1.2.3.2 Méthodes recourant à la microfluidique pour la séparation des bactéries

Dans le cadre des techniques d'identification basées sur les séquences génétiques, on a vu que la préparation de l'échantillon était cruciale pour éviter les contaminants. C'est en grande partie pour cette raison que nombre de solutions ont vu le jour pour intégrer une étape de filtration mécanique ou de préparation des échantillons par voie microfluidique. Quelle que soit la méthode mise en place, l'objectif à atteindre est le même : parvenir à isoler et concentrer les composants biochimiques provenant des bactéries.¹⁵⁶ L'intégration de ces étapes sous forme de cartes microfluidiques peut permettre d'avoir un système « tout-en-un » avec à la fois la concentration, la détection et l'identification. Ces deux dernières étapes peuvent être réalisées par des techniques moléculaires, comme la PCR^{157,158} ou des équivalents du FISH.¹⁵⁹

Concernant la technologie de concentration en elle-même, plusieurs approches existent. On distingue d'une part des méthodes basées sur des propriétés microfluidiques (séparation inertielle, tri par la taille moléculaire, fractionnement en micro-gouttelettes, etc.) et d'autre part des méthodes basées sur l'affinité (migration par diélectrophorèse, acoustophorèse, ou piégeage avec des sondes spécifiques telles que des anticorps). La revue de BURKLUND et ZHANG¹⁵⁶ présente dans le détail le fonctionnement de la plupart de ces méthodes. Certains articles rapportent des performances idéales concernant le seuil de détection et le temps obtenu pour avoir la réponse. Par exemple, KANG et al. introduisent un système permettant de détecter 1 UFC.ml⁻¹ d'*E. coli* directement à partir d'un échantillon sanguin en moins de 4 heures. Cependant, le volume d'échantillon analysable par ces méthodes microfluidiques est souvent limitant. Dans le dernier cas évoqué, le débit maximal est de 10 $\mu\text{l.min}^{-1}$, ce qui implique 1 heure 40 pour faire passer 1 ml d'échantillon sanguin. Dans un contexte clinique, un tel délai n'est pas envisageable pour un test ne proposant à l'heure actuelle l'identification spécifique d'une seule séquence génétique. Pour réellement être une alternative aux systèmes actuels, il sera nécessaire que ces technologies de concentration permettent d'opérer à haut-débit avec une forte efficacité de séparation. Il convient en effet de rappeler ici que le volume de prélèvement sanguin recommandé est de l'ordre de 40 à 60 millilitres. L'utilisation en routine de ces méthodes microfluidiques est donc encore plus que délicate pour la détection de bactériémies.

Ces méthodes microfluidiques sont également fréquemment couplées à différents types de biocapteurs pour la détection ou l'identification. La partie 1.3 qui suit introduira ce concept, ainsi que quelques exemples d'applications pour la détection de bactériémies.

1.3 Les biocapteurs pour la détection de bactéries

1.3.1 Principes généraux des biocapteurs

1.3.1.1 Définition conceptuelle

Introduits dans le courant des années 60 par le professeur Leland Clark Jr, les premiers biocapteurs servaient au dosage d'oxygène dans le sang grâce à des électrodes.¹⁶¹ Le domaine n'a pas cessé d'évoluer depuis ses premiers développements et est toujours en progression. Les applications sont sorties du simple secteur de la santé et vont maintenant du contrôle alimentaire à la sécurité intérieure en passant par l'agroalimentaire ou la surveillance de l'environnement. Ces changements rapides n'aident pas à la définition exacte de ce qu'est un biocapteur.¹⁶² Cependant, une définition conceptuelle fondamentale émerge.

Un biocapteur est un système intégré qui contient un élément récepteur servant à la reconnaissance d'une cible biologique, et transmettant un signal par le biais d'un mécanisme de transduction physico-chimique. La figure 1.10 résume ce principe, tout en donnant des exemples pour chaque élément. Présenté autrement, ce fonctionnement implique qu'au contact d'un échantillon biologique contenant une cible, le biocapteur va fournir un signal de sortie relatif aux interactions se produisant à sa surface. Au-delà des différents mécanismes de transduction possibles, qui vont notamment avoir une importance dans les caractéristiques du capteur, le choix de l'élément capteur est fondamental pour la spécificité.

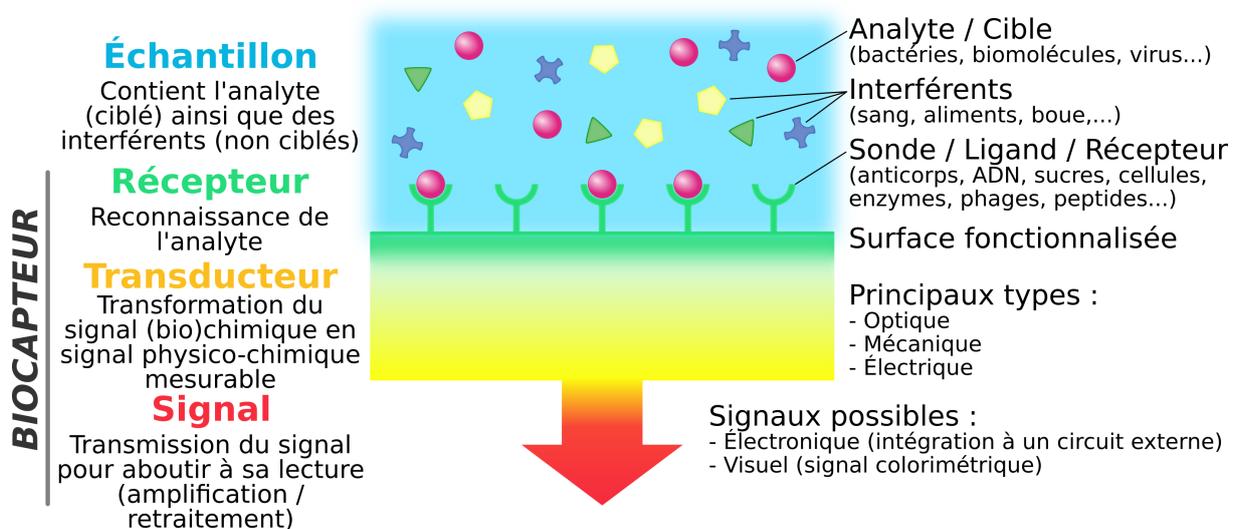


Figure 1.10 – Principe de fonctionnement d'un biocapteur et éléments constitutifs.

Pour caractériser un biocapteur, plusieurs grandeurs ou notions sont régulièrement utilisées : sensibilité, spécificité, régime de réponse linéaire, saturation et limite de détection. Sensibilité et spécificité vont généralement de pair. La première notion correspond à l'ampleur de la réponse positive pour le capteur lorsqu'il est exposé à sa cible. Elle peut être définie comme un rapport entre le signal d'entrée et celui de sortie. Plus ce rapport est élevé, plus le capteur est considéré comme sensible. La spécificité, au contraire, consiste pour le capteur à ne donner un signal que lorsque la cible est présente. En d'autres termes, cela signifie qu'un biocapteur spécifique ne doit pas être sensible aux interférences de la part d'éléments non ciblés, provenant de la matrice d'analyse par exemple. Un biocapteur sensible et spécifique sera parfois

appelé sélectif. On peut également associer à ces grandeurs la notion de dérive du capteur, qui correspond à la variation de signal observée à cause d'interactions non-spécifiques. Régime de réponse linéaire, dérive, saturation et limite de détection sont représentées sur la figure 1.11. Ils correspondent respectivement : à l'intervalle sur lequel la réponse est proportionnelle entre la concentration de l'analyte et l'intensité du signal de sortie, la concentration maximale détectable et enfin la minimale. À noter qu'en fonction du type d'application, la concentration de la cible peut être directement liée au temps. C'est notamment le cas dans le cadre d'une hémoculture, où la concentration des bactéries varie au cours du temps. Il peut alors être utile d'associer au seuil de détection (plus petite concentration détectable) le temps de détection nécessaire au système pour atteindre le seuil. Cette dernière notion est particulièrement importante dans le cadre de la détection de bactériémies, le temps étant un critère crucial pour la survie du patient.

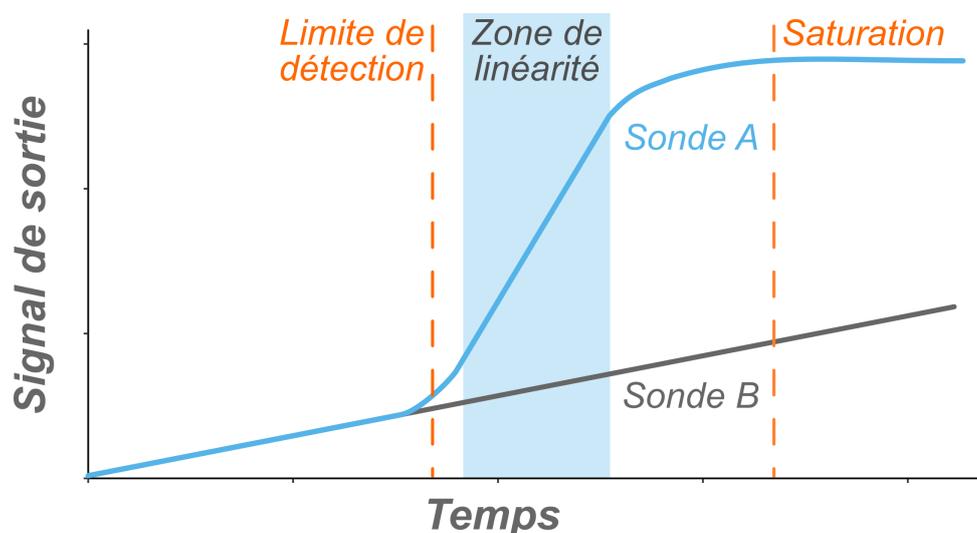


Figure 1.11 – Caractéristiques principales du signal d'un biocapteur multiplexe en fonction du temps – en supposant la concentration d'analyte comme proportionnelle à ce dernier. La sonde A est spécifique à l'analyte ciblé, tandis que la sonde B est non spécifique. Le signal obtenu sur la sonde A permet donc de mettre en évidence la limite de détection, la zone de linéarité et le plateau de saturation. Le signal obtenu sur la sonde B représente lui la dérive du capteur au cours du temps, à cause d'interférents par exemple.

1.3.1.2 Principaux types de transducteurs pour les biocapteurs

Différents types de transducteurs existent en fonction de la variation de signal physique qu'ils permettent d'observer. Les trois grandes classes que l'on distingue sont les transducteurs optiques, électriques et mécaniques.

Les microbalances à quartz (QCM) et les micro-leviers résonants sont des exemples de capteurs basés sur un signal mécanique suite aux variations de masse adsorbée à leur surface. La transduction est alors piézoélectrique. Dans le cas de la QCM, le seuil de détection peut descendre jusqu'à 10 UFC.ml^{-1} , même en matrice alimentaire.¹⁶³ Les micro-leviers, quant à eux possèdent encore peu d'applications sur échantillons réels notamment à cause de leur besoin d'opérer à l'air.¹⁶⁴ D'autres systèmes, basés sur des propriétés magnétoélastiques, permettent de détecter des variations de masse à distance, en mesurant des changements de champ magnétique. Une limite de détection de l'ordre de 10^2 UFC.ml^{-1} est alors atteinte.¹⁶⁵ Ces systèmes ne sont à l'heure actuelle que peu représentés dans les dispositifs de diagnostic.^{164,166}

La transduction électrique recouvre une grande variété de capteurs différents, allant des capteurs électrochimiques aux capteurs électroniques en passant par des capteurs exploitant des propriétés électromagnétiques. Lorsque la mesure est électrochimique, trois grandeurs distinctes peuvent être sondées : ampérométrique, impédimétrique ou potentiométrique.¹⁶⁷ Dans le cadre de la détection de bactéries, ce sont les capteurs impédimétriques qui sont les plus courants. Ils présentent une large gamme linéaire dans laquelle le signal obtenu est proportionnel à la quantité d'analyte fixée en surface du capteur. De plus, ils peuvent être utilisés dans des milieux complexes sans marquage des cibles. Les capteurs potentiométriques présentent eux le désavantage d'une très grande sensibilité à la composition ionique du milieu sondé. Concernant les biocapteurs basés sur l'ampérométrie, ils nécessitent que l'élément de reconnaissance soit électro-actif, ce qui restreint leur utilisation, notamment dans le développement de nouvelles cibles. Leur intégration au sein d'autre systèmes – microfluidique ou électronique – est également très favorable.¹⁶⁸ Les limites de détection annoncées dans les dispositifs fondamentaux sont très basses, de l'ordre de quelques pathogènes par millilitre, voire moins.¹⁶⁹ A l'heure actuelle, malgré tous les efforts de recherche et développement, il n'existe pas de système commercial basé sur la détection électrochimique directe de bactéries non lysées.¹⁶⁹ Une autre grande famille de biocapteurs électriques est formée par les transistors à effet de champ fonctionnalisés pour la détection.^{170,171} Si leur développement pour la détection de bactéries est encore récent, ces dispositifs micro-électroniques présentent toutefois une limite de détection basse, aux alentours de 10^2 UFC.ml⁻¹.^{172,173} Il est possible de les adapter sur des substrats souples,^{173,174} ce qui les rend moins contraignants à intégrer dans un contexte clinique.

Les biocapteurs optiques recouvrent plusieurs approches de détection.^{166,175} Les techniques comme la résonance plasmonique de surface, la spectroscopie Raman ou l'interférométrie constituent la première grande classe de capteurs optiques, basée sur les propriétés optiques. L'autre groupe de techniques qu'il est possible de distinguer est celui basé sur la colorimétrie, la luminescence ou la fluorescence. Tous ces capteurs optiques opèrent avec un signal lumineux, ce qui rend leur intégration aisée à la fois à des systèmes électroniques, grâce à des détecteurs ou des caméras, mais également pour une utilisation directe à l'œil nu dans certains cas. Les tests de grossesse sur bandelettes (*lateral flow assays*) sont un exemple typique de la facilité d'usage de ces capteurs colorimétriques.¹⁷⁶ La limite de détection de ce type de test pour cibler des bactéries reste toutefois élevée, de l'ordre de 10^3 UFC.ml⁻¹,¹⁷⁷ ce qui implique un enrichissement au préalable. Cette méthode, bien que très pratique pour une utilisation au chevet du patient,¹³⁴ ne semble donc pas adaptée pour la détection à partir du sang total. Si l'usage de sondes marquées par des fluorophores ou des nanoparticules est de très grand intérêt pour l'imagerie, il reste toutefois limité dans une application en matrice complexe et turbide comme le sang, d'autant plus lorsque l'échantillon doit être réutilisé.¹⁷⁸ Les capteurs basés sur des propriétés optiques sont donc *a priori* les plus adaptés dans cette catégorie pour une détection en milieu complexe. La SPR est notamment une technique largement employée. Lorsqu'elle est utilisée en mode imagerie, elle permet de suivre les interactions sur une surface entière, d'environ 1 cm^2 , ce qui permet d'intégrer plusieurs zones indépendantes fonctionnalisées avec des sondes différentes. Cette propriété est appelée multiplexage. Bien que la limite de détection, de l'ordre de 10^3 UFC.ml⁻¹ pour les systèmes SPR les plus sensibles,¹⁷⁹ soit élevée par rapport aux concentrations bactériennes rencontrées dans des échantillons, son potentiel de miniaturisation¹⁸⁰ permet par exemple de l'adapter à un téléphone.¹⁸¹ Cette technique, qui sera utilisée au

cours de cette thèse, sera traitée en détail en partie 1.3.2.

Quel que soit le transducteur choisi, un biocapteur reste toutefois intrinsèquement limité par le besoin d'une rencontre entre sa surface fonctionnalisée et l'analyte.¹⁸² Si certaines bactéries comme *E. coli* sont motiles et vont ainsi augmenter leur probabilité de rencontre avec la surface, d'autres, comme *S. aureus* sont moins mobiles. Il peut ainsi être tentant d'imposer un flux ou une agitation pour augmenter les chances de rencontre entre la cible et le capteur. Cependant de telles solutions peuvent être contre-productives pour la détection. En effet un fort débit peut par exemple entraîner des forces cisaillement qui empêcheraient l'établissement d'interaction avec la sonde, voire sectionneraient les bactéries.¹⁸³ De façon similaire, des ondes acoustiques^{184,185} ou un champ électrique¹⁸⁶ peuvent être employés pour concentrer des cellules vers une surface. Bien que cela permette effectivement d'abaisser la limite de détection des capteurs, l'opérabilité d'une telle technique dans un milieu complexe n'a pas été démontrée à ce jour. Pour le cas du sang, cela comporte en effet également le risque d'augmenter l'adsorption non-spécifique en surface. Dans le cadre de ce travail, les conditions seront sans agitation.

1.3.1.3 Importance du choix des sondes selon le type de détection

Au-delà du type de transduction choisi, qui influe surtout sur la sensibilité d'un système, c'est le choix de l'élément de reconnaissance (aussi appelé ligand) qui va amener au biocapteur sa spécificité. Pour la détection de bactéries, plusieurs niveaux de spécificité peuvent être atteints. La distinction peut se faire au sérotype, ou bien à une espèce, voire à l'ensemble d'une coloration de Gram. Par ailleurs, il est également possible de cibler des marqueurs membranaires particuliers, partagés par plusieurs pathogènes n'appartenant pas nécessairement à la même espèce. Les sondes par excellence dans les tests immunologiques sont les anticorps. Cependant ces protéines sont loin d'être les seules sondes utilisées pour la détection de bactéries¹⁸⁷ (voir figure 1.12).

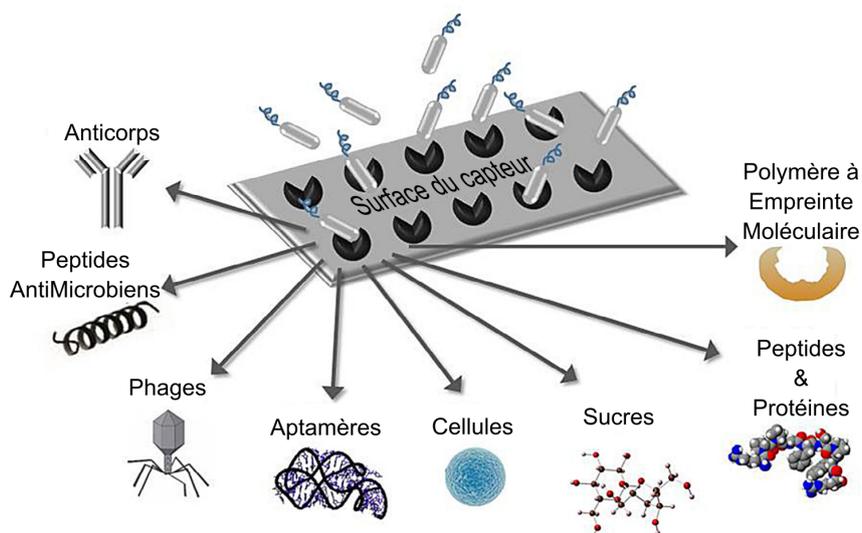


Figure 1.12 – Principaux éléments de reconnaissance employables pour la détection de bactéries entières avec des biocapteurs. D'après TEMPLIER *et al.*¹⁸⁷

Les aptamères sont des oligonucléotides sélectionnés à partir de bibliothèques aléatoires pour être affins d'une cible biologique choisie.¹⁸⁸ Ils atteignent ainsi souvent une haute spécificité,^{189,190} mais peuvent cependant aussi être développés comme ligands à large spectre, en ciblant par exemple les

peptidoglycanes,¹⁹¹ composant la paroi de nombreuses bactéries. Selon un principe de sélection similaire, le *phage display* permet, grâce à un processus d'évolution dirigée, d'obtenir des peptides spécifiques à une cible choisie. Les bactériophages peuvent également être isolés naturellement pour servir de ligands spécifiques.¹⁹² Au rang des molécules naturelles utilisables, on peut également citer les sucres qui vont fixer avec les lectines membranaires des bactéries.¹⁹³ Inversement, ces protéines fixant spécifiquement les sucres peuvent être employées pour reconnaître les pathogènes. D'autres protéines, comme des adhésines bactériennes sont également parfois employées comme ligands. L'inspiration puisée dans la nature a mené jusqu'à utiliser des cellules entières en tant que ligand.¹⁹⁴ Toutefois, si ces éléments de reconnaissance sont souvent directement empruntés à la nature, les contraintes industrielles et les besoins particuliers ont mené au développement de plusieurs types de ligands non naturels (synthétiques). On peut alors citer les polymères à empreinte moléculaire (ou MIP pour *Molecularly Imprinted Polymer*), qui consistent à « mouler » une matrice d'un copolymère autour de la cible, avant de « démouler » cette dernière pour libérer la cavité ainsi créée. Dans le cadre de la détection de cellules entières, l'opérabilité a été démontrée par COHEN et al., qui a utilisé les MIP pour piéger des bactéries entières avant de les étudier *via* diverses techniques de microscopie.¹⁹⁵ Enfin, les peptides forment une famille de molécules intermédiaires : ils peuvent être ingénierés, dérivés du *phage display* ou bien naturellement capables d'interagir avec les bactéries pour les peptides dits antimicrobiens. Cela leur permet d'être utilisés pour des cibles de natures variées.¹⁹⁶

Enfin, au-delà du critère de la spécificité, certes fondamental dans la conception d'un biocapteur, d'autres paramètres entrent en ligne de compte. Premièrement, les conditions environnementales (température, séchage, pH, milieu, etc.) auquel le capteur sera soumis sont à considérer. Pour une utilisation sur le terrain, un capteur qui peut être conservé sec à température ambiante sera préférable à une conservation réfrigérée en milieu liquide par exemple. Ensuite, concernant la facilité de production, le prix et la simplicité de mise en œuvre sont à prendre en compte. C'est notamment un des avantages de l'utilisation d'acides nucléiques ou de peptides, qui peuvent être synthétisés chimiquement en grande quantité et à bas coût. Enfin, il est nécessaire que la sonde puisse être immobilisée sans perdre son activité. Différentes techniques de greffage en surface d'un biocapteur seront abordées dans le chapitre suivant.

Pour l'application visée, soit la détection de pathogènes entiers dans le sang avec une possible identification, le choix des sondes sera particulièrement crucial. Idéalement, elles devraient être capables d'interagir avec tous les pathogènes possibles. De plus, dans l'optique d'une application clinique, les ligands choisis devraient être à la fois robustes et peu coûteux. Parmi les sondes évoquées jusqu'ici, les peptides antimicrobiens, naturellement à large spectre d'interaction semblent être des candidats idéaux. Ce sont ces molécules qui seront utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse. Une présentation plus détaillée en sera donnée au chapitre suivant.

1.3.1.4 Applications de biocapteurs à la détection de bactériémies

De ce que l'on sait, il n'existe pas à l'heure actuelle de système commercialisé à grande échelle qui emploie des biocapteurs pour détecter de bactéries. Au stade fondamental, la littérature des biocapteurs pour le diagnostic de bactériémies se développe dans plusieurs perspectives.

Le domaine le plus florissant est celui de l'intégration de tests PCR (ou équivalents) dans des puces

microfluidiques permettant d'aller de l'échantillon sanguin à la réponse. Cependant, ces systèmes souffrent des mêmes désavantages que ceux auparavant évoqués pour la PCR. La minimisation du nombre d'étapes permet toutefois de réduire les risques de contamination. Par ailleurs, la miniaturisation de tels systèmes permet d'imaginer à l'avenir de procéder en parallèle à plusieurs dizaines d'amplifications simultanées, permettant potentiellement une détection voire une identification rapide à large spectre.

La capacité des biocapteurs à être adaptés pour reconnaître tout type de cible biologique en fait également des outils idéaux pour la détection de biomarqueurs.¹⁹⁷ On l'a vu, les bactériémies sont effectivement liées à des anomalies dans la concentration de certains solutés dans le sang (le lactate par exemple en cas de sepsis). Certains systèmes sont ainsi développés pour mesurer directement au chevet du patient ces biomarqueurs, comme l'interleukine 3, une cytokine associée aux défaillances d'organe.¹⁹⁸ Ce sous-domaine des biocapteurs pour la détection des marqueurs du sepsis a récemment été couvert par une revue de KUMAR et al..¹⁹⁹ Dans une démarche similaire, la détection de molécules liées à la croissance des pathogènes est une voie envisagée par certaines équipes de recherche. Une fois de plus la nature de la cible imposera la spécificité. La détection de micelles d'acide lipotéichoïque (Gram⁺) ou des lipopolysaccharides (Gram⁻) permet ainsi une détection universelle avec identification du Gram.²⁰⁰ Cibler une molécule comme la pyocyanine, spécifique de la croissance des souches pathogènes PAO1 et PA14 de *Pseudomonas aeruginosa* a permis à WEBSTER et al. de détecter spécifiquement leur présence à forte concentration.²⁰¹ Le capteur électrochimique qu'ils ont développé pourrait par exemple être intégré dans une bouteille d'hémoculture, afin d'identifier spécifiquement ce pathogène plus rapidement. Une autre voie de détection indirecte est également de cibler des métabolites volatils. Introduire un nez électronique au-dessus d'une hémoculture ou bien d'un isolement en culture solide peut effectivement permettre l'identification des espèces en croissance. Si ce concept a été introduit auparavant pour contrôler la contamination bactérienne dans des lignes de production agroalimentaires,²⁰² elle est depuis une dizaine d'années adaptée aux hémocultures.²⁰³⁻²⁰⁷ L'intérêt d'une telle approche est manifeste : inclure le capteur au système de routine préexistant. Intégré au flacon d'hémoculture, le nez électronique détecte alors la croissance en 2,8 heures de moins que l'automate conventionnel. De plus, 2 heures après la détection de croissance, l'information sur l'identification est fiable dans 91,9% des cas.²⁰⁵ La discrimination se fait alors jusqu'à distinguer des souches différentes de SARM. Un tel système semble donc intéressant si son développement futur confirme ses performances. Il reste cependant une zone d'ombre concernant la réponse que fourniront les nez électroniques face aux mélanges de métabolites dans le cadre d'infections polymicrobiennes.

La dernière perspective dans laquelle les biocapteurs ont pu être employés est celle de la détection de cellules entières directement dans l'échantillon sanguin.²⁰⁸⁻²¹¹ SHI et al. ont proposé un capteur piézoélectrique basé sur le relargage d'un peptide antimicrobien dans le sang lorsque celui-ci contient des bactéries.²⁰⁸ Ils atteignent une limite de détection de l'ordre de 10^2 UFC.ml⁻¹ en sang de mouton, pour un délai d'exécution de seulement 15 minutes. Malgré le fait que cette approche ne permette pas d'identification, elle pourrait permettre une confirmation de la présence de bactéries bien plus rapide qu'une hémoculture classique. Toutefois la preuve de concept reste éloignée du contexte clinique et des adaptations de la méthodologie sont sans nul doute nécessaires. Enfin, le système développé au laboratoire CREAB, employé dans des conditions similaires à une hémoculture clinique, a permis de

détecter *Salmonella enterica* en moins de 12 heures, à une concentration initiale inférieure à une UFC par millilitre.²¹¹ Cela a été réalisé grâce à une puce à anticorps utilisée dans un imageur SPR.

1.3.2 L'imagerie SPR pour la détection de bactéries en milieu complexe

1.3.2.1 La résonance de plasmons de surface (SPR) pour la détection

Observée pour la première fois R.W. Wood en 1902,²¹² théorisée en 1941 par Fano²¹³ et confirmée en 1968 indépendamment par Otto d'une part²¹⁴ ainsi que Kretschmann et Haether d'autre part,²¹⁵ la résonance plasmonique est un phénomène optique se produisant à la surface de métaux. Le phénomène consiste en une réduction de l'intensité réfléchiée par une surface métallique lorsqu'elle est éclairée par une lumière incidente respectant des conditions particulières. L'exploitation de ce phénomène a permis à Nylander et Liedberg de d'abord développer un capteur à gaz anesthésiant²¹⁶ en 1982, ainsi que le premier biocapteur à anticorps en milieu liquide,²¹⁷ en 1983. Sept ans plus tard était commercialisé le premier modèle de SPR pour l'étude d'interactions biomoléculaires par la société Pharmacia (aujourd'hui Biacore).²¹⁸ Le phénomène physique sur lequel se basent les capteurs SPR va être présenté, avant d'introduire les spécificités liées à son utilisation en mode imagerie.

Le phénomène de résonance des plasmons de surface apparaît typiquement à l'interface entre un métal et un milieu diélectrique, comme l'air ou l'eau (voir figure 1.13). La théorie électromagnétique sous-jacente à la SPR peut être trouvée dans la littérature.²¹⁹ De façon générale, on peut la décrire comme un couplage entre la lumière incidente, avec la composante du champ magnétique polarisée orthogonalement à la surface – aussi appelée polarisation transverse magnétique (ou TM) – et les électrons libres du métal. La lumière incidente se propage dans le métal sous forme d'onde évanescente, c'est pour cela que l'épaisseur déposée est généralement de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres.

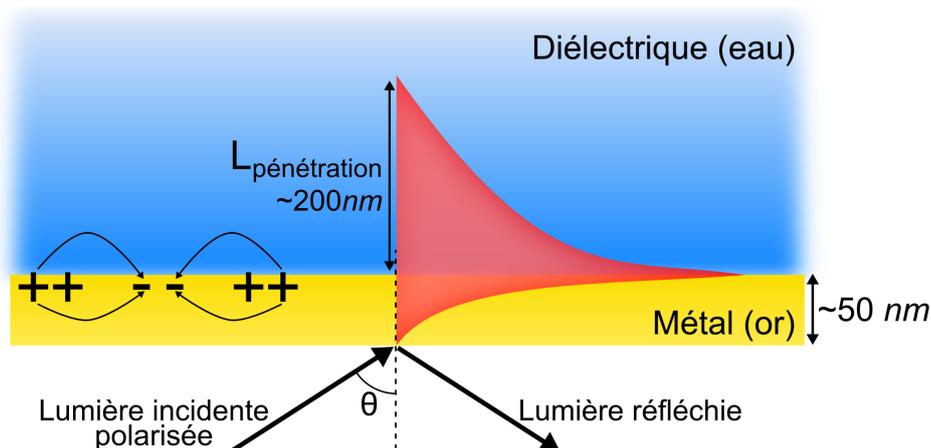


Figure 1.13 – Principe de la résonance des plasmons de surface. La lumière incidente vient faire osciller les charges à l'interface entre le métal et le diélectrique, ce qui crée l'onde plasmonique. Celle-ci se propage alors à la surface du métal, tout en pénétrant sous forme d'onde évanescente dans le diélectrique. C'est la variation de l'indice optique local à ce niveau qui vient modifier l'intensité de la lumière réfléchiée.

Les deux configurations les plus courantes (dites d'Otto et de Kretschmann) diffèrent quant au positionnement du diélectrique. Dans le cas d'Otto, il se trouve entre le métal et le prisme en verre, ce

qui rend son emploi pour la détection délicat, car cela impose la contrainte de travailler avec un système microfluidique. La configuration de Kretschmann au contraire place le métal directement sur le prisme pour ensuite mettre la surface métallisée en contact avec le milieu diélectrique. Cette configuration se prête ainsi particulièrement à fonctionnaliser les surfaces pour les rendre spécifiques et les utiliser en tant que biocapteur. En effet, en utilisant alors une lumière polarisée en TM, dans des conditions dites de réflexion interne totale, l'intégralité de la lumière est théoriquement réfléchi. Cependant, en fonction à la fois de l'angle d'incidence, ainsi que de l'indice optique local à l'interface métal/diélectrique, il peut arriver que les photons incidents entrent en résonance avec les électrons surfaciques du métal, créant ainsi une onde plasmonique. L'onde ainsi créée se propage de façon évanescence à la surface, dont l'amplitude décroît dans le diélectrique jusqu'à une longueur de pénétration de l'ordre de 100 à 200nm.¹⁸³ Lorsque ce phénomène de couplage est à son maximum, cela signifie que l'on se trouve à l'angle de résonance. Toute variation d'indice optique local en surface du métal vient alors décaler cette résonance et augmenter la quantité de lumière réfléchi. L'interaction d'un analyte avec un ligand est typiquement le type de signal biochimique que le dispositif SPR vient transduire en signal physique. C'est le suivi de ces variations de réflectivité qui permet donc l'usage en tant que biocapteur.

Parmi les différents métaux utilisables, l'or s'est largement imposé. Il présente notamment l'avantage d'une résistance à l'oxydation, ainsi qu'une grande polyvalence concernant les techniques d'immobilisation de ligands.²²⁰ Cependant, tel que présenté en figure 1.13, un capteur SPR ne permet pas de suivre la variation du signal que macroscopiquement sur l'ensemble de la surface, ce qui implique qu'un seul ligand peut être utilisé. Si une première manière de multiplexer la mesure consiste à utiliser des canaux parallèles, comme sur un appareil BIAcore par exemple, une autre approche est celle de l'utilisation de la SPR en mode imagerie (SPRI).

1.3.2.2 Mise en œuvre de la SPR en mode imagerie (SPRI)

La figure 1.14 présente un dispositif SPR couplé par prisme, selon la configuration de Kretschmann, adapté pour l'imagerie. La principale différence est l'intégration d'une caméra en lieu et place d'un photodétecteur. L'image ainsi obtenue de la surface du prisme permet de suivre simultanément les variations de réflectivité sur plusieurs régions d'intérêt (ou ROI pour *Region Of Interest*). Celles-ci sont définies comme un ensemble de pixels décrivant un seul type de ligand. Réaliser une fonctionnalisation différenciée avec des ligands variés sur des régions isolées les unes des autres permet donc d'avoir accès à plusieurs interactions parallèlement. Le signal obtenu à l'intérieur de chaque ROI sera ainsi moyenné, ce qui permet également de limiter le bruit de mesure lié aux pixels individuels de la caméra.

Concernant le suivi des variations de signal liées aux changements d'indice optique en surface, plusieurs modalités sont possibles (figure 1.15). Les courbes donnant la réflectivité en fonction du paramètre balayé (angle ou longueur d'onde) sont appelées courbes plasmons. Les interrogations spectrale et angulaire consistent à balayer toutes les valeurs possibles au cours du temps. Le système est alors plus lent et complexe à mettre en œuvre qu'un système à angle ou longueur d'onde fixe, mais peut permettre d'obtenir une sensibilité plus élevée, notamment dans le cas de l'interrogation spectrale.²²¹ Toutefois une source permettant une variation de longueur d'onde maîtrisée de façon monochromatique est extrêmement coûteuse et peu concurrentielle par rapport aux quelques centaines d'euros que coûte un

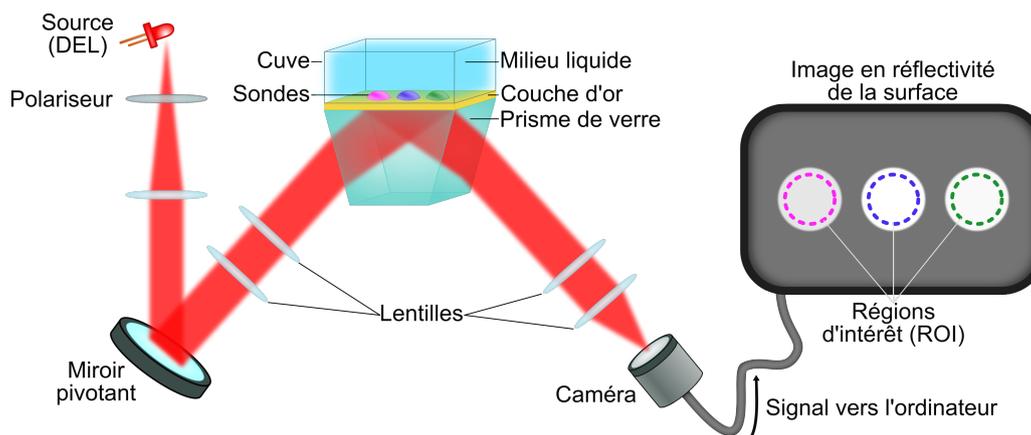


Figure 1.14 – Principe d'un imageur SPR en configuration de Kretschmann. Le miroir pivotant (motorisé ou manuel) permet de modifier l'angle incident sur la surface.

miroir motorisé. Au-delà des techniques d'interrogation par balayage, il est possible d'utiliser les appareils à angle et longueur d'onde fixes, en suivant uniquement la variation de réflectivité. Cette technique met à profit l'allure des courbes plasmons, en choisissant un angle de travail dans la zone linéaire. Cela permet d'obtenir une sensibilité maximale aux variations se produisant à la surface du capteur, sans perdre en fréquence d'acquisition. Toutefois un fort changement d'indice optique local impliquera alors une saturation du capteur. De plus des sondes aux propriétés différentes (d'épaisseur de dépôt ou d'indice optique) posent alors problème, car elles ne permettent pas de définir un angle de travail optimum pour chacune.

1.3.2.3 La méthode « Culture–Capture–Mesure » pour la détection de pathogènes

Les biocapteurs, comme toute technique d'analyse, présentent une limite de détection. La SPR pour la détection ne déroge pas à cette règle. Dans le cadre de la détection de bactéries, la littérature donne une limite généralement située entre 10^5 et 10^6 UFC.ml⁻¹, lorsque la détection est réalisée sans marquage.¹⁷⁹ Pour le diagnostic de bactériémies, cela implique par exemple d'utiliser un échantillon sanguin enrichi par l'hémoculture. Le fait de découpler cette phase d'analyse de celle de l'enrichissement provoque un potentiel délai entre la positivité de l'hémoculture et l'identification par le biocapteur.

C'est dans l'idée de supprimer ce délai que la méthode « Culture–Capture–Mesure » a été développée (figure 1.16). Elle consiste à coupler hémoculture et identification des pathogènes. Cela passe par le fait d'exposer une biopuce SPRI fonctionnalisée avec différents anticorps à un échantillon sanguin comportant des bactéries en croissance. Les plots d'anticorps comportant une réponse positive mettent ainsi en évidence à la fois la présence de bactéries, mais surtout la reconnaissance spécifique en fonction de l'anticorps qui a donné le signal. Dans un premier temps, l'emploi de cette méthode a permis de détecter quelques UFC.ml⁻¹ en une dizaine d'heures pour *Salmonella* Enteritidis et *E. coli* O157:H7 au sein d'une matrice alimentaire.^{222,223} L'utilisation en sang dilué par un milieu d'hémoculture a permis de démontrer la faisabilité de détecter *Salmonella* Enteritidis à moins d'une UFC.ml⁻¹ dans un échantillon d'environ 40 ml,²¹¹ soit un volume correspondant à ceux prélevés en milieu clinique. De plus, le capteur SPRI permet d'obtenir la détection sans effet négatif sur l'échantillon. Ainsi, le sang enrichi en bactéries issu de l'hémoculture est toujours utilisable pour réaliser des tests d'antibiosensibilité par exemple. La réunion de

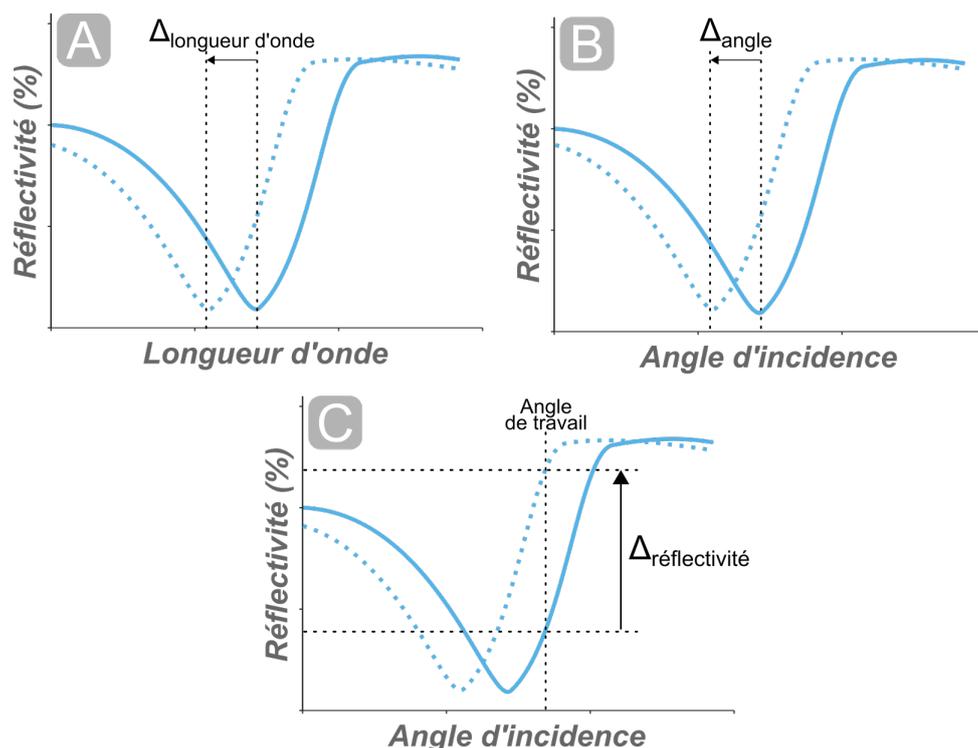


Figure 1.15 – Différents types d'interrogation possibles pour un capteur SPR. Les courbes en pointillés correspondent au résultat théorique suite à la capture de cibles en surface. A – Interrogation spectrale avec suivi du décalage de longueur d'onde de résonance. B – Interrogation angulaire avec suivi du changement d'angle de résonance. C – Suivi du changement de réflectivité à angle de travail fixe.

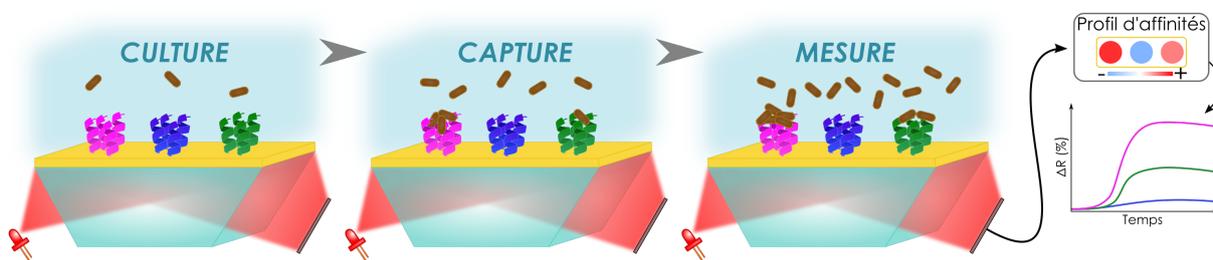


Figure 1.16 – Principe de la méthode « Culture–Capture–Mesure ». Les bactéries sont initialement injectées à forte concentration pour une première phase de culture enrichissant l'échantillon. Les premières captures de bactéries en surface des sondes viennent permettre de confirmer la présence de bactéries dans l'échantillon. Enfin la mesure des profils d'affinité peut avoir lieu une fois les sauts de détection effectués. Nota bene : le dispositif SPRI est ici représenté de façon simplifiée.

ces caractéristiques fait du système SPRI, couplé à la méthode « Culture–Capture–Mesure », une solution technique parfaitement adaptée aux enjeux de la détection de bactériémies en milieu clinique.

Comme dans le cadre d'une hémoculture classique, le temps de détection de ce système va donc dépendre de la concentration bactérienne initiale, ainsi que du taux de croissance des pathogènes. Cependant, la méthode à l'heure actuelle n'a été démontrée que de façon spécifique en utilisant des anticorps. De plus, certains pathogènes tels que *S. aureus* se révèlent pour le moment difficilement identifiables spécifiquement.²²⁴ Un nouveau développement peut donc être apporté à cette technique en intégrant des sondes possédant un spectre d'affinité plus large. D'une part ils permettraient au capteur SPRI d'avoir une

réponse positive, quel que soit le pathogène présent. D'autre part, la combinaison des réponses de ces sondes pourrait également permettre une identification par affinité croisée, chaque bactérie provoquant un profil de réponse particulier. Ce concept sera développé en partie 4.3.4. C'est la capacité des peptides antimicrobiens à jouer ces rôles que nous allons évaluer au cours de ces travaux.

1.4 Objectifs de la thèse

La présence de bactéries dans le sang, normalement stérile, n'est jamais dénuée de conséquences. Une bactériémie avérée peut évoluer en sepsis voire en choc septique et alors engager le pronostic vital d'un patient. Il est donc nécessaire de rapidement confirmer la présence de pathogènes pour ensuite les identifier et administrer au patient les antibiotiques les plus adaptés. L'obstacle majeur au diagnostic d'une bactériémie est la concentration très faible des bactéries dans le sang, de l'ordre d'une unité par millilitre. De plus la complexité du sang et les risques de contaminants extérieurs sont autant de risques d'aboutir à un diagnostic faussé. Le temps est un facteur majeur dans le déroulement d'un diagnostic. Un délai réduit avant l'adaptation de l'antibiothérapie augmente significativement les chances de survie du patient.

Classiquement, l'identification passe par une hémoculture qui vient confirmer la présence de bactéries et enrichir l'échantillon sanguin. Cette première étape fondamentale est donc nécessaire pour savoir s'il faut poursuivre ou non une antibiothérapie. Ensuite viennent les étapes d'identification et de tests de sensibilité aux antibiotiques. Au-delà des traditionnelles caractérisations biochimiques, kyrielle de techniques co-existent à l'heure actuelle pour parvenir à l'identification des pathogènes en cause. Il revient au clinicien de choisir quelle combinaison utiliser en fonction des symptômes observés et des moyens à disposition. Il existe par ailleurs des méthodes permettant l'identification directe à partir du sang, notamment en utilisant des techniques de préconcentration. Le plus souvent basées sur les acides nucléiques, ces techniques permettent de se passer de culture. Ces méthodes sont donc particulièrement adaptées pour les pathogènes peu ou pas cultivables, ou bien ceux à croissance lente. Le risque de faux-négatif reste cependant présent et ne permet pas encore d'envisager de se passer de culture. Pour la majorité des cas, l'hémoculture reste donc incontournable avant de pouvoir identifier les agents infectieux.

Les biocapteurs ont un potentiel intéressant pour être intégrés dans la chaîne de diagnostic. La possibilité de les miniaturiser tout en les faisant communiquer avec le reste du système peut permettre d'imaginer un suivi en temps réel d'une culture. Cependant si de tels systèmes existent dans des matrices simples ou bien dans l'agroalimentaire, il n'existe pas encore d'exemple de biocapteur utilisable au contact du sang. L'adaptation de nez électroniques à l'étape d'identification sur les cultures solides est un exemple prometteur du gain d'information que les biocapteurs peuvent donner. Une telle démarche d'identification à large spectre au sein des flacons d'hémoculture n'a jamais été éprouvée. Elle représenterait pourtant un gain de temps non négligeable, en couplant détection et identification, ce qui permettrait d'adapter plus rapidement l'antibiothérapie empirique.

L'emploi de la SPRI en milieu sanguin a déjà été démontré et permet de suivre la croissance de pathogènes en temps réel, une fois le seuil de détection franchi. Toutefois sa mise en œuvre pour l'heure n'a été effectuée qu'en employant des sondes spécifiques. L'objet de ces travaux de thèse sera d'évaluer l'emploi de peptides antimicrobiens en tant que sondes à large spectre pour la détection de pathogènes

bactériens, quels qu'ils soient et sans prérequis. Cette approche sera dans un premier temps validée en milieu de culture simple avant d'être transférée en plasma puis en sang total, dilués dans des conditions similaires aux hémocultures réalisées en laboratoire d'analyses médicales. De plus, si des différences d'affinité sont constatées, le potentiel d'identification sera testé, notamment par le biais d'analyses statistiques des données obtenues. Enfin, si de telles sondes sont validées, elles pourraient à terme être intégrées en parallèle de sondes spécifiques sur des capteurs SPRI. Le capteur ainsi obtenu pourrait proposer d'une part une détection à large spectre, et d'autre part une identification précise des souches les plus pertinentes. L'autre avantage de la SPRI est d'être une méthode qui permet de sonder l'échantillon sans le modifier. Cela permettrait de procéder, après l'hémoculture ainsi instrumentée, aux autres analyses conventionnelles à partir du même échantillon sanguin.



Sélection et synthèse de peptides antimicrobiens pour la détection bactérienne

2 Sélection et synthèse de peptides antimicrobiens pour la détection bactérienne 53

- 2.1 Peptides antimicrobiens : propriétés et applications
- 2.2 Choix de peptides références depuis l'état de l'art
- 2.3 Critères de conception des sondes supplémentaires
- 2.4 Synthèse des peptides antimicrobiens sélectionnés

Chapitre 2

Sélection et synthèse de peptides antimicrobiens pour la détection bactérienne

2.1 Peptides antimicrobiens : propriétés et applications

2.1.1 Caractéristiques des peptides antimicrobiens (PAM)

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont une composante des défenses immunitaires de nombreux organismes, des bactéries aux mammifères²²⁵ en passant par les plantes²²⁶ ou encore les insectes.²²⁷ Ils se définissent par leur capacité d'interaction avec les bactéries, en inhibant leur croissance ou en les lysant, et sont souvent considérés comme l'une des premières barrières de l'immunité. Cependant, cela ne suffit pas à totalement décrire les PAM, qui possèdent à la fois une grande variété de structures et d'interactions possibles avec les bactéries. Ce sont ces propriétés que nous allons introduire, avant de présenter plus en détail les applications des PAM en tant que ligands dans la littérature des biocapteurs.

2.1.1.1 Structures chimiques et classification des PAM

La très grande variété des séquences connues de PAM a conduit à les rassembler dans diverses bases de données, en fonction de leurs propriétés. Si le regroupement basé sur leur origine ou leur activité contre une cible particulière s'avère intéressant dans la compréhension de leurs mécanismes d'action, il reste intéressant d'avoir des bases de données généralistes, aux critères de recensement plus larges. Parmi ces bases de données, l'*Antimicrobial Peptide Database 3** (APD3), regroupe les informations sur la majorité des peptides naturels antimicrobiens publiés à ce jour.²²⁸ Sa mise à jour de mai 2019 a porté son nombre de références à 3112 peptides, dont seuls 4 % sont synthétiques. Bien qu'ils possèdent une grande variété de structures, une tendance émerge dans les peptides recensés, en effet 87,9 % sont cationiques, pour 5,9 % neutres et 6,2 % anioniques. Cependant, il s'agit là de données uniquement pour des peptides surtout naturels, qui en réalité ne sont qu'une fraction des séquences peptidiques antimicrobiennes découvertes. La mise à jour de juillet 2019 du *Data Repository of AntiMicrobial Peptides†* (DRAMP) a par exemple porté à 19 899 le nombre d'entrées différentes, en prenant en compte tous les peptides synthétiques, dépôts de brevets et essais cliniques de PAM.²²⁹ Toutefois, bien que la base DRAMP contienne 6,4 fois plus de séquences que l'APD3, cette dernière possède tout de même 797 séquences non redondantes vis-à-vis de DRAMP. Il convient ainsi d'insister sur le fait que chaque base de données possède ses particularités, comme des séquences ou des données qui ne se retrouvent pas dans les autres.²³⁰ Il n'existe donc pas à

*. Accessible sur <http://aps.unmc.edu/AP/> – dernier accès le 19 août 2019

†. Accessible sur dramp.cpu-bioinform.org/ – dernier accès le 19 août 2019

l'heure actuelle de base de données consensuelle pour les PAM.

Au-delà de cette charge positive en commun, les PAM présentent également une proportion non négligeable d'acides aminés hydrophobes. Cependant, utiliser les propriétés physico-chimiques n'est pas suffisant pour regrouper les peptides. Leur structure secondaire est généralement privilégiée comme critère de classement. FJELL et al. ont par exemple classé par similarité les peptides dont les structures sont connues, afin de représenter leur variété (figure 2.1). Cela met en avant que tous les PAM décrits dans la littérature possèdent au moins une région en hélice α ou en feuillet β , ce qui traduit leur caractère partiellement amphiphile.



Figure 2.1 – Classification de 135 peptides antimicrobiens à la structure décrite dans la Protein Data Bank. Les données utilisées sont extraites à partir des angles de torsion du squelette peptidique. Les PAM avec une structure similaire sont classés ensemble. D'après FJELL et al.²³¹

Trois grandes catégories liées à la structure sont généralement distinguées parmi les PAM. Tout d'abord, les PAM linéaires en hélice α , probablement parmi les plus fréquemment décrits dans la littérature.^{232,233} Il s'agit d'une classe de peptides qui regroupe de nombreuses sous-familles, dont on peut par exemple citer les magainines, les cécropines ou les mélittines. Ensuite, on distingue les peptides riches d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s) particulier(s). On peut citer ainsi les peptides riches en arginine et tryptophane,²³⁴ comme l'indolicidine, ou encore ceux riches en proline,²³⁵ fréquemment retrouvés chez les abeilles par exemple.²³⁶ Enfin, ceux riches en cystéine forment une famille à part, la présence de cet acide aminé engendrant la formation de ponts disulfures qui stabilisent la structure tridimensionnelle des peptides. Parfois une distinction au sein de cette famille se fait entre les peptides présentant un seul pont disulfure et ceux en présentant plusieurs. Cette nuance vient notamment de la structuration plus forte apportée par plusieurs ponts, là où un seul vient généralement seulement cycliser le peptide.

Ce premier critère basé sur la structure est ainsi à l'heure actuelle celui le plus aisément employable

dans la classification des PAM. Il reste cependant encore délicat²³⁷ de considérer cette classification comme définitive, étant donné le nombre conséquent de peptides aux structures encore non résolues. De plus, l'étude des PAM présentant des modifications post-traductionnelles vient encore enrichir cette variété.²³⁷ Une autre distinction parmi les PAM naturels peut en effet se faire par ailleurs en fonction de leur voie de synthèse, ribosomique ou non.²³⁸ Les peptides non ribosomiques sont produits par des complexes enzymatiques le plus souvent au sein de bactéries ou de levures, et présentent fréquemment des acides aminés non protéinogènes. A contrario, les PAM ribosomiques vont contenir majoritairement des acides aminés naturels, bien qu'ils puissent subir des modifications post-traductionnelles.

Au-delà de la simple considération de la structure, il reste par ailleurs utile pour des applications particulières de continuer à regrouper dans des bases de données spécifiques des peptides possédant des caractéristiques ou des mécanismes communs, pour faciliter leur étude.²³⁰ Au-delà de la nécessité de classification, l'étude de leurs mécanismes d'action est primordiale à la compréhension des peptides antimicrobiens.

2.1.1.2 Interactions des PAM avec les bactéries

Avant d'entrer plus précisément dans les mécanismes d'interaction, il faut préciser que trois principaux types d'actions des PAM sur les bactéries sont possibles. L'action d'inhibition des PAM sur les micro-organismes peut ainsi être soit localisée au niveau membranaire, soit sur une cible intracellulaire. Enfin le troisième grand mécanisme intervient lorsque le PAM induit un mécanisme de résistance. Cette thèse portant sur la détection de bactéries, seuls les mécanismes d'interaction avec ces micro-organismes seront introduits.

Les modes d'action membranaires sont les mieux décrits à l'heure actuelle. La membrane bactérienne étant anionique, ce sont majoritairement les PAM cationiques qui présentent une action inhibitrice ou lytique par le biais d'une interaction membranaire. Les interactions électrostatiques leur permettent effectivement de s'adsorber préférentiellement sur ces membranes. Dans un second temps, la présence de résidus hydrophobes va favoriser leur insertion dans la membrane. Cependant, si la présence de résidus cationiques et hydrophobes est souvent considérée comme nécessaire afin que ces mécanismes puissent avoir lieu, elle n'est toutefois pas suffisante. La distribution des charges positives le long de l'hélice α vient par exemple moduler l'activité antimicrobienne des peptides.²³⁹ La figure 2.2 présente de façon schématique la plupart des mécanismes pouvant arriver suite à l'interaction initiale des peptides avec la membrane cytoplasmique des bactéries. La disruption des membranes suite à cette insertion initiale passe alors *a priori* majoritairement par la formation de pores ou bien de micelles. Toutefois, plusieurs autres mécanismes permettent de mener à une inhibition de l'activité des bactéries.

De prime abord, il est intéressant de souligner que pour parvenir à l'inhibition ou bien à la lyse des bactéries, la plupart de ces mécanismes nécessitent une synergie entre peptides. Dans le cadre de la formation de micelles par exemple, il a en effet été démontré qu'une quantité seuil de peptides était nécessaire pour solubiliser les membranes,²⁴¹ parfois équivalente à les recouvrir entièrement.²⁴² L'accumulation de peptides au niveau de la membrane peut également entraîner son amincissement, jusqu'à provoquer la fuite de métabolites depuis l'intérieur du cytoplasme bactérien. Du point de vue évolutif, cette tendance à la synergie entre PAM pourrait découler de mutations de peptides au caractère

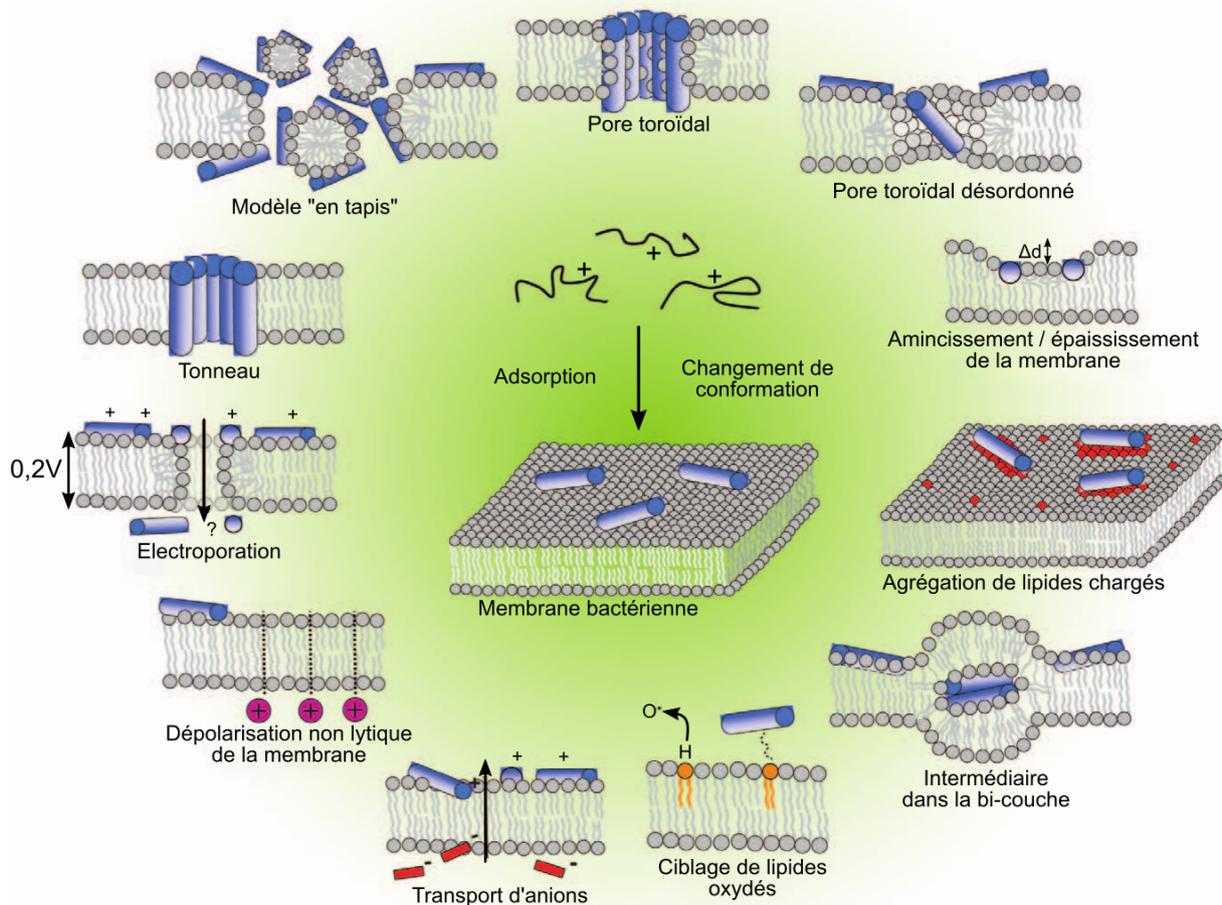


Figure 2.2 – Principaux modes d'action des PAM sur les membranes bactériennes après interaction initiale. Traduit depuis NGUYEN et al.²⁴⁰

amyloïde vers un caractère antimicrobien, du fait de l'apparition de charges positives.²⁴³ Malgré tout, la majorité des études portant sur ces mécanismes sont réalisées *in vitro*, il reste encore une zone d'ombre sur les mécanismes précis conduisant à l'action des PAM *in vivo*.²⁴⁴

Un autre grand pan des interactions membranaires des PAM repose sur leur capacité à cibler des éléments spécifiques à la surface des bactéries. Cela va être le cas par exemple du lipide II, un précurseur de la synthèse du peptidoglycane.²⁴⁵ Certains PAM, comme la nisine, vont isoler ce lipide du septum, empêchant ainsi la division cellulaire pour les bactéries et de ce fait leur prolifération. D'autres molécules impliquées dans la division bactérienne, généralement des lipides anioniques, peuvent également être ciblées.²⁴⁶ Cela entraîne généralement des cellules bactériennes anormalement grandes, ou à la morphologie atypique.²⁴⁷

Ainsi, l'interaction des PAM avec les membranes va principalement entraîner soit la lyse de la bactérie ciblée, soit un dysfonctionnement de sa machinerie moléculaire interne, inhibant alors sa croissance. Toutefois, il convient de souligner que si la capacité d'interaction avec les membranes est un facteur important dans la description des PAM, il ne reste pas suffisant à qualifier un peptide d'antimicrobien.²⁴⁸

L'autre grand type d'action antimicrobienne des PAM nécessite d'atteindre des cibles intracellulaires.²⁴⁹ Cela implique donc également une interaction initiale avec les membranes bactériennes, bien qu'elle

soit alors transitoire avant que le peptide ne se transloque. À noter que ce mécanisme de traversée de la membrane bactérienne peut être accompli avec l'aide de transporteurs spécifiques, comme des protéines membranaires des bactéries.²⁵⁰ L'action que le PAM aura à l'intérieur du cytoplasme peut alors prendre diverses formes. En se liant aux ribosomes, certains PAM entraînent l'inhibition du mécanisme de traduction génétique. La déstabilisation du cycle de division bactérien est l'autre grande voie d'action des peptides à cible intracellulaire. Cela peut se faire par exemple en interférant avec les précurseurs de la synthèse membranaire, ou bien en induisant des protéines qui auront un effet similaire. Le résultat obtenu sera alors à nouveau des cellules déformées, qui perdent leur capacité de multiplication.^{251,252}

Enfin, la présence de PAM peut également induire des mécanismes de résistance de la part des bactéries. Ces mécanismes de survie peuvent survenir soit après l'activation de récepteurs spécifiques, soit de façon plus générique suite aux dégradations subies par la membrane.²⁵³ Plusieurs types de stratégies peuvent alors être adoptées par les bactéries.²⁵⁴ Une modification de la membrane peut advenir par exemple, *via* sa neutralisation ou bien la création « d'îlots anioniques » pour y piéger les PAM et ainsi les détourner du septum de la division cellulaire. Ce mécanisme de piégeage peut également avoir lieu suite à la sécrétion de protéines ou de polysaccharides extracellulaires. La sécrétion de protéases est également possible afin de dégrader les PAM. Enfin, des mécanismes d'efflux ou bien d'incorporation peuvent se mettre en place, afin d'en débarrasser la membrane bactérienne des peptides.

Bien que ces mécanismes de résistance soient problématiques dans le cadre de pathogènes, ils peuvent au contraire être nécessaires pour les bactéries symbiotiques. Par exemple, la présence majoritaire de *Staphylococcus epidermidis* sur notre épiderme provient en partie de la résistance qu'il peut développer face aux PAM.²⁵⁵ De plus, il peut réguler le développement d'autres flores bactériennes en envoyant des signaux faisant produire aux kératinocytes une concentration plus importante de PAM. De tels mécanismes se retrouvent dans les autres niches écologiques du corps humain (muqueuses, intestins, système respiratoire, etc.). Une revue de MERGAERT présente l'implication des PAM dans divers mécanismes de symbiose entre hôtes et bactéries.²⁴⁴

2.1.1.3 Recherche et développement dans le domaine des antibiotiques

Les peptides antimicrobiens présentent donc pléthore d'interactions possibles avec les bactéries. La majorité d'entre elles conduit à l'inhibition de la croissance bactérienne, voire à la lyse. L'émergence croissante de bactéries multi résistantes, insensibles parfois aux antibiotiques de deuxième ou troisième ligne, se fait parallèlement à une baisse drastique dans la découverte de nouveaux antibiotiques.²⁵⁶ Les caractéristiques des PAM en font des modèles prometteurs pour le développement de nouveaux agents antibactériens afin de faire face à cette tendance.²⁵⁷ Cet enthousiasme provient également du fait que les PAM s'inscrivent dans la logique d'utiliser la nature pour isoler des antibiotiques, ce qui est le schéma historique du développement de ces molécules.²⁵⁸ Le développement de nouveaux antibiotiques consiste à majoritairement travailler sur la structure du peptide, avec la découverte de nouvelles séquences ou l'amélioration de celles déjà connues. Au-delà des logiques d'isolation de PAM à partir du vivant, l'exploration des bases de données connues est une autre façon de parvenir à identifier de nouvelles séquences actives.²⁴⁸ Cela peut être par exemple réalisé en appliquant des algorithmes linguistiques, qui vont rechercher des motifs récurrents dans les PAM déjà identifiés.²⁵⁹⁻²⁶¹ La recherche de nouvelles

séquences peut également être effectuée en partant de principes physico-chimiques. La revue de TORRES et al. aborde les principales approches actuelles dans la conception de nouveaux peptides.²⁶²

Par la suite, l'amélioration de PAM identifiés comme prometteurs peut se faire suivant différentes méthodes.²⁶³ L'approche la plus intuitive se base sur des mutations empiriques, afin de conserver les mêmes propriétés physico-chimiques, tout en augmentant potentiellement l'activité antibactérienne grâce à une structure tridimensionnelle plus favorable. Ceci peut être réalisé en synthétisant des séquences aléatoires du peptide initial par exemple.²⁶⁴ L'identification des acides aminés les plus importants peut également être réalisée en substituant un à un les résidus par des alanines,²⁶⁵ les acides aminés alors « inutiles » peuvent être alors substitués par d'autres, potentiellement plus propices à l'activité antibactérienne. D'autres méthodes, basées sur la modélisation informatique ou la dynamique moléculaire sont également développées. La revue de LI et al.²⁶³ revient sur les principales avancées de ces méthodes.

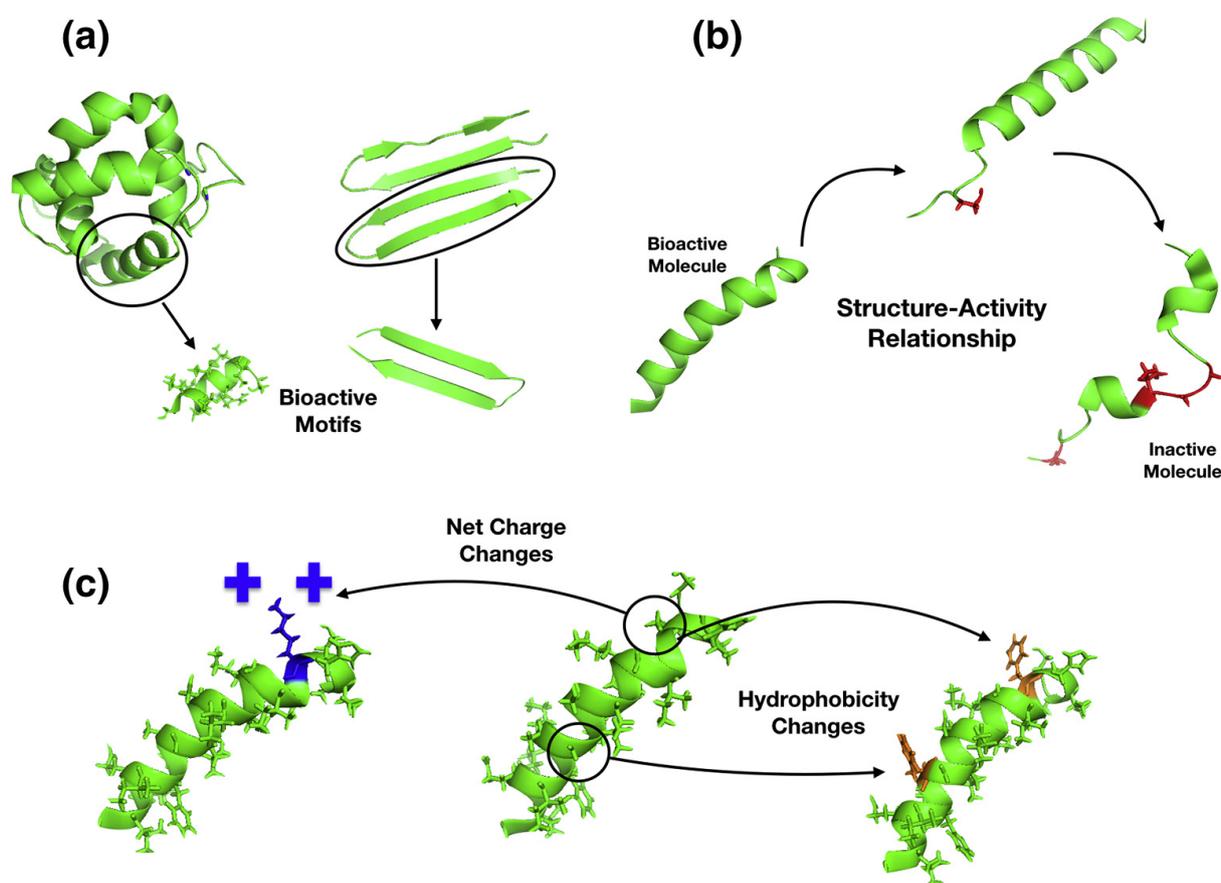


Figure 2.3 – Principes généraux d'amélioration de l'activité d'un peptide antimicrobien. (a) Identification de séquences d'intérêt, soit de peptides naturellement antimicrobiens, soit à partir de fragments de protéines. (b) Exploration de changements de structure et d'amphipathicité. (c) Substitutions d'acides aminés pour augmenter la charge ou l'hydrophobicité du peptide. Tous ces changements peuvent potentiellement faire perdre la structure du peptide et ainsi diminuer son activité. D'après TORRES et al.²⁶²

Le développement de PAM en tant que nouveaux antibiotiques ne se fait tout de même pas sans encombre. Depuis l'introduction des premiers antibiotiques, l'histoire du développement de nouvelles solutions thérapeutiques est effectivement marquée par l'apparition systématique de bactéries résistantes.²⁶⁶ Les craintes sont élevées qu'il en soit de même avec les PAM, d'autant plus pour ceux ribosomiques qui

possèdent pour certains un mécanisme d'action identique aux PAM humains.^{267,268} Le développement d'une résistance croisée des pathogènes face à ces PAM d'une part, et face au système immunitaire inné d'autre part est en effet supposé peu probable, en raison du mécanisme lytique d'élimination des bactéries.²⁶⁹ Toutefois, si les premiers doutes concernant ce risque de résistance croisée ont été émis dès le début des années 2000, à l'heure actuelle, peu d'études ont cherché à l'évaluer.²⁷⁰ La seule certitude acquise entre-temps est la capacité des bactéries à effectivement développer des mécanismes de résistance face aux PAM.^{254,271} Concernant la résistance croisée, des études s'en font écho,^{270,272} mais leur nombre est encore trop restreint pour aboutir à une conclusion définitive. Ceci est en partie dû à la difficulté de mener de telles études *in vivo*.²⁷³ L'apparition de résistance face aux PAM seuls semble cependant effectivement moins probable que dans le cas des antibiotiques classiques.²⁷⁴ Cela proviendrait notamment de leur pharmacocinétique favorable, qui permet d'atteindre rapidement la dose inhibitrice. De plus, les PAM à action membranaire n'enclenchent pas les mécanismes de réparation de l'ADN des pathogènes, ce qui vient réduire leur capacité à développer une résistance.²⁷⁵ Certaines approches proposent également de contourner le risque de faire apparaître une résistance à un peptide donné en utilisant des « cocktails » de PAM.²⁷⁶ Il est alors supposé que les bactéries ne développeraient pas de résistance particulière à cet ensemble de peptides, contrairement à ce qu'elle peut faire lorsqu'elle est exposée à une seule molécule spécifique.

Le risque de voir les pathogènes être moins sensibles aux PAM n'est pas le seul obstacle à leur développement en tant qu'antibiotiques. On peut en effet évoquer un coût de synthèse élevé, le risque d'une toxicité pour l'humain ou encore le manque de stabilité *in vivo*, en raison des protéases par exemple. Toutefois, ces divers obstacles peuvent être contournés. La biosynthèse semble être une méthode prometteuse pour arriver à une synthèse à bas coût.²⁷⁷ Les séquences peuvent être conçues pour limiter les interactions avec les cellules non ciblées.²⁷⁸ Concernant la stabilité, inclure les PAM dans des vecteurs pour aboutir à une délivrance ciblée est une approche permettant d'éviter la dégradation du médicament avant d'atteindre le pathogène.^{279,280} Toutefois, malgré ce potentiel prometteur, début 2018, seuls 11 peptides étaient autorisés en tant que médicaments par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA).²⁸¹ Tous à part l'enfurvitide – un inhibiteur de fusion du VIH-1 – sont des peptides nécessitant des modifications post-traductionnelles. Une petite vingtaine d'autres sont actuellement en cours d'essais cliniques.²⁸²

2.1.1.4 Au-delà des néo-antibiotiques : autres applications des PAMs

La recherche pharmaceutique sur les PAM ne se limite pas uniquement aux antibiotiques. En effet, en plus des propriétés antimicrobiennes, certains peptides peuvent avoir d'autres applications thérapeutiques.²⁸³ En lien direct avec le traitement d'infections, certains PAM peuvent agir lors d'inflammations, voire stimuler l'activité du système immunitaire. LL-37, de la famille des cathélicidines, est un exemple chez l'humain de peptide qui présente ces propriétés supplémentaires.²⁸⁴ Les peptides antimicrobiens pourraient donc trouver des applications dans plusieurs maladies inflammatoires, grâce au rôle ubiquitaire qu'ils peuvent tenir, tour à tour pro- ou anti-inflammatoire.²⁸⁵ Ces caractéristiques incluent également une propension à faciliter la cicatrisation.²⁸⁶ Ces divers avantages conduisent à étudier l'application de peptides dans différents cadres, comme pour le traitement d'infections buccales,²⁸⁷ du

sepsis,²⁸⁸ où leur utilisation pourrait se faire en complément d'antibiotiques classiques.²⁸⁹ Des PAM naturels ou modifiés sont également à l'étude pour développer des molécules anticancéreuses.²⁹⁰ Par ailleurs, bien qu'ils ne soient pas l'objet principal d'étude ici, certains PAM permettent d'éliminer d'autres micro-organismes que les bactéries, comme les virus,²⁹¹ les champignons²⁹² ou encore les parasites.^{293,294} Ces propriétés biocides à large spectre permettent également de faire de certains PAM des candidats intéressants pour une application ailleurs que chez l'humain. Ainsi, ils pourraient remplacer dans l'agriculture les produits phytosanitaires de synthèse actuels.²⁹⁵ La conservation des aliments²⁹⁶ est enfin un des premiers domaines d'application à grande échelle pour les PAM avec la nisine, intronisée additif alimentaire (E234) dans les années 1960 et utilisée pour la conservation de viandes, fromages ou boissons.

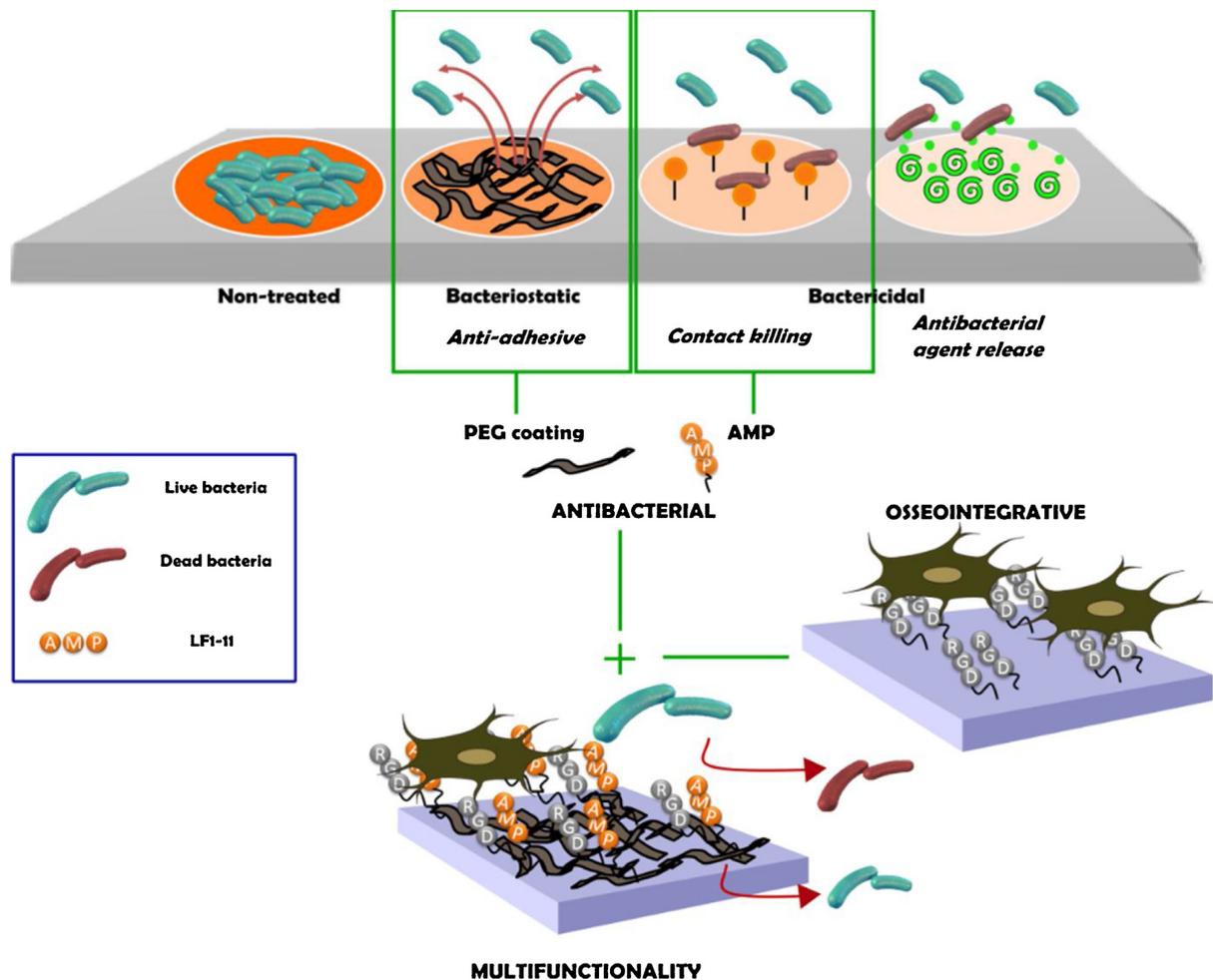


Figure 2.4 – Principe d'intégration d'un peptide antimicrobien sur une surface fonctionnalisée multifonctionnelle. Le PAM immobilisé procure un caractère biocide à la surface, le polyéthylène glycol (PEG) réduit l'adhésion, tandis que le motif RGD favorise l'intégration de l'implant. À noter qu'une stratégie classique consiste au relargage progressif d'un antibiotique vers le milieu, ce qui présente l'inconvénient d'une efficacité limitée dans le temps. D'après HOYOS-NOGUÉS *et al.*²⁹⁷

Toutes les applications des peptides antimicrobiens abordées jusqu'ici possèdent un point commun : les peptides y sont utilisés en solution. Or, leurs propriétés biocides en font également des molécules d'intérêt pour les immobiliser sur des surfaces qui doivent rester stériles. Les PAM sont donc au premier rang des approches bio-inspirées pour le développement de surfaces antibactériennes,²⁹⁸ qui peuvent se retrouver

dans plusieurs contextes d'application. Comme précédemment évoqué (partie 1.1.1.1), les infections bactériennes sont régulièrement liées aux biofilms qui s'établissent dans les dispositifs médicaux.³⁰ C'est donc naturellement que des surfaces comme les cathéters sont des objets d'étude fréquents pour l'immobilisation de PAM.^{299,300} La surface des implants médicaux, source majeure de foyers infectieux, est également un terrain propice pour être fonctionnalisé avec des PAM.^{297,301-304} Leurs propriétés antibactériennes peuvent alors être intégrées dans des couches mixtes, fonctionnalisées avec d'autres biomolécules, pour éviter les rejets des implants (voir figure 2.4) Dans la même tendance, la stratégie de dépôt sur des gants en latex, pour la chirurgie par exemple, comme démontré par JEONG et al.³⁰⁵ laisse augurer le potentiel d'une utilisation à large échelle de surfaces antibactériennes fonctionnalisées avec des PAM.

2.1.2 La détection de bactéries avec les PAM

La majorité des applications des PAM mettent à profit leur caractéristique fondamentale, à savoir leur fort potentiel bactéricide. Nonobstant l'intérêt de ce dernier, il se traduit également par une capacité des PAM à interagir préférentiellement avec les membranes bactériennes. Cet atout peut être mis à profit non pas pour éradiquer des pathogènes, mais au contraire pour les détecter.

Historiquement cet emploi des PAM a été initié dans le domaine de l'imagerie médicale, avec l'utilisation de domaines antimicrobiens de l'ubiquitine, couplés au technétium 99m, un traceur isotopique.³⁰⁶ L'avantage de l'emploi des peptides spécifiques aux parois bactériennes est alors de pouvoir distinguer une infection bactérienne d'une inflammation.³⁰⁷ Toutefois, l'utilisation de tels traceurs est à l'heure actuelle encore au stade de la recherche fondamentale,³⁰⁸ malgré le potentiel qu'ils montrent.

L'application des PAM comme traceurs d'infections ne s'est faite pour le moment que pour détecter des bactéries dans des tissus biologiques et non pas des fluides comme le sang. La suite de cette partie va donc plutôt s'attarder sur l'utilisation des PAM immobilisés en tant qu'éléments de reconnaissance pour des biocapteurs. Seront dans un premier temps succinctement présentées quelques applications pour la détection spécifique, avant de détailler la littérature pour la reconnaissance de pathogènes à large spectre. Cette revue de la littérature permettra de fournir un référentiel des performances atteintes par des peptides antimicrobiens en tant que sondes pour des biocapteurs.

Plusieurs revues^{196,309-311} ont déjà pu aborder l'emploi de peptides antimicrobiens dans les biocapteurs. Par ailleurs, on écarte de cet état de l'art les applications de peptides dérivés d'anticorps ou de phages, qui sont généralement spécifiques.³¹² On se propose ici de présenter les publications majeures des PAM dans les biocapteurs spécifiques, avant de compléter les revues en couvrant l'intégralité des publications sur les applications à large spectre publiées jusqu'au printemps 2019. Large spectre est entendu comme la capacité à reconnaître la présence de bactéries dans un échantillon, quelle que soit leur souche. On distinguera cette notion de l'identification, qui correspond à la capacité du capteur à renseigner ou non sur la nature de ces bactéries.

2.1.2.1 Les PAM comme sondes dans les biocapteurs : une histoire récente

Les premières études qui ont intégré les PAM comme éléments de capture dans un biocapteur sont issues de laboratoires de recherche de l'armée américaine.^{313,314} Les PAM sont alors immobilisés soit

dans des puits pour une révélation colorimétrique avec la peroxydase du raifort,³¹³ soit sur des lames pour une mesure à l'aide d'un capteur de fluorescence.³¹⁴ *E. coli* O157:H7 est une souche commune aux deux études, tandis que *Salmonella* est également détectée dans le cas de KULAGINA et al. Le système par fluorescence de KULAGINA et al. a par la suite été étendu à d'autres cibles, virus comme bactéries, en intégrant de nouveaux peptides.^{315,316} Les limites de détection les plus basses alors obtenues sont de l'ordre de 10^4 UFC.ml⁻¹ dans le cas de la détection d'*E. coli* avec la magainine.³¹⁶ Le capteur ainsi développé, tel que présenté en figure 2.5–A, a fait l'objet d'un brevet par la suite.³¹⁷ Dans les deux cas, ces méthodes nécessitaient toutefois l'emploi d'anticorps ou de cellules bactériennes marquées par un fluorophore pour aboutir à la révélation du résultat. L'étude d'ARCIDIACONO et al. est le premier exemple d'une détection directe avec des peptides marqués par le marqueur fluorescent Cy5 (cyanine 5), alors avec une spécificité pour *E. coli* O157:H7.

La détection par voltammétrie cyclique du parasite *Leishmania*, démontrée en 2009 par ZAMPA et al.³²¹ à une concentration de 10^3 cellules.ml⁻¹, est le premier exemple d'une détection sans marquage d'un micro-organisme avec un PAM, la dermaseptine 01. Dans le cas des bactéries, la première publication advient en 2010 par MANNOOR et al.³¹⁹ Il s'agit alors d'une preuve de concept de la reconnaissance spécifique de pathogènes à Gram négatif, comme *E. coli* O157:H7 ou *Salmonella typhimurium*, grâce à la magainine 1 immobilisée sur un réseau de microélectrodes interdigitées (voir figure 2.5–B). La limite de détection atteinte est alors de l'ordre de 10^3 UFC.ml⁻¹ en solution saline. Ces premières preuves de concept mettant en œuvre biocapteurs électrochimiques sont donc les précurseurs de nombre d'articles à leur suite utilisant le même type de transduction avec des peptides.³²²⁻³³⁴ La revue de HOYOS-NOGUÉS et al.³¹¹ revient plus en détail sur ces biocapteurs électrochimiques utilisant des PAM.

Les peptides antimicrobiens ont été utilisés avec d'autres méthodes de transduction. Leur intégration a ainsi pu se faire sur des capteurs électroniques,^{173,335} adaptables sur des substrats souples. Cela a ainsi permis à MANNOOR et al. de mettre au point le premier capteur implantable sur des poches d'intraveineuse par exemple, afin de surveiller l'apparition d'une éventuelle contamination.¹⁷³ Ce capteur, présenté en figure 2.5–C, est basé sur les variations de résistivité lorsque des bactéries s'accrochent sur une surface de graphène fonctionnalisée avec un PAM, l'odoranine-HP. Ce dernier est couplé à un peptide affiné du graphène, afin d'assurer son greffage sur la surface. Le lien avec une bobine qui sert d'antenne de lecture de la résistivité permet au capteur d'être implanté sans prévoir de connexions particulières. Le capteur peut ainsi également être appliqué directement sur des tissus dont on soupçonne l'infection par exemple. Cette application, particulièrement intéressante dans le milieu médical, a mené à une protection par brevet en 2015.³³⁶

YONEKITA et al. ont intégré différents PAM, dont notamment la cécropine P1, la magainine 2 et la cératotoxine A en tant que marqueurs pour la détection de différentes souches pathogènes d'*E. coli* sur bandelettes en papier. Le système, présenté en figure 2.5–D, consiste à coupler le PAM à une biotine, avant de l'exposer à des nanoparticules d'or couplées à la streptavidine, afin d'obtenir un résultat coloré. La bandelette, fonctionnalisée avec trois anticorps spécifiques différents permet de détecter la contamination à des souches courantes des toxi-infections alimentaires : *E. coli* O157, O26 et O111. Le système, possédant une limite de détection annoncée de 10^4 UFC.ml⁻¹, a permis de détecter la contamination de bœuf haché aux *E. coli* productrices de shigatoxines en 18 heures, avec une contamination de l'ordre de quelques UFC

pour 25 grammes de viande. Dans un cadre comme l'alimentaire, les pathogènes ciblés sont clairement identifiés par des cahiers des charges, de telles solutions mettant en œuvre des sondes spécifiques sont intéressantes. Elles reposent néanmoins sur la nécessité de produire des anticorps parfois coûteux, ce qui limite encore leur développement.

Des applications dans le lait,³²⁷ voire même dans le sang²⁰⁸ viennent confirmer la capacité des PAM à conserver leurs performances de reconnaissance des bactéries, même en matrices complexes. Le principe du premier capteur appliqué en sang, par SHI et al., est présenté en figure 2.5–E. Basé sur le relargage de la pleurocidine en solution en présence de bactéries, il est basé sur des différences d'affinités, il permet d'atteindre une limite de détection de l'ordre de 10^3 UFC.ml⁻¹ dans le sang de mouton, ce qui se rapproche des concentrations retrouvées dans un cadre médical. La détection universelle proposée est alors intéressante pour accélérer le diagnostic de positivité d'une hémoculture et ainsi confirmer qu'une antibiothérapie est effectivement nécessaire. Toutefois, cette technologie ne permet pas à l'heure actuelle d'obtenir une quelconque identification du pathogène en présence.

Bien que la première application des PAM pour la détection de bactéries soit récente, ils ont su s'adapter à des contextes variés, notamment grâce à leur facilité d'intégration aux technologies préexistantes. Nous nous proposons pour la partie suivante de dresser un état de l'art de leurs applications de détection sans intégration d'autres marqueurs.

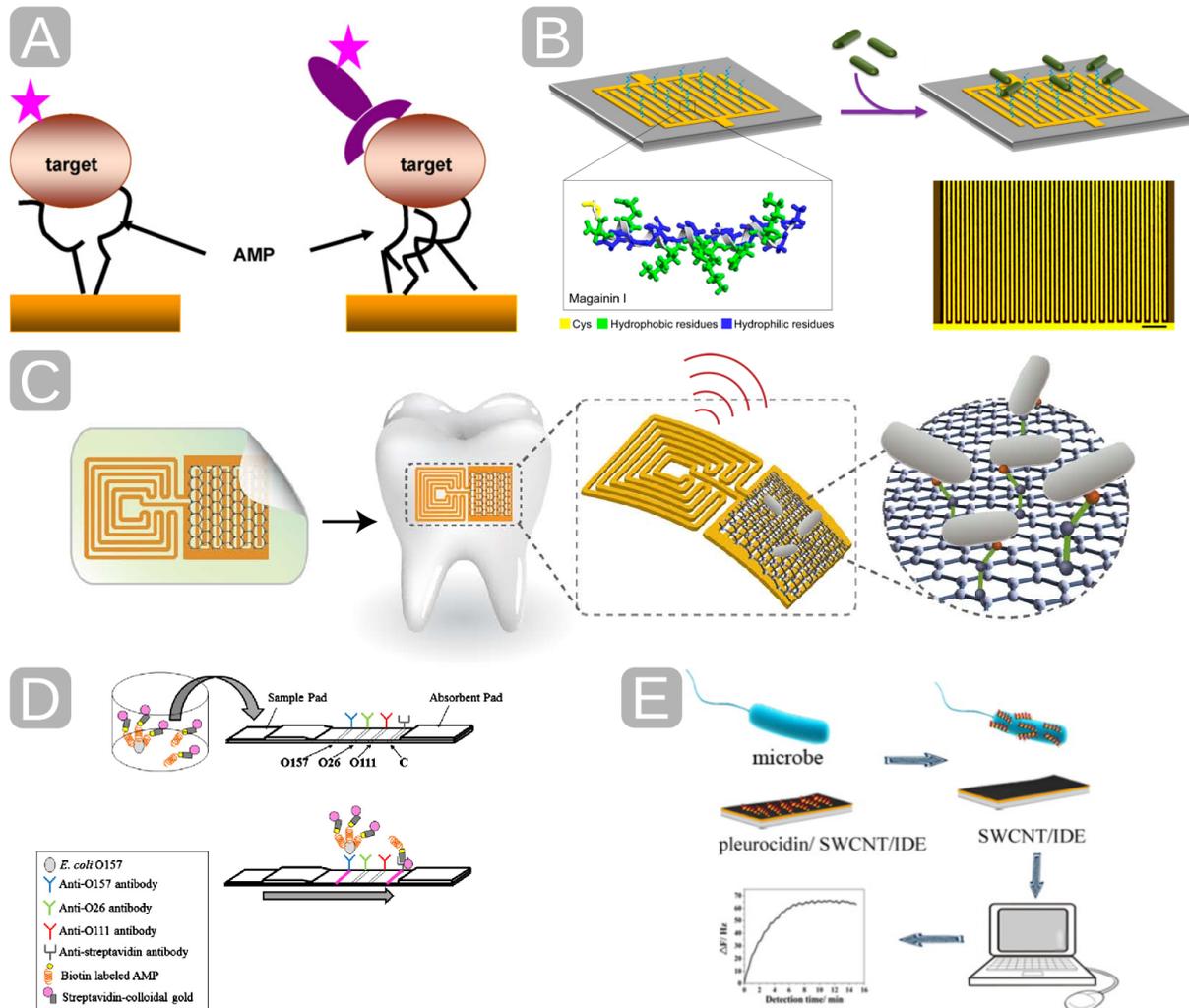


Figure 2.5 – Exemples historiques de biocapteurs employant des peptides antimicrobiens comme sondes. A – Une des premières applications en tant qu'élément de capture pour la détection. Les bactéries sont capturées sur une surface présentant des PAM, puis détectées par fluorescence, soit grâce à un anticorps marqué, soit par marquage direct des cellules. La détection d'*E. coli* et *Salmonella* est alors spécifique.

D'après KULAGINA et al.^{315,316}

B – Immobilisation de la magainine 1 sur des microélectrodes, pour réaliser ensuite la détection de pathogènes à Gram négatif. Première utilisation d'un PAM dans un biocapteur sans marquage pour détecter des bactéries entières. D'après MANNOOR et al.³¹⁹

C – Première application d'un capteur à peptide antimicrobien en milieu clinique. Il s'agit d'un capteur flexible et biotransférable. Le substrat en soie se dissout au contact du support biologique et le capteur sans fil est composé d'une surface en graphène dont la résistivité change au contact des bactéries, ainsi que d'une bobine pour la lecture du signal sans fil. Le peptide employé est un hybride entre un peptide affiné du graphène et l'odoranine-HP, un PAM actif contre *E. coli*, *S. aureus* et *Helicobacter pylori*.

D'après MANNOOR et al.¹⁷³

D – Première application en matrice alimentaire en l'intégrant à un capteur applicable dans un contexte aux ressources limitées. Les PAM sont utilisés en tant que marqueurs à large spectre de souches d'*E. coli*, avant d'avoir une reconnaissance par des anticorps spécifiques. D'après YONEKITA et al.³²⁰

E – Premier capteur dont l'utilisation est démontrée en matrice biologique complexe – en l'occurrence le sang de mouton. La pleurocidine est adsorbée sur un capteur piézoélectrique déjà fonctionnalisé avec des nanotubes de carbone. Le relargage dans le milieu en présence de bactéries contre lesquelles le PAM est actif sert de signal positif au capteur. D'après SHI et al.²⁰⁸

2.1.2.2 Utilisations des PAM comme sondes pour la détection de pathogènes par des biocapteurs

Nous allons ici présenter l'état de l'art des peptides antimicrobiens en tant qu'élément de reconnaissance pour la détection de bactéries par des biocapteurs. Les caractéristiques principales de ces capteurs sont présentées dans le tableau 2.1. Cet état de l'art se veut à jour jusqu'au premier semestre 2019.

Méthodologie de la sélection

Les utilisations où les peptides jouent un rôle annexe à la détection, comme la capture avant de détecter les pathogènes par spectroscopie³³⁷⁻³³⁹ ou avec une PCR³⁴⁰ ont été écartées. Seuls les biocapteurs où toute la chaîne d'analyse est intégrée sont considérés, ce qui élimine les applications basées sur l'utilisation de différentes microscopies.³⁴¹⁻³⁴⁷ En d'autres termes, cela signifie que le résultat doit être interprétable par l'opérateur sans autre étape supplémentaire que celle de mise en contact entre l'échantillon et le biocapteur. Toutefois, certaines applications peuvent demander une préparation de l'échantillon, par exemple par concentration avec des billes magnétiques.³³³ L'élément de reconnaissance reste alors toutefois le PAM. De plus ne sont considérées que les applications visant des bactéries entières, ce qui correspond aux conditions de détection ciblées lors d'une hémoculture. Il est à noter cependant que nombre de ces publications utilisent des bactéries inactivées, que ce soit chimiquement, par radiation ou par la chaleur. Les informations concernant les temps pour obtenir le résultat, ainsi que les volumes ou les débits d'analyse sont renseignés, afin de les confronter à une application réelle.

Conclusions sur cet état de l'art

Les travaux les plus proches d'un biocapteur adapté à la détection de pathogènes lors d'une hémoculture sont ainsi ceux de SHI et al.,²⁰⁸ auparavant évoqués. Leur principe de détection qui repose sur la désorption de la pleurocidine lorsque le milieu contient au moins 10^2 UFC.ml⁻¹ de bactéries pourrait aisément s'adapter dans une bouteille d'hémoculture. Toutefois, comme ils le soulignent eux-mêmes dans leur étude, la pleurocidine démontre en solution une capacité rapide à lyser les bactéries. Dans le cadre d'une hémoculture, cette activité antibiotique pourrait empêcher un recouvrement des pathogènes pour effectuer des tests de susceptibilité aux antibiotiques. Leurs travaux ne permettent pas d'évaluer la concentration des peptides relargués en solution, ni la viabilité des cellules bactériennes suite à l'interaction avec les PAM. Cela reste cependant la démonstration d'une technique de détection qui aboutirait à une positivité de l'hémoculture dès 10^2 UFC.ml⁻¹, soit bien en dessous des techniques actuelles (environ 10^8 UFC.ml⁻¹), ou encore de la méthode basée sur la conductivité de PUTTASWAMY et al.¹⁵⁵ (10^4 UFC.ml⁻¹).

Concernant les capacités d'identification, seuls les capteurs employant des peptides spécifiques la permettent. Il faut toutefois souligner que certains exemples comme MANNOOR et al.³¹⁹ et ETAYASH et al.³²⁷ présentent des capteurs qui peuvent distinguer un groupe large, comme un Gram. Cependant, ils ne sont pas sensibles aux autres pathogènes et ainsi provoqueraient des faux-négatifs dans le cadre d'hémocultures. Les méthodes électrochimiques, notamment de ANDRADE et al.,³²⁸ de MIRANDA et al.³³¹ ou JUNIOR et al.³³² permettent une discrimination au Gram, mais à condition d'opérer à une concentration connue, ce qui peut être problématique en application réelle. Les travaux de WILSON et al.³³³ sur un capteur similaire démontrent par ailleurs que l'identification dépend fortement de la concentration. Enfin ces capteurs électrochimiques, bien que présentant des limites de sensibilités basses, de 10 voire 1 UFC.ml⁻¹, questionnent tout de même par leur sensibilité à la composition du milieu. Par exemple, la

détection annoncée par de MIRANDA et al.³³¹ à 10 UFC.ml⁻¹ dans un volume de 2 μ l correspond à la présence théorique de 0,02 UFC dans l'échantillon. La compatibilité d'une telle sensibilité avec un milieu à la composition aussi variable est sujette à caution. Tout comme la nécessité d'utiliser des volumes d'analyse supérieurs aux quelques microlitres récurrents dans les applications électrochimiques.

Il reste encore à démontrer l'employabilité des PAM dans un système qui serait adapté à l'hémoculture, en permettant une détection, ainsi que potentiellement une identification rapide des pathogènes en présence. La méthode « Culture-Capture-Mesure », dont l'application avec des peptides antimicrobiens est présentée par la suite est une voie intéressante pour répondre à ce cahier des charges.

Tableau 2.1 – Biocapteurs utilisant uniquement des peptides antimicrobiens pour la détection de bactéries.

Peptide	Cible	Seuil	Temps du test	Volume / Débit	Milieu	Méthode	Référence
Magainine 1	<i>E. coli</i> O157:H7	10 ³	20 min	5 μ l.min ⁻¹	PBS	Microcapacitif, à électrodes interdigitées	MANNOOR et al. ³¹⁹
	<i>S. Typhimurium</i>	10 ⁴					
Odorranin-HP	<i>E. Coli</i>	10 ³	30 min	1 μ l	PBS	Capteur résistif en graphène. Biotransférable et communiquant sans fil	MANNOOR et al. ¹⁷³
	<i>S. aureus</i>	10 ⁵	10 min	1 μ l	Salive		
	<i>H. pylori</i>						
Magainine 1	<i>E. coli</i> O157:H7	10 ³	90 min	–	PBS	Mesure d'impédance : groupe ferrocène sur la magainine	LI et al. ³²²
Leucocine A	<i>L. monocytogenes</i>	10 ³	20 min	20 μ l	PBS ;	Microcapacitif, à électrodes interdigitées	ETAYASH et al. ³²⁷
	<i>S. aureus</i>				Lait/PBS		
	<i>E. faecalis</i>				(1:9)		
	<i>L. innocua</i>				(pour <i>Listeria</i>)		
G10KHc C16G2cys	<i>P. aeruginosa</i>	10 ⁵	25 min	Quelques μ l	Tampon salin	Puce microfluidique couplée à une mesure par impédance	LILLEHOJ et al. ³²⁶
	<i>S. mutans</i>						
MSal 020417 (peptide de phage)	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁶	<10 min	25,2 μ l.min ⁻¹	PBS	Microleviers	WANG et al. ³⁴⁸
Indolicidine	<i>E. coli</i> O416	10 ⁵	2 min	15 μ l.min ⁻¹	PBS	Les peptides fluorescents sont piégés par une onde acoustique. Le passage de bactéries les marque pour être détectées par UV en aval.	SCHWARTZ et BERCOVICI ³⁴⁹
		10 ⁸			Eau du robinet		
Magainine 1	<i>E. coli</i> O157:H7	803	60 min	50 μ l.min ⁻¹	PBS	Conductimétrie sur transistor en graphène oxydé réduit	CHEN et al. ³³⁵
Clavanine A	<i>E. faecalis</i>	10 ²	10 min	1 μ l	PBS	Capteur impédimétrique structuré avec des nanotubes de carbone, sur électrode d'or	ANDRADE et al. ³²⁸
	<i>E. coli</i>						
	<i>B. subtilis</i>						
	<i>K. pneumoniae</i>						
Magainine 1	<i>E. coli</i> O157:H7	4 · 10 ²	10 min	–	PBS	QCM	DONG et ZHAO ³³⁴
		1,5 · 10 ³	10 min	–	PBS	Mesure d'impédance	

Suite à la page suivante

Suite de la page précédente

Peptide	Cible	Seuil	Temps du test	Volume / Débit	Milieu	Méthode	Référence
Leucocine A Leu10 (fragment Leuc. A) Ped3 (fragment Pédiocine)	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁵	60 min	5 ml.h ⁻¹	PBS	Micro-leviers	AZMI et al. ³⁵⁰
Colicin V	<i>E. coli</i> O6	10 ²	Quelques min	Quelques μ l	PBS	Mesure d'impédance	JIANG et al. ³²³
Magainine 1	<i>E. coli</i> O157:H7	1,2 · 10 ²	30 min	100 μ l	PBS	Électrochimiluminescence amplifiée par un complexe magainine 1 – Ruthénium	LI et al. ³⁵¹
WK ₃ (QL) ₆ K ₂ G ₃ C	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. epidermidis</i>	10 ²	30 min	100 μ l	Tris-Hcl	Électrochimique	LIU et al. ³³⁰
Pleurocidine	<i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i> <i>C. albicans</i>	10 ²	< 15 min	2 ml	Sang de mouton 50% SPS 0,01%	Capteur piézoélectrique	SHI et al. ²⁰⁸
Lactoferrine humaine (résidus 1 à 11)	<i>S. sanguinis</i>	$\frac{3,5 \cdot 10^1}{10^2}$	30 min	100 ml	$\frac{KCl}{\text{Salive artificielle}}$	Électrochimique avec électrodes interdigités 3D	HOYOS-NOGUES et al. ³²⁹
Clavanine A	<i>E. coli</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i>	10	70 min	2 μ l	PBS	Mesure d'impédance	de MIRANDA et al. ³³¹
Magainine 1	<i>E. coli</i> O157:H7	5 · 10 ²	10 min	200 μ l	Eau Jus de fruit Jus de légume	Résonance plasmonique de surface sur fibre optique, amplifiée par des nanocomposites de graphène oxydé réduit et de nanoparticules d'argent	ZHOU et al. ³⁵²

Suite à la page suivante

Suite de la page précédente

Peptide	Cible	Seuil	Temps du test	Volume / Débit	Milieu	Méthode	Référence
Clavanine A	<i>E. coli</i>	10	–	2 μ l	PBS	Mesure d'impédance	JUNIOR et al. ³³²
	<i>S. Typhimurium</i>						
	<i>E. faecalis</i>						
	<i>S. aureus</i>						
	<i>K. pneumoniae</i>						
	<i>B. subtilis</i>						
Paire de fragments de Leucocine A	<i>L. monocytogenes</i>	10	60 min	2 ml	Eau de mer	Un fragment est conjugué à une particule magnétique pour l'isolement. L'autre est conjugué à HRP, pour la détection potentiométrique	LV et al. ³²⁴
Mélittine	<i>E. coli</i> O146	1 (ou 3,5) (jus de pomme)	25 min	250 μ l (20 pour la mesure)	PBS ; Eau potable Jus de pomme (<i>E. coli</i> seulement)	Mesure d'impédance après capture par des nanoparticules magnétiques couvertes du peptide	WILSON et al. ³³³
	<i>S. aureus</i>	10					
	<i>S. Typhimurium</i>						
Jeu de 6 PAM, détaillé dans le tableau 2.2	<i>S. Typhimurium</i>	6	9 h	1 ml	TSB	Imagerie SPR avec la méthode Culture–Capture–Mesure	PARDOUX et al. ³⁵³
	<i>S. aureus</i>	16	7 h				
	<i>E. coli</i> O1:K1:H7	51	11 h				
	<i>S. epidermidis</i>	$2,5 \cdot 10^3$	6 h				
	<i>L. monocytogenes</i>	$2,6 \cdot 10^3$	19 h				

Acronymes : HRP, peroxydase du raifort (*Horse-Radish Peroxidase*) ; TSB, bouillon digéré de soja-caséine (*Tryptic Soy Broth*) ; PBS, tampon de phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline*) ; QCM, microbalance à quartz ; SPR, résonance plasmonique de surface

2.2 Choix de peptides références depuis l'état de l'art

2.2.1 Travaux préliminaires à la thèse : évaluation de PAM extraits de la littérature des biocapteurs

Historiquement au sein du laboratoire CREAB, l'activité de détection bactérienne à large spectre à l'aide de peptides antimicrobiens a débuté en 2015 avec les travaux post-doctoraux d'Agnès Roux. Les premières études portèrent sur la preuve de faisabilité de la détection par « Culture–Capture–Mesure » de pathogènes à partir de peptides dont l'usage comme sondes pour la détection de bactéries avait déjà été démontré. Les principales nouveautés introduites étaient alors la mise en œuvre de façon multiplexe, ainsi que le couplage à la méthode « Culture–Capture–Mesure ». Cela permet à la fois de comparer les performances des peptides, mais également d'évaluer le potentiel d'identification de bactéries par affinité croisée, en obtenant un profil différent pour chaque souche. Un jeu de six peptides avait ainsi été évalué, afin de prouver le concept de détection par SPRI avec la méthode « Culture–Capture–Mesure » et de choisir des références parmi eux. Ce jeu de peptides est représenté dans le tableau 2.2, avec leurs séquences ainsi que quelques informations concernant leur contexte d'utilisation dans l'état de l'art. La partie 2.2.1.1 revient plus en détail sur ces peptides et les articles les utilisant comme sondes. Ce jeu de peptides a été testé sur un groupe varié de bactéries pathogènes, représentant des menaces à la fois au niveau de la santé, mais également concernant les toxi-infections alimentaires. Les résultats de cette étude sont présentés en partie 2.2.1.2.

2.2.1.1 Littérature de référence pour les sondes évaluées

Nom	Séquence	Bactéries ciblées dans la littérature	Technique
Clavanine A	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFHSHVF–espaceur–C–NH ₂	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> & <i>S. Typhimurium</i>	Impédance électrochimique ³²⁸
Magainine 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS–espaceur–C–NH ₂	<i>E. coli</i> & <i>S. Typhimurium</i> <i>E. coli</i> & <i>Salmonella</i> <i>E. coli</i> <i>Listeria spp.</i> & <i>E. coli</i>	Fluorescence ³¹⁴ Capacitance électrochimique ³¹⁹ Fluorescence ³⁴⁴ Transistor à effet de champ ³³⁵
Pédiocine Ped3	GKATTCIHNGAMA–espaceur–C–NH ₂	<i>Listeria monocytogenes</i>	Micro-leviers ³⁵⁰
PGQ	GVLSNVIGYLKKGTLGALNAVLKQ–espaceur–C–NH ₂	<i>E. coli</i>	Fluorescence ³¹⁸
Leucocine A 24	C–espaceur–SVNWGEAFSAGVHRLANGNGFW–OH	<i>Listeria monocytogenes</i> & <i>E. coli</i>	Impédance électrochimique ^{354,355}
Peptide contrôle	C–espaceur–RGEWFWGNLVSAAASFGNHNAGG–OH	Version aléatoire de la Leuc. A 24 (nouvellement introduit)	

Tableau 2.2 – Premier jeu de peptides évalués pour la détection bactérienne en SPRI. Présentés avec les références de la littérature des biocapteurs dont ils sont extraits, ainsi que les techniques utilisées et les bactéries ciblées en commun avec l'étude préliminaire réalisée au CREAB. L'espaceur correspond au motif acide [2-(2-(amino)éthoxy)éthoxy] acétique (voir figure 2.11).

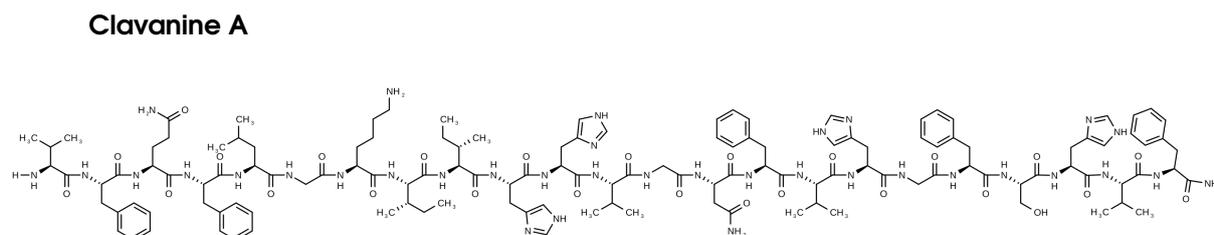


Figure 2.6 – Représentation de la clavanine A (ClavA).

La clavanine A (ClavA) fait partie d'une famille de quatre peptides antimicrobiens de 23 acides

aminés isolés depuis *Styela clava*, ou tunicier solitaire, un invertébré sous-marin.³⁵⁶ Dotée d'un spectre d'activité très large,³⁵⁷ la ClavA présente des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'ordre du $\mu\text{g.ml}^{-1}$ contre des pathogènes courants (*E. coli*, *L. monocytogenes*). La concentration minimale inhibitrice correspond à la concentration de peptide nécessaire pour éviter la croissance de bactéries. La capacité antibiotique de ClavA passerait majoritairement par des interactions avec la membrane des bactéries et plus particulièrement leur bicouche lipidique.³⁵⁸ Cela en fait donc un candidat intéressant pour la conception d'un biocapteur pour la détection bactérienne à large spectre, car il ne vise pas un marqueur spécifique dans les membranes.

C'est ainsi qu'il a été mis en œuvre dès 2015 par ANDRADE et al.,³²⁸ grâce à son immobilisation sur des nanotubes de carbone pour parvenir à une détection électrochimique. Cette technique a permis d'atteindre une limite de détection très basse, de l'ordre de 10^2 UFC.ml⁻¹, dans un échantillon de 1 μl , soit 0,1 UFC. μl^{-1} . Une telle limite signifie que la détection se base non seulement sur l'interaction directe de bactéries viables avec la surface du capteur, mais également sur la détection de débris bactériens ou bien de changements de composition du milieu de culture suite à la croissance bactérienne. Ces recherches ont été poursuivies par la suite,^{331,332} abaissant le seuil de détection à 0,01 UFC. μl^{-1} sur un jeu de 6 souches différentes : *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* et *B. subtilis*.

Magainine 1

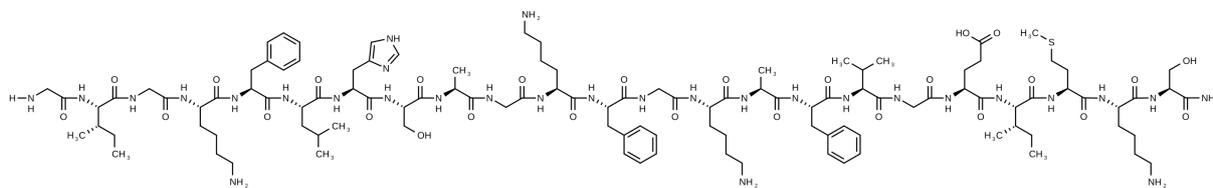


Figure 2.7 – Représentation de la magainine 1.

Isolées d'une grenouille africaine (*Xenopus laevis*), les magainines ont été découvertes par ZASLOFF dans les années 1980.³⁵⁹ Elles constituent un couple de peptides de 23 acides aminés de long, différent l'un de l'autre par seulement deux substitutions. Peptide parmi les plus répandus quelles que soient les applications, la magainine 1 est de loin le plus utilisé dans la littérature des biocapteurs (voir tableau 2.1). Dans un cadre plus large, son immobilisation sur surface a donné d'intéressantes propriétés antibactériennes et antifouling.^{360,361} Par ailleurs, son mécanisme d'action se base majoritairement sur l'interaction avec les membranes et leur lyse par perméabilisation *via* la formation de pores.³⁶² La toxicité préférentielle de la magainine 1 pour les bactéries à Gram négatif viendrait ainsi de son affinité pour les phospholipides anioniques de la paroi externe de ces dernières. Par ses antécédents et ses propriétés, choisir la magainine 1 était particulièrement à propos lors de la première sélection de sondes candidates pour la détection de bactéries par SPRI.

PGQ

Le peptide PGQ (pour Peptide à Glycine en N-terminal et Glutamine (abréviation Q) en C-terminal) a été également découvert chez *Xenopus laevis*, cette fois-ci dans l'estomac,³⁶³ faisant ainsi suite à la découverte des magainines sur sa peau. L'exploitation de ce peptide n'a par la suite pas connu le succès de

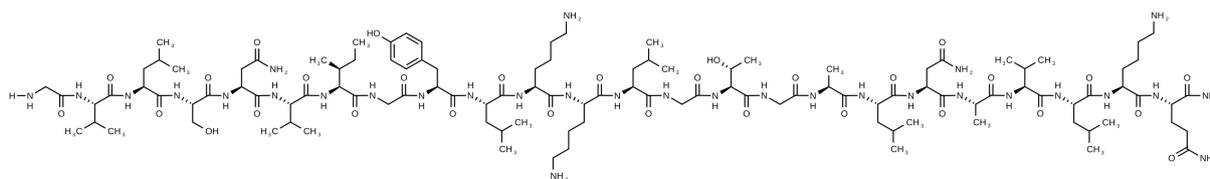


Figure 2.8 – Représentation de PGQ.

ces dernières. Son mécanisme précis d'action est donc à l'heure actuelle encore inconnu. Il reste à noter un emploi intéressant parmi les premiers articles de la littérature des biocapteurs utilisant des peptides antimicrobiens. ARCIDIAONO et al. ont ainsi testé PGQ en tant qu'agent de fluorescence en parallèle d'autres peptides, avec pour objectif de les substituer à des anticorps.³¹⁸ Les peptides étaient préparés en intégrant une cystéine terminale puis en les couplant par chimie maléimide à la cyanine 5 (Cy5). La détection d'*E. coli* O157:H7 est ensuite réalisée à l'aide d'un fluorimètre sur fibre optique. Le seuil de détection n'a toutefois pas été amélioré *via* l'utilisation de PGQ par rapport aux anticorps. Cependant le peptide ainsi couplé à un marqueur fluorescent a tout de même permis de détecter le pathogène à la concentration de 10^5 UFC.ml⁻¹. Cette limite est équivalente aux seuils de détection usuels en SPRI pour détecter des pathogènes avec des anticorps.²²² Il avait donc été intéressant d'intégrer cette sonde à l'étude initiale pour avoir un peptide de référence pour la détection d'*E. coli*.

Pédiocine PA-1 – fragment Ped3

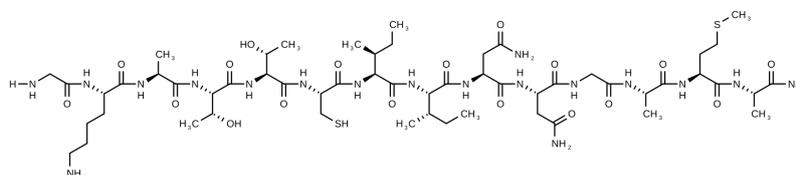
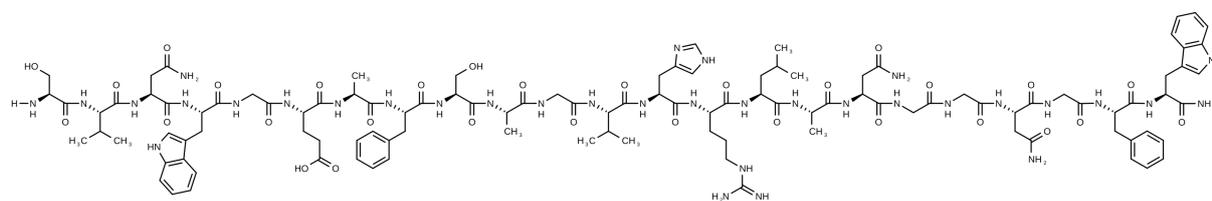


Figure 2.9 – Représentation du fragment Ped3 de la pédiocine PA-1.

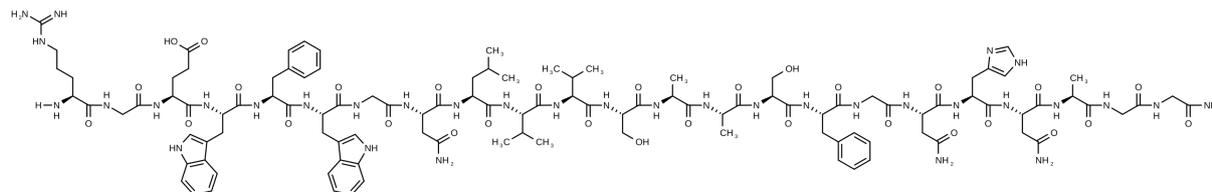
Les bactériocines, des protéines et peptides antimicrobiens émis par les bactéries lactiques, représentent une grande famille, de plus de 200 peptides.³⁶⁴ La sous-classe IIa de cette famille est constituée des *pediocin-like peptides*, à l'activité anti-*Listeria*, qui présentent tous un motif similaire en N-terminal (-YGNGV-), ainsi qu'un C-terminal variable, mais le plus souvent hydrophobe ou amphiphile.^{365,366} La pédiocine PA-1 est l'emblématique représentante de cette sous-classe et a été isolée depuis la souche PAC-1.0 de *Pediococcus acidilactici*.³⁶⁷ Son mécanisme d'action s'est révélé passer par une action de dissipation du potentiel électrique transmembranaire, inhibant ainsi l'assimilation d'acides aminés par la bactérie ciblée.³⁶⁸ De façon intéressante, il a aussi été montré que la spécificité des bactériocines provenait en partie de la composition de la région C-terminale.³⁶⁹ C'est probablement cette dernière qui se lie donc à un récepteur spécifique de la membrane. Des fragments du C-terminal de ce peptide ont ainsi été testés par AZMI et al. pour la reconnaissance des bactéries fluorescentes, ainsi que pour la détection *via* micro leviers. Le fragment Ped3 a ainsi montré une capacité d'interaction faible avec toutes les souches de *Listeria* testées, mais également avec celles de staphylocoque doré ou d'*E. faecalis*.³⁵⁰ Ce plus large spectre d'interaction possible avec ce peptide est ainsi très intéressant pour une application de détection

universelle.

Leucocine A 24 – naturelle et randomisée



(a) Leucocine A 24 – fragment du peptide naturel.



(b) Leucocine A 24 – fragment aléatoire.

Figure 2.10 – Représentations des leucocines.

La leucocine A (ou LeuA) est une autre bactériocine de la sous-classe IIa. Isolée depuis la bactérie lactique *Leuconostoc gelidum* (souche UAL 187),³⁷⁰ elle présente elle aussi le motif -YGNGV- dans sa région N-terminale. Il est à noter qu'elle intègre également deux cystéines, structurant ainsi le peptide par la formation d'un pont disulfure. Son spectre d'activité est similaire aux autres bactériocines, à savoir principalement dirigé contre les *Listeria*. LeuA entière ou ses fragments ont été assez largement étudiés pour une application en détection.^{327,350,354,355} Que ce soit par le biais de capteurs à impédance, de micro leviers ou d'une détection par fluorescence, LeuA a ainsi démontré une capacité de reconnaissance élevée, notamment pour des bactéries à Gram positif telles que *Listeria monocytogenes* ou *E. faecalis*.

Cependant afin de conserver des peptides de longueur similaire, et ainsi faciliter la mise en œuvre du choix de l'angle de travail, il est intéressant de travailler avec un fragment de LeuA. Ainsi, l'étude de ETAYASH et al. a permis de montrer qu'un fragment de 24 acides aminés de la région C-terminale présentait des capacités d'adhésion aux bactéries avec un effet biocide réduit.³⁵⁵ Ce dernier point est intéressant pour une application en détection à faible concentration telle que la méthode « Culture-Capture-Mesure ». En effet, un effet biocide réduit limite le risque d'éradiquer la population bactérienne d'un échantillon avant qu'elle atteigne le seuil de détection du système. C'est donc ce fragment LeuA 24 qui avait été choisi.

Par ailleurs, LeuA 24 présente l'intérêt d'être un peptide sans charge nette à pH neutre. Cette propriété en avait fait un candidat intéressant pour générer une version randomisée, présentant *de facto* une structure différente, et sans les propriétés cationiques servant usuellement pour l'interaction électrostatique initiale entre les PAM et les bactéries.

2.2.1.2 Première mise en œuvre de biopuces à PAM pour la SPRI

Le jeu de peptide ainsi sélectionné avait donc été soumis à une série d'expériences de détection en croissance, tel que décrit en partie 1.3.2.3. Les peptides avaient été alors synthétisés par Smart Biosciences (Saint-Égrève, France) après intégration d'un espaceur acide [2-(2-(amino)éthoxy)éthoxy] acétique (figure

2.11) et d'une cystéine en N-ter ou C-ter.

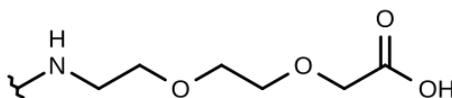


Figure 2.11 – Structure de l'espaceur acide [2-(2-(amino)éthoxy)éthoxy] acétique. Le radical marque l'emplacement du groupe Fmoc présent sur le synthon.

Les biopuces alors préparées par Agnès Roux comportaient deux réplicats de chacun de ces peptides, immobilisés par chimie thiol-or avec assemblage sur la nuit après dépôt par automate sans contact. La solution de dépôt alors utilisée était constituée d'eau ultra-pure, avec 5% de glycérol, afin d'en augmenter la viscosité et de limiter l'évaporation complète des gouttes après dépôt. Le prisme était placé de façon à obtenir une surface verticale, tel que proposé par V. TEMPLIER au cours de sa thèse, afin de limiter la sédimentation des bactéries en surface et donc l'apparition de signaux non-spécifiques.^{211,224} Le fond de puce, c'est-à-dire l'espace entre les plots, était alors bloqué à l'aide d'une solution de BSA 1% en PBS pour 20 minutes, avant de rincer la surface au PBS puis d'introduire 900 μ l de TSB. L'inoculation était alors réalisée en injectant 100 μ l d'une dilution de la suspension bactérienne obtenue à partir d'une pré-culture sur la nuit avant le suivi.

Les suivis selon ce procédé ont été réalisés sur 5 souches de pathogènes représentant une assez large variété microbiologique (voir tableau 2.3). Par ailleurs, ces souches sont retrouvées dans des contextes variés : sécurité alimentaire (*Listeria* ou *Salmonella*), infections urinaires (*E. coli*) ou sanguines (*S. aureus*).

Espèce	Souche	Collection	Origine	Classe
<i>Salmonella enterica</i> , sous-espèce <i>enterica</i>	Sérotype Typhimurium (<i>S. Typhimurium</i>)	CIP 104474	souche type	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sérotype moléculaire IVc	ISHA	Viande de poulet	2
<i>Staphylococcus aureus</i> sous-espèce <i>aureus</i>	Souche résistante à la méthicilline	ATCC43300	–	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	ATCC12228	Souche-type	1
<i>Escherichia coli</i>	Sérotype O1:K1:H7	ATCC11775	Urine	2

Tableau 2.3 – Caractéristiques des souches bactériennes utilisées lors de l'étude préliminaire. ATCC : American Type Culture Collection (Manassas, Virgine, États-Unis d'Amérique). CIP : Collection de l'Institut Pasteur (Paris). ISHA : Institut Scientifique d'Hygiène et d'Analyse (Massy, France).

La détection de ces pathogènes avait donc été réalisée en croissance sur une période d'au moins 14 heures, et jusqu'à observer le saut de signal lié à la détection.

2.2.2 Sélection de références parmi les PAM évalués

2.2.2.1 Résultats des suivis cinétiques

En repartant de ce jeu de données SPRI brutes, une nouvelle analyse a pu être menée pour mieux évaluer la performance du système et déterminer quels peptides conserver pour la suite. Dans cette nouvelle voie de traitement, une moyenne de 3 zones de référence sur le fond de puce, couvert de BSA,

est soustraite aux autres signaux.

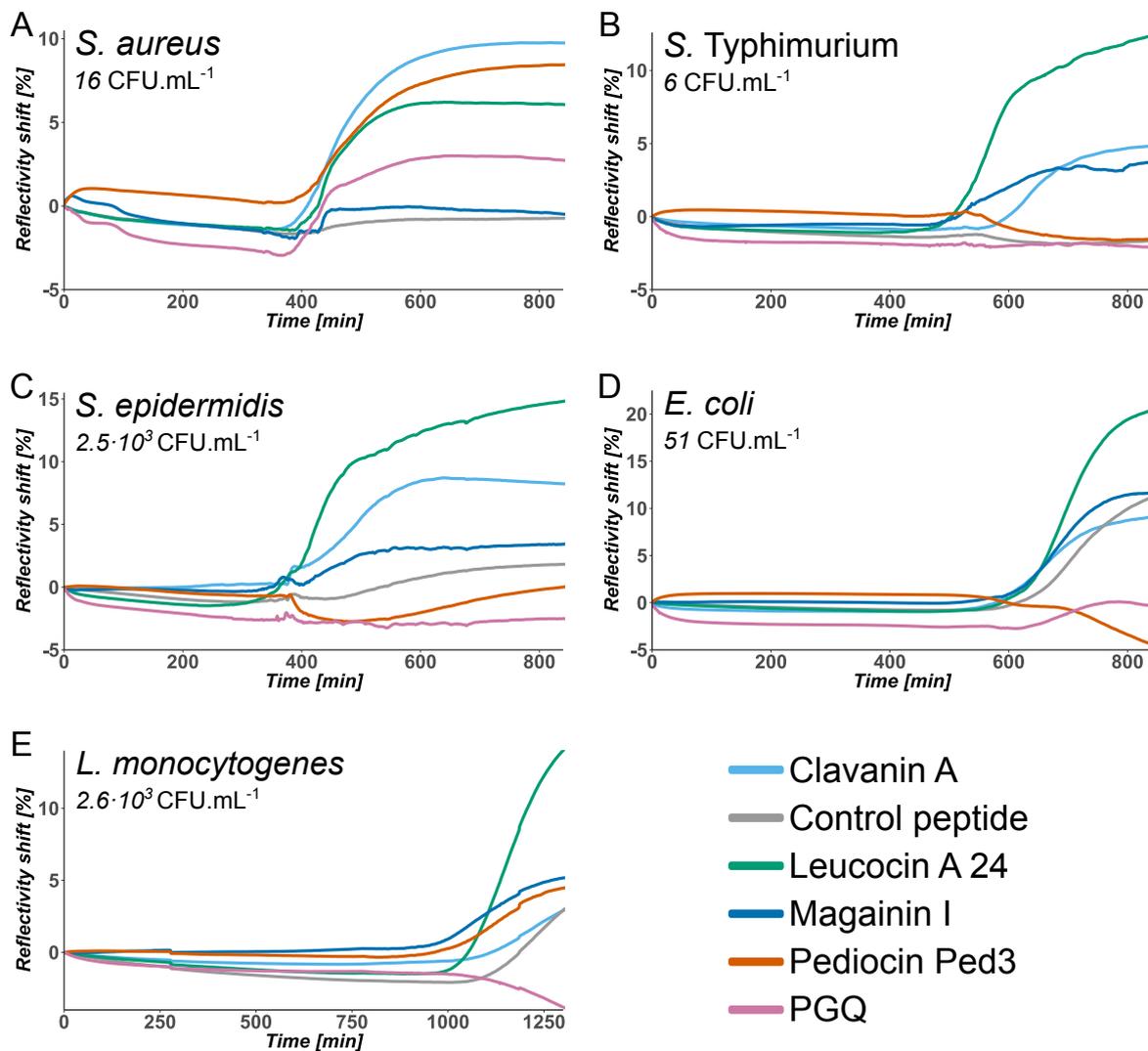


Figure 2.12 – Données cinétiques des suivis de croissance bactérienne par SPRI obtenus sur cinq pathogènes différents à 37°C en TSB. Chaque courbe représente la moyenne sur deux plots pour une séquence peptidique, avec soustraction de la référence prise sur la BSA.

Les résultats obtenus, représentés en figure 2.12, sont ainsi conformes aux attentes : chaque bactérie a été positivement reconnue par *a minima* un peptide. Les amplitudes des réponses varient d'un peptide à l'autre et d'une bactérie à l'autre, confirmant la variété des affinités entre les surfaces ainsi fonctionnalisées et la croissance des bactéries. Depuis ces courbes de suivis, il est possible d'extraire des temps de détection pour chaque peptide (voir table 2.4).

On constate ainsi que la détection est effective, au plus en 19 h, voire moins de 6 ou 7 heures pour *S. aureus* et *S. epidermidis*, présents initialement à respectivement 16 et 2,5 · 10³ UFC.ml⁻¹. D'autre part, concernant les performances de détection, la leucocine A 24 montre les performances les plus intéressantes, avec une grande variété de souches détectées et un saut de détection parmi les plus précoces dans chaque cas.

Brièvement, il est possible de mettre en regard ces résultats par rapport à la littérature dont ces PAM

Souche ciblée	Concentration initiale (UFC.ml ⁻¹)	Plus petit temps de détection (min / h)	Peptide correspondant
<i>S. aureus</i> ATCC43300	16	433 / 7h13	Leucocine A 24
<i>S. Typhimurium</i> CIP104474	6	537 / 8h57	Magainine I
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	2,5·10 ³	374 / 6h14	Leucocine A 24
<i>E. coli</i> ATCC11775	51	677 / 11h17	Clavanine A
<i>L. monocytogenes</i> sérotipe IVc	2,6·10 ³	1160 / 19h20	Leucocine A 24

Tableau 2.4 – Temps de détection obtenus en présence de différentes souches pathogènes. Les temps sont la moyenne pour les deux duplicats, déterminés à partir de la valeur maximale de dérivée première. Cette valeur correspond en effet à la pente maximale, soit le milieu du saut de détection. Seuls les peptides donnant un fort signal positif étaient considérés pour déterminer les temps.

étaient tirés. Ainsi, la leucocine avait été décrite comme possédant une affinité particulière pour les bactéries à Gram positif.³⁵⁵ Or, dans le cas du système utilisé ici, on obtient la détection des bactéries quelle que soit leur coloration Gram. Cette différence peut cependant venir du protocole mis en place qui, dans le cas d'une détection en croissance sur le long terme, est plus favorable à l'établissement d'interactions faibles entre les bactéries et les peptides immobilisés. En effet, ETAYASH et al. procédaient à un rinçage de leur surface avant observation des bactéries liées aux peptides, ce qui pourrait avoir comme conséquence de rompre ces interactions faibles. De façon intéressante, on remarquera que la version randomisée de LeuA 24 ne présente que peu ou pas d'interactions avec les souches testées. Cela suggère que les seules propriétés physico-chimiques de ce peptide ne suffisent à évaluer son potentiel d'interaction, mais que sa structure est également primordiale. De tels résultats sont cohérents avec la littérature à ce sujet pour les peptides antimicrobiens.²³¹ Dans le cas de la Clavanine A, les bactéries à Gram positif ont montré une affinité d'apparence plus élevée, avec une variation de réflectivité de 10 % pour les staphylocoques contre environ 5 et 8 % pour *Salmonella* et *E. coli*. Cela apparaît être en contradiction avec les résultats obtenus précédemment par JUNIOR et al.,³³² qui donnaient une intensité de réponse plus forte pour les Gram négatifs. Toutefois cela est à pondérer par le fait que la technique de détection électrochimique peut induire des biais dans la reconnaissance des affinités, notamment du fait de la charge des membranes bactériennes, différente d'une souche à l'autre. Concernant la magainine 1, les résultats obtenus sont en accord avec ceux déjà observés. Néanmoins, elle n'a pas permis d'obtenir de reconnaissance forte avec *S. aureus*, une espèce qui a pourtant déjà été détectée avec succès par fluorescence.³⁴³ L'immobilisation avec un espaceur plus court dans notre cas plutôt qu'en tant que sonde fluorescente en solution pourrait expliquer cette différence de réactivité et donc la perte de la capacité de reconnaissance.

Enfin, concernant Ped3 et PGQ, les résultats obtenus furent conformes à la littérature. Le premier ne montrant effectivement que des interactions faibles avec *L. monocytogenes*, tel que décrit auparavant.³⁵⁰ À noter que Ped3 a toutefois montré un assez fort potentiel d'interaction avec *S. aureus*. Dans le cas de PGQ, il a seulement montré une très faible affinité pour *E. coli*, ainsi qu'une réponse moyenne pour *S. aureus*. Étonnamment, il n'y a pas eu de réponse franche auprès de *S. Typhimurium*, autre Gram négatif présentant

aussi des lipopolysaccharides habituellement reconnus par ces peptides.

Par la suite, une seconde phase d'analyse de ces résultats, basée sur la statistique multidimensionnelle cette fois-ci, a également permis de démontrer l'intérêt d'utiliser la réponse combinée différentes sondes pour obtenir une signature spécifique par bactérie.³⁵³ L'analyse exploratoire de données ainsi menée permet de mettre en évidence des tendances qui ne sont pas directement apparentes dans les résultats obtenus en SPRI.

2.2.2.2 Choix des peptides étalons dans le premier jeu étudié

Développer un nouveau jeu de peptides comme sondes implique de déterminer des étalons auxquels comparer les performances des PAM qui seront nouvellement introduits. Le choix de peptides étalons parmi les sondes évaluées en première intention s'est porté sur trois de ces peptides : la leucocine A 24, sa version randomisée, ainsi que la magainine 1. La première a été conservée en tant que « contrôle positif » suite aux premières expériences. Il s'agit en effet du seul peptide qui ait donné une réponse forte quelle que soit la bactérie ciblée. Sa version aléatoire a été utilisée pour permettre de conserver la comparaison de performances pour deux peptides ayant les mêmes propriétés physico-chimiques, mais une structuration *a priori* différente en surface. De plus, ce peptide étant de charge nette nulle, il aura potentiellement moins d'interactions avec les composants présents dans le sang. La magainine 1 a elle été conservée surtout comme standard par rapport au reste de la littérature des biocapteurs. Elle constitue de loin le peptide le plus utilisé pour la détection de bactéries jusqu'ici (cf. tableau 2.1). De fait, il était intéressant de le conserver pour pouvoir par la suite comparer notre système au reste de l'état de l'art.

Par souci de comparabilité avec les expériences qui avaient été menées par Agnès Roux, ces peptides ont été conservés sans aucune modification. Par ailleurs, certains aspects de ces travaux préliminaires pourront être améliorés, tels que le blocage, pour trouver une molécule de substitution à la BSA, ou encore le nombre de duplicats de chaque peptide, pour obtenir une plus grande pertinence statistique.

2.3 Critères de conception des sondes supplémentaires

Ces résultats préliminaires ont constitué l'occasion de vérifier la faisabilité de la détection de pathogènes avec des PAM grâce à la SPRI. L'intérêt est donc maintenant de faire émerger de nouvelles sondes qui présenteraient des propriétés de détection universelle comparables ou supérieures à celles entrevues avec la leucocine A 24, afin d'augmenter la robustesse du biocapteur.

Pour ce faire, il faut établir des critères de choix pour faire émerger des séquences pertinentes parmi les plus de 3000 peptides antimicrobiens naturels répertoriés jusqu'ici.²²⁸ Ces critères découlent naturellement de contraintes liées aux techniques mises en œuvre, que ce soit la détection par SPRI ou la synthèse peptidique. Ils proviennent également du cahier des charges établi pour obtenir une détection à large spectre.

2.3.1 Critères de choix des séquences

Longueur des séquences

D'une première part, en considérant la synthèse peptidique, qui s'effectue par couplages successifs des acides aminés sur un support solide (voir partie 2.4.1.1), il vient naturellement à l'esprit que les peptides

courts présenteront des rendements plus élevés. De plus, un nombre limité d'acides aminés présente l'avantage de simplifier la rationalisation des séquences et l'interprétation des interactions du peptide avec les bactéries pour de futures améliorations. En effet, comme nous l'avons vu dans le cas des cécropines et méliittines auparavant, des peptides de plus de 30 acides aminés, ces peptides longs présentent plusieurs domaines qui ne sont pas tous liés à la reconnaissance des membranes bactériennes. L'idée ici est donc d'utiliser à terme les séquences les plus courtes possible, contribuant uniquement à l'affinité des sondes avec les parois externes des pathogènes ciblés.

Par ailleurs, lors de la mise en œuvre de l'imagerie SPR, l'utilisation de sondes ayant des masses moléculaires similaires permet de limiter la dispersion des angles de résonance des différentes surfaces fonctionnalisées. La figure 2.13 illustre l'allure que peuvent prendre les courbes plasmons lorsque les masses moléculaires des sondes sont hétérogènes. Le choix d'un angle de travail optimal pour tous les plots est alors complexe. Ainsi, les peptides de référence faisant 23 acides aminés de long, c'est cette limite supérieure qui a constitué le premier critère appliqué à la base de données, afin d'éviter ce problème.

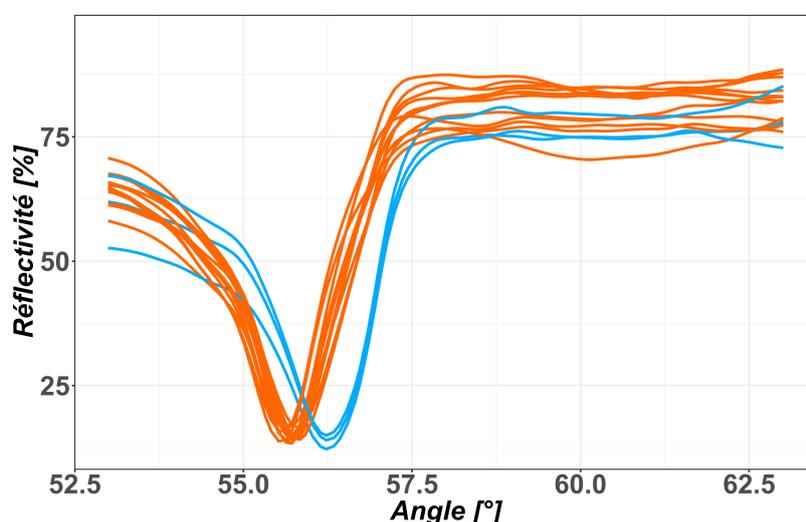


Figure 2.13 – Réflectivité en fonction de l'angle d'incidence sur la surface pour un jeu de sondes de masses moléculaires différentes. Les sondes représentées en bleu représentent un groupe dont la masse moléculaire moyenne est plus faible que celle des sondes représentées en orange.

Le fait de sélectionner des peptides de poids similaire devrait également faciliter le blocage par des molécules thiolées, dont la longueur pourra ainsi être choisie en fonction de celle des peptides.

Composition en acides aminés

Concernant les séquences peptidiques en tant que telles, il existe également des contraintes qui ont permis de guider nos choix. Tout d'abord, l'utilisation de la SPRI comme technique de détection implique l'emploi de prisme à surface d'or sur laquelle l'immobilisation devra se faire par monocouches auto-assemblées (SAM, pour *self-assembled monolayers*). Afin de maîtriser régiosélectivement l'ancrage sur la surface d'or il est donc nécessaire, pour les peptides, de présenter un seul groupe thiol. Les séquences présentant une ou plusieurs cystéines non terminales sont ainsi mises de côté. Cependant ce critère ne restreint pas l'utilisation de séquences linéarisées, dans lesquelles les cystéines formant un pont disulfure auraient été substituées par d'autres acides aminés.

Par ailleurs, seules des séquences ne présentant pas de modifications post-traductionnelles seront choisies. Cela reste dans l'idée de conserver des synthèses simples avec des acides aminés naturels, à bas coût et haut rendement.

Propriétés physico-chimiques de la séquence

Au-delà des acides aminés à employer dans les séquences à sélectionner, il est essentiel de fixer également des propriétés physico-chimiques idéales à atteindre. Ceci a déjà été évoqué, la foisonnante littérature pharmaceutique regorge de modèles pour tenter de prédire l'« efficacité antibiotique » des peptides à partir de leur séquence et des propriétés qui en découlent.^{262,371-374} Deux approches principales coexistent : d'une part la recherche de séquences consensus dans les bases de données de peptides connus,^{243,259} d'autre part l'identification de nouveaux PAM en visant des propriétés physico-chimiques particulières, le plus souvent la cationicité ou l'hydrophobicité.^{231,248,375,376}

Dans ce cadre nous suivons une approche se basant principalement sur la réutilisation de peptides déjà décrits, en abordant donc la sélection avec une stratégie mixte. Nous utiliserons ainsi des peptides avec des propriétés physico-chimiques censées favoriser l'interaction avec les membranes. Les propriétés généralement considérées comme propices à celle-ci sont principalement une charge nette très positive du peptide,³⁷⁶ ainsi qu'une amphiphilicité élevée.³⁷⁷

Revue des utilisations précédentes des peptides

En plus de ces critères basés sur la séquence d'acides aminés et ses propriétés, un dernier paramètre de sélection émerge. Il s'agit de choisir des peptides qui proviennent d'horizons applicatifs divers, tout en conservant une efficacité antimicrobienne à large spectre avérée. Ce dernier point est toutefois sujet à caution et peut comporter des risques. En effet, immobiliser en surface des capteurs un peptide à fort pouvoir biocide peut être contreproductif pour obtenir une capture de pathogènes sans détérioration de la capacité de se multiplier. Cette dernière est nécessaire à la détection rapide des bactéries dans la méthode « Culture Capture Mesure ». Dans le cadre des peptides antimicrobiens pour la détection, cela reste à contrebalancer par le fait que l'immobilisation en surface viendra *a fortiori* réduire les possibilités d'interaction peptide à peptide. Ces dernières sont souvent corrélées à une forte activité biocide sur les membranes bactériennes.³⁷⁸ La capacité des peptides à se mouvoir dans les membranes est également un facteur qui leur permet en solution de s'orienter de façon à atteindre une des configurations lytiques vues auparavant (pore, tapis, etc.). De plus ces interactions passent par la nécessité d'une forte saturation en PAM, allant parfois jusqu'à la couverture totale de la membrane.^{241,242} De telles conditions ne devraient donc pas survenir avec des peptides immobilisés en surface des capteurs. Toutefois, comme nous l'avons auparavant vu (cf. partie 2.1.1.2), l'action inhibitrice et biocide des PAM sur les bactéries passe dans un premier temps nécessairement par une interaction avec la membrane. Une CMI faible devrait donc être garante d'une capacité d'interaction élevée. En conséquence, les peptides immobilisés, s'ils perdent leur caractère biocide, peuvent toujours rester affins pour les membranes bactériennes.

Il reste cependant nécessaire de souligner que ce critère de diversité des origines des PAM, comme les autres posés jusqu'ici, reste évidemment en grande partie subjectif et n'assure en rien une diversité des résultats. Toutefois, cet ensemble de contraintes nous permet de choisir des peptides issus d'une même famille – les peptides courts, cationiques, à hélice α amphiphile – mais présentant tout de même une

variété de compositions en acides aminés et d'origines.

2.3.2 Jeu de peptides choisis

Cet ensemble de considérations a donc servi de cahier des charges pour le choix des peptides à essayer et tester. Il reste toutefois évident que l'étude bibliographique menée et la sélection des séquences pourraient avoir été conduites avec d'autres critères, en conservant un potentiel résultat satisfaisant pour la détection. À noter également que les principales propriétés des peptides utilisés sont récapitulées en tableau 6.1.

2.3.2.1 Bacténécine bovine

La bacténécine bovine est un dodécapeptide cyclique cationique isolé depuis les granulocytes neutrophiles du boeuf.³⁷⁹ Il s'agit d'un des plus courts peptides parmi les PAM naturels à large spectre découverts jusqu'à présent.³⁸⁰ Toutefois, sa structure cyclique induite par la présence de deux cystéines le rend peu idéal pour une immobilisation contrôlée sur une surface d'or. Néanmoins, sa singularité a fait de la bacténécine et ses dérivés des peptides très largement étudiés pour le design de peptides courts, servant régulièrement de référence ou de contrôle positif.^{264,380-382}

Ainsi, les premières propositions d'amélioration de la bacténécine proviennent de WU et HANCOCK, avec l'introduction de plusieurs dérivés cycliques ou linéaires.³⁸³ Les modifications apportées ont permis d'améliorer l'activité du peptide, tout en élargissant le spectre des bactéries sensibles, jusqu'alors principalement limitées aux pathogènes à Gram négatif. Un candidat en particulier, Bac2A, dans lequel les deux cystéines sont substituées par des alanines, a montré des propriétés antimicrobiennes contre des bactéries à Gram positif comme négatif. Ces nouvelles propriétés s'accompagnent également d'une disparition de l'agglutination des érythrocytes, observée pour la bacténécine naturelle. Ce dernier point est intéressant dans le cadre d'études d'interaction avec les bactéries dans le sang. En effet, les interactions non spécifiques avec les cellules sanguines seront ainsi probablement réduites par rapport à des peptides présentant une agrégation plus forte.

Il a donc servi de base pour le développement de nouveaux peptides alternatifs, notamment par la mise en œuvre de la méthode de synthèse SPOT.³⁸⁴ Dans ce cadre HILPERT et al. ont étudié l'activité inhibitrice de l'intégralité des substitutions possibles à Bac2A.³⁸¹ Il en ressort un nouveau peptide linéaire prometteur, Bac2A-Sub3, qui présente des capacités d'inhibition légèrement supérieures à Bac2A, sur un spectre aussi large.

Ainsi, Bac2A et Bac2A-sub3 seront deux des nouveaux peptides linéaires et cationiques que nous évaluerons (voir formules en figure 2.14).

Concernant le mode d'action de ces dérivés, il est encore soumis à controverse. En effet, le fait qu'ils présentent une activité forte, même immobilisés sur cellulose, tendrait à favoriser un mécanisme membranaire, basé sur la dépolarisation de celles-ci.³⁸⁵ Cependant, l'activité de Bac2A semble plus grande lorsqu'il est libre de pénétrer le cytoplasme des micro-organismes inhibés,³⁸⁶ visant alors des cibles intracellulaires. Un effet biocide dans le cadre d'une application SPRI reste toutefois peu probable, les densités greffées mises en jeu étant très différentes : de 50 à 280 $nmol.cm^{-3}$ pour la technique SPOT,^{381,385} contre environ quelques $nmol.cm^{-2}$ en monocouche sur surface d'or (voir partie 3.3.2).

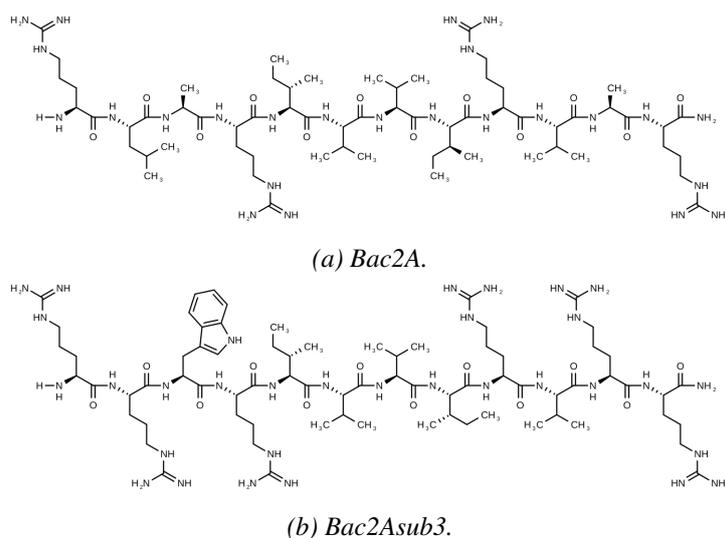


Figure 2.14 – Représentations des bacténécines bovines modifiées.

Il est enfin à noter que, si les dérivés linéaires n'ont jamais été exploités en tant que sondes dans des biocapteurs, c'est le cas de la bacténécine naturelle cyclique.^{316,317,387} Dans ces premiers travaux, elle a montré de bonnes performances de détection d'agents pathogènes (notamment de virus), sans pour autant arriver aux performances de puces à anticorps équivalents. Elle a également été utilisée comme contrôle négatif dans un test colorimétrique basé sur le changement de conformation des porphyrines,³³⁷ sa structure contrainte par le pont disulfure diminuant ces changements structuraux.

2.3.2.2 Cécropine-méllittine 15 (CM15)

La cécropine A est l'un des deux premiers peptides antimicrobiens isolés depuis un insecte, en l'occurrence le papillon géant *Hyalophora cecropia*.³⁸⁸ Présentant un spectre d'activité plus large et à des concentrations plus faibles que la magainine, il aurait pu être un candidat médicament idéal comme antibiotique. Cependant sa taille – 37 acides aminés – a empêché ce développement, en raison des difficultés de synthèse engendrées. Ainsi des initiatives sont nées pour l'hybrider à un autre peptide,^{389,390} la méllittine, issue du venin d'abeille.³⁹¹ Ces hybridations, basées sur la combinaison de domaines des deux peptides, ont mené à l'obtention de PAM longs de 15 acides aminés à l'activité antibactérienne et antimalarique, tout en ayant des effets hémolytiques réduits.³⁹²

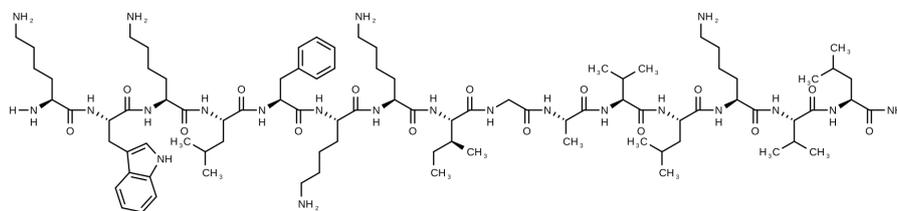


Figure 2.15 – Représentation de la cécropine-méllittine 15.

Parmi ces nouveaux peptides chimériques, l'hybride CM15 (figure 2.15), obtenu par combinaison des résidus 1 à 7 de la cécropine A avec les 2 à 9 de la méllittine, a particulièrement éveillé les intérêts par la suite. L'étude de son mécanisme par différentes équipes a montré que ces hybrides opéraient

principalement par interaction ionique avec les phosphates anioniques puis provoquaient la lyse par perméabilisation des membranes.³⁹³⁻³⁹⁵

Toutefois, pour une application antibiotique contre un large spectre de souches cliniques de bactéries, l'efficacité est moindre que des antibiotiques traditionnels.³⁹⁶ C'est pour cela que des solutions alternatives ont pu être développées, telles que l'immobilisation sur des nanoparticules d'or.³⁹⁷ Une telle solution technique a permis à la fois d'augmenter l'activité antibactérienne, tout en obtenant une cytotoxicité et une stabilité supérieures au peptide CM15 seul.

Enfin, si ce dernier n'a jamais été utilisé après immobilisation pour la capture ou la détection, d'autres dérivés de la cécropine ou de la méllittine ont pu l'être. On notera l'un des premiers exemples connus d'utilisation d'un peptide antimicrobien immobilisé pour la capture de cellules bactériennes par GREGORY et MELLO.³⁹⁸ Cette publication se base déjà sur le principe qu'un peptide immobilisé perdra sa capacité antibiotique, tout en conservant ses propriétés de capture des bactéries. En effet, la cécropine P1 alors utilisée n'est lytique qu'en cas de couverture complète de la surface de la bactérie.³⁹⁹

Pour ce qui est d'une mise en œuvre dans des biocapteurs, plusieurs dérivés ou analogues de cécropine ou de méllittine ont également été testés.^{313,316,333,337,387} Cela a même abouti au dépôt d'un brevet pour des capteurs à affinité croisée.³¹⁷

Il était donc intéressant d'inclure CM15, peptide hybride présentant de fortes propriétés antibactériennes et regroupant les critères établis de charge et d'hélicité en solution.

2.3.2.3 Pénétratine

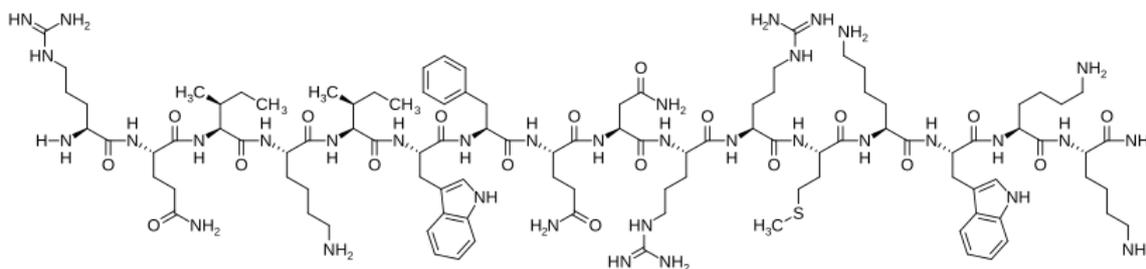


Figure 2.16 – Représentation de la pénétratine.

Contrairement aux exemples précédents, la pénétratine n'est pas définie comme un peptide antimicrobien, mais un peptide pénétrant dans les cellules eucaryotes (ou *Cell-Penetrating Peptide*). Dérivée de la troisième hélice d'un homéodomaine du gène Antennapedia de la drosophile, la pénétratine présente une courte séquence de 16 acides aminés, riche en résidus cationiques, ainsi qu'avec deux tryptophanes facilitant la translocation.⁴⁰⁰ Un tel peptide a ainsi rapidement été utilisé comme molécule cargo pour l'administration de médicaments.⁴⁰¹

Toutefois ses propriétés physico-chimiques et sa séquence en font un peptide très similaire aux PAM cationiques à hélice α , bien qu'ils appartiennent à deux familles différentes de peptides actifs sur les membranes.⁴⁰² Par ailleurs, sa richesse en arginine le rapproche de certains PAM, eux aussi riches de cet acide aminé.²³⁴

Cela a mené à l'étudier pour des applications antibactériennes.⁴⁰³⁻⁴⁰⁵ Au plus faible, les CMI obtenues, sont de l'ordre de 8 à 16 μM pour *E. coli* et 32 μM pour *S. aureus*.⁴⁰⁵ À titre de comparaison, le

céfotaxime, un antibiotique de référence pour ces deux pathogènes, présente une CMI de l'ordre de 0,5 μM . Il y a ainsi entre un et deux ordres de grandeur de plus pour la pénétratine. Toutefois cela les CMI obtenues signifient tout de même que ce peptide présente un effet biocide sur les bactéries, impliquant ainsi qu'il y a interaction avec les membranes de ces dernières.

La pénétratine a donc été incluse dans le jeu de peptides synthétisés, car elle possédait les caractéristiques physico-chimiques adéquates, sans toutefois présenter de très fortes propriétés d'inhibition de la croissance des bactéries. En ce sens, elle permet d'inclure un indicateur sur l'influence de la séquence sur la reconnaissance au-delà des seules propriétés antibactériennes.

2.3.2.4 Peptide à Caractère Hélicoïdal et Amphipathique : PàCHA – conçu *de novo*

Une dernière séquence additionnelle a été conçue *de novo*, en se basant sur les critères précédemment posés. Celle-ci possède un caractère amphiphile et hélicoïdal. Il faut toutefois souligner que cette séquence n'a donc pas été vérifiée pour son activité antibiotique ni sa conformation. Pour des raisons de confidentialité, les caractéristiques précises (séquence, longueur et propriétés) ne seront pas divulguées dans ce manuscrit.

2.3.3 Technique d'immobilisation des peptides sur l'or

2.3.3.1 Intérêt de l'immobilisation par chimie thiol

La fonctionnalisation de surfaces à l'aide de biomolécules peut se faire par plusieurs approches différentes (voir figure 2.17). D'abord, il s'agit de déterminer si nous désirons un greffage physique – par adsorption ou assemblage multicouches – ou bien chimique – *via* liaison (quasi)covalente avec la surface ou un procédé d'électropolymérisation par exemple. Les techniques physiques reposent majoritairement sur des interactions faibles avec la surface et peuvent ainsi être inadéquates lorsque le substrat sera exposé longtemps à l'échantillon, du fait du risque de relargage. Plusieurs méthodes permettent d'aboutir à une immobilisation chimique covalente ou quasi covalente – comme la chimie thiol ou l'électropolymérisation. Toutefois, la technique d'ancrage employée pour une molécule est tributaire de l'utilisation finale de la surface fonctionnalisée. Cet usage peut en effet imposer un type de substrat et une méthode particulière associée.

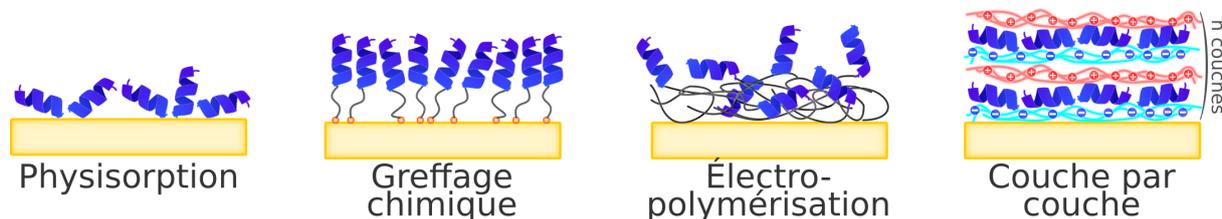


Figure 2.17 – Principales approches pour l'immobilisation de peptides sur surface.

Concernant l'emploi de biocapteurs SPR, nous avons vu que l'usage de l'or était quasi obligatoire. Ce dernier ne permet pas d'employer de techniques de greffage chimique covalent. Cependant, l'or présente l'avantage d'avoir une affinité très forte avec les groupements thiols.⁴⁰⁶ Un contrôle important des surfaces ainsi modifiées est donc rendu possible.⁴⁰⁷ Ceci a permis le développement d'une large gamme d'applications des molécules thiolées pour l'immobilisation sur l'or, selon le principe des monocouches

auto-assemblées⁴⁰⁸ (SAM pour *self-assembled monolayers*).

Par ailleurs, cette technique d'immobilisation par greffage chimique présente d'autres avantages. Premièrement, il permet de contrôler régiosélectivement l'orientation de la molécule en surface, à condition de positionner à façon le groupe thiol dans la sonde. Une telle approche n'est pas possible avec une immobilisation physique, par adsorption, plus aléatoire.⁴⁰⁹ Deuxièmement, le greffage permet d'inclure aisément des espaceurs entre la sonde et la surface, dont on contrôlera longueur et flexibilité. Ceci peut permettre de moduler l'activité de la sonde, selon que l'objectif soit de mimer le comportement en solution (espaceur long et flexible) ou au contraire de contraindre l'orientation de la molécule (espaceur court et rigide). Comme on le verra par la suite (2.3.3.2), cette modulation peut aller jusqu'à permettre de faire disparaître l'activité antibactérienne, sans atténuer celle de capture.

Enfin, entre les différentes techniques d'immobilisation de sondes moléculaires disponibles pour l'or, la chimie thiol présente l'avantage de la simplicité de sa mise en œuvre. Elle est en effet réalisable en une seule étape : le dépôt sur la surface d'une solution contenant la sonde avec ou sans contact. De plus, l'inclusion sélective d'un résidu thiol, typiquement *via* une cystéine, limite les modifications à apporter aux sondes à immobiliser.

Concernant l'élaboration des biopuces, l'utilisation de la chimie thiol permettra également d'aisément recourir à des solutions alternatives aux protéines bloquantes. On pourra les substituer avec des molécules thiolées, telles que les polyéthylènes glycols (PEG), généralement plus efficaces que les traditionnelles albumine et caséine.⁴¹⁰⁻⁴¹² L'introduction de ces agents bloquants se fera donc au détriment de la BSA qui avait été auparavant utilisée. Par ailleurs elle ouvre aussi sur la possibilité de créer des surfaces mixtes présentant à la fois des peptides comme sondes et des PEG comme agents à la fois antiadhésifs et de dilution en surface.³⁶⁰

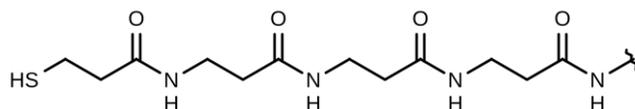
2.3.3.2 Influence de l'espaceur et de l'orientation de l'ancrage

De nombreuses études sont consacrées aux différences de comportement découlant de l'immobilisation en surface des PAM.^{298,342,409,413-419} De prime abord, il est intéressant de noter que la réduction de l'activité antibactérienne se fait dans certains cas sans perte des propriétés d'interaction avec les membranes.^{342,420}

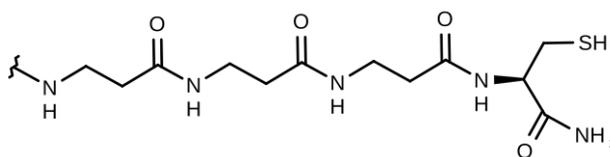
Parmi les principaux critères régissant ces changements d'activité, on compte la longueur de l'espaceur, sa flexibilité et l'orientation de la sonde. Concernant ce dernier point, il a été démontré que le sens de l'immobilisation peut faire totalement perdre le caractère biocide d'un peptide, pour des conditions similaires d'accroche.^{301,421-423} Il sera donc nécessaire pour chaque peptide de tester les deux orientations d'ancrage (N-ter ou C-ter) pour évaluer un éventuel effet de ce type. Chaque séquence sera donc synthétisée deux fois, dans un cas avec un acide mercaptopropionique à l'extrémité N-terminale et dans l'autre une cystéine en position C-terminale.

D'autre part, l'inclusion ou non d'un espaceur, sa longueur et sa flexibilité sont cruciaux pour l'activité du peptide immobilisé.⁴²⁴⁻⁴²⁷ De façon générale, l'espaceur idéal pour une application antimicrobienne n'est pas trop court ou rigide, car cela limite la possibilité d'orientation du peptide en surface.⁴²⁶ Inversement, un espaceur trop long et flexible diminue les possibilités de synergie entre les peptides pour arriver à une activité antibactérienne.⁴²⁷ Enfin il faut aussi noter que l'immobilisation peut entraîner une variation du mode d'action antimicrobien des peptides en surface. Par exemple il a été démontré que la cécropine

P1, dont l'action biocide découle de son insertion dans les membranes, reste active par le biais d'interactions électrostatiques lorsqu'immobilisée avec un espaceur court.⁴²⁸ Ce résultat nous rapproche d'études précédentes selon lesquelles, une charge surfacique positive au-delà d'un seuil variant entre 10^{12} et 10^{16} charges par cm^2 , permet d'atteindre des propriétés antibactériennes, sans structuration particulière.⁴²⁹ La cécropine P1 ainsi immobilisée sans espaceur conserverait donc ses propriétés antimicrobiennes, car elle dépasserait ce seuil.



(a) Dans le cadre d'une immobilisation en N-terminal : ancrage avec l'acide mercaptopropionique, espaceur triple β -alanine.



(b) Dans le cadre d'une immobilisation en C-terminal : ancrage avec une cystéine amidée, espaceur triple β -alanine.

Figure 2.18 – Espaceurs utilisés pour les peptides nouvellement synthétisés.

La conclusion à tirer reste que la technique d'immobilisation à employer est intimement liée au contexte applicatif visé. Substrat, espaceur et voie de fonctionnalisation seront à déterminer en fonction des peptides utilisés, ainsi que de l'utilisation ciblée.⁴²⁷ Toutefois, dans le cadre d'une application mettant en œuvre plusieurs peptides en parallèle, il sera intéressant de développer une solution de fonctionnalisation générique permettant leur comparaison. Notre objectif est de conserver l'affinité en limitant l'effet biocide, qui serait contreproductif pour une détection en croissance. Nous avons donc choisi d'inclure trois β -alanines en tant qu'espaceur, ainsi qu'une cystéine pour l'immobilisation en C-terminal ou bien l'acide mercaptopropionique pour l'ancrage en N-terminal (voir figure 2.18). Ce choix devrait permettre aux peptides la possibilité de changer de conformation pour interagir avec les membranes bactériennes sans pour autant avoir une flexibilité suffisamment importante pour un effet biocide.

2.4 Synthèse des peptides antimicrobiens sélectionnés

2.4.1 Stratégie de synthèse

2.4.1.1 Synthèse peptidique Fmoc supportée sur résine

Les peptides nouvellement introduits au cours de cette thèse (présentés en partie 2.3.2) ont tous été synthétisés par automate sur support solide ou SPPS (pour *Synthèse Peptidique en Phase Solide*). Cette méthode est classique parmi les différentes voies de synthèse possibles de peptides ou de protéines.⁴³⁰ Proposée pour la première fois en 1963,⁴³¹ elle consiste en un greffage séquentiel sur support des acides aminés du C-terminal au N-terminal du peptide (figure 2.19). Le support solide est une résine polymère décorée de bras espaceurs porteurs d'une fonction permettant de recevoir le premier acide aminé. La

synthèse se fait ensuite par étapes successives de couplage et déprotection, jusqu'à obtenir le peptide complet. L'un des avantages de cette technique de synthèse sur billes solides est la simplicité d'isolation du peptide entre deux étapes de couplage. Celle-ci peut en effet se faire simplement par rinçage et filtration des billes entre chaque étape.

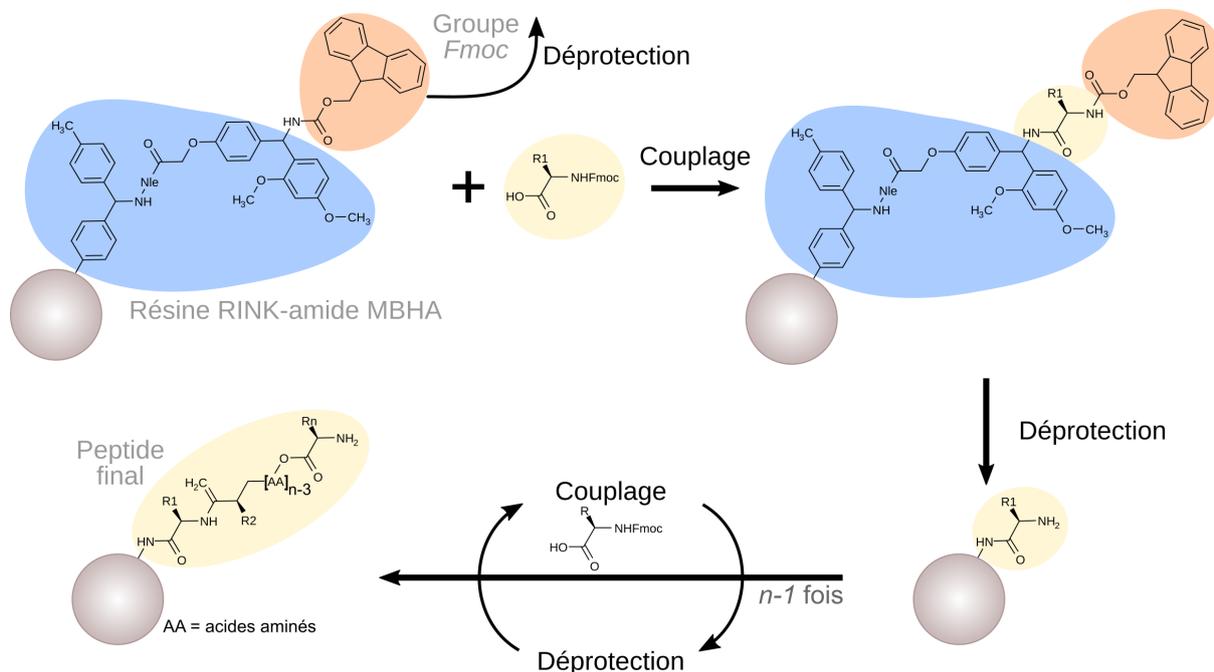


Figure 2.19 – Exemple de synthèse peptidique sur support solide.

Plusieurs stratégies de SPPS existent. Les deux plus notables sont les chimies *Boc* et *Fmoc*. Ces fonctions sont les groupements protecteurs du N-terminal, présents au cours des étapes de rinçage. Dans le cadre de la stratégie *Fmoc* (fluorénylméthoxy-carbonyl), ce dernier est déprotégé en présence de pipéridine. Il est également important de noter que certaines chaînes latérales des acides aminés constituant le peptide doivent être protégées par des groupes dont les réactions de déprotection sont orthogonales au groupe protecteur du N-terminal. Cette protection permet d'éviter des interférences dans les réactions de couplage. L'utilisation du *Fmoc* permet donc d'utiliser des groupements orthogonaux éliminés en conditions acides tels que les groupes *Pbf*, *Boc*, *Trt*, etc. Ces conditions acides sont les mêmes qui permettront le clivage du peptide de sa résine en fin de synthèse, économisant ainsi une étape supplémentaire. Il est enfin intéressant de noter que cette synthèse étape par étape permet aisément d'intégrer des acides aminés non naturels ou bien des espaceurs dans les peptides produits. Les dérivés commerciaux *Fmoc* étant produits à très large échelle, cette voie de synthèse est ainsi également intéressante pour une éventuelle application industrielle.

2.4.1.2 Voie de synthèse effectuée

Tel qu'évoqué en partie 2.3.3, la chimie thiol est particulièrement favorable à l'élaboration simple de monocouches auto-assemblées sur l'or. En ce sens, un résidu thiolé (cystéine ou acide mercaptopropionique (MPA)) sera systématiquement inclus à l'une des extrémités des peptides synthétisés pour mettre à profit le groupement thiol présent sur sa chaîne latérale. La synthèse se faisant du C-terminal au N-terminal, le MPA ne sera intégré que pour l'immobilisation depuis le N-terminal. Cette ancre thiolée sera séparée du

reste de la séquence par un groupe de trois β -alanines.

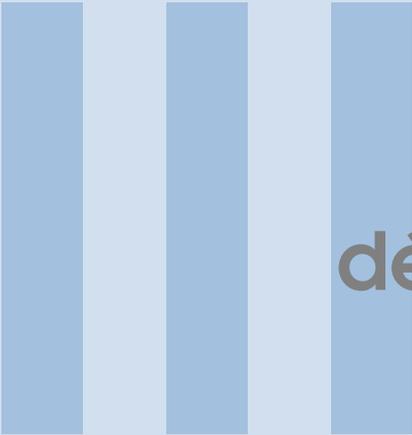
Au-delà de l'immobilisation des peptides en surface, qui a déjà longuement été abordée, il est important d'anticiper une éventuelle dégradation qu'ils pourraient subir des exopeptidases présentes dans les échantillons sanguins. Ainsi, le C-terminal des peptides sera systématiquement amidé pour réduire l'action des carboxypeptidases. Cette amidation est effectuée grâce à l'emploi d'une résine Rink amide, qui libère le C-ter directement amidé lors du clivage des peptides depuis la résine.

Chaque séquence sera synthétisée deux fois, avec un greffage prévu en N-ter ou en C-ter. La présence de la cystéine et de l'espaceur à une extrémité ou à une autre permettra ainsi d'évaluer l'influence du sens de l'immobilisation du peptide sur sa capacité d'interaction une fois greffé. Tout comme il peut réduire l'accès à certains acides aminés cruciaux dans les interactions avec les membranes bactériennes.

2.4.1.3 Résultats de synthèse

La voie de synthèse suivie, basée sur la SPPS est décrite en détail en annexe 6.2.1.1.

Brièvement, une fois le peptide synthétisé, il est déprotégé et clivé de sa résine support, en présence de molécules pour capturer les groupes de protection (appelées *scavengers* en anglais). L'acide trifluoroacétique (TFA) permet de séparer le peptide de la résine RINK. Les *scavengers* sont le triisopropylsilane (TIS), qui permet de capturer les carbocations, le 3,6-dioxa-1,8-octane-dithiol (DOTD), capturant les thiols et trityles (groupes protecteurs des cystéines notamment) et enfin le 1,4-diméthoxybenzène, *scavenger* des phénols. L'eau, nucléophile, agit également en tant que *scavenger*. Le clivage se fait ainsi en mélange 85 % TFA ; 2,5 % TIS ; 3,75 % DOTD ; 3,75 % DMB et 5 % d'eau ultra-pure. Le peptide clivé est ensuite précipité à l'éther diéthylique avant d'être purifié par chromatographie en phase liquide (HPLC). Les méthodes de caractérisation (ESI-MS et HPLC analytique) et les résultats obtenus pour les peptides synthétisés sont aussi décrits en annexe 6.2.1.2.



Biopuces à peptides antimicrobiens pour la détection de bactéries par SPRI : caractérisation en milieu modèle

3	Biopuces à PAM pour la détection de pathogènes en milieu simple	91
3.1	Méthodologie de fonctionnalisation	
3.2	Mise en œuvre des biopuces à PAM pour la détection en milieu simple	
3.3	Caractérisation de la fonctionnalisation des puces par les peptides	
3.4	Conclusions du chapitre	

Chapitre 3

Biopuces à peptides antimicrobiens pour la détection de bactéries par SPRI : caractérisation en milieu modèle

3.1 Méthodologie de fonctionnalisation

3.1.1 Principes de fonctionnalisation des biopuces

3.1.1.1 Préparation des surfaces : plasma- O_2 et automate de dépôt

Comme déjà évoqué, l'utilisation de surfaces d'or ouvre différentes perspectives pour la fonctionnalisation (voir partie 2.3.3). Dans le cadre de l'élaboration de biopuces pour la détection en imagerie SPR, les objectifs à suivre sont multiples. Idéalement, pour une utilisation à grande échelle, le capteur préparé devrait être simple dans son procédé de fonctionnalisation, tout en restant robuste face aux conditions de stockage. La mise en œuvre d'un procédé de fabrication simple pour le capteur permet d'aisément envisager un développement industriel ultérieur, tout en réduisant son coût. Il est donc intéressant d'avoir recours à une chimie de fonctionnalisation covalente plutôt que des procédés d'adsorption, moins contrôlables que la formation d'une monocouche auto-assemblée par exemple. Par ailleurs, au-delà du choix de la technique de greffage des sondes, celle de passivation du reste de la surface est également d'importance. En effet, l'or étant très réactif de façon non spécifique, il est primordial de minimiser les interactions qu'il pourrait avoir, notamment l'accroche non spécifique de bactéries qui produiraient alors un biofilm hors des plots.

Les anticorps, bien que très spécifiques, sont généralement peu stables face au séchage ou à des conditions chimiques éloignées de celles biologiques. Ils peuvent en effet perdre leur conformation en milieu peu salin, ou encore en étant exposés à un pH acide ou basique ou un solvant organique. La conception de capteurs utilisant des anticorps est donc peu favorable. En effet, de telles biopuces doivent alors être conservées en tampon aqueux, à température contrôlée – généralement + 4°C. Le même problème survient lors de l'utilisation de protéines bloquantes telles que la BSA. En effet, cette dernière nécessite également une conservation en milieu liquide.

Pour ces raisons, l'utilisation de peptides, couplée à l'intégration de groupes thiol pour une immobilisation covalente est prometteuse. D'une part, les peptides sont très stables face au séchage et aux changements de solvants. Par ailleurs, cela va permettre de mettre en œuvre un dépôt par automate sans contact, ce qui autorisera d'avoir un grand nombre de plots en surface. En comparaison avec l'électrodépôt de polypyrrole, cela permet aussi d'obtenir des sondes immobilisées en monocouches, avec des effets de bord moins importants, du fait de l'épaisseur moindre des plots. En effet, lorsqu'il y a présence d'un fort contraste d'épaisseur entre les plots et le fond de puce, il arrive que les bactéries s'établissent en

périphérie des plots, formant une auréole non spécifique.⁴³² Enfin, concernant la passivation du fond de puce, l'emploi de molécules thiolées pour obtenir la formation d'une monocouche auto-assemblée entre les plots remplacera la BSA immobilisée par adsorption. Cette dernière présente en effet également le désavantage d'une taille très importante (66,4 kDa) en comparaison de la taille des sondes peptidiques utilisées (de 1,7 à 2,7 kDa). L'introduction de PEG thiolés de masse moléculaire similaire aux peptides sera donc également un moyen d'augmenter le potentiel d'interaction des sondes avec les bactéries, en minimisant leur recouvrement par la BSA.

La surface d'or utilisée lors du dépôt est préparée en amont de l'expérience par un traitement par plasma- O_2 . Celui-ci est réalisé au minimum 24 heures en amont d'une fonctionnalisation, afin d'une part de nettoyer la surface, ainsi que d'assurer une oxydation homogène de la surface. La mise au point de conditions de préparation optimales a été réalisée auparavant au sein du laboratoire CREAB. Les conditions utilisées en routine sont donc les suivantes : le plasma est généré à 0,6 mbar, par un générateur pulsé à 13,56 MHz pour une puissance de 40 watts. Le mélange de gaz utilisé est constitué à 75% d' O_2 et 25% d'Ar. Le premier sert à oxyder à la fois la pollution présente et la surface, tandis que le deuxième sert majoritairement à stabiliser le plasma ainsi qu'à une action de « nettoyage mécanique » de la surface. Le substrat à fonctionnaliser est ainsi exposé pour 3 minutes à ce plasma.

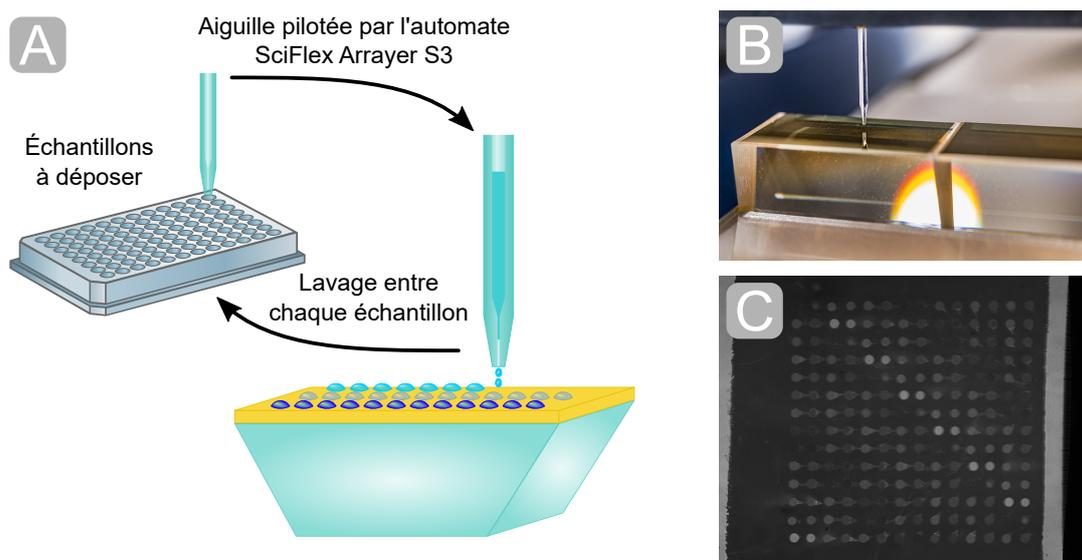


Figure 3.1 – A - Principe du dépôt par automate à jet d'encre. B - Prisme après dépôt d'un champ de peptides. C - Observation d'un champ de dépôt à l'aide d'un imageur SPR en début de suivi.

Les dépôts de peptides réalisés avec un automate de précision permettent de faire varier la surface du dépôt réalisé en fonction du nombre de gouttes déposées et de la mouillabilité du substrat. La taille de goutte dépend de l'automate et de la nature de l'échantillon. Dans le cas présent, ces gouttes ont un volume compris entre 280 et 360 pL, grandeur variable en fonction de la nature de l'échantillon et des paramètres d'éjection. Ce robot permet le dépôt séquentiel d'un grand nombre d'échantillons différents, avec une précision de l'ordre du micromètre sur le champ de dépôt (voir figure 3.1). Cette technique demande toutefois une attention particulière aux solvants utilisés pour le dépôt sur une surface donnée. Il faut effectivement s'assurer à la fois que la sonde déposée ne va pas s'agréger, mais également que la

goutte la contenant ne s'évapore pas totalement durant le processus d'auto-assemblage. Pour atteindre ces objectifs, on peut ajouter à la solution de dépôt des solvants organiques, pour augmenter la solubilité des peptides, ainsi que des composés hygroscopiques, qui éviteront le séchage trop rapide du dépôt. Ces conditions ont fait l'objet d'optimisations qui seront notamment abordées en partie 3.1.2.

Ces conditions ont mené à des plots d'un diamètre moyen de l'ordre de 300 à 350 μm , principalement influencé par la viscosité des différentes solutions de dépôt. Les volumes déposés correspondaient alors à 6 gouttes, soit 1,7 à 2,2 nl. L'auto-assemblage se produit sur la nuit, pour une durée de 18 heures, à 25°C, au sein d'une chambre humide au nitrate de potassium, afin de maintenir l'humidité à 92%.

Pour éviter toute coalescence des plots – et donc les éventuels mélanges de sondes – un espacement de 750 μm entre les centres de plots est systématiquement inclus.

3.1.1.2 Méthodologie de révélation des spots par biotinylation post-fonctionnalisation

Avant de procéder à l'optimisation du procédé de dépôt, il est essentiel d'établir une méthodologie d'évaluation de la qualité des surfaces. Pour ce faire, bien que l'utilisation de l'imageur SPR permette d'avoir une image globale de la surface, la microscopie de fluorescence a été préférée pour révéler les éventuels agrégats surfaciques. En effet, la résolution spatiale de la SPRI est inférieure à celle accessible en microscopie de fluorescence. Le principe de ce procédé est présenté en figure 3.2. Une fois les surfaces fonctionnalisées avec les peptides, ils seront biotinylés en employant des biotines-NHS (*N*-hydroxysuccinimide). Ce couplage est réalisé en conditions basiques à pH 8,5, pour 2 heures, à 25°C, avec la biotine-NHS à 250 μM . La passivation puis l'exposition à la streptavidine-phycoérythrine (SAPE) permettront la révélation des plots par fluorescence de cette dernière. Un protocole plus détaillé est présenté en annexe 6.2.2.2.

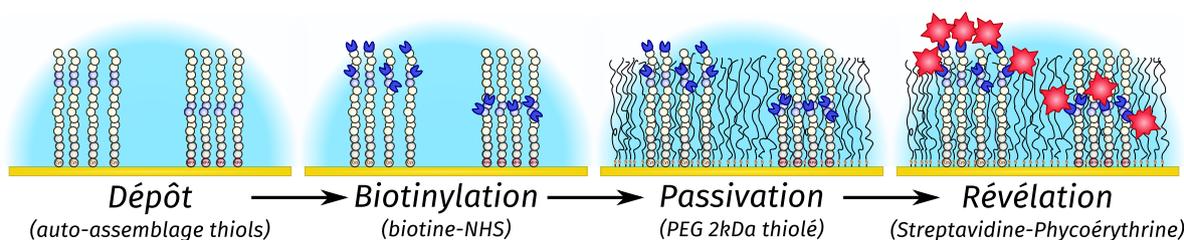


Figure 3.2 – Principe du protocole de révélation des plots de peptide par fluorescence. Le couplage des biotines (représentées en bleu ici) se fait sur les amines primaires.

3.1.2 Optimisation du procédé de dépôt des peptides

3.1.2.1 Influence de la composition de la solution de dépôt sur le spotting

Comme déjà introduit (3.1.1.1), la composition de la solution de dépôt est cruciale pour une bonne fonctionnalisation des surfaces, notamment concernant la solubilité des sondes et l'hygroscopicité de la solution. Pour améliorer ces paramètres, des gammes croisées de solvant et de glycérol ont été testées. Le solvant organique de prédilection pour les peptides est généralement le diméthylsulfoxyde (DMSO). Toutefois, sa température de fusion haute (18,5 °C) peut rendre son emploi parfois complexe, d'autant plus qu'il aura une viscosité très dépendante de la température. Ainsi, le choix s'est porté sur l'usage du *N,N*-diméthylformamide (DMF), qui présente des propriétés de solvant et d'hygroscopicité similaires au DMSO,

pour un point de fusion à -61°C . Le glycérol, quant à lui, est utilisé principalement pour sa capacité à retenir des molécules d'eau par liaisons hydrogène *via* ses trois groupes alcool. Sa viscosité élevée permet également de limiter l'étalement des gouttes en surface, amenant une protection supplémentaire face au risque de coalescence entre plots voisins.

Enfin, au-delà du comportement que la goutte déposée adoptera en surface, une bonne fonctionnalisation passe également par une éjection propre des gouttes depuis la buse de l'automate. C'est-à-dire que le solvant utilisé ne doit pas être trop mouillant vis-à-vis de la surface de la buse, pour éviter la rétention de gouttes sur celle-ci. Le revêtement de cette dernière n'étant pas divulgué par le fabricant, il est difficile d'optimiser cet aspect du processus de fonctionnalisation autrement qu'empiriquement. De plus, les conditions atmosphériques – température et humidité – au sein de l'enceinte de l'automate ont également une forte influence. Des défauts dans le contrôle de cette étape peuvent par exemple entraîner une éjection en spray ou encore la coalescence de plots voisins si l'éjection se fait en biais par rapport à la normale (figure 3.3).

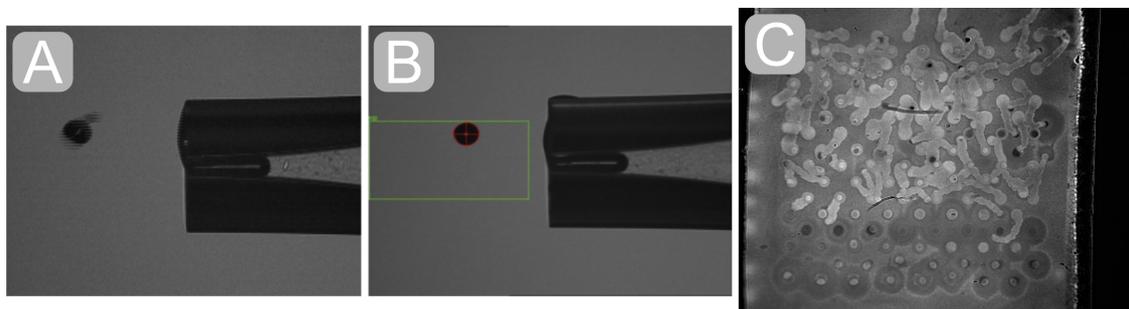


Figure 3.3 – Exemples de soucis engendrés par une mauvaise éjection de goutte. A – éjection de goutte provoquant des satellites. B – déviation de la goutte par rapport à la buse. C – observation en SPRI d'un dépôt troublé par une mauvaise éjection des gouttes de peptide.

L'optimisation des conditions de dépôt s'est faite en deux étapes. D'abord en travaillant sur un seul peptide pour isoler les compositions de solvant menant à des plots répétables sans soucis d'éjection. Ce critère sera jugé sur le spotting et l'allure en fluorescence des plots déposés et révélés. Ensuite en généralisant le dépôt sur tous les peptides à tester pour vérifier les bonnes conditions d'éjection et l'homogénéité, quel que soit le peptide. Ce critère sera jugé sur les paramètres de goutte mesurés par l'automate et à nouveau sur la fluorescence.

Exploration d'une gamme croisée DMF/glycérol

Le dépôt de BNC, peptide présentant une unique amine primaire en N-terminal, avec différentes compositions de solvant a été réalisé dans 10 cas différents. Des mélanges à 15 ou 30 % de DMF et à 0, 5, 10, 15 et 20% (volume par volume) de glycérol ont été utilisés. Le dépôt est effectué avec 6 gouttes de chaque solution. Le volume de chaque goutte dépendait de la nature de sa composition, mais variait généralement entre 280 et 360 pl, soit un volume global de l'ordre de 1,7 à 2,2 nl. Les compositions à D15G15 (15 % DMF et 15 % glycérol), ainsi que D30G10 ont donné les résultats les plus satisfaisants, sans souci d'éjection ni disparités dans les plots formés. Les diamètres moyens des plots ainsi déposés étaient respectivement de $316 \pm 6\mu\text{m}$ et $311 \pm 3\mu\text{m}$, sur un échantillon de 4 plots.

Ces deux compositions de solvants sont donc conservées pour expérimenter le dépôt des 13 peptides

étudiés.

Application à la bibliothèque entière de peptides

Dans cette étape, les 13 peptides sont testés pour un dépôt à $100\mu M$, avec les deux différents solvants précédemment identifiés, D15G15 et D30G10.

De prime abord, on constate lors du processus de dépôt que la composition D30G10 donne des gouttes de volume moins régulier (voir figure 3.4). Cette diminution après dépôt est dommageable, car elle entraîne une incertitude sur le volume exact de solution déposée, qui peut ainsi diminuer jusqu'à 20% entre le premier et le dernier dépôt. Pour cette raison, nous écarterons l'utilisation de D30G10.

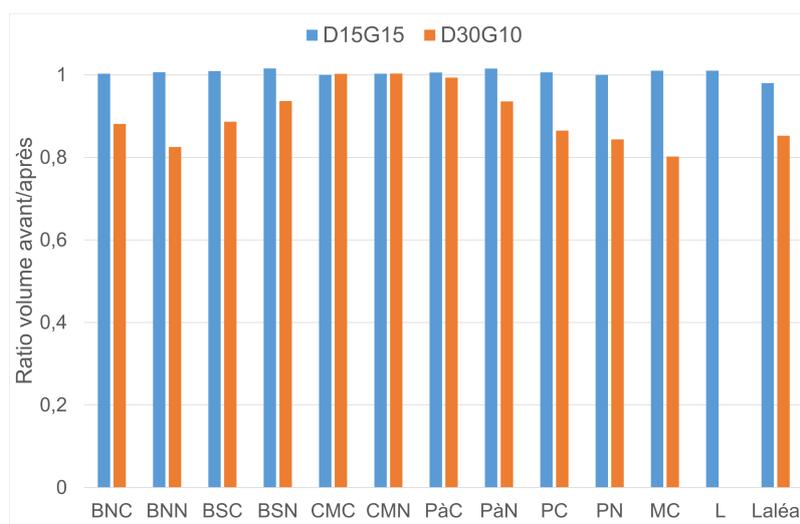


Figure 3.4 – Ratio des volumes de goutte à l'éjection de la buse, avant et après dépôt sur le substrat pour chaque peptide (V_{post}/V_{pre}).

Par ailleurs, il faut noter qu'en amont de cette série de dépôts, une optimisation des conditions atmosphériques de dépôt a été faite et a abouti à la sélection d'une humidité relative de 60%. La température de la pièce, contrôlée, varie de 19 à 26°C. Cela permet de limiter l'évaporation des gouttes avant leur mise en chambre humide, tout en évitant la présence résiduelle d'humidité sur la buse après rinçage de l'échantillon, qui peut engendrer des satellites (voir figure 3.3–B par exemple).

Des données en microscopie de fluorescence obtenues après cette expérience, il ressort que l'utilisation de D15G15 amène un processus de dépôt plus stable, tout en produisant des plots globalement homogènes (figure 3.5.A). On observe alors l'allure classique de plots qui ont partiellement séché au cours de l'assemblage, ce qui entraîne une auréole extérieure à l'intensité moins forte. D'autre part, on vérifie également que les peptides ne présentant pas d'amines primaires (bacténécines immobilisées en N-ter) n'engendrent pas de fluorescence notable (données non montrées). On note toutefois que certaines espèces présentent des agrégats sur les images (voir figure 3.5.B)). Par ailleurs, la présence de « queues de comète », dues au rinçage des substrats après auto-assemblage, vient renforcer l'intérêt d'utiliser un espacement inter plots suffisamment grand pour éviter toute contamination croisée. La présence de ces défauts n'est pas observée sur l'intégralité des plots, ce qui tendrait à montrer qu'il y a un effet lié à la séquence pour l'immobilisation d'un peptide à l'autre. Ce sont effectivement les peptides à la masse moléculaire la plus élevée (magainine et leucocines) qui présentent ces « queues de comète ». Des

optimisations dans le processus de rinçage et lavage des échantillons viendront par la suite minimiser ces effets de coulure.

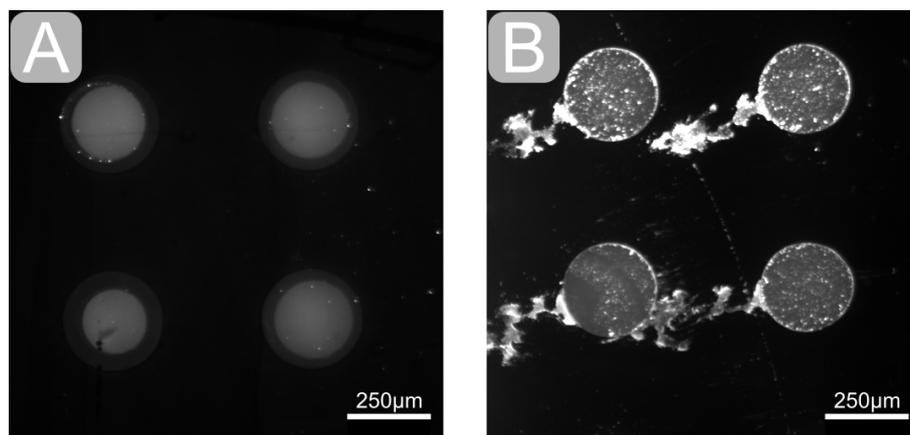


Figure 3.5 – Allure en microscopie de fluorescence de plots obtenus avec l'utilisation du solvant D15G15 (zoom 4x – exposition 40 ms – gain 4). A – Bacténécine naturelle immobilisée en C-ter. B – Leucocine aléatoire.

Pour limiter la formation d'agrégats en surface, une ultime piste a été explorée : l'ajout de chaotropes dans les solutions de dépôt.

Évaluation de l'effet des chaotropes sur le dépôt de peptides

Les chaotropes sont des petites molécules couramment utilisées pour interférer avec les biomolécules ayant une forte tendance à former des agrégats.⁴³³ Ils agissent en s'opposant aux interactions non covalentes, facilitant ainsi la solubilisation des molécules. L'urée et le chlorure de guanidinium seront ainsi utilisés à une concentration de 3,3 M dans le solvant D15G15 pour s'assurer une complète dénaturation. La comparaison sera effectuée sur la leucocine aléatoire, qui présentait quelques agrégats avec l'utilisation de D15G15 seul (voir figure 3.5).

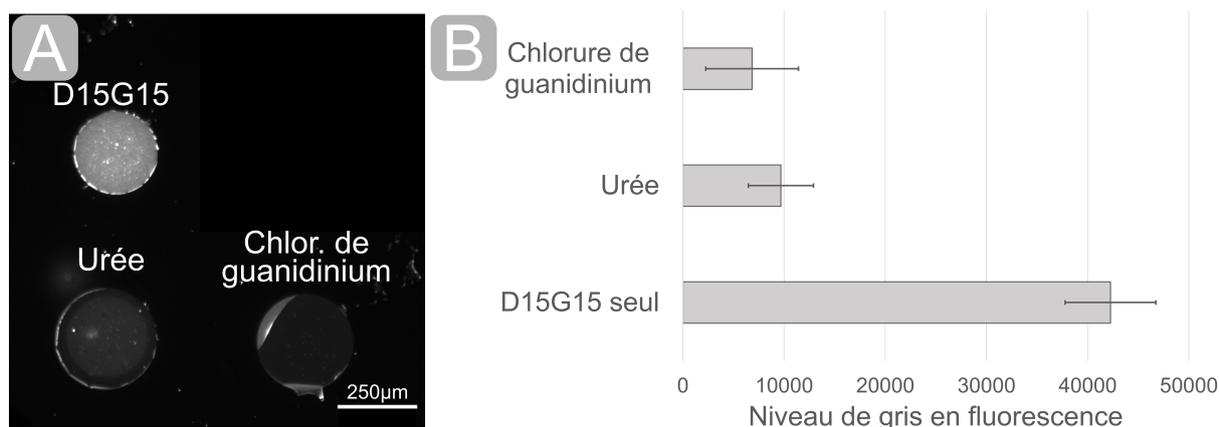


Figure 3.6 – Effets de l'ajout de chaotropes dans la solution de dépôt. A – Image obtenue par microscopie de fluorescence (zoom 4x – exposition 40 ms – gain 4). B – Niveaux de gris moyens obtenus, mesurés avec IMAGEJ sur 4 répliquats. Les barres d'erreur représentent les moyennes des écarts-types.

Il ressort de cette série de dépôts plusieurs éléments (figure 3.6). D'une part l'ajout de chaotropes diminue l'intensité globale de la fluorescence des plots, ce qui signifie une densité de greffage des

molécules inférieure. Par ailleurs, dans le cas du chlorure de guanidinium, les plots présentent un aspect quasi « pelés », suggérant qu'il empêche l'accroche des peptides en surface jusqu'au moment du rinçage des plots. Ainsi, dans les conditions expérimentées, l'apport de ces agents chaotropiques ne semble pas apporter de plus-value suffisante pour conserver leur usage systématiquement.

La suite des expériences de fonctionnalisations se déroulera donc avec le solvant D15G15, dans les conditions décrites par le protocole présent en annexe 6.2.2.

3.2 Mise en œuvre des biopuces à PAM pour la détection en milieu simple

La première vérification de la bonne fonctionnalisation des prismes par les peptides est l'imagerie SPR. En effet, si la microscopie de fluorescence permet de s'assurer qu'il y a effectivement présence de peptides en surface, l'élément prépondérant reste la capacité d'interaction avec les bactéries. La mise en œuvre de la détection de bactéries *via* SPRI est donc le meilleur moyen de s'assurer de la bonne fonctionnalité des peptides une fois les plots déposés.

Dans un premier temps, nous avons effectué des suivis comparatifs avec les quatre souches de pathogènes ciblées, en regard d'un suivi sur cuve stérile (3.2.1). Les objectifs étaient d'une part de s'assurer que la détection est possible et d'autre part d'évaluer la variété des signaux obtenus en fonction des bactéries en présence. Ensuite nous avons évalué des stratégies de fonctionnalisation alternatives (3.2.2). Dans un premier temps, les prismes utilisés présentaient uniquement des plots composés à 100 % de peptides, et déposés avec une solution à 100 μM . Cette concentration avait été définie comme optimale pour l'auto-assemblage des peptides en surface lors des travaux préliminaires réalisés par Agnès Roux. Le fond de ces puces était bloqué à l'aide d'un PEG thiolé de masse moléculaire moyenne de 2kDa (à 2 mM, 25°C et 92% d'humidité relative, pour deux heures)

3.2.1 Comparaison de cinétiques d'interaction en milieu simple

La vérification de la présence d'interactions entre les sondes nouvellement synthétisées et les bactéries est primordiale avant de procéder à toute tentative de détection en milieu complexe. Pour ce faire, le milieu de culture de référence choisi est à nouveau le TSB, avec un protocole mis en place similaire à ce qui avait été réalisé au laboratoire auparavant (voir partie 2.2.1.2). Brièvement, cela consiste à re-suspendre une colonie en TSB pour pré-culture la veille d'un suivi, avant d'effectuer des dilutions en cascade jusqu'à la concentration voulue, de l'ordre de 1 à 10² UFC.ml⁻¹, en fonction du pathogène. Un *inoculum* est alors injecté dans la chambre SPR, tout en effectuant plusieurs étalements pour quantifier la concentration initiale des suivis. Cette façon de procéder implique que chaque expérience est réalisée sans avoir de connaissance précise de la concentration initiale des bactéries dans la cuve de l'imageur SPR. C'est notamment la standardisation du protocole de pré-culture qui permet d'assurer que l'*inoculum* se situe dans la plage de concentration souhaitée. Le fait d'observer des bactéries vivantes – et non tuées par la chaleur ou des radiations comme c'est souvent le cas dans la littérature – nous rapproche ainsi les expériences du cas réel en hémoculture. Cela implique toutefois une part aléatoire dans les expériences, notamment à faible concentration, où le risque d'un *inoculum* sans bactéries est présent.

Cette méthodologie a été appliquée sur les quatre souches pathogènes différentes, ainsi qu'avec une injection blanche – en absence de bactéries (figure 3.7).

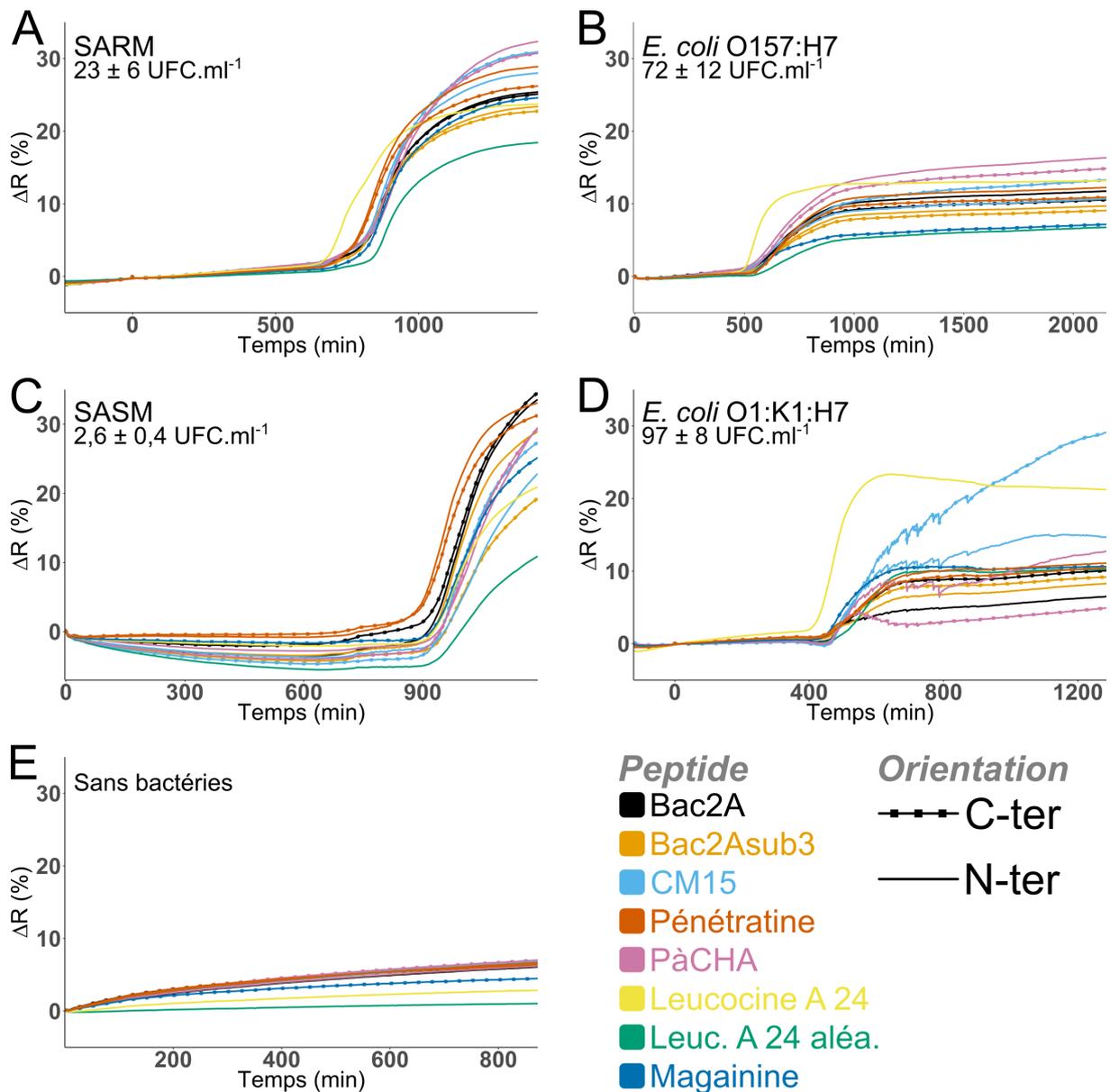


Figure 3.7 – Variations cinétiques de la réflectivité en SPRI pour le nouveau jeu de peptides. Les courbes sont la moyenne de 6 plots. Les concentrations sont celles dans la cuve en début de suivi, après injection d'un inoculum de 100 μ l dans 1900 μ l de bouillon digéré de soja-caséine (TSB). Les bactéries sont cultivées pour 18 heures en TSB à 37°C et sous agitation à 200 tours par minute. A – *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), concentration initiale de 23 ± 6 UFC.ml⁻¹. B – *Escherichia coli* sérotype O157:H7, concentration initiale de 72 ± 12 UFC.ml⁻¹. C – *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM), concentration initiale de $2,6 \pm 0,4$ UFC.ml⁻¹. D – *Escherichia coli* sérotype O1:K1:H7, concentration initiale de 97 ± 8 UFC.ml⁻¹. E – Injection blanche d'un inoculum sans bactéries.

D'une première part, l'intégralité des souches testées a effectivement été détectée avec succès. Le saut de détection caractéristique qui intervient après une faible phase de dérive initiale de plusieurs heures est ainsi visible sur la majorité des peptides. Par ailleurs, les amplitudes des sauts sont différentes d'un peptide à l'autre. Cela semble confirmer que chaque souche possède un profil d'affinité qui lui est propre. Réciproquement, chaque peptide présente des affinités différentes en fonction du pathogène ciblé. Il est

également intéressant de noter qu'il n'y a pas eu de faux-négatif, impliquant donc la perte probable de l'activité antimicrobienne des peptides, sans perte de celle de reconnaissance. Des expériences précédentes au laboratoire avaient en effet montré que l'immobilisation de molécules antibiotiques – la vancomycine – à haute concentration empêchait la détection des bactéries, à cause de leur action biocide très rapide sur les bactéries ciblées.²²⁴

La leucocine A 24 présente les performances de détection les plus précoces dans trois cas sur quatre parmi les différents peptides – seul le suivi sur SASM fait exception. Concernant *E. coli* et *S. aureus*, cette observation est conforme aux expériences préliminaires, qui avaient été réalisées avec des concentrations initiales similaires (voir partie 2.2.1.2). Par exemple, la détection d'*E. coli* O157:H7, à initialement (72 ± 12) UFC.ml⁻¹, par la leucocine est réalisée en environ 8 h 30. Ceci est équivalent aux temps de détection auparavant obtenus par détection *via* anticorps en sérum dilué par la technique Culture-Capture-Mesure.²¹¹ Il faut toutefois souligner que la détection en TSB est *a fortiori* plus favorable qu'en sérum dilué.

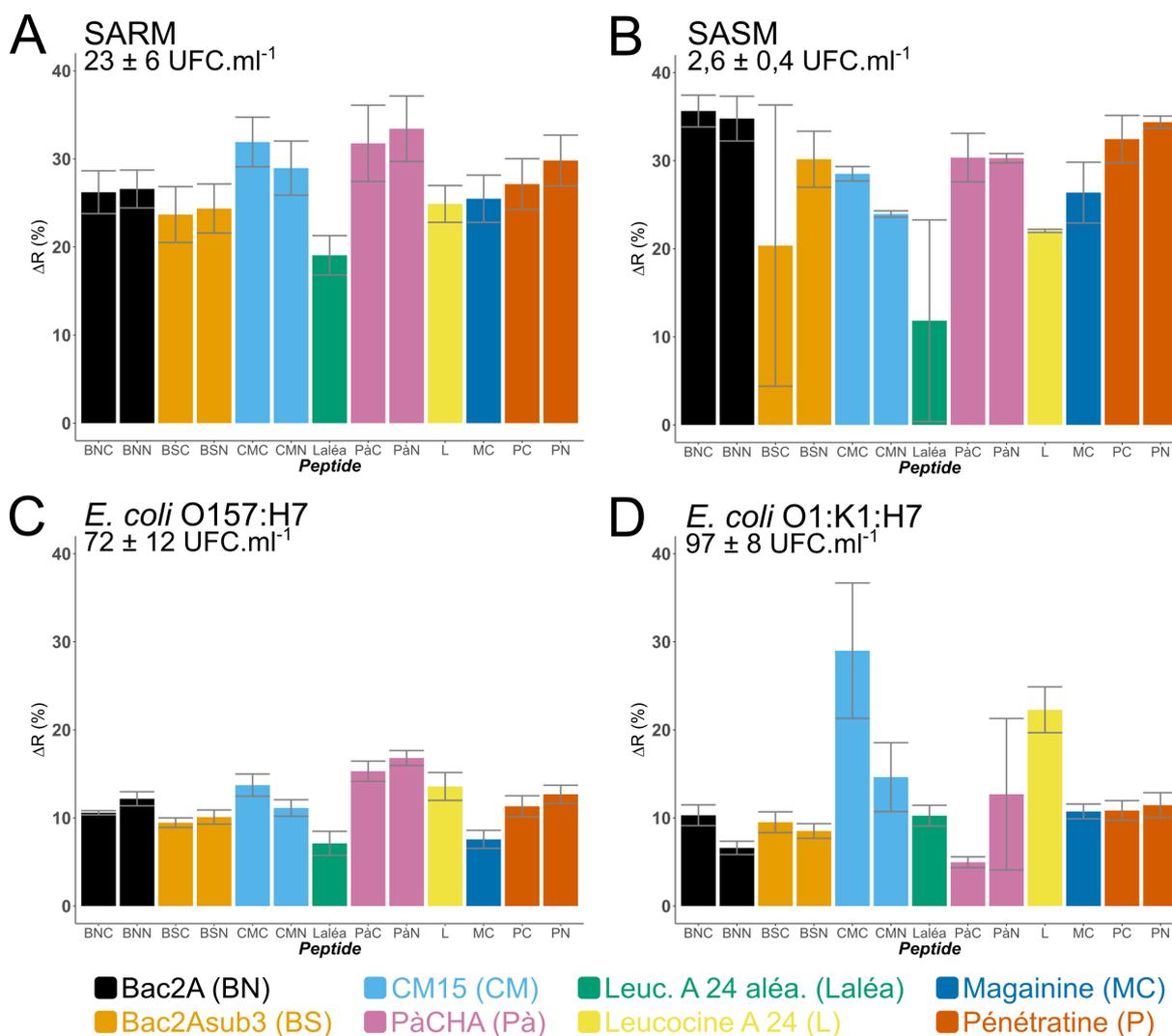


Figure 3.8 – Valeurs finales de variation de réflectivité en SPRI lors de suivis cinétiques ciblant *Staphylococcus aureus* résistant à la mécilline (SARM), *Staphylococcus aureus* sensible à la mécilline (SASM), *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* O1:K1:H7. Les valeurs sont la moyenne de 6 plots, l'écart-type est pris sur la même population. Ces expériences sont les mêmes que celles présentées en figure 3.7

L'interprétation des variations finales d'amplitude des signaux (figure 3.8) permet de tirer plusieurs observations. Il faut toutefois souligner qu'elle n'est pas directe : les différents plots de peptides peuvent présenter des sensibilités et des dérives initiales différentes, il faut donc interpréter ces données tout en s'appuyant sur l'allure des courbes cinétiques (figure 3.7). En dehors du suivi sur *E. coli* O1:K1:H7, on remarque que les peptides nouvellement introduits fournissent des performances relativement homogènes. Les suivis de détection sur *S. aureus* donnent une réponse de l'ordre de 25 à 35 % de variation de réflectivité, tandis que l'amplitude sur *E. coli* est moindre : environ 10%. Il n'est cependant pas possible de mettre en évidence un ou plusieurs peptides avec un comportement particulier sur les deux souches de *S. aureus* et *E. coli* O157:H7. Ceci est en cohérence avec leur nature similaire. Les leucocines et la magainine, peptides gardés comme référence par rapport aux expériences préliminaires, montrent eux des allures singulières. Il s'agit notamment de réponses de faible amplitude pour la leucocine aléatoire (sur tous les suivis) et la magainine (sur *E. coli* O157:H7). Les peptides nouvellement introduits sont donc généralement plus affins aux bactéries testées que ces deux sondes. De plus, la leucocine aléatoire répond toujours de façon moindre à l'originale. L'enchaînement des acides aminés de la version aléatoire est donc moins favorable à l'interaction avec les membranes bactériennes. Cela vient confirmer une fois de plus le constat déjà réalisé concernant l'importance de la structuration indispensable des peptides afin d'interagir avec les pathogènes.

Par ailleurs, on note qu'il y a peu de différences notables dans les réponses en fonction de l'orientation en N-ter ou C-ter de l'immobilisation, excepté pour la cécropine-méllittine avec *E. coli* O1:K1:H7. Ce suivi de détection d'*E. coli* O1:K1:H7 est le seul à montrer une forte dispersion dans les réponses, ce qui vient nuancer une influence réelle de l'immobilisation sur la reconnaissance des bactéries. Toutefois la détection de tous les pathogènes testés est bien obtenue en milieu simple, les peptides antimicrobiens nouvellement introduits conservent leur capacité d'interaction avec les bactéries une fois immobilisés. Cela valide le transfert de ces sondes vers des milieux plus complexes comme le plasma, puis éventuellement le sang, afin de se rapprocher des conditions finales d'application du système.

Enfin, les résultats présentés sont ici issus de surfaces fonctionnalisées avec une séquence peptidique par plot. L'utilisation de surfaces mixtes pourrait permettre d'élargir les capacités d'interaction des puces avec les bactéries. Cette piste est explorée dans la partie suivante.

3.2.2 Approche alternative de fonctionnalisation : co-mélanges surfaciques entre peptides et PEG



Figure 3.9 – Principe de la co-dilution surfacique : les PEG augmentent l'espacement entre peptides.

Une solution pour augmenter l'affinité d'une surface peut être de co-diluer les sondes avec des molécules inertes qui vont jouer le rôle de « diluants surfaciques ». Cela peut notamment augmenter la surface spécifique des sondes ou encore limiter l'encombrement stérique autour des sondes en réduisant leur densité de greffage. Plusieurs méthodes permettent d'arriver à ce résultat, les principales étant

l'utilisation de monocouches autoassemblées mixtes suivi d'un greffage des sondes³⁶⁰ ou la préparation d'un co-mélange avec des molécules inertes dans les solutions de dépôt.⁴³⁴ Le désavantage de la première méthode dans le cadre de l'élaboration de biopuces est le caractère hydrophile des couches mixtes, qui complique le dépôt matriciel des sondes. En effet dans ce contexte, les gouttes déposées s'étalent plus en surface, ce qui augmente le risque de coalescence des plots. C'est pour cela que la deuxième option a été explorée, avec l'inclusion de PEG thiolés dans les solutions de dépôt. Ces derniers jouent ainsi le rôle d'espaceurs en surface des plots, en supposant qu'il n'y a pas d'auto agrégation des peptides (voir figure 3.9).

Dans cette idée, on peut évaluer par exemple des co-mélanges à concentration constante de molécules thiolées, mais en variant les proportions entre peptides et PEG. Cela a été réalisé dans les proportions suivantes : 100, 75, 50, 25, 10 et 0 % de peptide – le complément (soit respectivement 0, 25, 50, 75, 90 et 100 %) provenant du PEG thiolé 2000 Da. En première intention, un suivi a été réalisé avec SASM, qui donnait les réponses avec le plus d'amplitude dans les suivis à 100% (figure 3.7). Cela devrait donc permettre d'observer plus aisément les potentielles variations d'amplitude introduites par les surfaces co-mélangées. Les valeurs de variation de réflectivité utilisées ont été prises au moment moyen du saut de détection, pour comparer tous les peptides au même temps de suivi. Pour s'affranchir des effets de dérive, la valeur référence est prise relativement à celle trois heures avant ce saut, soit $\Delta R = \Delta R_{saut} - \Delta R_{3\ h\ avant}$. Enfin, pour une interprétation plus simple, ces valeurs sont représentées en écart relatif entre les plots à 100% de peptide et ceux à 100% de PEG (figure 3.10). Cela permet de mettre en évidence l'apport du peptide dans la réponse.

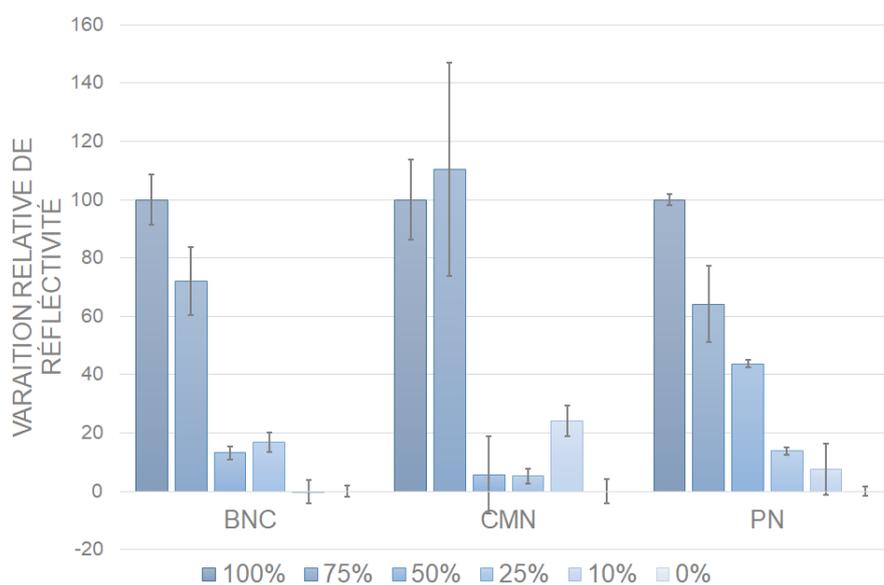


Figure 3.10 – Écart relatif de réflectivité lors du saut de détection pour différents co-mélanges de peptides et PEG lors de la détection de SASM. L'écart relatif est calculé par rapport au signal à 100% pour chaque peptide ainsi qu'à 0%, soit le signal du PEG thiolé. Cela correspond à calculer $\frac{\Delta R_i - \Delta R_{100\%PEG}}{\Delta R_{100\%peptide} - \Delta R_{100\%PEG}} \cdot 100$. La référence pour la variation de réflectivité ΔR est prise 3 heures avant le saut. Par souci de lisibilité, l'intégralité des peptides n'est pas représentée, mais uniquement certains qui permettent de montrer la diversité des réponses obtenues.

La détection à l'aide de ces surfaces mixtes permet de mettre en avant les différences de comportement d'un peptide à l'autre. La pénétratine N-ter, lorsqu'elle est présente à 75% et 50% de ratio peptide:PEG, présente une réponse proche d'un résultat linéaire, avec 64% et 44% de signal supplémentaire par rapport au PEG seul. Cela n'est pas le cas pour CMN qui présente un signal à 75% qui est en moyenne supérieur à celui du 100%. Il pourrait s'agir ici d'une co-dilution qui permettrait au peptide de plus librement interagir avec les bactéries, en présentant par exemple un encombrement minime ou bien une plus grande surface spécifique. Toutefois, ces plots de CMN à 75% montrent également une grande dispersion, ce qui peut impliquer que la fonctionnalisation de surface de ce mélange n'est pas répétable. Enfin, les ratios à moins de 50% présentent le plus souvent (en dehors de CM15 en N-ter à 10%) une réponse inférieure à celle de leur ratio. Une explication pourrait venir de l'existence d'une densité seuil de peptide en surface afin d'obtenir une interaction avec les bactéries. Une autre interprétation pourrait être que le PEG2000, structuré en pelote, recouvre les peptides lorsqu'il est présent en majorité. L'emploi de PEG plus courts, qui adopteraient une structure en brosse sur la surface, pourrait permettre d'atteindre un réel effet de dilution sans risque de masquer les peptides. Il reste que la relation de linéarité que l'on aurait pu supposer entre les ratios de peptide et l'augmentation de réponse en SPRI n'est pas observée.

Il faut cependant nuancer ces résultats par le fait que les ratios présentés ici sont ceux préparés en solution, ce qui peut introduire un biais. En effet, une dernière explication concernant les différences de réponse des co-mélanges pourrait simplement être une quantité de peptide en surface qui ne correspondrait pas à celle en solution. Pour remédier à cela, il est donc important de caractériser les surfaces mixtes, concernant leur densité, mais également les ratios des mélanges. Deux techniques vont principalement être employées pour cela : la mesure d'angle de contact, ainsi que la spectrométrie photoélectronique X (XPS).

3.3 Caractérisation de la fonctionnalisation des puces par les peptides

3.3.1 Mesures d'angle de contact

Une des hypothèses expliquant l'attachement préférentiel de bactéries sur une surface est la diminution de l'énergie surfacique.^{435,436} Une surface permettant la réduction de la tension superficielle des membranes bactériennes favoriserait alors le passage de l'état planctonique à l'établissement en biofilm. Pour vérifier cela, il est intéressant de mesurer l'angle de contact des monocouches peptidiques. Cette mesure permet d'accéder à une estimation de l'énergie superficielle et donc du caractère hydrophile plus ou moins élevé de la surface. Ceci est réalisé sur 3 peptides qui présentent des similarités en taille, mais des comportements différents face aux bactéries : la leucocine, sa version aléatoire et la magainine. Des lames d'or ont été entièrement recouvertes de couches sans co-mélange de ces peptides, ainsi que de couches mixtes entre séquences peptidiques et PEG800 thiolé. Enfin, des couches à 100% de PEG800 ont aussi été utilisées comme référence. Trois séries de mesures ont été effectuées sur ces échantillons (figure 3.11).

De ces résultats ressortent deux informations principales. D'une part, on voit que la leucocine présente des propriétés différentes selon qu'elle soit naturelle ou rendue aléatoire. En effet, Leuc. A 24 forme une surface moins hydrophile que la version aléatoire (55° contre 48°), ce qui est en accord avec la théorie

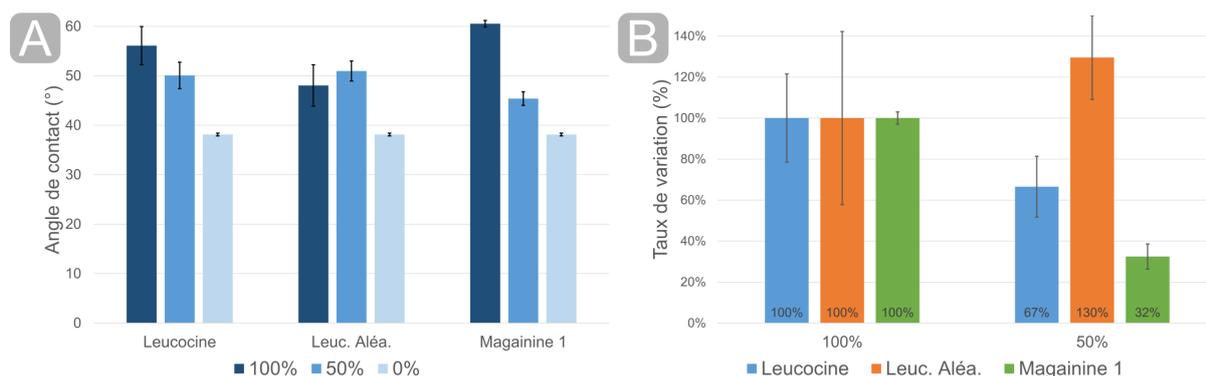


Figure 3.11 – Angles de contact absolus et relatifs au PEG800–SH, obtenus pour différents types de couches (à 100% ou mixtes). Les données sont obtenues sur un ensemble de 3 réplicats.

A – Valeurs absolues d’angle de contact obtenues.

B – Valeurs relatives (obtenues grâce à $\frac{angle_{pep} - angle_{0\%}}{angle_{100\%} - angle_{0\%}}$).

présentée précédemment exposée. Cependant, en comparaison avec la Magainine 1, qui présente une surface encore moins hydrophile (62°), n’a pas pour autant de meilleures performances en détection SPRI. Cela indique que l’affinité préférentielle des bactéries pour les surfaces fonctionnalisées n’est pas uniquement favorisée par la diminution de l’énergie superficielle. Si cela est sans doute un prérequis, la structuration adéquate et la présence de résidus favorablement orientés en surface semble donc tout autant nécessaire.

Par ailleurs, on voit (en figure 3.11.b) que les mélanges à 50 % en PEG ne donnent pas des résultats purement intermédiaires entre la surface de peptide à 100% et celle de PEG à 100%. La version aléatoire de la leucocine présente même un ratio supérieur à 100%, ce qui, en considérant l’incertitude élevée, correspondrait à une absence de différence entre le 50 et le 100%. Le peptide aurait alors une cinétique de greffage en surface plus rapide que les PEG800-SH. Ces résultats suggèrent à nouveau que les surfaces mixtes ont des proportions surfaciques très différentes des ratios présents en solution, notamment en fonction de la nature de la séquence du peptide.

3.3.2 Caractérisation de la densité de greffage par analyses XPS

La caractérisation des densités de greffage des molécules est particulièrement intéressante pour trancher entre les différents types d’interaction qui peuvent avoir lieu avec les bactéries. En effet, une forte densité implique également une capacité de changement de conformation potentiellement faible et des interactions alors gouvernées par les propriétés physico-chimiques. La densité surfacique d’immobilisation des molécules alors déterminée permet d’estimer si les sondes sont espacées ou non et donc d’en déduire le type d’interaction potentiellement à l’œuvre.

Ces expériences d’analyse en spectrométrie photoélectronique X (XPS) ont été menées par Vincent Humblot (Laboratoire de réactivité de surface, Sorbonne Université, Paris). Les échantillons suivants furent analysés en triplicats :

- Surfaces à 100 % pour la leucocine, sa version aléatoire, la magainine et le PEG800;
- Surfaces mixtes pour ces trois peptides à 50 % (ratio molaire en solution) avec le PEG800.

Nous aborderons dans un premier temps la caractérisation de la densité de greffage des surfaces

élaborées à partir d'une seule espèce (3.3.2.1). Ensuite, le cas des couches mixtes sera étudié, avec une approche différente, permettant principalement de accéder à une estimation des ratios de greffage en surface (3.3.2.2).

Succinctement, les analyses XPS se basent sur la mesure du spectre d'émission photoélectronique obtenu lorsqu'un échantillon est bombardé par des rayons X. Ce spectre va présenter des photoélectrons avec des énergies dont la valeur dépend de la composition élémentaire de l'échantillon et du type de liaisons mises en jeu.

3.3.2.1 Le cas des surfaces à 100% de peptide ou PEG

Pour les surfaces non mixtes, la démarche consiste tout d'abord à évaluer l'épaisseur équivalente de la couche déposée, en supposant que celle-ci soit homogène. L'hypothèse retenue est que les peptides utilisés présentent des hélices α , tandis que les PEG devraient présenter une couche dense en pelote. Un premier modèle permet d'évaluer cette épaisseur de couche en fonction des signaux reçus pour l'or et le soufre (respectivement les électrons Au_{4f} et S_{2p}). L'utilisation de ces signaux implique l'hypothèse que le soufre est absent d'une éventuelle pollution de l'échantillon.

Il est ensuite possible d'utiliser l'épaisseur ainsi déterminée pour déduire le nombre de molécules en surface, en utilisant la masse volumique théorique de celles-ci :

$$n_{mol} = \frac{\rho_{mol} \cdot d_{mol} \cdot N_A}{M_{mol}} \quad (3.1)$$

Avec n , densité surfacique molécules.nm⁻², ρ la densité volumique théorique, d l'épaisseur équivalente de la couche déposée, N_A le nombre d'Avogadro et M_{mol} la masse moléculaire.

Molécule immobilisée	Épaisseur équivalente (Å)	Densité de greffage (molécules par nm ²)
Leucocine A 24	67,5 ± 3,2	2,0 ± 0,1
Leuc. aléatoire	72,6 ± 1,7	2,1 ± 0,1
Magainine 1	50,7 ± 2,3	1,5 ± 0,1
PEG800-SH	31,6 ± 0,3	3,0 ± 0,1

Tableau 3.1 – Épaisseurs équivalentes et densités surfaciques pour les surfaces de peptides ou PEG800 à 100 %. Les écarts-types sont calculés sur 3 séries de répliquats.

L'application de ce modèle aux analyses menées par V. Humblot nous a permis de remonter à des densités de greffage de l'ordre de quelques molécules par nm² (tableau 3.1). Les valeurs ainsi obtenues sont en cohérence avec d'autres exemples de la littérature pour des peptides,⁴²⁴ tout comme pour des monocouches de polymères⁴⁰⁸ ou encore des molécules d'ADN.⁴³⁴

En supposant les molécules uniformément réparties sur la surface, on obtient une formule qui permet d'estimer la distance moyenne entre elles :

$$d_{inter-molecules} = \sqrt{S_{greffage}} \quad (3.2)$$

Avec $S_{greffage}$, la surface en nm² occupée par une molécule. Les distances moyennes théoriques ainsi

calculées sont données dans le tableau 3.2.

Molécule immobilisée	Distance inter-ondes (Å)
Leucocine A 24	$7,1 \pm 0,2$
Leuc. aléatoire	$6,9 \pm 0,2$
Magainine 1	$8,1 \pm 0,2$
PEG800-SH	$5,8 \pm 0,1$

Tableau 3.2 – Distances théoriques entre les sondes en supposant une répartition uniforme.

En considérant que le diamètre moyen d'une hélice α est de 12 Å, on obtient ainsi des valeurs proches d'une couverture totale de la surface par les peptides. Cela va dans le sens d'une surface où les peptides seraient si densément greffés qu'il n'y aura que peu de place pour une structuration au contact des membranes bactériennes. Les interactions seraient donc principalement gouvernées par les propriétés macroscopiques des surfaces plutôt que *via* des interactions individuelles peptides–bactéries.

3.3.2.2 Surfaces mixtes peptides–PEG

Dans le cadre de couches mixtes, l'utilisation du modèle précédent pour des dépôts homogènes n'est plus possible. Il faut mettre en jeu les signaux d'autres électrons qu'uniquement ceux de l'or et du soufre. Un système d'équations est donc défini pour discerner la contribution aux signaux de trois composés : le peptide, le PEG800 et une pollution externe inévitable supposée majoritairement carbonée.

$$\frac{N_{tot}}{C_{tot}} = \alpha_{pep} \frac{C_{pep}}{C_{tot}} \quad (3.3)$$

$$\frac{C_{286,3}}{C_{tot}} = \gamma_{pep} \frac{C_{pep}}{C_{tot}} + \frac{C_{PEG}}{C_{tot}} \quad (3.4)$$

$$\frac{C_{pep}}{C_{tot}} + \frac{C_{PEG}}{C_{tot}} + \frac{C_{pollution}}{C_{tot}} = 1 \quad (3.5)$$

Les coefficients α_{pep} et γ_{pep} sont déterminés à partir de la composition de chaque peptide. Respectivement ils représentent le ratio d'atomes d'azote par rapport aux atomes de carbone, ainsi que le ratio d'atomes de carbone pris dans une liaison avec un atome d'oxygène ($-C-O-$), par rapport au total des atomes de carbone. En effet, les photoélectrons à 286,3 eV sont caractéristiques des carbones impliqués dans cette liaison, typique du motif éthylène glycol. L'équation 3.3 permet d'utiliser ce coefficient pour remonter à la part de peptide dans le signal du carbone obtenu. L'équation 3.4 permet elle d'utiliser le signal des photoélectrons du Carbone à 286,3 eV pour déterminer la portion due au PEG800-SH. Enfin, l'équation 3.5 vient estimer la part résiduelle du signal, due à la pollution externe, de nature non identifiée.

De façon intéressante, ce système d'analyse nous permet non seulement d'évaluer les ratios surfaciques entre peptides et PEG (tableau 3.3), mais également d'évaluer la part de pollution présente sur les surfaces à 100% (tableau 3.4). Il faut noter cependant que les parts de pollution ainsi exprimées sont estimées sans connaître leur nature exacte, on ne peut donc pas les considérer comme un pourcentage molaire de molécules carbonées polluantes. Il s'agit d'un ratio basé sur la présence relative d'atomes de carbone

Peptide immobilisé (co-dilué au PEG800-SH)	Leucocine A 24	Leuc. aléatoire	Magainine 1
Ratio peptide / PEG800-SH (%)	70,9 ± 1,8	89,2 ± 2,5	37,0 ± 0,7

Tableau 3.3 – Ratios surfaciques en pourcentage molaire pour des couches mixtes fonctionnalisées à concentration égale de PEG et peptide en solution. Les écart-s-ypes sont calculés sur 3 séries de répliquats.

n'appartenant ni aux peptides, ni aux PEG. Le ratio molaire équivalent serait donc *a priori* plus faible, cette pollution se présentant probablement sous la forme de chaînes hydrocarbonées.

Molécule immobilisée	Leucocine A 24	Leuc. aléatoire	Magainine 1	PEG800-SH
Part estimée de pollution (%)	89,6 ± 3,2	91,2 ± 0,1	91,2 ± 0,5	86,4 ± 3,2

Tableau 3.4 – Estimations des parts de pollution observées pour des couches de molécules sans co-mélange. Les écart-s-ypes sont calculés sur 3 séries.

De ces résultats transparaissent plusieurs conclusions. Tout d'abord, le rapport de concentration en solution ne se retrouve absolument pas en surface lorsque l'on met en jeu des molécules différentes (masse molaire et longueur). Cela vient renforcer les résultats déjà observés à l'aide de mesures de l'angle de contact, où les surfaces mixtes présentaient des angles différents de la moyenne des deux surfaces sans co-mélange.

De plus, l'analyse en XPS a permis de révéler qu'il existait une part importante de pollution de nos surfaces, due à la technique de fonctionnalisation choisie. En effet, l'immobilisation des molécules en surface se faisant à l'air libre, de nombreuses molécules carbonées peuvent venir se déposer sur nos surfaces.

Pour la suite, nous conserverons donc uniquement les plots non co-dilués, afin de s'assurer le contrôle de la composition de la surface. Ceci est également en cohérence avec les résultats présentés en partie 3.2.2, où nous avons vu que les surfaces mixtes présentaient généralement un saut de détection plus faible que les surfaces avec peptides non co-dilués.

3.4 Conclusions du chapitre

Les peptides nouvellement introduits au cours de cette thèse ont permis de détecter avec succès les quatre pathogènes ciblés en milieu de culture simple. La détection des bactéries a été réalisée sans observer d'activité biocide qui empêcherait la croissance de ces dernières. La voie de fonctionnalisation choisie pour les peptides, avec un espaceur composé de trois β -alanines leur permet ainsi de reconnaître les membranes bactériennes, sans pour autant les détériorer. Il y a donc probablement une perte de l'activité bactéricide des PAM, du fait de l'immobilisation ainsi obtenue, très dense en surface. L'activité de reconnaissance est elle cependant conservée, ce qui est essentiel pour la suite des travaux. Par ailleurs, les réponses obtenues, bien que présentant des affinités différentes en fonction des couples peptide/bactérie considérés, sont relativement homogènes. Identifier une bactérie en fonction de ces réponses va amener à remettre en cause l'approche classique clef-serrure, où une seule sonde reconnaît une seule cible, au profit d'une interprétation plus globale de la réponse du capteur. Ceci sera abordé au chapitre suivant, par la

mise en place d'analyses exploratoires de données.

Sur un autre pan, si la technique d'immobilisation suivie a montré de bons résultats pour la détection, elle a montré ses limites concernant le contrôle fin des états de surface. En effet, si les surfaces non co-mélangées ont donné une densité de fonctionnalisation élevée et proche des résultats auparavant observés, les surfaces mixtes se sont révélées plus complexes à mettre en œuvre. D'une part les ratios en solution ne se retrouvent pas en surface ce qui impliquerait une caractérisation fine dès qu'un nouveau type de surface est produite. D'autre part, ces ratios mixtes n'ont pas montré de façon répétable des performances améliorées par rapport aux surfaces de peptide à 100%. Cela a toutefois permis de souligner la possible existence d'un « effet seuil », d'une concentration surfacique en peptide en deçà de laquelle la détection n'est plus réalisée. Il n'a cependant pas été déterminé si ce seuil provenait d'une perte d'affinité du peptide à faible concentration surfacique ou bien d'un recouvrement des sondes par le PEG2000, dont l'immobilisation en pelote pourrait recouvrir les peptides. La mise en place d'approches faisant varier les longueurs et natures d'espaceur ainsi que d'agent co-diluant pourraie permettre d'affiner la compréhension à un niveau plus fondamental de ces mécanismes d'interaction. Il reste cependant que l'emploi des surfaces élaborées uniquement à partir des peptides permet d'obtenir la plus grande intensité d'interaction avec les pathogènes. Ceci justifie de conserver cette voie de fonctionnalisation par la suite.

Les sondes pré-électionnées, directement immobilisées sans co-mélange sur puces, sont prometteuses pour une utilisation en matrice complexe – sérum ou sang. L'introduction de ce nouveau paramètre présente le risque d'augmenter sensiblement les interférences entre la matrice et les PAM. Ces derniers, de nature cationique et amphiphile, possèdent effectivement un potentiel d'interaction très élevé avec les composants du sang – cellules et surtout protéines.⁴³⁷ Les peptides sélectionnés, aux propriétés *a priori* similaires (cationiques, amphiphiles et à hélice α) ont montré des résultats variés. Avec des séquences et notamment des compositions en acides aminés variées, il en sera donc probablement de même avec les interférences depuis le milieu sanguin.

Le passage d'un milieu simple tel que le TSB à un milieu plus complexe risque également de remettre en cause la méthodologie employée jusqu'à alors. Que ce soit au niveau de la chimie de surface, des opérations en SPRI ou encore du traitement de données, des ajustements seront probables. Le chapitre suivant sera l'objet de ces ajustements, ainsi que des performances que le jeu de peptides aura montré esen milieu complexe. Il se clora par l'évaluation de méthodes d'analyse exploratoire de données à partir des résultats ainsi obtenus.

IV

Détection de pathogènes à faible concentration en milieu complexe

4 Détection de pathogènes à faible concentration en milieu complexe . . . 111

- 4.1 Adaptation de la stratégie de détection aux milieux complexes
- 4.2 Compatibilité de la méthode « Culture-Capture-Mesure » en plasma
- 4.3 Détection de pathogènes en sang total dilué
- 4.4 Conclusions du chapitre

Chapitre 4

Détection de pathogènes à faible concentration en milieu complexe

4.1 Adaptation de la stratégie de détection aux milieux complexes

4.1.1 Le milieu sanguin : composition et fonctions

Au-delà de son rôle prépondérant dans le développement récent de tests de diagnostic rapides au chevet du patient,⁴³⁸ le sang est avant tout un liquide biologique indispensable.^{439,440} Il constitue en effet une matrice complexe réalisant un grand nombre de fonctions majeures pour l'organisme, étant ainsi un organe à part entière. Chaque individu possède en moyenne 4 à 6 litres de sang – soit 7 à 8 % de la masse totale de l'organisme. Ce volume est constitué d'une fraction cellulaire de généralement 45 %, la fraction restante étant le plasma (voir figure 4.1 pour le détail de la composition sanguine).

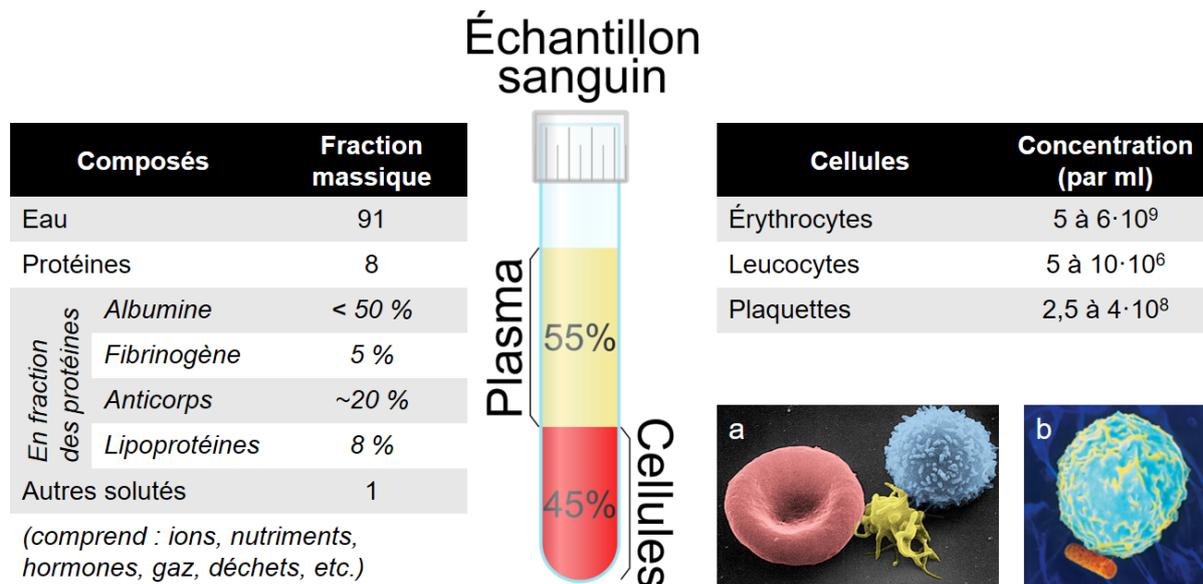


Figure 4.1 – Composition relative du sang. (a) Image tridimensionnelle d'un érythrocyte (rouge), d'une plaquette (jaune) et d'un lymphocyte-T (bleu) – source : Electron Microscopy Facility at The National Cancer Institute at Frederick (NCI-Frederick). (b) Neutrophile attaquant une bactérie de genre *Bacillus* – microscopie électronique à balayage ×8000, source : JOHNSON.⁴⁴⁰

Le rôle essentiel du sang est d'approvisionner en éléments nutritifs et gaz les autres organes, tout en servant également à l'évacuation d'une partie des métabolites produits par ces derniers. Ceci est majoritairement réalisé par le biais des érythrocytes (communément appelés globules rouges), qui fixent le dioxygène grâce à l'hémoglobine pour l'apporter aux organes. Ils évacuent également le dioxyde de carbone vers les poumons. Les autres déchets issus de l'activité cellulaire (sels, eaux, métabolites, etc.)

sont eux transférés vers le système urinaire *via* les reins ou le foie. Le sang assure en parallèle le transfert de nutriments depuis le système digestif. Enfin, il est aussi vecteur d'informations entre cellules, en permettant la circulation d'hormones.

Toutefois, le sang ne constitue pas seulement un organe transporteur, mais il est également une partie essentielle du système immunitaire. La présence à la fois des leucocytes et des immunoglobulines (anticorps et autres protéines du complément ou de l'histocompatibilité) vient assurer la reconnaissance du soi et la défense des organismes contre les pathogènes exogènes. Les leucocytes (ou globules blancs) sont produits à partir des cellules souches, tout comme les érythrocytes. Cependant, contrairement à ces derniers, ils possèdent un noyau cellulaire et se déclinent avec une plus grande diversité, en fonction de leur rôle précis dans le système immunitaire. Les trois grandes classes que l'on peut distinguer sont les monocytes, les lymphocytes et les granulocytes. Concernant les modes d'action de ces cellules, on peut simplifier ceux-ci à deux grands mécanismes. D'une part, certains leucocytes peuvent phagocyter des corps étrangers solides pour les éliminer de l'organisme : c'est le cas notamment des neutrophiles (les plus fréquents des leucocytes), des éosinophiles et des macrophages. D'autre part, les leucocytes participent également à l'immunité en émettant plusieurs classes de composés jouant des rôles importants dans les mécanismes d'allergies (éosinophiles), d'inflammation (l'histamine, libérée par les basophiles) ou encore de production des anticorps (lymphocytes qui comptent pour environ 30 % des leucocytes). Les anticorps sont une part importante des protéines retrouvées dans le plasma, de même que l'albumine, composant majoritaire avec 39 à 50 $g.L^{-1}$ et le fibrinogène, une protéine notamment impliquée dans la coagulation. Dans ce dernier mécanisme sont également impliquées les plaquettes (ou thrombocytes), petites cellules de 2 à 4 μm de diamètre. La coagulation rapide est vitale pour à la fois limiter l'entrée dans l'organisme de pathogènes exogènes, mais également pour contenir le sang au sein des vaisseaux sanguins et éviter les hémorragies. À noter enfin, bien que présentes en quantité moindre, les protéines du complément jouent un rôle important dans la réponse immune, modulant les réactions inflammatoires et pouvant éliminer directement les pathogènes par lyse.

Pour finir, en plus de ces rôles de transport et de défense immunitaire, le sang est également un acteur majeur du maintien de l'homéostasie. Il sert à la fois de régulateur pour la température, le maintien d'un pH constant autour de 7,4 ou encore l'apport des solutés nécessaires aux réactions à l'œuvre dans l'organisme.

L'ensemble de ces caractéristiques fait du sang un milieu complexe par excellence. Que ce soit sa nature intrinsèquement antibiotique, sa composition très variée ou sa tendance à coaguler, cette complexité va impliquer nombre de contraintes lors de l'analyse d'échantillons sanguins. Notamment l'activité du système immunitaire sera à contourner pour pouvoir faire du sang un milieu propice à la croissance et donc à la détection de pathogènes bactériens.

4.1.2 Procédés de préparation et de culture des échantillons sanguins

Comme introduit en partie 1.2.1, une hémoculture en milieu clinique se déroule généralement sur plusieurs prélèvements en parallèle.¹⁰⁹ Ceci est réalisé afin de cultiver les pathogènes à la fois en conditions anaérobies et aérobies. En effet, certaines bactéries, comme les *Clostridium* ou les *Bacteroides* par exemple, sont anaérobies strictes et nécessitent ces conditions de culture pour être détectées. Par ailleurs, d'autres

souches, anaérobies facultatives telles que *S. aureus* ou *E. coli*, ne sont parfois détectées que par les cultures anaérobies.⁴⁴¹ Il reste cependant que 86 % des cas de bactériémie détectés ont pu l'être par culture aérobie.⁴⁴¹ Pour ces raisons, les études menées dans le cadre de cette thèse l'ont toutes été en conditions aérobies, les pathogènes ciblés étant adaptés à ces paramètres. Il faut cependant souligner que dans le cadre d'une application clinique stricte, d'autres conditions de culture – anaérobies notamment – devraient être développées.

4.1.2.1 Importance de l'anticoagulant dans les milieux d'hémoculture

L'analyse d'échantillons sanguins nécessite d'ajouter au milieu d'hémoculture des composants pour neutraliser d'une part la coagulation et d'autre part l'activité biocide naturelle du sang. En effet, tel qu'on l'a vu (4.1.1), le sang est partie prenante du système immunitaire et il est donc nécessaire d'inhiber ces propriétés pour éviter de dégrader les pathogènes présents dans l'hémoculture.⁴⁴² Par ailleurs, les patients sur lesquels sont prélevés les échantillons sanguins sont souvent déjà soumis à une antibiothérapie. L'ajout de charbon actif ou de résines est donc courant pour neutraliser les antibiotiques en circulation et le système immunitaire.¹⁰⁷ C'est le cas du milieu commercial modèle choisi, les bouteilles BACTEC Plus Aerobic/F de Becton Dickinson (voir figure 4.2.a). Celles-ci, dont la composition est précisée dans le tableau 4.1, contiennent à la fois des résines adsorbantes visant à neutraliser les antibiotiques et également des résines échangeuses de cations. L'ajout de ces dernières permet de capturer et réduire l'activité des antibiotiques par piégeage ionique ou hydrophobe.^{443,444} Par ailleurs, il s'avère également plus performant d'utiliser ces résines plutôt qu'une dilution au dixième, tel que pratiqué dans le système VersaTREK (de Thermo Fisher Scientific) par exemple.⁴⁴⁵ Le prélèvement clinique pour un adulte dans les flacons BACTEC est donc réalisé avec 10 ml de sang pour 30 ml de milieu pour chaque bouteille. Comme évoqué en introduction (partie 1.2.1.1), un volume seuil est nécessaire pour assurer les chances de réussite du diagnostic. Les 40 à 60 millilitres de prélèvement recommandé sont donc répartis dans 4 à 6 flacons différents. Ce ratio de 10 pour 30 ml est conservé dans les commandes d'échantillons sanguins passées auprès de l'Établissement Français du Sang de Grenoble.

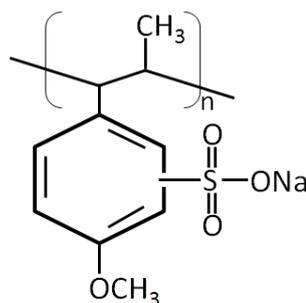
TSB (ou bouillon digéré de soja-caséine)		BD BACTEC Plus Aerobic/F	
Ingrédients	$g.L^{-1}$	Ingrédients	% (w/v)
Digestion pancréatique de caséine	17,0	TSB	3,0
Peptone de soja	3	Extrait de levure	0,25
Glucose	2,5	Acides aminés	0,05
Chlorure de sodium	5	Polyanétholsulfonate de sodium (SPS)	0,05
Hydrogénophosphate de dipotassium	2,5	Vitamines	0,025
		Antioxydants/réducteurs	0,005
		Résine adsorbante non ionique	13,4
		Résine échangeuse de cations	0,9

pH final à 25°C identique : $7,3 \pm 0,2$

Tableau 4.1 – Compositions des deux principaux milieux de culture utilisés : le TSB pour les études préliminaires et le milieu d'hémoculture aérobie BACTEC, qui sert à la dilution du sang.

Au-delà de la neutralisation de ces effets antibiotiques, deux autres propriétés essentielles du sang déjà évoquées sont à prendre en compte : la coagulation et l'équilibre physiologique de l'échantillon. Concernant la coagulation, celle-ci peut être très rapidement néfaste si elle advient après prélèvement de l'échantillon. En effet, les caillots alors formés pourraient par exemple emprisonner les bactéries contaminant l'échantillon ou bien recouvrir les sondes. Ainsi, la présence d'un agent anticoagulant dans le milieu d'hémoculture est nécessaire.

L'anticoagulant en usage dans les bouteilles BACTEC est le polyanétholsulfonate de sodium (SPS) (voir figure 4.2.b). Il s'agit d'un des plus courants⁵⁰ et du seul autorisé aux USA.⁴⁴⁶ Au-delà de l'effet anticoagulant, le SPS présente l'intérêt d'accélérer le diagnostic sur certains pathogènes.⁴⁴⁷ Cependant, il peut aussi avoir des effets inhibiteurs sur la croissance de certaines espèces, comme *Neisseria meningitidis*. Toutefois ces pathogènes sont rares et il n'existe pas à l'heure actuelle d'autre anticoagulant aux performances similaires à celles du SPS. L'utilisation de ce dernier est donc préférable grâce aux principaux avantages qu'il amène.



(a) Flacon d'hémoculture BACTEC aérobie. (b) Formule chimique du polyanétholsulfonate de sodium (SPS).

Figure 4.2 – (a) Flacon d'hémoculture présentant les résines adsorbantes et échangeuses de cations au fond. (b) Représentation du SPS, anticoagulant présent dans le milieu BACTEC.

Brièvement, l'action du SPS passe par un mécanisme similaire à celui de l'héparine un autre anticoagulant polyanionique. Il agit en inhibant l'activité de l'antithrombine III qui vient en temps normal elle-même inhiber la cascade de coagulation.⁴⁴⁸ L'action du SPS induirait également une précipitation du fibrinogène, précurseur de la fibrine, la protéine filamenteuse formant les caillots sanguins.⁴⁴⁹

Au-delà de l'inhibition de la coagulation, le SPS présente de même des effets d'inhibition de l'activité immunitaire du sang. Une partie des immunoglobulines sont ainsi précipitées en présence du SPS,⁴⁴⁹ de même la croissance des pathogènes se retrouve favorisée.^{450,451} Enfin, concernant l'inhibition, il a été démontré que les effets néfastes observés sur *N. meningitidis* sont réduits sur certaines souches lorsqu'il est présent à 0,05 %, ⁴⁵² tout en conservant une activité inhibitrice de la coagulation et de l'activité bactéricide du milieu sanguin.

Par ailleurs le SPS peut également inhiber l'activité d'antibiotiques, comme les aminosides par exemple.⁴⁵³ Ces effets inhibiteurs passent par l'interaction du SPS polyanionique avec les amines primaires de cette classe d'antibiotiques. De tels effets risquent donc fortement de se produire en interaction avec les PAM cationiques immobilisés en surface, augmentant donc le signal non-spécifique sur ces plots. Cela s'ajoutera donc aux contributions des autres molécules et cellules négativement chargées déjà présentes

dans le sang. Le risque est alors la formation de plusieurs couches successives d'électrolytes, tour à tour cationiques ou anioniques.

4.1.2.2 Adaptation de la méthodologie aux besoins de la détection SPRI

Comme on le voit par sa composition (tableau 4.1), le milieu BACTEC n'est que peu tamponné. En effet, c'est en partie cela qui permet de détecter la présence de bactéries par l'acidification du milieu, suite à la production de CO_2 par la respiration. Ce phénomène n'est cependant pas favorable aux biopuces car le changement de pH du milieu peut entraîner une déstructuration des sondes en surface. Au cours des travaux de thèse de Vincent Templier, il avait été démontré l'intérêt de surtamponner le milieu de suivi.²²⁴ Cela permet d'une part de grandement diminuer les interférences entre milieu d'hémoculture et anticorps immobilisés sur biopuces (objet de la thèse de V. Templier). D'un autre côté cela maintient aussi le milieu d'hémoculture à un pH proche de celui physiologique pour une durée plus longue, permettant de mieux conserver la structure des anticorps.

Dans le cadre des études sur les PAM, il était donc nécessaire d'évaluer l'intérêt de conserver ce surtampon pour la détection.

Cela a été fait en première intention sur deux prismes préparés similairement, avec des peptides à 100 μM . Les temps de culture des bactéries étaient identiques, soit 18 heures, dans les mêmes conditions d'incubation (25°C et 200 tours.min⁻¹), et elles ont été injectées à une dilution forte (10^{-8} de la préculture). Lorsqu'il est surtamponné, le milieu est constitué de concentrations effectives de 50 mM en Na_2HPO_4 et 22 mM en KH_2PO_4 . Pour l'expérience contrôle sans tampon supplémentaire, de l'eau distillée a été ajoutée à 10 % (v/v). Les données obtenues (figure 4.3), prises sur le peptide qui a répondu en premier dans les deux cas, montrent que la présence de tampon supplémentaire amène une détection bien plus précoce.

La présence de surtampon permet de détecter le pathogène dès 22 heures de suivi contre 33 heures en milieu BACTEC non modifié. La différence de concentration bactérienne entre les deux suivis, avec une valeur deux fois plus faible pour celui sans surtampon, n'est pas suffisante pour expliquer la différence dans le délai de détection. En effet, si les bactéries présentaient exactement le même comportement, ce facteur 2 entraînerait une différence de seulement un temps de doublement, soit environ 40 minutes pour SARM en sang. Ce retard peut donc soit venir d'une conformation plus favorable des sondes lorsque le milieu n'est pas soumis à l'acidification, soit, de façon fort probable, le maintien du pH proche de 7 permet aux bactéries de croître de façon plus favorable.

L'intérêt d'ajouter des sels pour surtamponner le milieu est donc manifeste. La méthodologie proposée par Vincent Templier sera donc conservée, avec l'ajout systématique à 10 % (v/v) dans le milieu d'hémoculture d'une solution 10x de sels Na_2HPO_4 et KH_2PO_4 à pH 7, pour des concentrations finales de respectivement 50 mM et 22 mM.

Ainsi, les conditions de culture pour la suite sont fixées telles que suit : le sang est récupéré auprès de l'Établissement Français du Sang (EFS), qui réalise directement le prélèvement de 10 ml dans les flacons BACTEC contenant 30 ml de milieu BACTEC. Cet échantillon n'est délivré qu'après deux jours d'analyses pour s'assurer de son innocuité. La solution de tampon 10x est alors ajoutée à 10 % (v/v) à ce mélange 25 % sang total, 75 % BACTEC. 1900 μl de cette préparation sont alors utilisées pour un suivi,

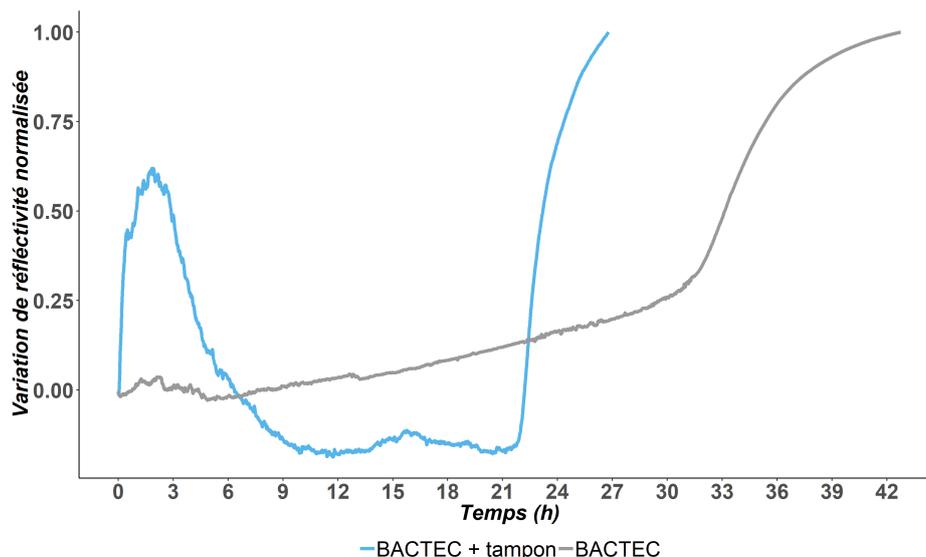


Figure 4.3 – Comparaison de deux cinétiques de croissance en sang total pour *S. aureus* résistant à la méthicilline, avec ou sans ajout de tampon au milieu BACTEC. Les inocula initiaux étaient respectivement de $1,6 \pm 0,2 \text{ UFC.ml}^{-1}$ pour le suivi avec tampon (bleu) et $0,8 \pm 0,2 \text{ UFC.ml}^{-1}$ pour celui sans tampon (gris). Les valeurs sont prises pour PàCHA immobilisé par le C-ter qui a répondu dans chaque cas avec l'amplitude la plus élevée, en normalisant à la valeur finale. L'acquisition des données pour le suivi avec tampon a été stoppée après 25h de suivi.

auxquels seront ajoutés 100 μl de suspension bactérienne en milieu salin.

Il faut enfin préciser que ces paramètres qui seront utilisés pour la suite ne sont bien sûr pas totalement représentatifs des conditions de culture idéales en laboratoire d'analyse. En effet, le système ne présente pas d'agitation et seules les conditions de culture aérobies sont mises en œuvre. Toutefois, cela reste satisfaisant dans un but de preuve de faisabilité de la détection de pathogènes en milieu sanguin.

4.1.3 Détection SPRI en milieu sanguin : la question de la passivation du biocapteur

4.1.3.1 La passivation en milieu complexe

La réalisation en première intention de suivis de croissance bactérienne en milieu sanguin a mis en avant plusieurs limites du système. En premier lieu, les courbes plasmons, utilisées pour la détermination de l'angle de travail avant un suivi, sont moins définies que sur une biopuce à anticorps (figure 4.4). En effet, pour un même peptide elles sont beaucoup plus dispersées dans le sang que dans le milieu BACTEC par exemple. Choisir un seul angle implique alors de devoir travailler avec des sensibilités très différentes d'un plot à l'autre. De plus, la forme des courbes pour certains peptides (dont celui représenté) est très loin de celle qui était jusqu'ici obtenue en milieu de culture simple. En effet, l'amplitude entre le minimum et le maximum de réflectivité est réduite, passant d'environ 60 à 70 % à moins de 30%. De plus, la largeur de la zone linéaire augmente, ce qui implique une sensibilité ($\Delta R/\theta$) inférieure lorsque le suivi est réalisé à angle fixe. Le peptide étudié en figure 4.4 représente les allures typiques de ces courbes plasmons. On peut aussi voir sur cette figure qu'un long temps d'incubation en sang, correspondant par exemple à hémoculture prolongée (24 heures), entraîne un élargissement supplémentaire des courbes plasmons, en plus d'un décalage de la résonance de plus de 1° par rapport au début de l'incubation.

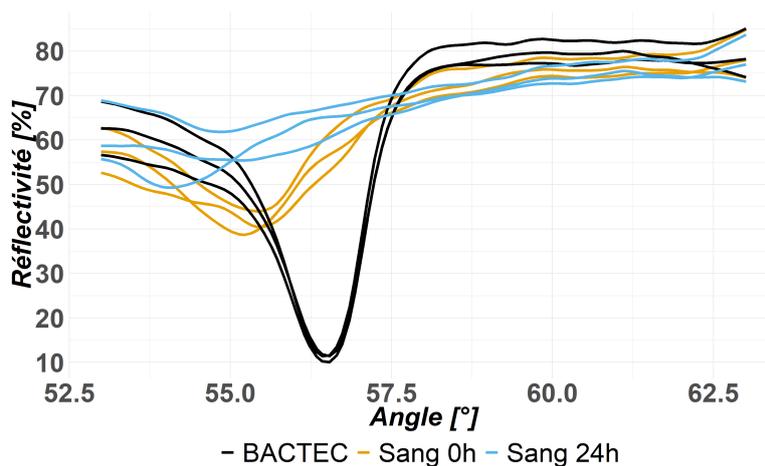


Figure 4.4 – Comparaison des courbes plasmons entre le milieu BACTEC seul (noir) et le sang dilué au milieu d'hémoculture – en début (orange) et en fin de suivi (bleu) – le tout en l'absence de contamination, pour une puce bloquée au PEG2000 thiolé. Pour la simplicité de lecture, un seul peptide – PàCHA N-ter – est présenté à titre d'exemple. Les données proviennent du même prisme, avec un simple changement du contenu de la cuve pour passer de BACTEC seul au sang dilué au milieu d'hémoculture.

De tels types de courbes plasmons entraînent donc une perte de sensibilité des mesures SPR par rapport aux suivis dans un milieu simple tel que le TSB ou le milieu BACTEC (figure 4.4).

Le signal observé sur le fond de puce, bien que non pris en compte dans le cadre des interprétations des suivis est aussi problématique. En effet, comme on le voit sur une image différentielle (figure 4.5), la zone entre les plots présente une variation de signal SPR durant la mesure. Comme précisé auparavant, la surface de la biopuce est située sur une des parois de la cuve, afin d'éviter la sédimentation non spécifique des bactéries. Le bas de la puce, soit le fond de la cuve, comporte un signal positif (rouge), correspondant à l'accumulation de cellules sanguines en surface du capteur. Cette accumulation provient de la sédimentation de ces cellules, qui devient visible en SPRI après quelques heures de suivi (un tel dégradé n'apparaît pas en suivi en plasma). C'est pour cette raison que le haut de la surface du capteur présente au contraire un signal négatif (bleu). Si ce phénomène de décantation n'est pas néfaste pour le suivi, il faut toutefois souligner qu'il met en évidence la nature antiadhésive du PEG2000 thiolé utilisé jusqu'ici. Cela entraîne de fortes dérives négatives sur le signal de la zone inter plots, qui empêche donc de la considérer comme une zone de référence pour les données SPR. Par ailleurs, cela montre aussi que l'absence d'agitation implique que la détection se déroule en fin de suivi e, l'absence de cellules sanguines, c'est-à-dire dans un milieu plus proche en composition du plasma que du sang.

Un changement de la nature du passivant, pourrait entraîner une diminution de ces interactions non spécifiques. Si les plots de peptides sont effectivement fonctionnalisés avant le blocage de fond de puce avec le PEG, ce dernier peut toutefois s'immiscer au sein des plots de peptides. En effet, des lacunes peuvent être présentes à la surface des plots, permettant l'insertion de l'agent passivant lors du blocage de la surface par le PEG thiolé, qui a lieu après dépôt des peptides. Pour cette raison, des molécules passivantes de substitution seront évaluées. L'objectif sera d'une part d'obtenir des courbes plasmons satisfaisantes, se rapprochant de celles obtenues auparavant en milieu simple. D'autre part, il s'agira de réduire la dérive du signal SPR en présence de sang.

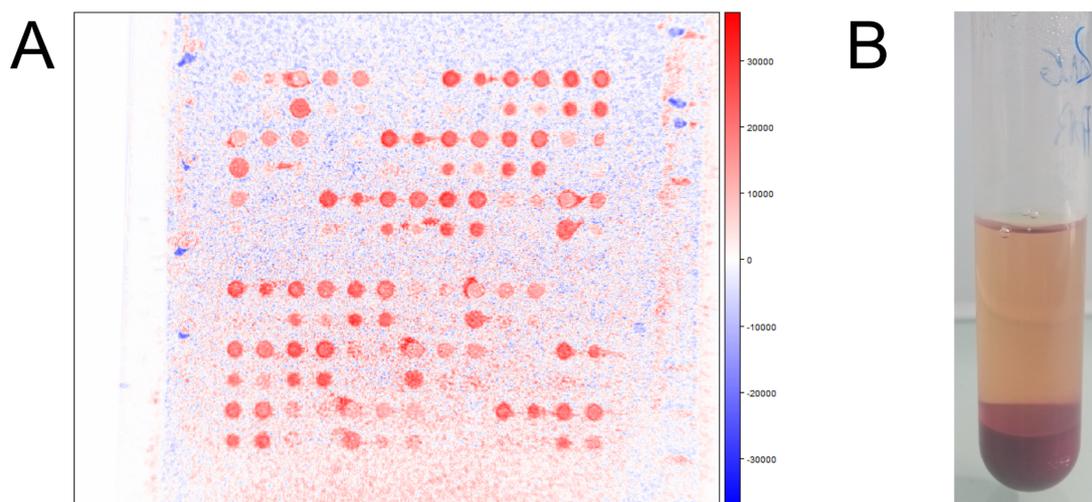


Figure 4.5 – Influence de la décantation du sang sur le signal de fond de puce lors d'un suivi stérile. A – Image différentielle après 25 heures d'exposition au sang en milieu d'hémoculture pour un prisme bloqué au PEG2000 thiolé. La variation différentielle est obtenue à partir des niveaux de gris de l'image SPRI directe entre le début et la fin du suivi. Le haut de l'image correspond au haut de cuve. B – Tube de sang en milieu d'hémoculture après 25 heures sans agitation. La décantation des cellules sanguines est clairement observée.

4.1.3.2 Étude de solutions alternatives au PEG2000

L'évaluation des performances d'alternatives se fera en exposant différentes puces avec des blocages différents face au milieu sanguin. Les courbes plasmons, qui permettent d'évaluer l'état de l'intégralité de la puce, seront mesurées en début et en fin de suivi. Cela permettra d'évaluer le décalage de l'angle de résonance et de s'affranchir des problèmes de saturation de signal parfois observée en suivi cinétique. Le tableau 4.2 présente les molécules qui seront testées en alternative au PEG2000 thiolé. D'une part sont les molécules thiolées sont immobilisées de façon contrôlée en formant des monocouches auto-assemblées après le dépôt des peptides. La BSA, dont l'adsorption est non spécifique, est la seule de ces alternatives qui nécessite une fonctionnalisation de dernière minute, directement au sein de l'imageur SPR, pour éviter un éventuel séchage de celle-ci.

Elle a été néanmoins incluse ici car elle reste une protéine très largement utilisée dans les tests immunologiques.

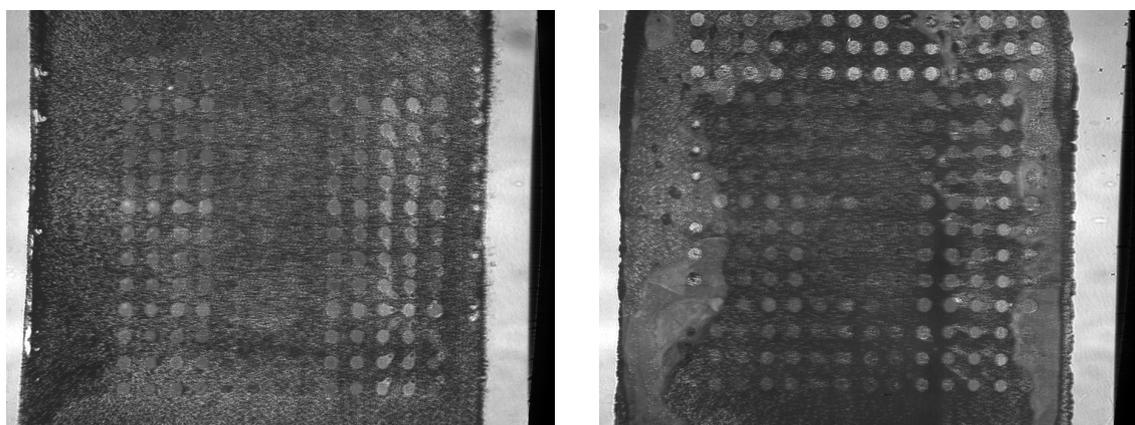
Les peptides sont déposés tel que décrit précédemment, à 100 μM à l'aide de l'automate, avant incubation pour 18 heures. Concernant le blocage, celui-ci est toujours effectué à 2 mM de molécules thiolées dans l'eau ultra-pure pour 3 heures. La BSA, elle, sera déposée à l'aide d'une solution à 1 % en PBS, pour 20 minutes, directement dans la SPRI.

Concernant la BSA, sans considérer les performances pour limiter le décalage de résonance, un premier souci apparaît : l'inhomogénéité du blocage de fond de puce (voir figure 4.6). Les côtés de la surface présentent une réflectivité plus élevée que le centre, ce qui signifie qu'il y a eu un dépôt de BSA préférentiel dans ces zones. Cela souligne la nature hasardeuse du blocage par adsorption non spécifique, d'autant plus qu'un tel procédé *in situ* est plus complexe à envisager dans le cadre d'une application à grande échelle. En effet, dans ce cadre-là il faudrait soit conditionner en milieu liquide salin les puces

Nom	Formule	Poids (Da)
PEG2000 thiolé ($n \approx 43$)		2000 (moyenne)
PEG800 thiolé ($n \approx 16$)		800 (moyenne)
O-(2-Mercaptoéthyl)-O'-méthyl-hexa(éthylène glycol) (PEG350)		356,48
(11-Mercaptoundécyl)hexa(éthylène glycol) (PEG-OH)		468,69
Albumine bovine sérique (BSA)	–	66430

Tableau 4.2 – Molécules testées en alternative au PEG2000 thiolé en tant que passivant de fond de puce pour les expériences en milieu sanguin.

bloquées au préalable, soit laisser la charge à l'opérateur de réaliser ce blocage extemporanément. Au-delà des performances qui seront obtenues sur le décalage de l'angle de résonance, cela écarte *a priori* le blocage BSA. Les 4 autres blocages testés ne présentaient pas de telles inhomogénéités.



(a) Fond de puce au PEG2000 thiolé.

(b) Fond de puce BSA.

Figure 4.6 – Images directes obtenues dans l'imageur SPR pour différents prismes, à l'angle de travail. (a) PEG2000 : prisme au blocage homogène. (b) BSA : inhomogénéités présentes sur le fond de puce. Le contraste des deux images a été corrigé de façon identique pour une meilleure lecture.

Les résultats des suivis de dérive du signal SPR, obtenus après 24 heures d'incubation dans le sang en milieu BACTEC surtamponné sont présentés en tableau 4.3. Les valeurs sont sous la forme d'une mesure du décalage d'angle de résonance des plots de peptides. La mesure de cette différence d'angle de résonance permet d'évaluer l'amplitude de la dérive en s'affranchissant d'une éventuelle saturation des plots qui pourrait arriver lors d'un suivi cinétique à angle fixe. Dans la graduation de référence choisie, une variation négative de l'angle implique alors une addition de matière en surface. Enfin, à titre indicatif, la fenêtre de linéarité sur les courbes plasmons est généralement d'une largeur comprise entre 0,75 et

1°. L'angle de travail est habituellement choisi dans la partie basse de cette fenêtre, mais jamais à un extrême, afin d'avoir la plus grande plage de linéarité possible tout en conservant la possibilité d'observer des dérives négatives.

Blocage	PEG2000	PEG800	PEG350	PEG-OH	BSA
Décalage de résonance (°)	$-0,45 \pm 0,34$	$-0,17 \pm 0,05$	$-0,78 \pm 0,45$	$-0,77 \pm 0,61$	$-0,28 \pm 0,14$

Tableau 4.3 – Valeurs moyennes de décalage de l'angle de résonance en fonction du blocage pour des plots de peptides déposés à 100 µM sans co-diluants. Le décalage est mesuré après 24 heures d'exposition au sang en milieu d'hémoculture surtamponné. Les prismes sont verticaux pour éviter la sédimentation sur la surface. Il y a pour chaque peptide 3 réplicats et 13 peptides différents, soit 39 réponses pour chaque mesure.

Les résultats sont favorables pour le PEG800 thiolé, qui présente à la fois le décalage moyen le plus faible et avec le moins de variance. Les deux PEG courts (PEG350 et PEG-OH), quelle que soit leur terminaison, présentent des résultats plus intéressants que ceux du PEG2000 thiolé, avec un décalage d'angle moins élevé. Ceci avait déjà été reporté auparavant.⁴⁵⁴ Enfin, les résultats de la BSA sont dans un entre-deux entre ceux du PEG2000 et du PEG800. La longueur de chaîne optimale est donc celle du PEG800, intermédiaire entre les PEG courts et le PEG2000. Ces données sont confortées par d'autres résultats décrits dans la littérature.⁴⁵⁵ Une longue chaîne PEG entraîne effectivement une structure en pelote, parfois inadéquate pour réduire l'adsorption des protéines. Ici, dans le cadre du recouvrement de surfaces déjà occupées en partie par des peptides, les PEG courts ne sont probablement pas assez longs pour réduire l'adsorption. C'est donc le PEG800, qui permet de créer les surfaces les plus denses, *a priori* en brosse, ce qui réduit l'adhésion. La nature flexible du PEG devrait toujours permettre aux PAM d'interagir avec les bactéries.

La minimisation du décalage de l'angle de résonance n'est cependant pas suffisante, il faut également vérifier qu'elle s'accompagne de courbes plasmon dont l'allure est satisfaisante. C'est-à-dire avec une amplitude d'au moins 50 % et une zone linéaire de moins d'1°. C'est effectivement le cas, comme en témoigne la figure 4.7.

Cette étude simple de l'impact de la passivation de fond de puce sur la dérive observée en SPRI nous mène donc à conclure que l'utilisation du PEG800 thiolé est à conserver pour la suite, en lieu et place du PEG2000 thiolé, utilisé jusqu'ici.

4.2 Compatibilité de la méthode « Culture-Capture-Mesure » en milieu complexe : application au plasma

Avant de procéder à la détection des pathogènes en sang total, il est intéressant de passer par une étape d'évaluation des performances du système en plasma. D'une part, cela permettra de s'assurer que la détection est effectivement faisable dans un milieu plus complexe en composition que le TSB. D'autre part, cela confirmera également que le changement de molécule pour bloquer le fond de puce n'entrave pas les capacités de détection. Enfin, on obtiendra ainsi une référence utile par la suite pour estimer l'influence de

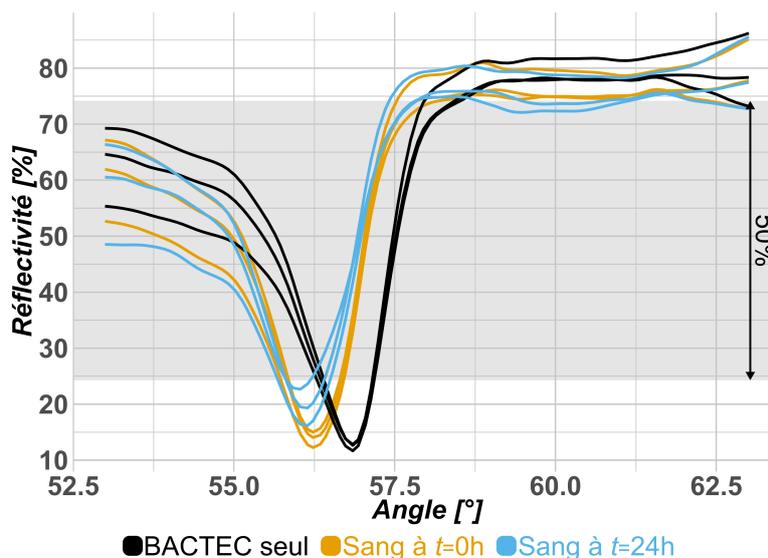


Figure 4.7 – Amélioration des courbes plasmons par le blocage au PEG800 thiolé. Comparaison des courbes plasmons entre le milieu BACTEC seul (noir) et le sang dilué au milieu d’hémoculture – en début (orange) et en fin de suivi (bleu) – le tout en l’absence de contamination. Pour comparaison avec la figure 4.4 on représente à nouveau PàCHA N-ter. Les données ont été acquises de la même façon que précédemment.

la présence des cellules sanguines dans les interférences. Négativement chargées, ces cellules risqueront en effet de susciter des interactions électrostatiques fortes avec les PAM cationiques du capteur.

En centrifugeant le milieu sanguin non coagulé, les composants du sang les plus denses (érythrocytes, leucocytes, plaquettes et une fraction des protéines de masse élevée) seront culottés. La récupération du surnageant fournit donc le plasma qui sera le milieu d’analyse pour cette partie. Le détail du protocole de préparation est décrit en annexe 6.1.6.

À noter que l’intérêt n’est pas ici d’évaluer le potentiel d’identification des bactéries, mais uniquement celui de détecter la présence d’un pathogène. Pour cette raison, seuls deux pathogènes seront ciblés : *S. aureus* résistant à la méticilline et *E. coli* O157:H7. Ces deux bactéries sont d’une part les plus virulentes des quatre ciblées dans cette thèse. D’autre part, elles représentent les deux colorations de Gram, ce qui permet à cette confirmation d’être pertinente par rapport à une détection à large spectre.

4.2.1 Détection de *S. aureus* résistant à la méticilline et *E. coli* O157:H7

Concernant le panel de peptides, les puces mises en œuvre dans cette partie seront similaires à celles qui ont permis la détection en milieu de culture simple. Les peptides sont donc déposés en réseaux de triplicats à 100 μM , incubés pour 18 heures. Puis les prismes sont rincés et lavés avant blocage du fond avec le PEG thiolé à 2 mM en eau ultra-pure pour 3 heures. La seule nuance par rapport aux expériences présentées dans le chapitre précédent vient donc de l’introduction du PEG800 au lieu du PEG2000. L’expérience de détection en tant que telle est aussi réalisée de façon comparable, soit en utilisant 1900 μl de milieu et 100 μl d’une suspension bactérienne diluée en tampon salin. Les concentrations sont à nouveau obtenues à partir de comptages issus des étalements réalisés en début de suivi, sur la dilution utilisée ou bien sur une pré-dilution plus concentrée. Les pré-cultures bactériennes sont réalisées sur la nuit

avant le suivi, comme précédemment. Garder ces conditions similaires permet d'assurer une comparaison des performances en fonction du milieu. Enfin, un suivi avec une injection contrôle – sans bactéries – est réalisée à titre de référence.

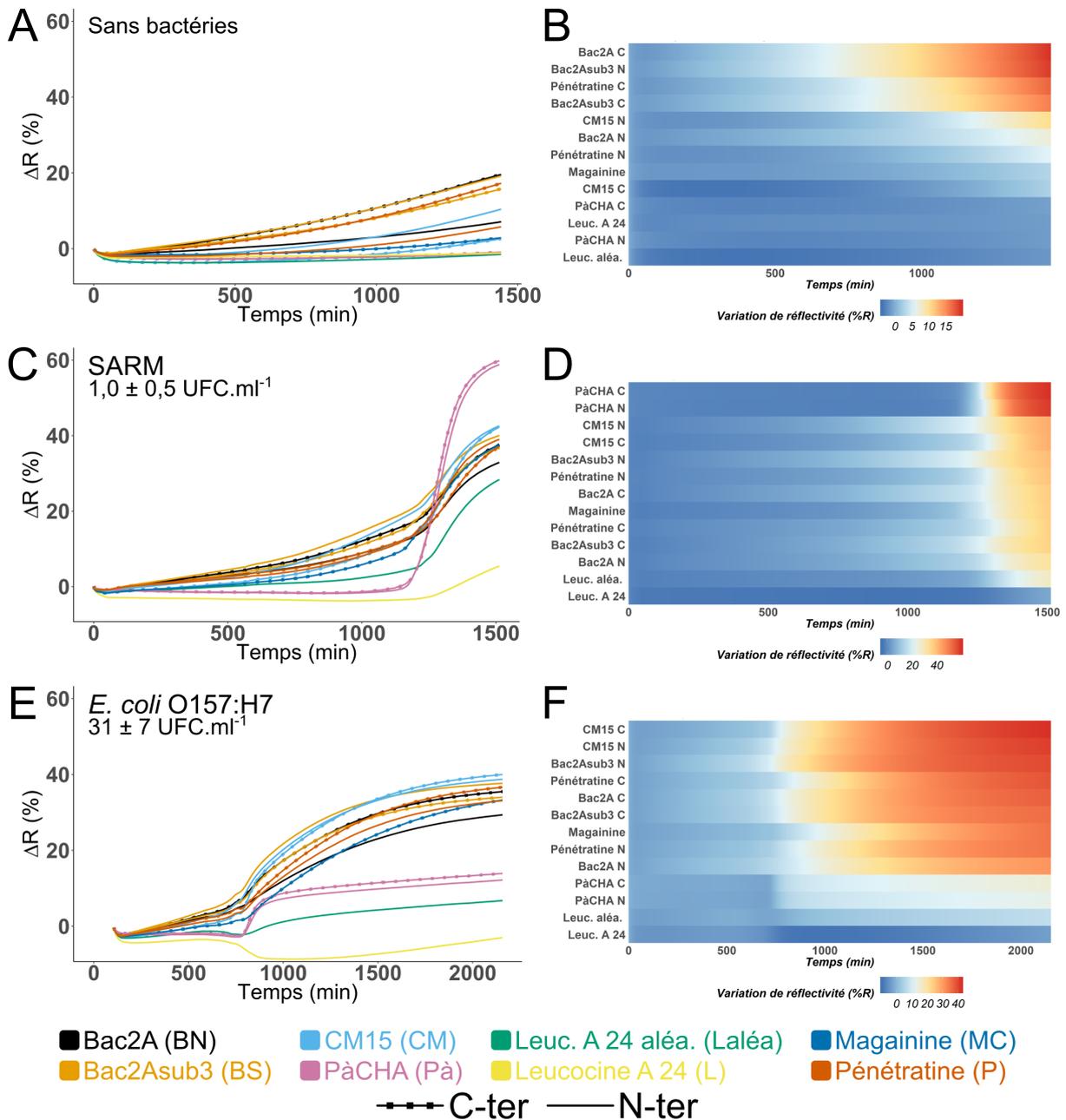


Figure 4.8 – Suivis cinétiques en plasma pour *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM – C et D) et *E. coli* O157:H7 (E et F), ainsi qu'un contrôle stérile avec injection blanche (A et B). Les données sont représentées à partir des moyennes sur 3 duplicats. Les plots de peptides sont fonctionnalisés à 100 μM, en l'absence de co-diluant. L'inoculum est réalisé juste avant de lancer les suivis. Pour les représentations cinétiques linéaires (A, C et E), l'échelle des ordonnées est identique à des fins de comparaison. Pour les représentations en tuiles nuancées (B, D et F), l'échelle est propre à chaque graphe et les couches sont triées par valeur finale de réflectivité (décroissante de haut en bas). Chaque expérience est réalisée à partir d'un échantillon sanguin différent, afin de garantir la fraîcheur de la préparation du plasma.

Les résultats de ces expériences, présentés en figure 4.8, viennent confirmer la possibilité de détection.

Le changement de milieu de culture pour le plasma introduit d'ores et déjà des nuances notables. Premièrement apparaît une dérive initiale importante sur le signal. Celle-ci, évidente sur le suivi stérile (figure 4.8.a/b), varie toutefois d'un peptide à l'autre. Ainsi, si les leucocines ou les PàCHA présentent une dérive quasi nulle après 24 heures de suivi, à l'opposé des peptides tels que les bacténécines qui présentent près de 20 % de variation positive en réflectivité absolue. Un tel changement n'empêche cependant pas la détection, comme on peut le voir sur les deux autres suivis présentés. Cependant, ces interactions non spécifiques avec les composants plasmatiques viennent réduire l'intensité du saut de détection, en décalant l'angle de résonance. Cela confirme toutefois l'intérêt de choisir un angle de travail qui se situe au pied de la zone linéaire des courbes plasmons. Effectivement, le décalage induit par l'adsorption de protéines plasmatiques fera revenir la courbe plasmon dans la zone linéaire.

Concernant l'affinité des peptides pour les bactéries testées, on note d'ores et déjà des différences par rapport aux suivis effectués en TSB (figure 3.7). Tout d'abord, la leucocine A24, qui répondait positivement pour tous les pathogènes qui avaient été testés, donne le signal le plus faible en plasma. La version aléatoire de la leucocine présente un signal plus fort que l'originale que ce soit pour la dérive initiale ou après les sauts de détection. Cette différence en fin de suivi est particulièrement marquée lors de la détection de SARM, où la variation de la leucocine aléatoire est de près de 25 % contre seulement quelques % pour la leucocine A 24. Cela dénote une fois de plus que dans le cadre de biopuces à peptides, la conformation et la structure secondaire influent sur le comportement en tant que sonde. Une explication qui peut être avancée sur l'absence de signal de la leucocine est une saturation très rapide des plots avant même le début des suivis cinétiques. En effet, dans le déroulé d'une expérience, il est nécessaire de définir les régions d'intérêt de l'image (ROI) sur lesquelles les valeurs de réflectivité sont mesurées. La définition de ces ROI se fait après avoir capturé les images nécessaires au calcul des courbes plasmons. Ainsi se déroulent plusieurs dizaines de minutes en aveugle sur l'évolution cinétique de l'état de surface avant un suivi cinétique. La durée de ces étapes (capture des courbes, définition des ROI, calcul des courbes et paramétrage du suivi cinétique) est aussi un temps au cours duquel s'adsorbent des composés sanguins en surface. Ce sont ces derniers qui pourraient interférer dans l'interaction des peptides avec les pathogènes testés. On peut toutefois évaluer l'impact de cette dérive avant suivi en prenant la variation des niveaux de gris de l'image de la surface entre les courbes plasmons et au début du suivi. Pour la leucocine, cela donne ainsi une variation de $2,3 \pm 0,7$ % de réflectivité. Une valeur si faible ne peut à elle seule justifier l'absence d'interactions observée pour la détection des bactéries. La perte d'affinité de la leucocine A 24 vient donc plus probablement d'interactions avec des molécules interférentes présentes dans le milieu d'hémoculture ou le plasma.

Au-delà de ces considérations sur l'allure des cinétiques obtenues, on peut également extraire des temps de détection (voir tableau 4.4). Ces temps sont déterminés sur les moyennes des signaux par peptide. Le temps de détection est donc le temps pour lequel la dérivée première est maximale.

Il ressort de cela que la détection se fait plus lentement en plasma qu'en TSB. Cela peut être expliqué par la présence d'interférents en plus grand nombre, qui viennent ralentir l'établissement des bactéries en surface. Le fait que la croissance bactérienne soit moins rapide en plasma qu'en milieu de culture comme le TSB est un autre facteur d'influence possible. Cette dernière hypothèse sera testée par la suite en milieu d'hémoculture (partie 4.3.1).

Souche ciblée	Temps (min)	Peptide	Concentration initiale	Milieu
SARM	975	Leuc. A 24	$2,6 \pm 0,4$ UFC.ml ⁻¹	TSB
	1260	Bac. Nat. N-ter	$1,0 \pm 0,5$ UFC.ml ⁻¹	Plasma
<i>E. coli</i> O157:H7	541	Leuc. A 24	72 ± 12 UFC.ml ⁻¹	TSB
	730	CM15 N-ter	31 ± 7 UFC.ml ⁻¹	Plasma

Tableau 4.4 – Comparaison des temps de détection obtenus entre le plasma et le TSB. Les temps sont calculés à partir du temps auquel est obtenue la valeur maximale de dérivée première. Sont exclus les peptides ne présentant pas de saut de détection.

4.2.2 Vérification de la détection directe des cellules bactériennes par le capteur

L'utilisation du plasma comme milieu de validation intermédiaire entre le TSB et le sang est intéressante pour procéder à des contrôles supplémentaires. Le plasma est en effet chargé en protéines, qui, soumises à l'activité enzymatique de croissance des bactéries, vont se retrouver dégradées en fragments protéiques. Le développement de la population bactérienne va aussi engendrer des modifications chimiques du milieu, qui peuvent affecter les PAM (changements de pH ou de concentrations en ions). Il est donc intéressant d'utiliser le plasma comme milieu modèle pour estimer l'impact de ces modifications sur les PAM immobilisés.

Par ailleurs, cette vérification avec un milieu conditionné par la croissance bactérienne permettra également de déterminer si les sauts de détection sont dus ou non à la présence de bactéries pendant la mesure.

4.2.2.1 Interactions des PAM avec un milieu conditionné par la croissance bactérienne

Le même échantillon sanguin sera utilisé pour les deux parties de cette expérience. Avant tout, un suivi (données non présentées) est effectué en plasma sur SARM jusqu'à obtenir un saut de détection. SARM a été choisi car il fournit en plasma des sauts de détection de forte amplitude, notamment pour PàCHA. Le milieu contenu dans la cuve de l'imageur SPR est alors prélevé puis centrifugé pour éliminer les bactéries. Un autre prisme est entre temps mis en place dans l'imageur. On effectue alors d'abord un suivi de dérive avec l'échantillon de plasma non modifié par SARM. Après 390 minutes de suivi, cet échantillon est retiré pour être remplacé par celui conditionné et centrifugé. On laisse alors le suivi se poursuivre sur la nuit (figure 4.9).

Premièrement, on constate l'absence du saut de détection marqué habituellement observé jusqu'ici. Cela indique donc que ces derniers sont liés à la présence directe des bactéries dans la chambre et non à la nature complexe du plasma.

Par ailleurs, l'injection du milieu conditionné provoque un changement dans la cinétique linéaire d'adsorption, ce qui est en cohérence avec la plupart des modèles existants.⁴⁵⁶ La dérive observée s'accroît fortement avec le milieu modifié, qui contient *a priori* des protéines plus petites, suite à la dégradation par SARM. Cela reste en accord avec ce qui est décrit dans la littérature, où les protéines de dimension réduite ont un taux cinétique d'adsorption plus élevé que des plus grosses, à charge égale.⁴⁵⁷ Toutefois, tous les peptides ne présentent pas les mêmes amplitudes face à ces variations dans la pente de

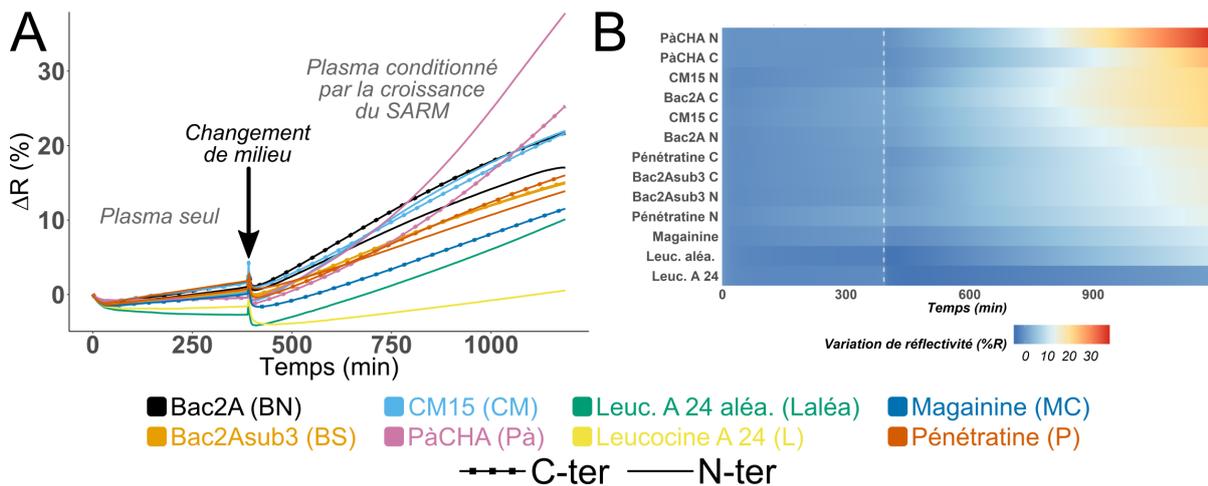


Figure 4.9 – Influence du conditionnement du plasma par la croissance de SARM. Au début du suivi le prisme est exposé à un plasma complété en l'absence de bactéries. Ce milieu a été remplacé par un plasma dans lequel SARM a été mis en culture SPR jusqu'à observation d'un plateau après le saut de détection. C'est l'échantillon centrifugé pour éliminer les bactéries qui est alors injecté à 390 minutes. A – Représentation cinétique linéaire. B – Représentation en tuiles nuancées.

la cinétique d'adsorption (voir figure 4.10).

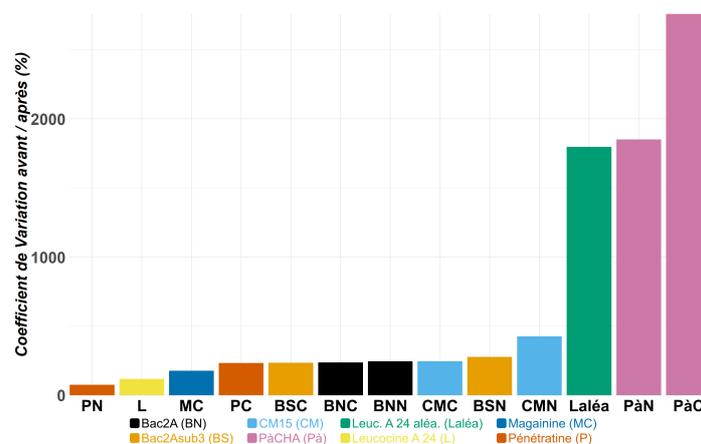


Figure 4.10 – Taux de variation entre la pente issue de la régression linéaire sur chaque courbe de la figure 4.9. Les régressions sont faites avant (de 240 à 340 min) ou après (de 440 à 540 min) le changement de milieu, réalisé à 390 min.

La leucocine aléatoire ainsi que PàCHA en C-ter et N-ter présentent des taux de variation respectifs de 1796, 1850 et 2759 %. Le reste va de 75 % (PN) à 425 % (CMN), pour une variation moyenne de 227 ± 62 %. Toutefois cette observation reste à nuancer par le fait que PàCHA et la leucocine aléatoire étaient avant le changement du plasma les peptides présentant la pente la plus faible. De plus ces deux peptides ne présentent pas de caractéristiques communes évidentes. En effet, la leucocine aléatoire n'est pas chargée et ne présente pas de structure amphiphile *a priori*. Au contraire, PàCHA est amphiphile et présente une charge positive.

Cette expérience vient d'une part souligner que le saut de détection n'est pas seulement lié à la modification du milieu par la croissance bactérienne. Toutefois, celle-ci engendre des différences dans les

cinétiques d'interactions non spécifiques avec la surface. Au cours d'un suivi de détection de bactéries en croissance, l'adsorption des protéines et la modification du milieu se font simultanément et décorréler l'une de l'autre peut être complexe. De plus, pour chaque peptide la sensibilité sur la courbe plasmon sera différente. Il est difficile d'assurer qu'une variation linéaire de signal correspond à un ajout linéaire de matière en surface. Enfin, si cet effet de variation de pente est clair en plasma, la présence de cellules sanguines dans le milieu d'hémoculture viendra augmenter encore le nombre d'événements à prendre en compte. Ainsi, bien que cette variation soit effectivement liée à la modification du milieu par la croissance bactérienne, elle n'est pas un phénomène utilisable de façon certaine pour confirmer la présence de bactéries. Elle n'est effectivement pas systématiquement présente lors d'un suivi en croissance. Il reste important de constater d'une part que la dérive initiale n'est donc pas nécessairement linéaire, en raison du changement de composition du milieu provoqué par la croissance. D'autre part, cela confirme que tous les peptides ne présentent pas la même sensibilité aux transformations du milieu.

4.2.2.2 Détermination de la concentration bactérienne seuil pour obtenir la détection en plasma

Après avoir déterminé que le saut de détection n'apparaît pas en absence de bactéries, nous allons déterminer la concentration à laquelle celui-ci advient lorsque les bactéries sont présentes. Pour ce faire, nous suivrons une dérive en plasma pour vérifier l'absence de saut, avant d'injecter 100 μl d'une suspension bactérienne à forte concentration dans les 1900 μl de plasma initial. SARM est à nouveau employé pour cette expérience (figure 4.11).

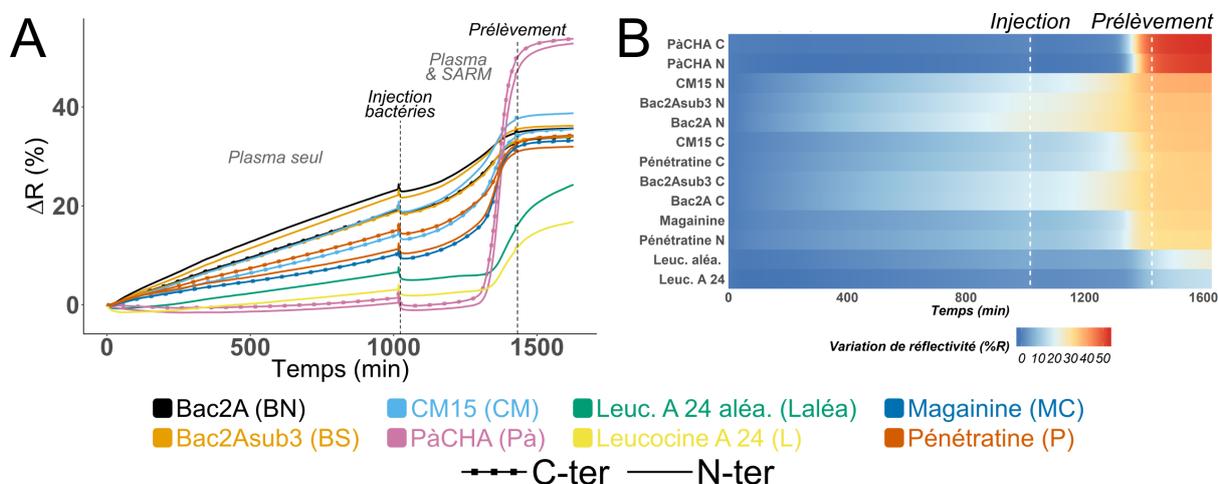


Figure 4.11 – Vérification du lien entre le saut de détection et la présence de cellules bactériennes. Le capteur est d'abord exposé à un plasma en l'absence d'inoculum, puis à 1023 minutes, 100 μl sont prélevés pour injecter une suspension de SARM pour obtenir $2,5 \cdot 10^6$ UFC. ml^{-1} dans la SPR. Un autre prélèvement est réalisé à 1432 minutes en début de plateau après le saut de détection. La concentration était alors de $2,8 \cdot 10^8$ UFC. ml^{-1} . A – Représentation cinétique linéaire. B – Représentation en tuiles nuancées.

Le résultat obtenu est conforme à ce que l'on attendait. D'une part la dérive initiale en plasma seul est linéaire et varie d'un peptide à l'autre, sans obtenir de saut. Les bactécines sont les peptides à la plus forte dérive, comme précédemment observé. PàCHA et les leucocines produisent les dérives les plus faibles (moins de 5% après 1000 minutes). L'injection de la suspension bactérienne de SARM vient diluer au vingtième le milieu, ce qui explique la légère baisse de réflectivité vue dans la cinétique d'adsorption

avant d'obtenir le saut de détection. Enfin lorsque le saut est obtenu, une partie du milieu est prélevée pour étalement et détermination de la concentration en début de plateau.

Le fait de connaître les concentrations bactériennes avant et après saut, ainsi que d'avoir accès aux temps correspondants va permettre de déduire la concentration en milieu de saut, à l'aide de la formule suivante :

$$n_{saut} = n_{inoculum} \cdot 2^{\log_2 \left(\frac{n_{plateau}}{n_{inoculum}} \right)} \cdot \frac{t_{saut} - t_{inoculum}}{t_{plateau} - t_{inoculum}} \quad (4.1)$$

L'équation 4.1 est obtenue en supposant la croissance par doublements successifs de la population bactérienne, sans délai d'adaptation au changement de milieu.

On a $n_{inoculum}$, n_{saut} et $n_{plateau}$ les concentrations bactériennes dans la SPRI respectivement à l'injection, au milieu du saut et au prélèvement en début de plateau.

Similairement, $t_{inoculum}$, t_{saut} et $t_{plateau}$ sont les temps correspondant à ces différents événements. Avec t_{saut} évalué à 1300 minutes. $t_{inoculum}$ correspond à 1023 minutes et $t_{plateau}$ à 1432 minutes.

On obtient une concentration de $6,1 \cdot 10^7$ UFC.ml⁻¹. Celle-ci est supérieure aux concentrations seuil obtenues par SPRI en méthode « culture-capture-mesure » avec des anticorps. Cette concentration seuil est en effet classiquement de 10^5 à 10^6 UFC.ml⁻¹.^{179,222} Il convient à ce stade de rappeler que l'objectif du système développé ici reste d'obtenir *in fine* la détection universelle, au contraire des concentrations initiales de référence évoquées ici qui sont obtenues avec des sondes spécifiques. La capacité de reconnaissance à large spectre passe généralement par une affinité moindre comparée à celle des sondes spécifiques, augmentant donc le temps de détection. Ce déficit d'affinité vient donc augmenter le seuil de détection par rapport aux capteurs SPR équivalents basés sur des puces à anticorps spécifiques d'un panel restreint de pathogènes.^{211,222,223}

4.2.3 Conclusions intermédiaires sur la détection en milieu complexe

Le passage du TSB au plasma a permis de mettre en lumière plusieurs aspects contraignants des milieux complexes pour la détection SPRI. D'une part, les dynamiques de croissance bactérienne ralentissent, ce qui implique des temps de détection plus longs. D'autre part, les peptides subissent des interférences de la part des composants du plasma, qui amènent une dérive positive du signal. Cette dérive reste cependant limitée, notamment grâce à l'ajustement de la méthode de blocage de fond de puce, dans laquelle le PEG2000 thiolé a été remplacé par le PEG800 thiolé.

La composition du milieu a par ailleurs son importance. On a pu voir que celle-ci pouvait être modifiée par l'activité de croissance bactérienne. Ainsi les cinétiques d'adsorption du milieu sont par la suite modifiées également. Si cette observation est confirmée en sang, elle pourrait être mise à profit pour obtenir un critère supplémentaire de la détection de croissance et donc de présence de pathogènes. Par ailleurs, ces interférences du plasma ont provoqué la diminution de l'intensité de réponse sur la leucocine. Cette dernière était pourtant en milieu simple parmi les plus intenses et la plus précoce sur les pathogènes testés en plasma.

Il faut souligner cependant que la détection a été possible en plasma, en conservant une majorité de peptides en capacité d'interagir avec les bactéries. Par ailleurs, des intensités de réponse variées d'un

peptide à l'autre sont toujours observées, ce qui permet encore d'envisager un potentiel d'identification grâce au profil des réponses obtenues.

La partie suivante va permettre de confirmer ou infirmer ces observations en sang total dilué en milieu d'hémoculture, dans lequel les interactions de la biopuce à peptides antimicrobiens avec les cellules sanguines restent la principale inconnue.

4.3 Détection de pathogènes en sang total dilué

4.3.1 Influence du milieu sanguin sur la cinétique de croissance des pathogènes

Avant de procéder aux expériences de détection en sang, nous allons confirmer les observations faites sur le délai de croissance mesuré en plasma (tableau 4.4). Pour ce faire, des étalements seront effectués à intervalles réguliers (0, 60, 120 et 240 minutes) lors de la croissance en parallèle dans le TSB et le sang en milieu d'hémoculture complétement. Ceci sera réalisé sur *S. aureus* résistant à la méticilline et *E. coli* O157:H7 (voir figure 4.12). Les conditions sont ici similaires à celles d'un suivi SPRI, à savoir une culture aérobie à 37°C, en l'absence d'agitation. Cinq étalements sont réalisés pour chaque point de mesure.

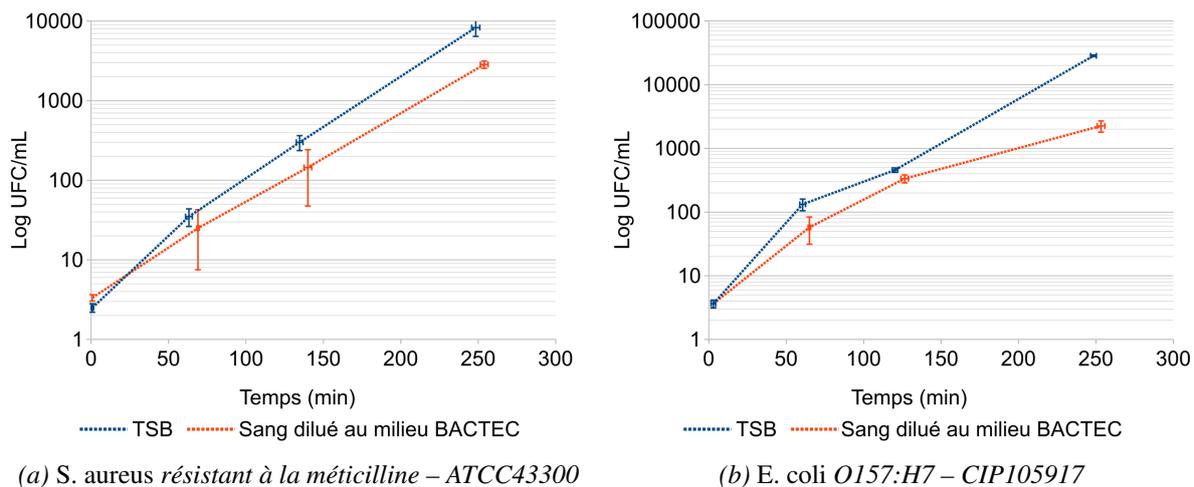


Figure 4.12 – Comparaison des cinétiques de croissance bactérienne entre le milieu d'hémoculture complétement et le TSB pour *E. coli* O157:H7 et *S. aureus* résistant à la méticilline. Dans les deux cas, le repiquage dans le milieu de suivi de croissance a lieu après une pré-culture en deux temps, de 18 heures puis 4 heures. L'échelle est semi-logarithmique et les barres d'erreur verticales représentent l'écart-type sur une série de 5 étalements. Les barres d'erreur horizontales représentent le temps mis pour effectuer les étalements.

Cette expérience vient confirmer ce qui avait déjà été observé : la croissance est plus lente en sang dilué au milieu d'hémoculture qu'en TSB. Cependant, cette vérification n'est que qualitative, en effet, l'expérience n'a été menée que sur un seul échantillon sanguin. La très forte variabilité rencontrée dans ce type d'échantillon biologique nécessiterait une population très large avant d'extraire avec certitude un temps de doublement en milieu d'hémoculture pour chaque pathogène. De plus, les conditions de culture en chambre SPRI, sans agitation et en l'absence de renouvellement de milieu, ne permettent pas de garantir une conservation du régime de croissance exponentielle sur la durée d'un suivi. Pour ces raisons,

nous ne chercherons pas à extrapoler ces mesures pour obtenir une estimation du délai de détection en sang. D'autre part, concernant le temps de croissance, nous avons observé dans le plasma une détection plus précoce pour *E. coli* O157:H7 comparé au SARM. C'est ici en partie expliqué par la croissance plus lente de ce dernier.

Par ailleurs, on constate l'absence de latence dans la reprise de croissance après changement de milieu pour les deux pathogènes lorsqu'ils sont repiqués suite à la pré-culture en deux temps. Cela vient confirmer que la méthode de pré-culture utilisée permet effectivement d'inoculer dans la SPRI des bactéries viables qui reprennent directement leur croissance. Il faut également garder à l'esprit que de telles conditions ne sont pas toujours réunies lors d'une hémoculture en milieu clinique. L'action biocide intrinsèque du sang, ainsi que l'éventuelle antibiothérapie, sont effectivement deux facteurs pouvant retarder la reprise de croissance des pathogènes une fois le sang du patient prélevé dans le milieu d'hémoculture. Les temps de détection présentés par la suite en sang seront donc atteints dans des conditions optimales pour l'état métabolique des bactéries et doivent être considérés comme des limites inférieures atteignables. Toutefois, l'introduction ultérieure d'améliorations dans la culture en SPRI devrait permettre d'améliorer encore ces délais de détection, même pour des bactéries initialement en dehors de la phase exponentielle de croissance.

4.3.2 Stabilité des peptides en milieu sanguin

Avant de passer aux expériences de détection en milieu d'hémoculture complétement, il est utile de confirmer l'intégrité des peptides face à l'activité de dégradation que pourrait avoir le sang. Par ailleurs, au-delà d'une dégradation partielle suite à l'activité enzymatique sanguine, il pourrait également survenir un phénomène de *leaching* ou lessivage des peptides, qui entraînerait leur décrochage de la surface.

Pour étudier ces phénomènes, plusieurs techniques d'analyse de surface peuvent être mises à contribution, allant de la QCM⁴²⁴ à des solutions d'analyse en électrochimie⁴⁵⁸ en passant par la SPRI elle-même. L'objectif poursuivi étant de s'assurer de la stabilité en effectuant le moins de modifications possible sur les PAM déjà synthétisés, deux techniques vont être privilégiées : la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et la microscopie de fluorescence.

L'avantage de la première méthode est de pouvoir fournir un spectre d'analyse qui donne la masse des molécules présentes dans l'échantillon sans nécessité de marquage. De plus, elle possède une grande capacité de traitement, qui autorise d'étudier en parallèle l'intégralité des PAM utilisés. Si ceux-ci sont présents en quantité suffisante, cela permettrait donc d'une part d'estimer le greffage effectif après exposition et d'autre part s'il y a dégradation, d'estimer quels sont les sites préférentiels de clivage. Cette technique est explorée en première intention en partie 4.3.2.1.

L'utilisation de la microscopie de fluorescence, déjà mise en œuvre au cours de ces travaux (partie 3.1.1.2), permet une vérification qualitative de la présence des peptides après exposition au sang. Seule une étape de biotinylation des peptides après immobilisation est nécessaire pour cette expérience. Cela ne donnera toutefois pas d'informations précises sur des phénomènes partiels de dégradation ou de lessivage. Cette technique sera mise à profit en partie 4.3.2.2.

4.3.2.1 Étude par MALDI-TOF

La technique de MALDI-TOF a déjà été présentée en partie 1.2.2.3. Dans le cadre de l'analyse menée ici, la cible utilisée initialement en acier inoxydable non poli a été métallisée avec une couche d'or d'une épaisseur de 50 nm. Cette métallisation permettra de l'utiliser comme un substrat classique pour l'assemblage de monocouches de PAM thiolés. Similairement aux prismes, les peptides sont donc déposés en D15G15 à 100 μM , 48 heures après traitement au plasma- O_2 . Les analyses MALDI-TOF présentées ici ont été réalisées avec le soutien technique de Christine Saint Pierre (UMR SyMMES 5819, équipe CREAB). Les spectres MALDI-TOF sont obtenus en mode réflectron positif grâce à un appareil BRUKER de type Microflex, équipé d'un réflecteur et d'un laser Azote (longueur d'onde à 337 nm). La matrice utilisée est l'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique, dont 0,75 μl (à saturation dans un mélange 50 % acétonitrile / 50 % eau avec 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA)). Celle-ci est déposée sur la cible suivant la méthode de la goutte séchée, au-dessus des surfaces préalablement fonctionnalisées.

La figure 4.13.a donne l'allure d'un spectre ainsi en obtenu pour le peptide BNC, après traitement du signal à l'aide du paquet MALDIquant du logiciel R. On obtient une valeur m/z de 1733,66 contre 1736,2 théoriquement attendus. On observe également la forme dimérisée du peptide BNC à une valeur de 3472,2 suite à la formation d'un pont disulfure entre les thiols terminaux. Cette valeur correspond à celle attendue pour un tel dimère. Le décalage, qui aura pu ensuite être corrigé par une calibration grâce à des peptides références, reste acceptable et témoigne de la présence effective du peptide immobilisé en surface. Il est possible de vérifier la biotinylation des surfaces par cette technique (figure 4.13.b). On observe alors deux pics principaux : un à 1737,9 qui correspond au peptide non modifié et un autre pic à une valeur de 1965. La différence constatée (228) correspond au couplage avec la biotine-NHS. Par ailleurs on remarque l'absence de dimères après biotinylation. La biotinylation est donc bien confirmée pour les peptides immobilisés en surface.

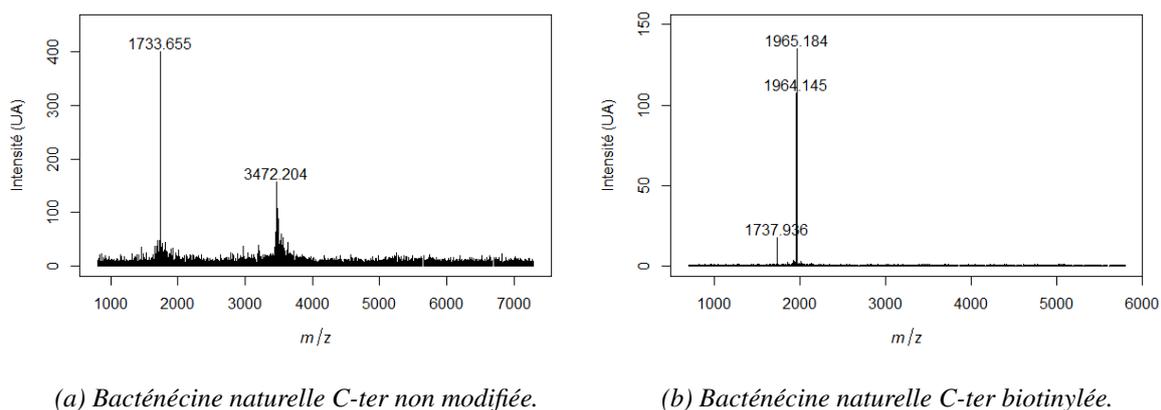


Figure 4.13 – Spectres obtenus en MALDI-TOF pour la bacténécine naturelle C-ter immobilisée sans modifications (a) et après biotinylation (b). Les données ont été corrigées comme suit : stabilisation de la variance, lissage de Savitzky-Golay sur 21 points et soustraction de la ligne de base. Les observations sont en mode réflectron positif, les rapports masse sur charge correspondent donc à $[M + H]^+$.

Les cibles fonctionnalisées sans biotinylation ont pu être ensuite exposées au sang en milieu d'hémoculture surtamponné pour 24 heures à 37°C. Durant cette phase, en dehors des éventuelles dégradations de la surface, un dépôt de matériel sanguin aura lieu, comme déjà observé sur un suivi SPRI en plasma. De

plus, les cellules sanguines sédimentent en surface, en interaction directe avec les peptides. Ce sont donc ces éléments qu'il faut éviter afin de pouvoir réaliser une observation propre du signal en MALDI-TOF, sans interférence de la part d'éléments sanguins.

Dans cet objectif, plusieurs protocoles de lavage et rinçage différents ont pu être expérimentés : rinçage sous flot d'eau ultra-pure, passage pour 15 minutes à 3 heures dans des bains d'ultrasons, lavage avec surfactant (SDS 2%). Cependant le résultat est le même quel que soit le lavage employé, le signal obtenu après exposition au sang ne présente jamais trace de peptides, et est toujours masqué par des produits de grande masse moléculaire. De plus, il est possible que l'on soit partiellement soumis à un lessivage, qui diminue la quantité de peptides présents en surface. Or, les échantillons déposés sur une cible MALDI pour un usage standard le sont habituellement en solution afin de co-cristalliser avec la matrice. Ceci aboutit à une quantité d'analyte largement supérieure à celle obtenue lorsque les peptides sont immobilisés en monocouches. La quantité utilisée est alors déjà en limite de résolution pour l'appareil MALDI-TOF utilisé. L'exposition au sang, ainsi que les lavages qui s'en suivent viennent donc probablement faire passer la quantité de peptide désorbée par le laser en dessous de cette limite.

Face à ces résultats non concluants, la vérification par biotinylation puis microscopie de fluorescence s'avère nécessaire avant d'éventuellement passer aux suivis de détection en sang.

4.3.2.2 Approche ON/OFF par fluorescence

Si l'approche par analyse MALDI-TOF a montré qu'il était délicat de s'affranchir totalement de l'adsorption spontanée des protéines du sang sur la surface du biocapteur, l'utilisation du marquage préalable avec des biotines pourrait permettre de contourner ce souci. En effet, l'affinité élevée de la streptavidine avec la biotine ($K_d \approx 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$) pourrait lui permettre de se substituer en surface des lames fonctionnalisées aux protéines du sang. Le principe de cette expérience, présenté en figure 4.14, consiste donc à biotinyler les peptides avant de les exposer au sang, afin de pouvoir ensuite les observer par microscopie de fluorescence. La comparaison des échantillons ainsi traités avec des références non exposées au sang permet d'évaluer si les peptides sont toujours visibles, et donc présents, après exposition au sang.

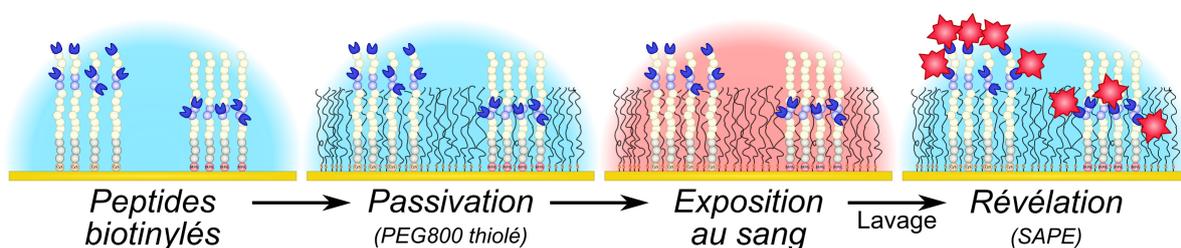


Figure 4.14 – Principe de l'évaluation par microscopie de fluorescence de la stabilité des peptides face au sang. Les biotines sont représentées en bleu, la SAPE en rouge.

Le protocole de révélation utilisé est similaire à celui déjà mis en œuvre (partie 3.1.1.2), avec la streptavidine-phycoérythrine (SAPE) comme agent de fluorescence. Pour aboutir à une vérification par microscopie de fluorescence avec la SAPE de la présence de peptides après exposition face au sang, il est nécessaire d'étiqueter les peptides pour pouvoir les révéler. Ceux-ci seront donc immobilisés avant d'être biotinylés. Un contrôle par MALDI-TOF de la biotinylation effective a pu être mené (voir figure 4.13.b).

On observe alors que le pic du peptide non biotinylé est toujours présent. Le réaction de biotinylation des PAM immobilisés n'est donc pas totale. Cependant, le but étant ici une révélation en fluorescence pour une vérification qualitative de la présence des PAM après exposition au sang, ce n'est pas un souci. De plus, certains peptides comme la pénétratine ou la magainine présentent des amines sur les chaînes latérales et pourraient fluorescer même en étant partiellement clivées. D'autres peptides comme BNC ou BSC possèdent uniquement l'amine du N-terminal, n'importe quel clivage viendrait donc supprimer toute fluorescence. Effectivement, de par l'encombrement stérique du fluorophore utilisé – le conjugué SAPE pèse 293 kDa – l'intégralité des biotines présentes ne seront pas couplées à ce dernier.

Les étapes sont donc les suivantes pour cette expérience : dépôt des peptides avec l'automate, ensuite biotinylation des peptides, exposition au sang dilué en milieu d'hémoculture, lavage et enfin révélation en microscopie de fluorescence. L'expérience en MALDI-TOF nous a montré qu'il était complexe d'éliminer totalement les protéines sanguines adsorbées en surface. C'est pour cette raison que la biotinylation a lieu avant exposition face au sang. Ceci permettra d'éviter de faux-positifs qui proviendraient de protéines plasmatiques biotinylées.

Dans cette expérience les lames de verre dorées et fonctionnalisées seront incubées en position verticale, sans agitation et à 37 °C, pour se rapprocher des conditions rencontrées lors d'un suivi SPRI. Le lavage des lames se fera dans les mêmes conditions que les tentatives les plus poussées qui avaient été faites pour le nettoyage des cibles MALDI. Il s'agit d'abord de rincer sous flot d'eau ultra-pure pour 30 secondes les échantillons, puis ensuite de l'exposer pour 2 heures aux ultrasons dans un bain de SDS 2% (masse par volume en eau ultra-pure). Ensuite un rinçage sous flot d'eau ultra-pure à nouveau et enfin 15 minutes aux ultrasons en bain d'eau ultra-pure.

La révélation à la SAPE se fait ensuite à 5% en PBS 1x pendant 10 minutes, avant rinçage au PBS 1x et observation avec le filtre adapté à la phycoérythrine. Le résultat de ces observations est visible en figure 4.15.

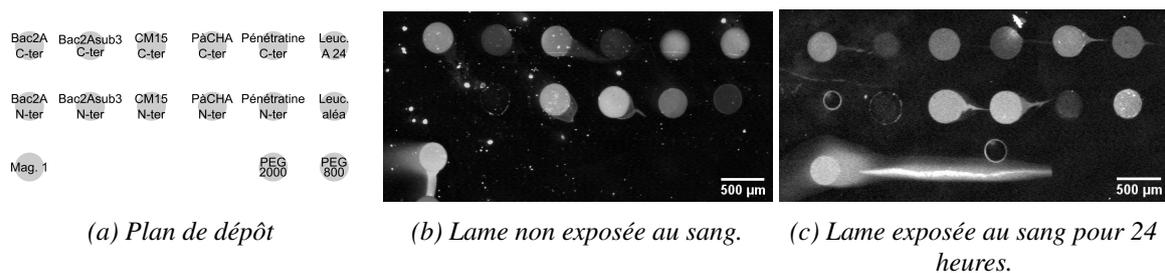


Figure 4.15 – Allure obtenue en microscopie de fluorescence pour un champ de dépôt des peptides sur lame d'or (dépôt à 100 μM en solution). (a) Disposition des peptides au sein du champ de dépôt. (b) Lame de contrôle, non exposée au sang dilué en milieu d'hémoculture. (c) Lame plongée 24h en sang dilué au milieu d'hémoculture. Paramètres d'acquisition : zoom 4x - exposition 200 ms - gain 4. Les deux lames ont subi le même lavage pendant 2 heures aux ultrasons en SDS 2%.

Contrairement aux résultats issus des analyses MALDI-TOF, on obtient ici bel et bien une présence des peptides après exposition au sang. Sans considérer les intensités de fluorescence, tous les peptides qui donnaient de la fluorescence sur le contrôle le font après exposition au sang. Bac2A et Bac2Asub3, lorsqu'elles sont immobilisées en N-ter, ne présentent pas d'amines primaires, il est donc normal qu'elles

ne donnent pas de fluorescence. Toutefois, certains peptides comme la pénétratine ou la magainine présentent des amines sur les chaînes latérales et pourraient fluorescer même en étant partiellement clivés. D'autres comme BNC ou BSC possèdent uniquement l'amine du N-terminal, un clivage en n'importe quelle position viendrait donc supprimer toute fluorescence. Le fait que ces peptides présentent de la fluorescence après exposition au sang signifie qu'ils restent entiers en surface – tout du moins pour une partie d'entre eux. Si les intensités sont globalement comparables, la leucocine aléatoire donne toutefois une fluorescence plus forte après exposition au sang. Cela peut s'expliquer par une accessibilité facilitée à la biotine présente en N-terminal après exposition au sang. Ce phénomène pourrait être expliqué par un lessivage partiel du plot par exemple. En effet, comme précisé auparavant, la fluorescence n'implique pas que l'intégralité des peptides soit conservée en surface. Il reste aussi possible que certains d'entre eux soient partiellement clivés.

Ces résultats permettent de passer aux tentatives de détection en sang dilué en milieu d'hémoculture en sachant que les PAM sont suffisamment stables en surface des puces sur des durées d'exposition compatibles avec un suivi de croissance bactérienne par SPRI.

4.3.3 Expériences de détection à faible concentration en sang

Les expériences suivantes sont réalisées selon le même protocole que les précédentes en plasma concernant le suivi SPRI. Il y a cependant quelques modifications mineures concernant la puce et le protocole de culture. D'une part, les puces présentent ici sept duplicats de chaque peptide. Ensuite, contrairement à précédemment, les étapes de définition des ROI et de calibration du système SPRI seront réalisées en milieu BACTEC sans sang. Ceci afin de limiter à ce moment la dérive causée par l'adsorption non-spécifique. Enfin, les pré-cultures bactériennes sont désormais réalisées en deux temps, d'abord sur la nuit, puis renouvelées quatre heures avant injection dans la SPRI – toujours à 37°C et 200 tours.min⁻¹. Ceci a permis d'une part d'avoir une garantie supplémentaire que la croissance bactérienne reprendra dans l'imageur SPR avec un délai minimal. D'autre part, il s'agissait d'un moyen d'uniformiser la durée de la seconde pré-culture, qui précède l'injection. En effet, l'heure à laquelle les échantillons sanguins étaient disponibles n'était pas fixe, mais communiquée le jour même par l'EFS Grenoble. Procéder à la pré-culture en deux étapes permettait donc de moduler l'heure de début de la seconde incubation en fonction de la contrainte temporelle liée à la récupération de l'échantillon sanguin. Cela évite ainsi des variations dans les temps d'incubation pour la dernière pré-culture avant injection de l'*inoculum*.

4.3.3.1 Contrôle en l'absence de bactéries : effets de la matrice sanguine

En amont des expériences de détection en tant que telles, il est important de procéder à une étape de vérification de l'amplitude des interactions non-spécifiques en conditions stériles. Il faut en effet s'assurer de l'absence de faux signal positif en procédant à un suivi en l'absence de bactéries. Pour ce faire, on remplace l'injection de la suspension bactérienne par une injection de milieu stérile. Les résultats sont présentés en figure 4.16. A noter que la saturation du signal du signal SPR étant atteinte en moins d'une heure, une calibration a été répétée au bout de trois heures, afin de redéfinir un angle de travail dans la zone de linéarité des courbes plasmons.

De façon surprenante, après redéfinition de l'angle de travail, certains peptides présentent une forte

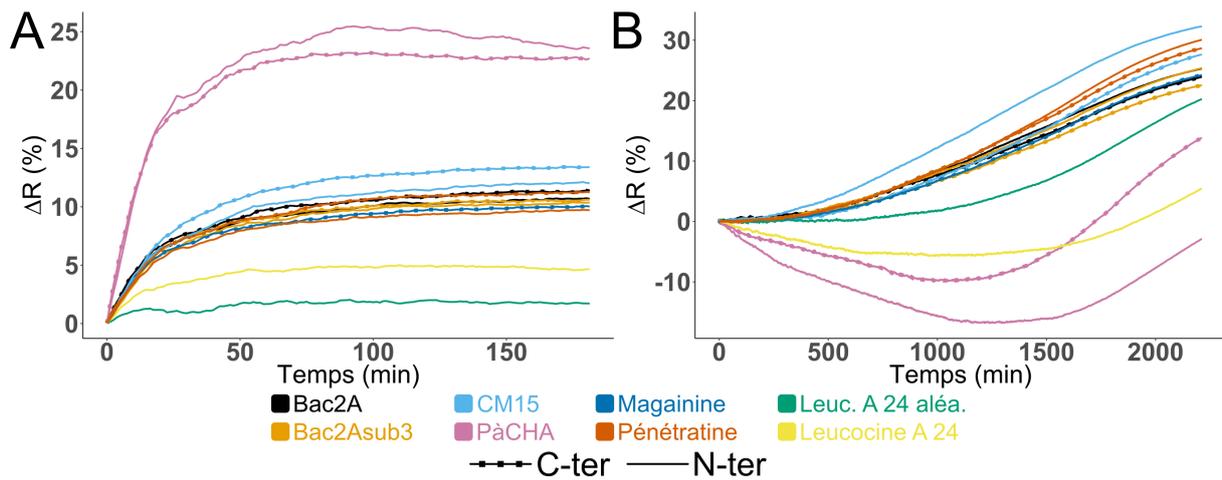


Figure 4.16 – Courbes cinétiques pour un suivi avec injection blanche (milieu de dilution en absence de bactéries) en sang dilué en milieu d'hémoculture BACTEC aérobic. Les signaux sont moyennés sur 7 plots différents. Il y a eu redéfinition de l'angle de travail après 3 heures de suivi. A – Suivi avant redéfinition de l'angle de travail, de 0 à 3 heures. B – Suivi après redéfinition de l'angle de travail, de 3 à 40 heures.

dérive négative. C'est notamment le cas de la leucocine A 24 et de PàCHA. L'apparition d'un tel comportement lors du passage du plasma au sang total peut s'expliquer par l'interaction avec les cellules sanguines. Celles-ci pourraient en effet se fixer initialement sur les plots de ces peptides par des interactions faibles, avant de finir par sédimenter et donc diminuer la réflectivité des plots de ces peptides. Cette fixation initiale semble pouvoir être observée sur le peptide PàCHA lors des trois premières heures de suivi. Ce serait donc les cellules sanguines qui satureraient alors la surface.

Concernant le reste des peptides, on distingue trois différentes allures principales. PàCHA, on l'a vu, qui marque une dérive initiale très forte, suivie d'une dérive négative. Les leucocines (A 24 et aléatoire) présentent une dérive initiale faible (moins de 5% après 24 heures). Le changement de pente qui a lieu après 25 heures de suivi peut être dû à une augmentation de sensibilité pour ces plots, lié à un décalage de l'angle de résonance sur les courbes plasmons. Enfin le reste des peptides présentent de très grandes similarités : dérive initiale de l'ordre de 10% puis dérive linéaire après réajustement de l'angle de travail. Le décalage final ne dépasse pas 30%, ce qui devrait permettre d'observer un saut de détection en présence de bactéries. Pour rappel, l'amplitude de la sensibilité aux plasmons est effectivement de 50% minimum.

Enfin, dans une lecture globale de ces courbes cinétiques, on constate l'absence de sauts de détection, caractéristiques jusqu'ici de la présence de bactéries. On peut ainsi *a priori* procéder aux suivis de détection en sang dilué en milieu d'hémoculture.

4.3.3.2 Détection d'*E. coli* et *S. aureus* en sang dilué au milieu d'hémoculture

La réalisation dans un premier temps d'un suivi pour chacun des quatre pathogènes ciblés au cours de cette thèse permettra d'évaluer la faisabilité de détection dans le sang. De plus, les profils alors obtenus nous renseigneront sur la faisabilité d'établir une identification à partir du jeu de sondes utilisé.

La méthodologie est donc celle précédemment décrite. Les comptages sont à nouveau réalisés sur les dilutions de la pré-culture, avec cinq réplicats pour obtenir l'erreur-type. Les concentrations visées sont de l'ordre de quelques unités à quelques dizaines d'UFC.ml⁻¹ au maximum. Ceci afin de rester au plus près des concentrations trouvées dans des échantillons réels.

L'observation des données cinétiques (figure 4.17) permet de conclure qu'il y a effectivement détection des pathogènes. Plusieurs groupes de réponses sont remarquables. D'une part, une majorité des PAM présente une dérive positive linéaire assez forte initialement, de l'ordre de 5 à 20 % au bout de 10 heures de suivi, en fonction de l'échantillon de sang utilisé. Ces peptides sont les mêmes que ceux identifiés sur le suivi sans bactéries. Cette forte dérive vient amoindrir l'intensité du saut de détection par rapport à ce qui avait auparavant été observé en milieux plus simples. L'autre groupe, les leucocines et PàCHA, présente une dérive initiale réduite, voire négative. Par la suite, les leucocines ne montrent pas un saut de détection clair, mais uniquement une inflexion du signal. Une seule exception à ce constat : la leucocine aléatoire pour SASM présente un saut de détection d'une amplitude d'environ 23%. Celui-ci a toutefois lieu plus de 3 heures après la détection la plus rapide par PàCHA. Les souches testées de *S. aureus* sont reconnus par ce peptide avec des sauts de détection d'une amplitude de près de 50 % de réflectivité. Cette amplitude se trouve réduite dans le cas des souches testées pour *Escherichia coli*, avec environ 15 % pour *E. coli* O157:H7 et 40 % pour *E. coli* O1:K1:H7. De prime abord, en dehors des réponses de PàCHA, il n'y a pas de différence forte qui apparaisse sur les courbes de suivis cinétiques pour distinguer les différentes souches.

La présentation des données sous forme de couches tuilées nuancées (figure 4.18) permet de plus facilement apprécier les signaux obtenus. Les trois groupes précédemment déterminés se retrouvent sur cette représentation : PàCHA, les leucocines et le reste des peptides. PàCHA montre un comportement inédit jusqu'à présent lors des détections de pathogènes : en début de suivi il y a un pic de signal qui s'accompagne ensuite d'une dérive négative. Cela avait déjà été entrevu sur le suivi en absence de contamination (figure 4.16), avec la dérive négative observée à partir de 3 heures et de la redéfinition de l'angle de travail. L'observation de ce pic vient corroborer l'hypothèse qu'il est dû à l'attachement transitoire des cellules sanguines en surface. La dérive négative qui s'en suit correspondrait donc effectivement à la sédimentation de ces cellules. Ce saut initial est également observé pour la leucocine aléatoire en présence du SASM. L'absence de ce pic pour la leucocine A24 marque une différence entre les deux séquences peptidiques.

Enfin, la réponse du reste des peptides ne va différer principalement que par la dérive initiale variant d'une séquence à l'autre, sans différence marquée d'amplitude. Il ne semble pas y avoir de différence marquée dans les sauts de détection non plus. Cela se retrouve par des plateaux finaux très proches en intensité. Ceci pourrait signifier qu'il y a saturation du signal SPRI pour ces plots en fin de suivi.

Excepté pour PàCHA sur le suivi de détection de SARM, qui présente une dérive négative plus forte en N-ter qu'en C-ter, il n'est pas observé de différence majeure en fonction de l'orientation des peptides. De plus, en considérant uniquement l'amplitude du saut de détection et non l'allure du suivi, on trouve en réalité pour PàCHA N-ter une valeur d'environ 40%, qui se rapproche de celle du C-ter (plateau à 45 %). L'immobilisation en N-ter ou C-ter ne semble donc pas être un facteur d'influence fort sur la capacité d'interaction des peptides avec les bactéries.

Les temps correspondant aux sauts de détection peuvent à nouveau être extraits grâce à la valeur maximale de dérivée. Les temps obtenus pour les détections les plus précoces sont présentés en tableau 4.5. Seuls les peptides présentant un saut de détection d'une amplitude supérieure à 5 % sont considérés.

On remarque ainsi que l'augmentation en complexité du milieu dans lequel on vient réaliser la

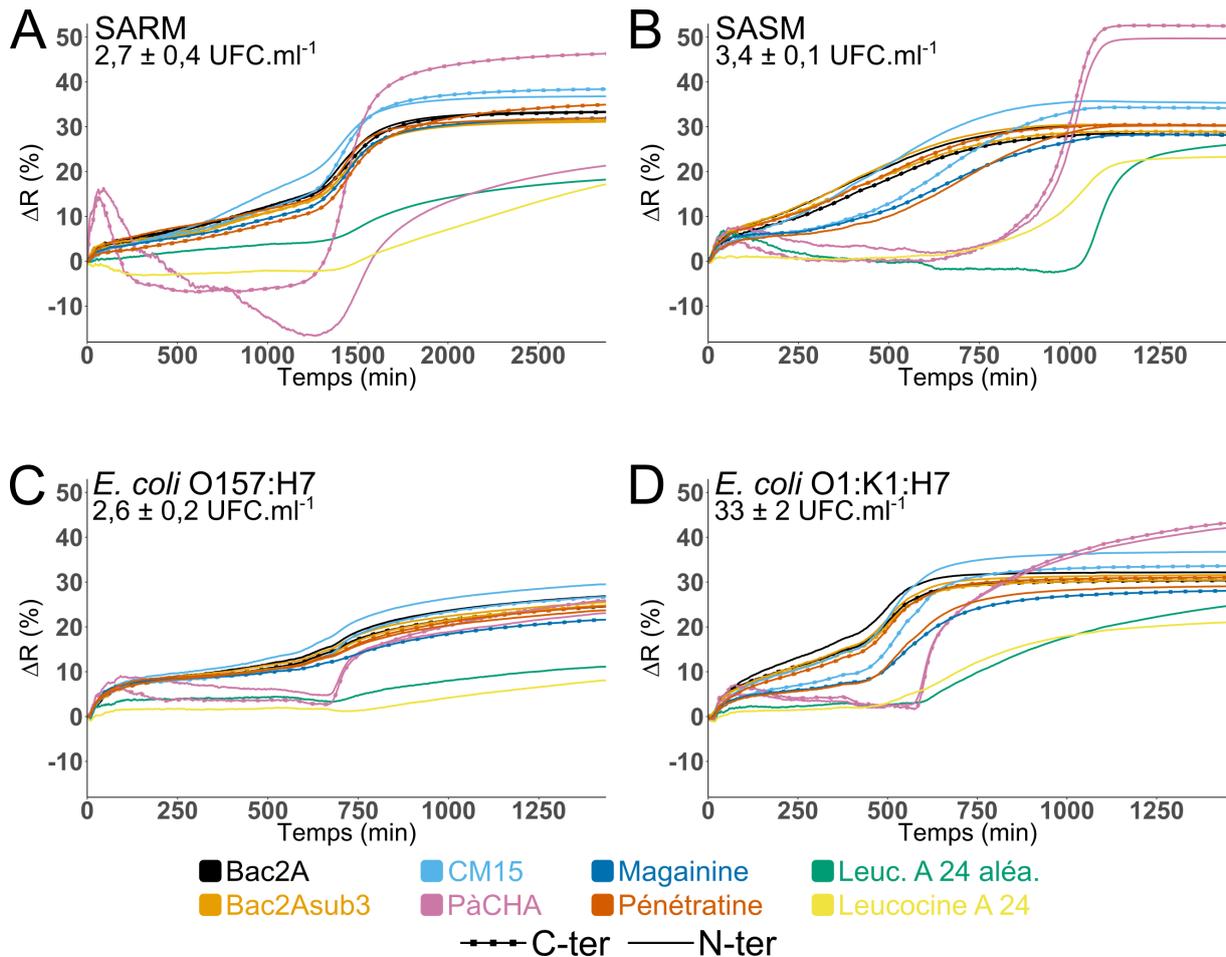


Figure 4.17 – Suivis cinétiques en représentation linéaire pour la détection de 4 pathogènes bactériens différents en sang dilué au milieu d'hémoculture BACTEC surtamponné. Les courbes sont la moyenne sur 7 plots. L'ensemencement en bactéries se fait juste avant le début de suivi. Les courbes sont représentées après lissage. Les échantillons sanguins sont différents à chaque suivi. A – *S. aureus* résistant à la métiline – $2,7 \pm 0,4 \text{ UFC.ml}^{-1}$. B – *S. aureus* sensible à la métiline – $3,4 \pm 0,1 \text{ UFC.ml}^{-1}$. C – *E. coli* O157:H7 – $2,6 \pm 0,2 \text{ UFC.ml}^{-1}$. D – *E. coli* O1:K1:H7 – $33 \pm 2 \text{ UFC.ml}^{-1}$.

Souche ciblée	Temps (min)	Peptide	Concentration initiale
SARM	1343	Bac2Asub3 N-ter	$2,7 \pm 0,4 \text{ UFC.ml}^{-1}$
SASM	1020	PàCHA C-ter	$3,4 \pm 0,1 \text{ UFC.ml}^{-1}$
<i>E. coli</i> O157:H7	593	Magainine 1	$2,6 \pm 0,2 \text{ UFC.ml}^{-1}$
<i>E. coli</i> O1:K1:H7	498	CM15 N-ter	$33 \pm 2 \text{ UFC.ml}^{-1}$

Tableau 4.5 – Comparaison des temps de détection obtenus entre le plasma et le TSB. Les temps sont calculés à partir du temps auquel est obtenue la valeur maximale de dérivée première. Sont exclus les peptides ne présentant pas de saut de détection.

détection s'accompagne d'une détection plus tardive. Cela reste en cohérence avec les études précédentes lors du transfert d'un capteur développé en milieu simple vers le sang.²²⁴

La détection de bactéries en croissance dans le sang est donc possible grâce au jeu de PAM choisi. Les peptides sélectionnés présentent un comportement similaire, à deux exceptions près (PàCHA et leucocine).

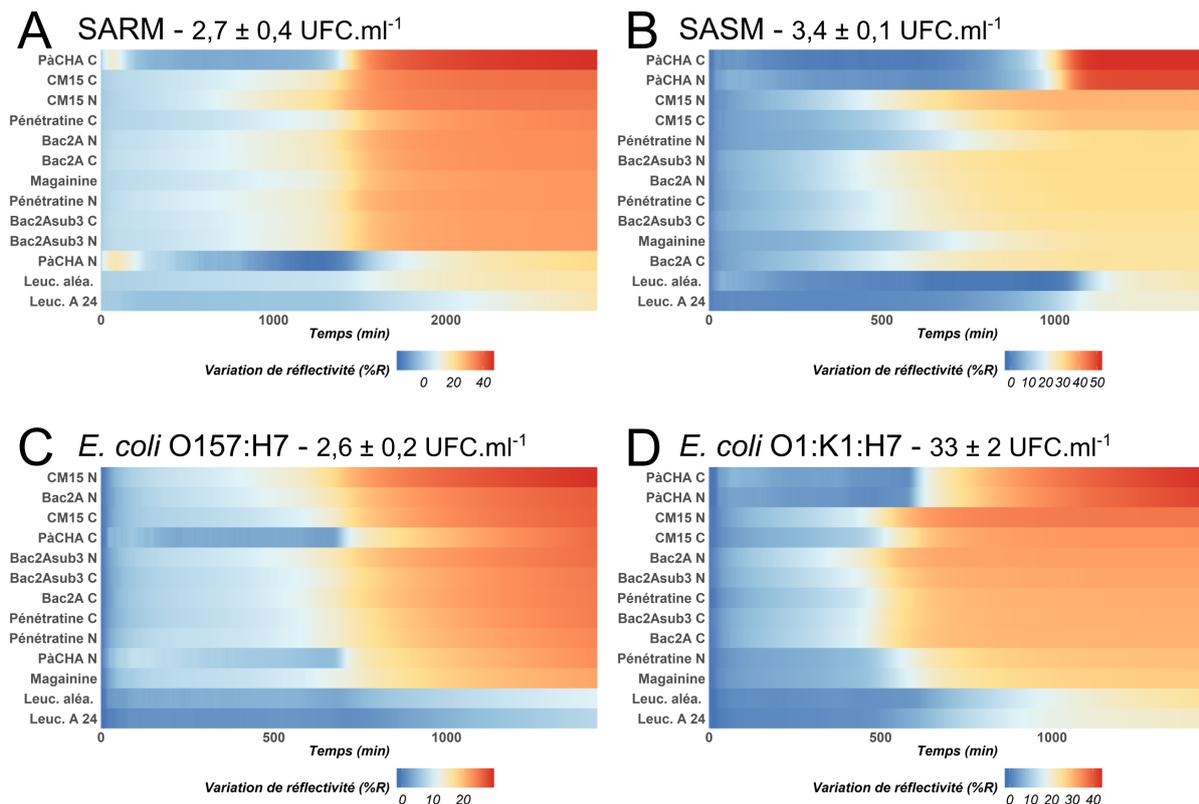


Figure 4.18 – Suivis cinétiques représentés en tuiles nuancées pour *S. aureus* résistant à la métilcilline (A), *S. aureus* sensible à la métilcilline (B), *E. coli* O157:H7 (C) et *E. coli* O1:K1:H7 (D). Les courbes sont la moyenne sur 7 plots. L'ensemencement en bactéries se fait juste avant le début de suivi. Les courbes sont représentées après lissage. Les suivis sont les mêmes qu'en figure 4.17.

Les peptides fortement cationiques semblent corrélés à une dérive initiale forte, comme déjà entrevu en plasma. Cette dérive vient limiter l'amplitude des sauts de détection mesurables par SPRI, ce qui explique potentiellement la difficulté de faire émerger des différences en fonction des bactéries ciblées. Malgré tout, les profils de détection restent marqués par quelques dissemblances, notamment de la part de PaCHA. Une identification partielle des types de bactéries présentes dans un échantillon reste donc possible.

4.3.3.3 Influence du positionnement des sondes sur la surface de la puce

Comme évoqué en partie 4.1.2.2, l'analyse SPRI est menée sans agitation. Cela pourrait impliquer un manque d'homogénéisation de la population bactérienne dans la chambre de culture SPRI. Une telle inhomogénéité pourrait alors entraîner des biais dans la détection en fonction de la position des plots à la surface de la puce. Typiquement cela pourrait poser souci lors de tentatives de détection de bactéries aérobies strictes, qui se développeraient en surface du milieu de culture, sans entrer en contact avec les sondes. Dans le cadre de cette thèse, les bactéries étudiées sont aéro-anaérobies facultatives, ce souci ne devrait donc pas se poser.

Toutefois, du fait des ensemencements initiaux faibles, à seulement quelques bactéries dans la chambre SPRI, il peut y avoir des différences dans les premières zones qui seront exposées aux bactéries en surface du prisme. Cela a pu être observé au cours de certains suivis (figure 4.19.a). Il est intéressant alors d'observer qu'il y a non seulement une arrivée asynchrone des bactéries en surface, mais également que

sur les images obtenues de la surface, elles se répandent progressivement au sein même d'un plot (voir figure 4.19.b/c/d). Cela fournit une confirmation supplémentaire que la prise de signal est due à la présence de bactéries en surface et non à un changement global du milieu de culture utilisé pour le suivi.

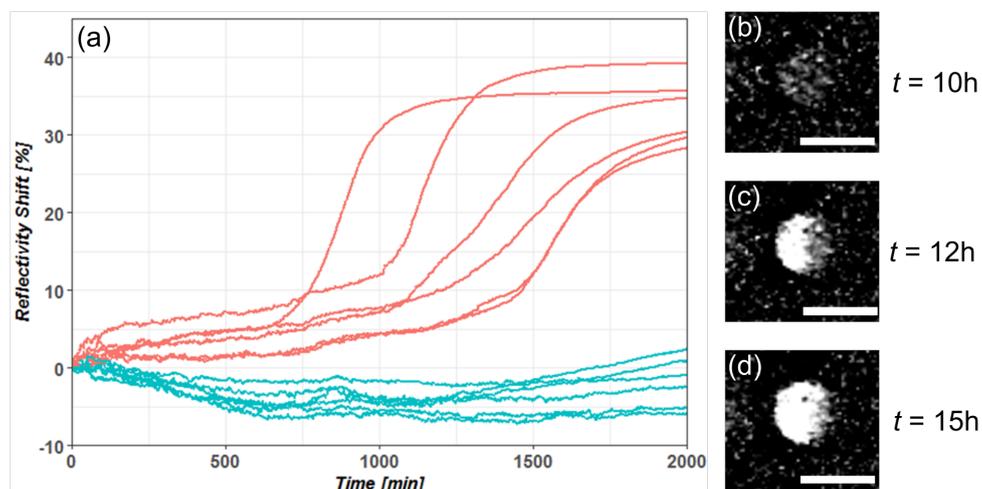


Figure 4.19 – Détection asynchrone entre répliquats d'une même espèce lors d'un suivi en sang sur SARM. (a) courbes cinétiques lors de la détection de SARM en milieu sanguin. (b,c,d) Images différentielles (soustraction de l'image initiale) pour le plot qui donne le saut de détection le plus précoce. Les barres d'échelle représentent 500 μm .

Cependant, si une homogénéisation de la chambre de culture par agitation pouvait favoriser la rencontre des bactéries avec la surface, elle pourrait également défavoriser des interactions faibles nécessaires à la formation de biofilms. Un projet entre les différents partenaires de cette thèse, ainsi que le Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, a été financé auprès de l'Agence Nationale de la Recherche afin d'explorer les alternatives possibles pour améliorer le système de détection sur ce point. L'augmentation du volume de la cuve, la mise en place d'un dispositif d'homogénéisation ou encore l'adaptation du prisme aux flacons d'hémoculture sont autant de perspectives de développement envisagées.

Par ailleurs, comme on l'a vu en partie 4.3.3.1, il peut y avoir un effet de la sédimentation sur le signal de fond de puce. La question se pose donc également pour les peptides en interaction avec les bactéries. L'influence du positionnement vertical sur les performances de détection est à vérifier.

Pour cela, les données de l'expérience présentée en figures 4.17 et 4.18 sont reprises sous une forme différente en figure 4.20. Dans cette représentation, pour chaque peptide, ainsi que pour les surfaces contrôle de PEG800, la moyenne et l'écart-type des variations de réflectivité en fin de suivi ont été calculées pour les répliquats de chaque peptide. Pour comparer la dispersion des réponses entre les différentes sondes, les valeurs pour chaque plot ont ensuite été centrées et réduites. Cela revient à calculer pour chaque plot la valeur suivante : $\frac{\Delta R_{plot} - \mu_{peptide}}{\sigma_{peptide}}$, avec ΔR_{plot} , la valeur brute de variation de réflectivité du plot, $\mu_{peptide}$ et $\sigma_{peptide}$ respectivement la moyenne et l'écart-type pour les répliquats. Ainsi, les différents jeux de répliquats sont rendus comparables. Les données obtenues de cette façon sont représentées en fonction de leur positionnement sur la puce – à noter que la forme carrée ici représentée ne sert que la lisibilité, les ROI originales sont circulaires.

Aucune position verticale préférentielle commune à tous les suivis ne se dégage – excepté pour SASM pour lequel le haut de puce semble généralement plus élevé (plusieurs plots en haut de puce avec une

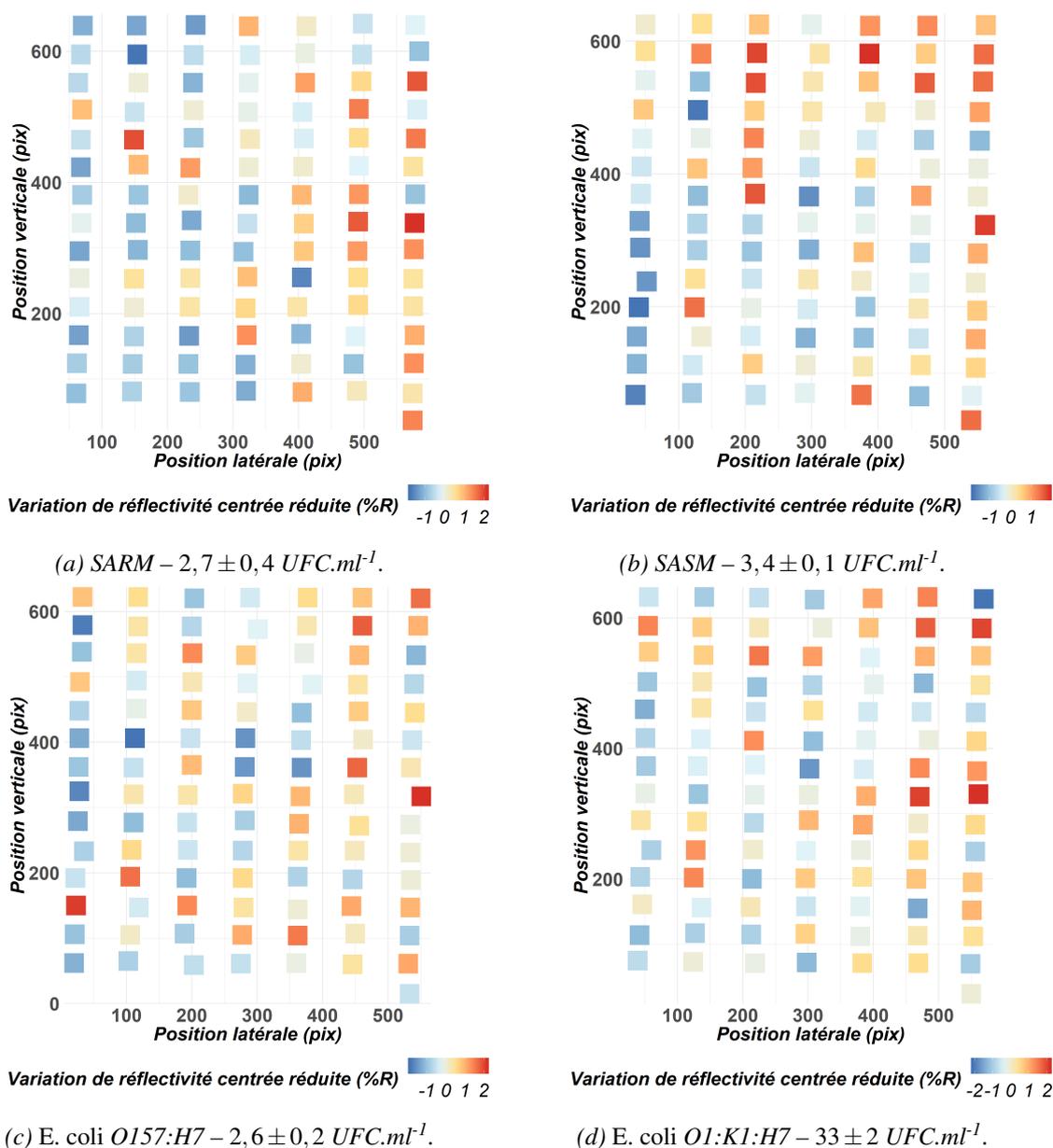


Figure 4.20 – Réponse en fin de suivi pour 4 suivis différents. Les valeurs sont centrées et réduites pour chaque peptide, afin de pouvoir comparer les réponses indépendamment de leur intensité. Les tuiles sont représentées en fonction de la position sur la puce de chaque ROI. Le haut de chaque graphe correspond au haut de la puce.

variation supérieure à 1). Cela pourrait s'expliquer par une croissance préférentielle de cette souche à proximité de la surface du milieu d'hémoculture. Toutefois, une tendance commune se dégage concernant la position latérale : les plots situés du côté droit présentent des signaux plus intenses. L'absence de rationnel pouvant expliquer ce point par la croissance des bactéries pousse à formuler une autre hypothèse : celle d'une inhomogénéité du réglage optique. Une collimation imparfaite de l'imager pourrait par exemple entraîner un tel défaut dans les images collectées.

Globalement, l'effet de ces variations en fonction de la position reste négligeable, notamment par rapport à l'intensité des dérives non-spécifiques liées au sang. La correction des dérives initiales afin d'extraire des grandeurs caractéristiques des signaux de détection sera donc traitée prioritairement.

4.3.4 Vers une possibilité d'identification par affinité croisée ?

Jusqu'ici, si la capacité de détection a été démontrée, notamment par l'intermédiaire des sauts de détection avec les maxima de dérivée associés, il reste à évaluer les capacités d'identification. Or, les suivis impliquent une grande quantité de données, difficilement assimilables par l'observation directe des résultats. Pour tirer une description rigoureuse et non biaisée des cinétiques obtenues, il va être nécessaire de procéder à une analyse exploratoire permettant de comparer les suivis réalisés. Néanmoins, afin de mener une étude statistique plus rigoureuse, la réalisation de plusieurs répétitions des suivis présentés dans la partie précédente a été nécessaire.

Lors du développement de capteurs destinés à identifier un nombre élevé de cibles différentes, la difficulté liée au développement d'un récepteur spécifique pour chaque cible implique d'exploiter le principe d'affinité croisée⁴⁵⁹ (préféré ici au terme « réactivité croisée » parfois employé). Celui-ci repose sur la capacité de chaque récepteur à interagir plus ou moins intensément avec plusieurs des cibles visées. La variété d'intensité de ces interactions dénote d'affinités différentes d'une cible à l'autre. L'utilisation simultanée de plusieurs récepteurs de ce type permet donc de faire émerger un profil de reconnaissance potentiellement spécifique à chaque cible à partir de la réponse de l'ensemble des sondes. Un tel principe peut par exemple se retrouver dans la nature avec le fonctionnement de l'olfaction humaine, où un jeu d'environ 400 récepteurs peut permettre de reconnaître plusieurs milliers d'odeurs différentes. Ce fonctionnement a ainsi été mis à profit au CREAB pour le développement d'un nez électronique basé sur un capteur SPRI adapté à la détection en gaz. La présence de 18 récepteurs variés – molécules organiques ou peptides – en surface de ce capteur permet de discriminer les molécules odorantes à l'atome de carbone prêt.⁴⁶⁰

Ainsi, tel qu'on a pu le constater, le jeu de peptides utilisé présente un potentiel pour mettre en place une identification par affinité croisée. Dans un premier temps, il s'agira donc ici de rappeler quels sont les objectifs et grands principes qui sous-tendent l'analyse exploratoire de données. Ensuite nous verrons de quelle façon ils pourront s'appliquer aux données obtenues lors des répétitions des expériences de détection en sang.

4.3.4.1 Objectifs et théorie de l'analyse exploratoire de données

Les jeux de données de volume important, dits à grande dimensionnalité, sont complexes à analyser sans recours à des méthodes statistiques multivariées. Le recours à l'analyse exploratoire de données permet de faire ressortir de façon descriptive des relations entre les diverses observations réalisées. Il devient alors possible de réduire le nombre de dimensions sur lesquelles représenter graphiquement les données. Pour illustrer ce principe, on peut considérer l'arrivée d'une course cycliste (figure 4.21) : il s'agit alors d'un objet multidimensionnel (espace à 3 dimensions et temps). Pour décrire le résultat, la projection dans un sous-espace à deux dimensions est possible. Il s'agit alors de choisir la perspective fournissant l'information la plus utile. Dans l'exemple présenté, cela revient à positionner une caméra de côté sur la ligne d'arrivée qui permet de représenter en 2 dimensions le résultat de la course, mieux que ne le fait la caméra frontale.

Le même principe se retrouve dans les analyses exploratoires de données, L'avantage des méthodes statistiques alors employées est qu'elles sont descriptives. Ceci signifie que la représentation graphique



Figure 4.21 – Représentations d'une arrivée de course cycliste en deux dimensions selon des perspectives différentes.

obtenue est estimée sans avoir de modèle présupposé. Cela minimise les biais d'observation et permet également de potentiellement faire ressortir des relations non soupçonnées entre les variables observées.⁴⁶¹

L'objectif, dans le cadre d'un capteur à affinité croisée, est de classer les points de données dans différents groupes ou classes (aussi appelées *clusters*). On distingue alors deux grands types d'analyses, selon qu'elles soient supervisées ou non. La supervision des données, avec des méthodes comme l'Analyse Discriminante Linéaire (ADL), consiste à prendre en compte leur étiquetage lors du classement. Cet étiquetage correspond à la nature de l'échantillon observé – ici il s'agit de la souche bactérienne. C'est-à-dire que l'on fournit alors pour chaque observation la classe à laquelle elle doit appartenir. Les variables sont donc réduites en dimension afin de faire alors ressortir au mieux les classes prédéfinies. Toutefois, si de telles analyses sont intéressantes pour étudier les relations entre variables – ici il s'agit de nos peptides – elles restent intrinsèquement biaisées. Leur tendance à discriminer les classes prédéfinies peut engendrer une projection des observations sur des dimensions qui ne seront pas répétables avec l'accumulation des expériences. Les tentatives de classification d'échantillons inconnus sont alors peu concluantes.⁴⁶²

Pour cette raison, dans notre étude nous utiliserons des méthodes non supervisées, qui passent uniquement par l'analyse des valeurs intrinsèques liées aux données. Il convient de marquer une dernière nuance parmi les méthodes de classifications disponibles : les partitionnements binaire et probabiliste. La première, aussi appelée *hard clustering* consiste à assigner une seule classe à chaque individu. La seconde correspond à évaluer la probabilité d'appartenance à toutes les classes possibles – de 0 à 1, qui correspond du moins au plus probable.

Dans l'étude menée ici nous exploiterons une méthode d'analyse pour chaque approche : l'Analyse en Composantes Principales (ACP) couplée à une Classification Hiérarchique sur Composantes Principales (CHCP) d'une part et la classification floue d'autre part. Les deux premières méthodes seront appliquées avec le paquet `FactoMineR`,⁴⁶³ la classification floue est incluse dans le paquet `cluster`.⁴⁶⁴

L'utilisation de ces méthodes, après avoir extrait des données des grandeurs pertinentes appelées descripteurs (partie 4.3.4.3), nous permettra d'évaluer quelles sont les capacités de discrimination du système décrit dans cette thèse. Dans le cadre de l'ACP, cela mettra également en avant l'apport des différents PAM aux composantes permettant de discriminer les différentes classes identifiables. L'annexe 6.3 vient par ailleurs introduire les notions nécessaires à la compréhension des trois principales méthodes d'analyse utilisées : l'Analyse en Composantes Principales (ACP), la Classification Hiérarchique sur Composantes Principales (CHCP) et enfin la classification floue.

4.3.4.2 Principes de l'analyse de données pour l'identification dans les biocapteurs

L'analyse exploratoire de données permet d'extraire une classification depuis des observations. Cependant, pour aboutir à des résultats satisfaisants, il est préférable de préparer les données en extrayant de celles-ci des grandeurs caractéristiques. Ces dernières sont également appelées descripteurs. Le choix de ces descripteurs va s'appuyer sur deux grands principes. D'une part ils doivent être représentatifs du phénomène que l'on souhaite décrire. D'autre part ils devront être observables à chaque répétition de l'expérience.

Typiquement dans le cadre des données obtenues en SPRI sur les échantillons sanguins, on a de manière brute 13 peptides, répliqués 7 fois chacun, avec un point de mesure toutes les 3 secondes. Pour un suivi de 24 heures, cela représente plus de 2,6 millions d'observations. Il est possible de réduire le nombre de ces dimensions avant de procéder à une analyse exploratoire, sans pour autant réduire l'information apportée. Cette préparation des données peut prendre plusieurs aspects. D'une part, il y a généralement un lissage temporel, et ensuite le calcul d'une moyenne par peptide. De plus, tous les points du suivi temporel n'apportent pas autant d'informations. Par exemple, la dérive initiale lors d'un suivi ne contribue pas à identifier les bactéries contaminantes.

Au-delà des données cinétiques directes, il est possible d'extraire d'autres grandeurs caractéristiques. Comme on l'a vu en introduction, les biocapteurs présentent généralement des constantes d'affinité correspondantes à des phases d'association ou de dissociation avec leurs cibles. De telles grandeurs, ou leurs profils cinétiques associés peuvent ainsi être utilisés comme données de l'analyse exploratoire.⁴⁶⁰ L'utilisation des méthodes statistiques multidimensionnelles permet alors une description objective de la réponse du capteur en accordant la même importance à tous les récepteurs utilisés. L'analyse de la réponse globale d'un capteur à affinité croisée fournit alors plus d'informations que l'ensemble de ses récepteurs considérés individuellement.

Le concept de routine d'analyse est important, d'autant plus pour une application future en milieu clinique. Si l'approche par essai/erreur peut s'appliquer pour déterminer les combinaisons de descripteurs pertinentes, elle n'est qu'intermédiaire. En effet, une fois la combinaison optimale déterminée, un suivi additionnel ne devrait pas impliquer une modification de ces descripteurs. Il faut donc toujours appliquer à un capteur donné le même traitement statistique, sans quoi les différentes répétitions d'une expérience ne pourront pas être comparables entre elles. Si le besoin de changer ces descripteurs survenait, il faut ainsi l'appliquer rétroactivement à l'ensemble de la base de données et non seulement aux nouveaux suivis.

Nous allons donc maintenant aborder le choix des descripteurs d'intérêt pour l'identification par affinité croisée dans la méthode « Culture-Capture-Mesure » en conservant ces principes directeurs.

4.3.4.3 Descripteurs pertinents pour la détection « Culture-Capture-Mesure » large spectre

Les données issues des travaux préliminaires à la thèse (figure 2.12) ont été prétextes à la définition des descripteurs qui seront utiles pour les analyses exploratoires.

Dans le cadre d'un diagnostic de *sepsis*, la durée d'analyse est un facteur crucial, il est donc nécessaire d'utiliser des descripteurs accessibles dès que le saut de détection est atteint. Dans cette idée, toute mesure prise sur le plateau est donc à proscrire. Une autre caractéristique observée sur les suivis SPRI est le fait que les sauts de détection arrivent de manière asynchrone : les peptides les plus affins répondent en

premier. Certains plots peuvent ainsi saturer avant que d'autres n'aient effectué leur saut de détection (voir figure 4.19). Considérer un unique temps pour extraire les valeurs des descripteurs n'est donc pas possible, il est nécessaire d'utiliser un paramètre qui assure que chaque plot fournira l'information la plus pertinente. Un tel critère a déjà été introduit auparavant : le temps correspondant au maximum de la dérivée première. Celui-ci correspond en effet au point d'inflexion maximale de la courbe de variation de réflectivité. Le calcul de la dérivée et l'extraction de son maximum peuvent ainsi constituer un premier descripteur. Le temps correspondant à ce maximum de dérivée peut être considéré comme un temps de détection objectif. Le fait d'appliquer une description purement statistique permet d'éviter un biais de sélection des données. En effet, le maximum de dérivée est non équivoque, contrairement à ce que pourrait donner une lecture graphique par un observateur. Le temps de détection obtenu par le maximum de dérivée première peut être utilisé également pour récupérer la variation de réflectivité correspondante. Lors des expériences préliminaires menées en TSB, la dérive initiale est quasi nulle, la variation de réflectivité récupérée de cette façon est donc celle entre le saut et la ligne de base. Les deux descripteurs ainsi déterminés sont schématisés en figure 4.22.

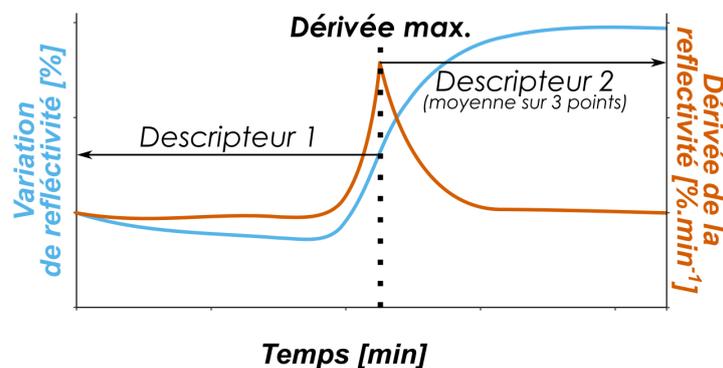


Figure 4.22 – Schématisation des deux descripteurs déterminés pour les analyses multidimensionnelles.

A noter par ailleurs que la méthode de détermination du temps de détection employée ici engendre des temps comparativement plus tardifs que la technique utilisée auparavant en « Culture-Capture-Mesure » par V. Templier.²²⁴ Celui-ci se basait sur un seuillage correspondant à la moyenne des dérivées secondes de plots de contrôle négatif, à laquelle on ajoutait 5 fois l'écart-type de ces plots. Dès qu'un plot d'anticorps dépassait ce seuil, la détection spécifique est déclenchée et le temps déterminé ainsi. Cependant, une détection plus précoce implique également une amplitude de réponse moindre, ce qui peut faire perdre de la variance aux profils alors obtenus.

Dans le cadre des données de détection préliminaires à la thèse, une observation possédait 6 peptides, avec pour chacun deux descripteurs : la dérivée maximale et l'amplitude correspondante. Les duplicats de chacun des peptides peuvent être mis à profit pour générer des combinaisons de réponses. Chaque suivi donne donc 64 combinaisons différentes (2^6), ce qui permet d'assurer que toutes les combinaisons possibles de duplicats sont représentées. Un possible biais de sélection des données est ainsi évité. De plus, on représente alors la dispersion des données, au contraire de l'utilisation de la moyenne, qui pourrait masquer la variance. De plus, l'utilisation de l'intégralité des combinaisons possibles permet également d'éviter un biais de sélection de jeux d'observations permettant une meilleure discrimination.

L'analyse en composantes principales et la classification hiérarchique qui en découle sont présentées en figure 4.23.

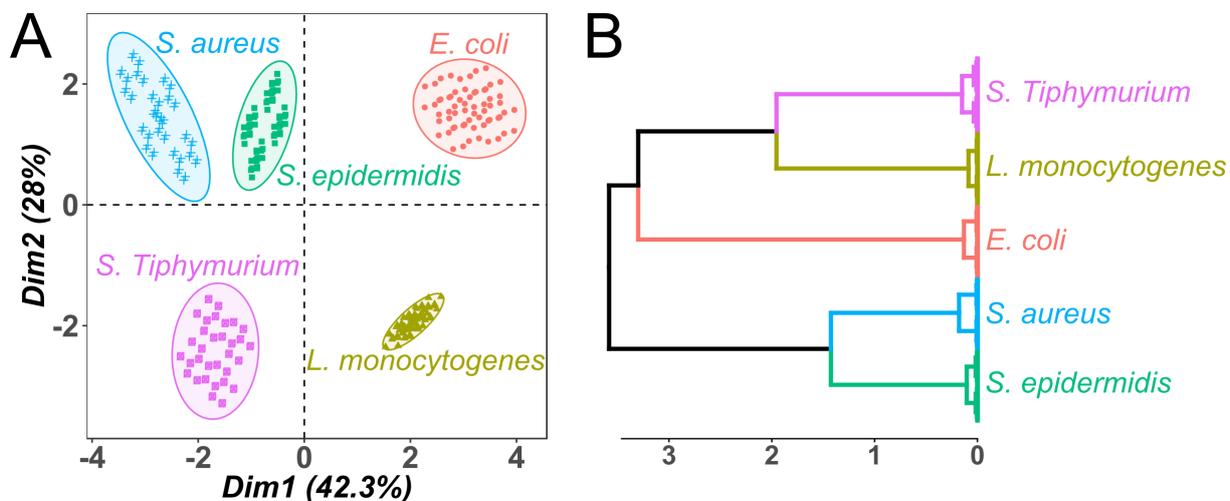


Figure 4.23 – Classification « dure » obtenue pour la détection des pathogènes issus des résultats préliminaires en TSB (figure 2.12). A – Graphe des individus pour les deux premières composantes principales. Les ellipses représentent un intervalle de confiance à 95 %. B – Dendrogramme obtenu sur les cinq premières composantes principales de l'analyse précédente. Les distances considérées sont euclidiennes.

D'une part l'ACP obtenue permet effectivement de discriminer les cinq pathogènes différents en grappes distinctes. Les deux premières dimensions des composantes principales représentent 70,3 % de la variance totale. Cela signifie que les données étaient effectivement de haute dimensionnalité, ce qui permet une bonne discrimination. De plus, cela signifie également qu'une grande partie de l'information est portée sur les composantes suivantes, justifiant donc l'emploi de la classification hiérarchique sur les composantes principales. Cette observation vient renforcer le constat d'une bonne discrimination selon cette méthode.

Les descripteurs choisis sont donc *a priori* pertinents pour la détection de bactéries en croissance par SPRI. De plus, cela vient confirmer que la variété des affinités proposées par des peptides peut effectivement permettre de fournir des profils de reconnaissance des pathogènes. Cette approche est donc *a priori* validée pour la détection SPRI.

4.3.4.4 Effets de la matrice sur l'extraction de descripteurs et lissage des données

Contrairement aux suivis en TSB, la détection en milieu complexe engendre des signaux moins simples dans l'analyse directe. Ainsi, des problèmes de bruit, dérive et saturation (figure 4.24) sont fréquents et viennent perturber l'extraction des descripteurs.

Cependant, il reste possible de préparer les données cinétiques ainsi obtenues pour arriver à extraire des descripteurs pertinents. Certains des défauts présentés en figure 4.24 peuvent être corrigés ou contournés. La figure 4.25.a montre un peptide problématique. Les interactions non-spécifiques de début de suivi peuvent être simplement ignorées par l'algorithme d'extraction des descripteurs en fixant un seuil temporel minimal avant de considérer la dérivée. Par exemple ici, on peut définir ce seuil à 1250 minutes et donc ignorer l'intégralité du suivi avant le saut de détection.

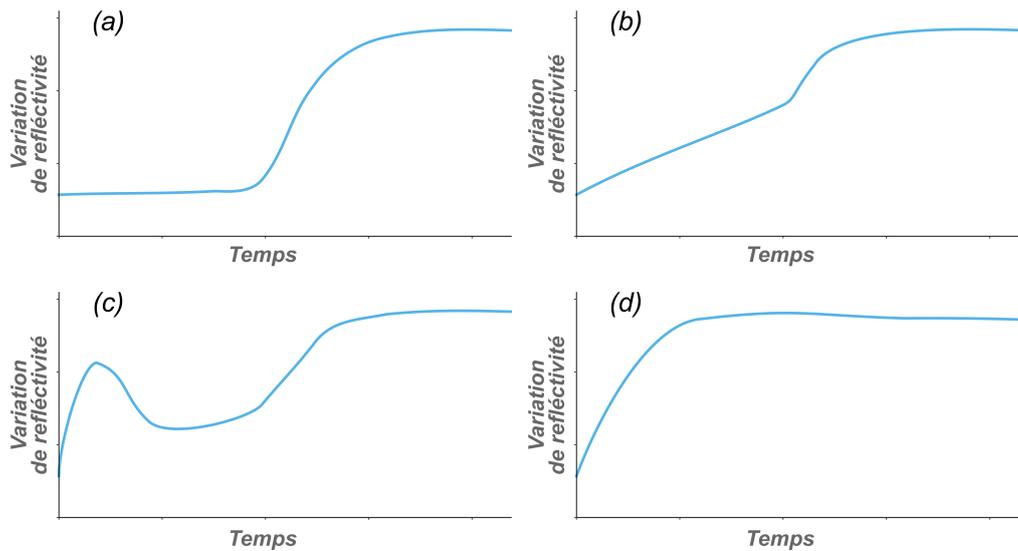


Figure 4.24 – Représentation schématique des types principaux de profils cinétiques rencontrés en sang. (a) Suivi idéal, présentant une dérive initiale faible et un saut de détection clair. (b) Suivi avec dérive initiale linéaire. (c) Suivi avec un saut de début de suivi, lié à l'accrochage puis décrochage de cellules sanguines. (d) Suivi avec dérive positive jusqu'à saturation : saut invisible.

Les dérives, positives comme négatives peuvent être corrigées du moment qu'il existe une fenêtre temporelle permettant de définir la pente et l'origine de cette dérive. Cette démarche de correction est présentée en figure 4.25. La droite affine rouge représente la régression linéaire effectuée sur une fenêtre allant de 900 à 1050 minutes. Après correction par cette droite, on observe qu'elle correspond à une ligne de base pertinente (pente et origine nulles). La valeur de réflectivité obtenue lors du saut pour ce peptide passe alors de -4 % à 21 %, ce qui devient en cohérence avec l'amplitude initialement visible. Le défaut de cette méthode reste la nécessité de définir manuellement une fenêtre temporelle adéquate pour définir la correction linéaire. Cependant, elle permet d'extraire efficacement un descripteur d'amplitude de réponse depuis un signal à forte dérive.

Enfin, la saturation d'un récepteur ou l'absence de saut de détection n'est évidemment pas corrigible et générera alors des descripteurs de valeur négligeable. Cela marque donc une des limites du système de suivi SPRI à angle de travail fixe.

Il faut souligner que la méthode de correction du signal choisie ici découle de la nature des descripteurs que l'on a prédéterminés en fonction de notre système. D'autres capteurs, par exemple sensibles à la concentration de l'analyte, peuvent nécessiter une étape supplémentaire de normalisation pour obtenir des profils répétables. Toutefois, ici ce n'est pas le cas, car au moment de la détection par notre système la concentration bactérienne est toujours similaire. C'est la charge initiale en pathogènes qui change. Le fait d'avoir toujours travaillé avec une concentration initiale inférieure à 100 UFC.ml^{-1} nous permet de minimiser l'effet de la variation du temps de détection d'un suivi à l'autre. Cette variation, si elle était d'importance, aurait pu avoir un impact négatif sur les amplitudes de détection observées, du fait que l'on se rapproche de la saturation en cas d'une dérive initiale positive très longue.

Pour résumer, le traitement d'un suivi passe par les étapes suivantes avant les analyses statistiques :

1. Lissage des données initiales, à l'aide d'un filtre passe-bas sur une fenêtre temporelle donnée ;

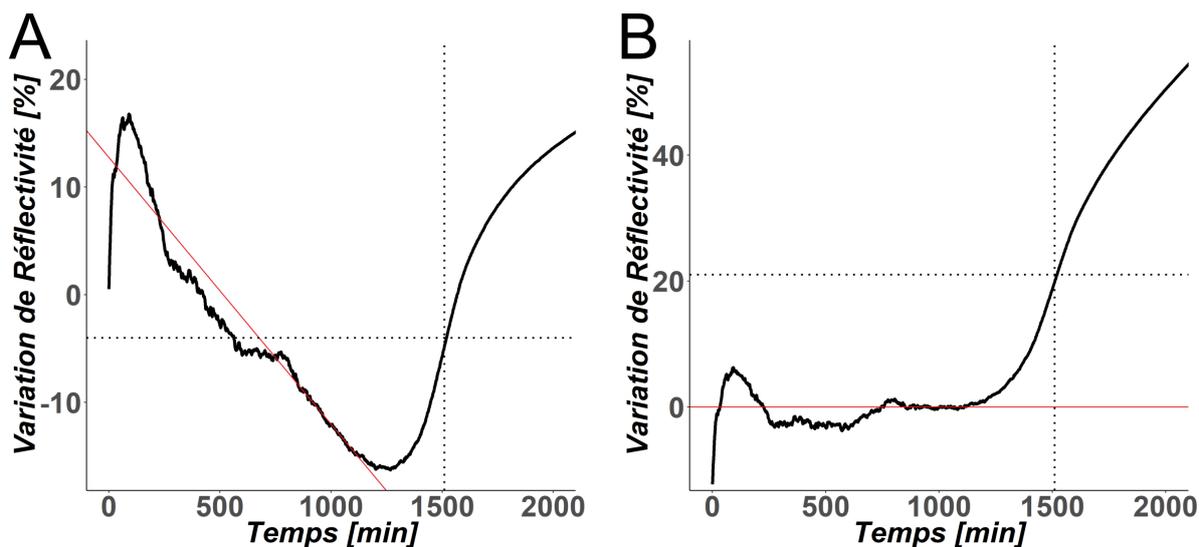


Figure 4.25 – Exemple d'un suivi cinétique SPRI avant et après correction linéaire de la dérive précédant le saut de détection. A – Données originales, uniquement lissées. B – Après correction par la dérive.

2. Moyenne par peptides ;
3. Correction de la dérive avant saut de détection ;
4. Extraction de la valeur de variation de réflectivité correspondant au temps de maximum de la première dérivée.

Ce traitement sera appliqué à toutes les répétitions des suivis qui montrent un saut de détection afin d'obtenir la base de données à analyser.

4.3.4.5 Résultats des analyses multidimensionnelles

Les expériences de détection en sang auront été répétées 13 fois en tout avec succès dans la détection des quatre pathogènes ciblés. Ce sont ces expériences qui constituent la base de données utilisée ici. Pour déterminer quels descripteurs utiliser dans les analyses sur les suivis en sang, nous repartons des descripteurs précédemment utilisés : valeur de dérivée maximale et variation de réflectivité correspondante (figure 4.22). Des analyses multivariées ont été réalisées avec les trois combinaisons possibles des descripteurs précédemment présentés. De ces analyses, il ressort que l'utilisation de la variation de réflectivité seule permet la meilleure discrimination en ACP. Les résultats de cette analyse, ainsi que la CHCP correspondante sont en figure 4.26.

D'une part, on constate que les quatre souches différentes ciblées ne sont pas totalement discriminées. Deux grappes distinctes se forment : une pour les deux souches de *S. aureus*, l'autre pour celles d'*E. coli*. Les deux premières composantes principales représentent 86,81 % de la variance totale. La première représente à elle seule 76,30 %, ce qui signifie qu'elle porte la majeure partie de l'information. Le graphe des variables montre que cette première composante est avant tout fortement corrélée avec les réponses des plots de PàCHA. De manière plus anecdotique, les deux versions de la leucocine contribuent également à cette première CP. De plus, par rapport aux deux grappes identifiées sur le graphe des individus, cette première composante suffirait à distinguer les deux espèces.

L'application de la CHCP permet d'évaluer l'information contenue dans les cinq premières compo-

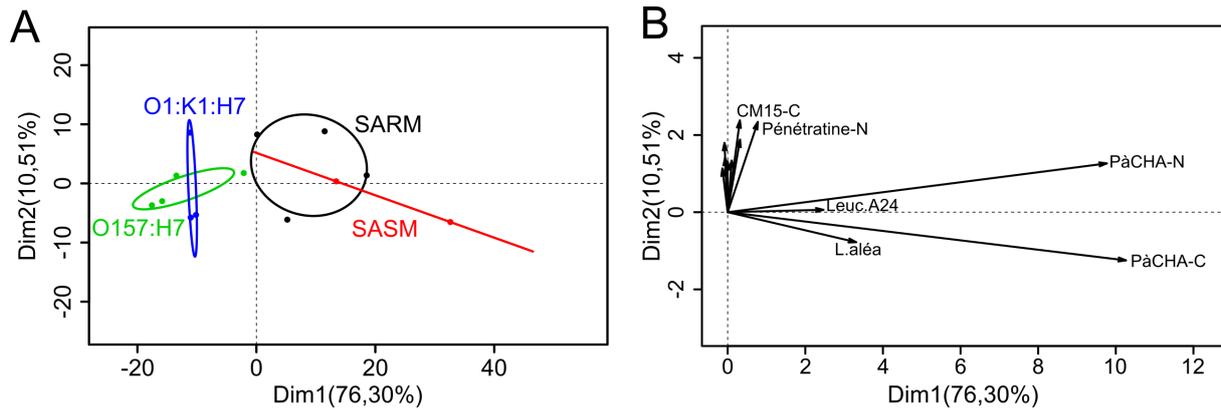


Figure 4.26 – Analyse en Composantes Principales sur les résultats cinétiques corrigés. A – Projection sur les deux premières composantes principales pour le graphe des individus. Les ellipses représentent un intervalle de confiance à 95 %. B – Corrélations des variables sur chacune des deux premières composantes principales. Seules les 6 variables les plus contributives sont étiquetées.

santes principales (figure 4.27). Ces CP portent 98 % de la variance totale.

Les deux branches principales de la CHCP correspondent aux deux groupes qui se distinguaient lors de l'ACP. Elles rassemblent d'une part les suivis ciblant *E. coli* et d'autre part ceux ciblant *S. aureus*. Toutefois, un suivi de détection de SARM est mal classé, ce qui n'était pas le cas dans le graphe présentant les deux premières CP. Cela résulte d'une similarité forte sur les autres dimensions entre ce suivi et ceux d'*E. coli*. Un tel résultat provient directement d'une similarité trop élevée entre les réponses des peptides d'une bactérie à l'autre lorsque l'on considère les composantes principales suivantes.

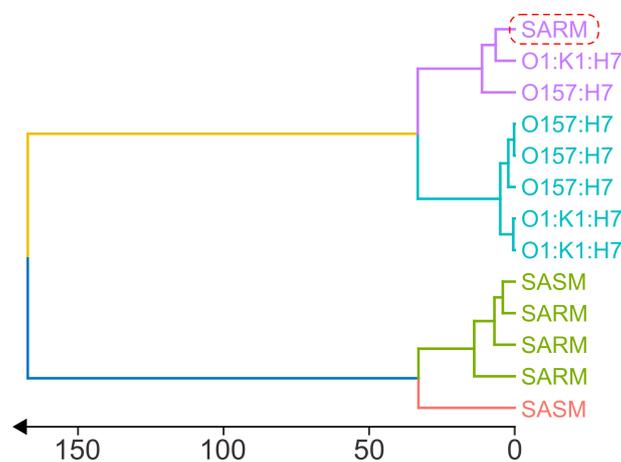


Figure 4.27 – Classification Hiérarchique sur Composantes Principales à partir de l'ACP menée précédemment (figure 4.26). Les distances sont euclidiennes. Les étiquettes sont données avec le nom de la cible, ainsi que le numéro de référence du suivi. L'encadré rouge en pointillé met en avant le même suivi que sur la figure 4.28.

Le résultat du graphe de cette ACP confirme toutefois les observations déjà faites sur les suivis cinétiques. Concernant les sondes, il existe effectivement trois groupes principaux. D'une part PàCHA, qui contribue de façon significative à la variance des données sur la première CP. D'autre part, les leucocines, qui contribuent à la même composante, mais de façon moindre. Enfin, le reste des peptides contribue avant tout à la deuxième CP, qui ne permet pas de distinguer les espèces ciblées. Toutefois si les deux

premières CP donnent un résultat satisfaisant, la classification hiérarchique sur les premières dimensions amène un doute sur la fiabilité du classement. L'analyse CHCP a amené confirmation qu'il n'est *a priori* pas possible de distinguer les bactéries à la souche près. Cependant, une différence entre *S. aureus* et *E. coli* a été mise en évidence.

L'emploi de la classification floue va permettre d'assigner à chaque suivi des coefficients d'appartenance, qui mettront en évidence les suivis incertains. Comme l'ACP a montré qu'une séparation en 4 groupes différents était incertaine, la classification floue sera effectuée en cherchant à séparer les données en 2 classes seulement. Les résultats de cette classification sont représentés en figure 4.28.

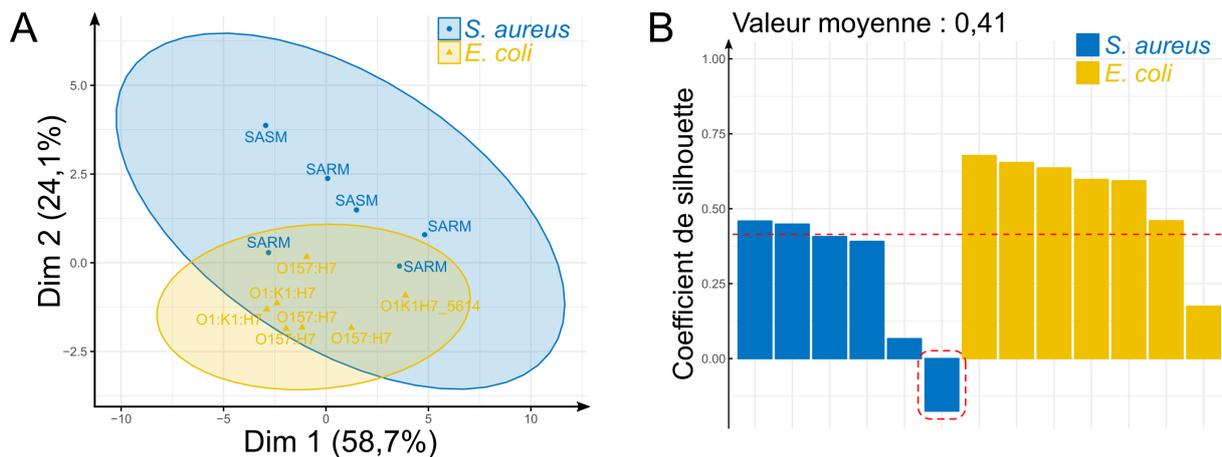


Figure 4.28 – Classification floue réalisée sur la base de données corrigée des variations de réflectivité au saut de détection. A – Partitionnement obtenu à partir des détections en sang dilué en milieu d'hémoculture. B – Coefficients de silhouette du jeu de données – *S. aureus* en bleu, *E. coli* en jaune. L'encadré rouge en pointillé met en avant le même suivi que sur la figure 4.27.

Le partitionnement ainsi obtenu classe à nouveau les suivis correctement entre les deux *clusters*. Toutefois, un recouvrement est constaté entre les groupes. L'analyse des coefficients de silhouette souligne ce fait. En effet, bien que la valeur globale soit positive (0,41), certains individus ont des coefficients proches de zéro, voire négatifs. Ce dernier correspond au suivi 5679 sur SARM, déjà incertain entre l'ACP et la CHCP. Toutefois la classification floue indique une appartenance plus probable au *cluster* regroupant les *S. aureus* (0,58).

La classification floue produit donc un partitionnement des données qui correspond à celui attendu, tout en indiquant les observations problématiques. L'interprétation est donc facilitée par rapport au couple ACP/CHCP. Cependant, contrairement à l'ACP, il n'est pas possible d'extraire les variables portant le plus d'information, car la représentation est ici basée sur les distances entre points. L'emploi de ces méthodes est donc complémentaire, notamment pour déterminer le nombre de *clusters* utilisés dans la classification floue.

4.3.4.6 Discussion sur l'apport des analyses multivariées

Les bactéries ciblées dans le cadre de ce travail ne permettent pas de définir précisément la nature de la discrimination qui a été réalisée. Celle-ci pourrait ainsi être résolue au niveau de l'espèce ou bien plus largement de la coloration de Gram ou de la morphologie (coque ou bacille). L'ACP a montré qu'il n'y avait pas une variété suffisante dans les réponses des peptides pour permettre une réelle discrimination à

la souche près. En effet, l'approche adoptée d'utiliser des peptides similaires (hélicoïdaux et cationiques) touche ici potentiellement ses limites. D'une part, les réponses obtenues ne sont pas suffisamment différentes d'un peptide à l'autre, comme on le présentait dans les résultats cinétiques. D'autre part, une part significative des réponses est potentiellement masquée par les interférences du sang.

Néanmoins, l'analyse ACP a permis de mettre en avant que la première composante principale, portée par PàCHA et la leucocine, permet une discrimination entre les deux classes. Si d'une part cela veut dire que l'emploi des statistiques multivariées n'était pas suffisant pour l'identification, cela souligne d'autre part qu'un nombre restreint de sondes peut permettre une différenciation, même en milieu sanguin. Cela encourage à développer le système en incluant des sondes peptidiques de nature différente. Par ailleurs, si la correction des signaux par la dérive a permis de rendre plus exploitables les données cinétiques, elle ne permet pas de récupérer les signaux des peptides qui ont saturé du fait de leur exposition au sang.

Enfin, il faut souligner les limites de la base de données présentée ici. Le nombre de répétitions reste négligeable par rapport à la taille d'une base pertinente cliniquement (*a minima* plusieurs milliers de répétitions²⁰⁶). De plus, la variété des souches est elle aussi négligeable par rapport à celles rencontrées dans une application réelle. Il faudrait donc avoir une variété supérieure de bactéries ciblées, mais aussi de peptides utilisés. C'est en possession d'une telle base de données qu'il sera alors possible d'estimer l'apport de la statistique multivariée et notamment la capacité de discrimination qui en découlera. La poursuite de ces travaux de thèse, par le biais d'un projet financé par l'ANR, a pour objectif d'explorer de nouveaux peptides comme sondes. L'objectif sera également de tester le système présentant ce panel élargi de sondes en évaluant sa capacité de reconnaissance des pathogènes d'espèces différentes de celles détectées jusqu'alors.

4.4 Conclusions du chapitre

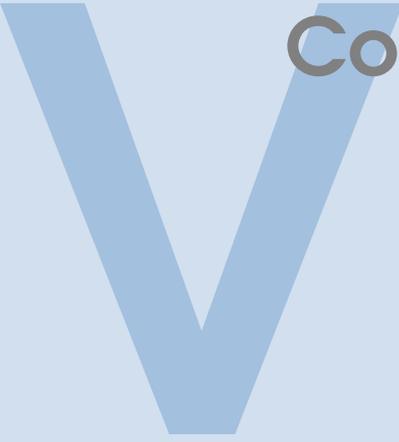
Il a été démontré dans ce chapitre que les peptides antimicrobiens employés sont adaptés à la détection en milieu sanguin. La composition complexe de ce dernier est venue imposer l'emploi d'un milieu d'hémoculture surtamponné. La présence d'une grande diversité de protéines dans le plasma engendre de fortes dérives sur le signal de détection SPR. Cette dérive a pu être réduite grâce à l'ajustement du blocage des biopuces, en substituant le PEG2000 thiolé par le PEG800. La stabilité des peptides immobilisés sur l'or a ensuite été confirmée par fluorescence. Bien que la fluorescence ne donne qu'une information partielle sur la présence des peptides, les expériences de détection des bactéries confirment que l'activité des peptides est *a fortiori* conservée.

La capacité de reconnaissance des quatre souches ciblées a été démontrée, bien qu'il reste encore à tester un panel bien plus large de cibles avant de considérer le capteur comme universel. Par ailleurs, la mise en œuvre de méthodes d'analyse multidimensionnelles a permis de mettre en évidence la possibilité d'une capacité de discrimination et donc potentiellement d'identification des pathogènes. Cependant, cette dernière caractéristique reste encore sujette à caution quant au niveau de discrimination qu'elle permettra d'atteindre. L'analyse exploratoire de données a aussi permis de mettre en évidence les peptides qui contribuent le plus à la séparation du nuage de données. Le peptide PàCHA, conçu spécialement dans le cadre de cette thèse a ainsi démontré une capacité d'interaction avec toutes les souches testées, avec une différence d'amplitude entre *S. aureus* et *E. coli*. De plus, il présente une dérive négligeable face aux protéines plasmatiques. La dérive, bien que réduite par l'apport du PEG800, reste fortement présente sur les autres peptides et a entraîné parfois une saturation partielle de la biopuce.

Le changement dans la méthodologie de suivi, en passant de l'angle fixe actuel à un balayage d'angle par exemple pourrait permettre de s'affranchir de la saturation. Une évolution vers un tel système autoriserait également l'emploi de sondes de nature variée, permettant par exemple de mettre en œuvre simultanément des peptides antimicrobiens et des sondes plus spécifiques, comme les anticorps.

Enfin, pour arriver à un système réellement employable dans le cadre de diagnostics cliniques, plusieurs verrous persistent. D'une part, les conditions de culture du système sont pour le moment uniquement adaptées aux bactéries aérobies (strictes ou facultatives). De plus, l'absence d'agitation entraîne probablement un retard dans la croissance des pathogènes au sein de l'imageur SPR. Les volumes utilisés (2 ml) sont également loin de ceux nécessaires pour des échantillons cliniques, de l'ordre de plusieurs dizaines de millilitres. Toutefois, la technologie « Culture–Capture–Mesure » est compatible avec ces volumes, comme V. Templier l'avait montré. Les analyses statistiques pour permettre l'identification des pathogènes nécessiteraient aussi un nombre bien plus élevé de répétitions avant d'être statistiquement fiables.

Néanmoins, il reste que la méthode utilisée ici permet une détection des pathogènes en milieu complexe, en moins de 24 heures. L'introduction de sondes supplémentaires, l'adaptation de la méthodologie pour rapprocher le système des conditions réelles et l'analyse d'une population bactérienne plus large sont les étapes suivantes à réaliser. Mener à bien ces objectifs pourrait à terme permettre la détection et l'identification de pathogènes en une seule étape, directement depuis l'échantillon clinique.



Conclusions et perspectives

5	Conclusions et perspectives	153
5.1	Développement de nouvelles surfaces peptidiques pour la détection	
5.2	Perspectives de développement instrumental	
5.3	De « Culture–Capture–Mesure » à « Hémo-culture–Capture–Mesure »	
5.4	Compréhension des mécanismes d’interaction entre peptides et bactéries	
5.5	Conclusion générale	

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

Les travaux menés au cours de cette thèse ont principalement porté sur l'élargissement du spectre des pathogènes reconnaissables en milieu sanguin par l'imagerie SPR et la méthode « Culture–Capture–Mesure ». Cette technique, tout d'abord développée en matrice alimentaire, puis transférée en milieu sanguin, s'était jusqu'ici toujours appuyée sur des sondes spécifiques à certaines souches pathogènes particulières. L'un de ses principaux avantages repose dans son couplage de la phase d'enrichissement bactérien avec celle de détection de la croissance. Cela permet d'obtenir en une seule étape la détection et l'identification de pathogènes, sans préparation particulière de l'échantillon. Le spectre restreint de reconnaissance de la technique, du fait de l'utilisation d'anticorps, était le principal inconvénient pour adapter le système à la détection de bactériémies. L'emploi pour la première fois de peptides antimicrobiens en matrice biologique complexe a permis d'ouvrir des perspectives intéressantes pour prolonger le développement de cette technologie.

Avant d'aborder plus précisément ces perspectives, il convient de souligner les avancées introduites par ces travaux. D'une part, il a été montré que les peptides antimicrobiens étaient employables comme sondes sur un biocapteur afin de détecter la présence de bactéries pathogènes en sang dilué au milieu d'hémoculture. Les profils des réponses obtenues dans ces conditions ont permis de détecter et distinguer *E. coli* de *S. aureus*, en respectivement moins de 10 et 22 heures, en partant de concentrations similaires à celles d'échantillons cliniques. Ces durées avant détection sont de l'ordre de celles pour obtenir la positivité de la détection par automate lors d'hémoculture. Contrairement à la technique développée dans ces travaux, ces automates ne permettent pas d'obtenir une information à propos de la nature des pathogènes présents. De plus, l'emploi de peptides, en lieu et place d'anticorps, a permis d'utiliser avec succès des biopuces plus d'un mois après leur élaboration, dans des conditions de conservation simplifiées. Ces éléments font des peptides antimicrobiens des sondes aux propriétés prometteuses pour être employées à grande échelle. Cependant, la route est encore longue avant l'application en routine de tels biocapteurs en milieu clinique.

Nous allons ici aborder quelles sont les pistes de développement possibles et évoquer les principaux verrous qui leur sont liés. Ces réflexions porteront sur l'emploi de peptides pour la détection de bactéries dans le sang, à la fois dans un cadre général, mais aussi plus particulièrement avec la méthode « Culture–Capture–Mesure ». Trois perspectives majeures seront traitées : l'ingénierie de sondes peptidiques, le perfectionnement du banc d'analyse SPRI, ainsi que les analyses de données liées aux expériences en SPRI.

5.1 Développement de nouvelles surfaces peptidiques pour la détection

Les sondes employées dans ces travaux présentaient du point de vue physico-chimique de grandes similarités, que ce soit concernant leur longueur, leur charge ou leur caractère amphiphile. Bien qu'il n'ait pas été possible au cours de cette thèse de résoudre la structure adoptée par les peptides une fois immobilisés, il est probable qu'elle soit ainsi similaire. Les différences de réponse obtenues, notamment en milieu simple, proviennent alors d'effets liés à la séquence. L'analyse exploratoire de données telle que menée ici n'a pas permis de distinguer les bactéries à la souche près, notamment en raison du manque de diversité des profils de réponse obtenus en milieu complexe. Le développement de nouvelles surfaces peptidiques pourrait permettre d'obtenir une variété supérieure de réponses à celle obtenue dans ces travaux. Deux perspectives principales pourraient offrir cette possibilité : expérimenter des variations autour de ces PAM, ou bien explorer de nouvelles séquences, encore non mises en œuvre dans les biocapteurs.

Concernant cette dernière perspective, la famille des peptides antimicrobiens est riche de milliers de séquences différentes, qui peuvent être classées dans pléthore de sous-familles en fonction des critères considérés. Ainsi, que ce soit dans cette thèse ou dans la littérature des biocapteurs basés sur les PAM, les peptides hélicoïdaux et cationiques sont majoritaires. La leucocine démontre toutefois que ces peptides ne sont pas la panacée et que des peptides à charge nette faible peuvent permettre la détection, en milieu simple, comme en sang – bien qu'avec une amplitude réduite. De plus, cette faible charge nette a présenté l'avantage de minimiser les dérives liées à l'adsorption non-spécifique de composés anioniques depuis la matrice sanguine. Ainsi explorer d'autres séquences connues qui peuvent partager ces propriétés physico-chimiques particulières dans le paysage des peptides antimicrobiens peut être une première piste.

Sur un autre plan, il n'existe pas dans la littérature d'exemple de l'emploi d'un peptide antimicrobien non linéaire comme sonde immobilisée à la surface d'un biocapteur. L'utilisation de peptides cycliques, lasso ou encore en feuillet β pourrait pourtant potentiellement introduire une plus grande variété dans les profils d'interaction avec les pathogènes ciblés. Toutefois, les mécanismes d'interaction avec les bactéries de ces peptides aux conformations particulières sont parfois encore peu connus, ce qui augmente le risque de leur faire perdre leur activité suite à une immobilisation en surface.

Ceci permet d'aborder l'autre grande perspective liée à l'ingénierie peptidique : les variations autour des séquences déjà expérimentées. Deux *modus operandi* principaux peuvent ici être distingués : d'une part, conserver la même séquence afin de l'immobiliser le plus favorablement possible, ou bien d'autre part modifier cette séquence pour améliorer les performances en détection. La seconde approche se déroulerait dans des conditions similaires au développement de PAM en tant qu'antibiotiques : substitutions d'acides aminés, génération aléatoire de séquences, etc. Cependant, appliquer ce processus a deux limites majeures : d'une part le temps mis pour obtenir une quantité suffisante de chaque variation et d'autre part, le nombre limité de plots fonctionnalisables à la surface d'un prisme. Il semblerait donc plus pertinent en première intention de se concentrer sur l'amélioration de l'immobilisation en surface des peptides les plus prometteurs – comme PàCHA ou la leucocine. Celle-ci peut se faire en variant l'orientation de l'ancrage, ou encore en modulant la longueur ou la nature de l'espaceur entre la séquence et la surface. Une amplitude de réponse supérieure serait ainsi peut-être atteinte. Il reste cependant peu probable que

cela élargisse leur spectre d'interaction : cela pourrait même le restreindre.

L'ingénierie peptidique pourrait toutefois résoudre un autre problème rencontré au cours de ces travaux : les interactions non spécifiques. Que ce soit sur les plots ou en fond de puce, l'adsorption non maîtrisée de composants du sang s'est effectivement montrée non négligeable. Si l'évaluation de différents agents bloquants a permis de mettre en avant le PEG800 thiolé comme alternative à la BSA et au PEG2000 thiolé, utilisés en première intention, il est encore possible d'améliorer cet aspect du système. La mise à l'essai d'autres types de polymères peut être la première piste venant à l'esprit. Une autre approche pourrait consister à explorer les possibilités d'hybridation des peptides antimicrobiens avec d'autres peptides, développés par ailleurs pour l'auto-assemblage sur des surfaces. L'introduction de ce type d'espaceur, aux propriétés antiadhésives, en substitution ou en complément de la triple β alanine utilisée dans ces travaux pourrait être une piste d'étude intéressante pour réduire la réponse non spécifique du capteur. Dans le même ordre d'idée, l'utilisation de peptides s'auto-assemblant dans des structures contrôlées finement en surface pourrait être une piste pour orienter à façon les sondes en surface. Les peptides non linéaires évoqués auparavant pourraient bénéficier de ce genre d'approche.

Ainsi les deux voies évoquées répondent en réalité à deux besoins du système. D'un côté la mise à profit de nouveaux types de peptides permettrait avant tout de diversifier les profils d'interaction entre sondes et bactéries, pour maximiser le potentiel d'identification par affinité croisée. D'un autre côté, les outils d'ingénierie peptidique à disposition permettent de laisser des voies d'amélioration des performances du capteur une fois qu'un panel de sondes aux réponses suffisamment diverses sera identifié. Ces deux approches complémentaires sont donc autant d'étapes à satisfaire avant d'obtenir un système en mesure d'identifier des pathogènes par affinité croisée dans le sang.

5.2 Perspectives de développement instrumental : transduction et analyse du signal

Quelles que soient les nouvelles sondes peptidiques développées pour le biocapteur SPRI, ce dernier peut également profiter d'améliorations. L'exposition des biopuces au sang dilué en milieu d'hémoculture a parfois montré une saturation de la réponse SPR avant d'observer le saut de détection. L'interrogation à angle fixe adoptée par notre système empêche de contourner cette problématique. Cependant l'appareil utilisé, équipé d'un miroir motorisé, permettrait suite au développement d'un nouveau logiciel de suivi d'obtenir une interrogation angulaire avec suivi de l'angle de résonance. Cette méthode est généralement peu utilisée en SPRI, du fait de la fréquence d'acquisition plus faible qu'elle implique, qui est peu compatible avec l'étude d'interactions biomoléculaires qui peuvent parfois se réaliser en seulement quelques secondes. Il en est autrement de la détection de pathogènes avec la méthode « Culture–Capture–Mesure » : la croissance des pathogènes est un phénomène suffisamment lent pour adopter une acquisition des données à fréquence réduite de seulement quelques points par heure. Il devient alors possible d'envisager de mesure tout au long du suivi les courbes plasmons, afin de déterminer les variations d'angle de résonance.

La réalisation de suivis en interrogation d'angle, tout en répétant des mesures de contrôle sur des échantillons sanguins issus de donneurs différents, pourrait alors permettre de caractériser au mieux la

contribution des différents phénomènes au signal SPR. Les parts liées à l'adsorption non-spécifique des protéines plasmatiques, à la croissance des bactéries ou encore à l'accroche puis décrochage des cellules sanguines sur la surface pourraient alors être déconvoluées. Il serait alors possible d'extraire du signal SPR ainsi traité une information de meilleure qualité quant à l'interaction des pathogènes avec les sondes. La qualité des analyses exploratoires de données menées à partir des descripteurs statistiques du signal ainsi obtenus ne pourrait alors qu'être supérieure à celles présentées dans ces travaux. L'identification des caractéristiques des pathogènes en présence serait alors potentiellement plus précise que la distinction entre *E. coli* et *S. aureus* atteinte ici.

5.3 Passer de « Culture–Capture–Mesure » à « Hémoculture–Capture–Mesure » : développements pour une intégration à un laboratoire de microbiologie clinique

Un système idéal de détection de bactériémie doit pouvoir détecter la présence d'une unité formant colonie dans un volume sanguin de l'ordre de 40 à 60 millilitres. Le biocapteur SPRI à peptides antimicrobiens tel qu'employé dans cette thèse a permis la détection au minimum de 0,7 UFC.ml⁻¹, pour un volume de 2 millilitres (expérience sur *S. aureus* sensible à la méticilline, données non présentées). La même méthodologie avait toutefois auparavant été adaptée pour obtenir des performances similaires dans environ 40 millilitres pour réaliser la détection avec des anticorps. Les limitations du système « Culture–Capture–Mesure » ne se trouvent donc pas au niveau du volume, mais plus précisément des conditions de l'hémoculture. En effet, si la composition du milieu est quasiment celle utilisée en laboratoire d'analyses médicales (au détail près du surtamponnage), d'autres paramètres diffèrent encore grandement. L'absence d'homogénéisation, l'expérience menée uniquement en conditions aérobies et la nécessité de réaliser un transfert de l'échantillon depuis le flacon de prélèvement vers la chambre de la SPRI sont les principaux défauts du système actuel.

Ce dernier point, bien que non abordé au cours de ces travaux, est en réalité crucial. Nous l'avons vu, la majorité des faux-positifs à la suite d'hémocultures provient de la contamination par des staphylocoques à coagulase négative, généralement suite aux manipulations des échantillons par les opérateurs chargés des prélèvements et des tests microbiologiques. Minimiser les étapes et adapter le système de détection de façon non invasive au flacon dans lequel le sang du patient est prélevé est donc nécessaire. Cette contrainte d'adapter le biocapteur de façon non invasive doit donc guider les choix effectués dans le développement d'un système adaptable à une utilisation en laboratoire de microbiologie clinique. Le système idéal doit donc soit adapter la biopuce directement sur le flacon de prélèvement, soit *via* une solution fluide à usage unique. Inclure le capteur dans les bouteilles d'hémoculture serait également une solution d'arriver à mener la détection dans des conditions anaérobies.

Concernant l'intégration d'une agitation ou d'un flux au sein de la cuve de suivi, plusieurs solutions sont envisageables. L'ajout d'une fluide active, à l'aide par exemple d'une pompe péristaltique ou d'un agitateur, est une première piste. Toutefois, un tel système actif semble difficilement compatible avec une solution non invasive du flacon d'hémoculture. La solution d'une homogénéisation grâce à un agitateur orbital semble être plus adaptée, c'est ainsi celle qui est choisie dans les automates d'hémoculture.

Enfin, il convient de souligner que malgré tout ce qui pourra être fait pour rapprocher notre système des conditions d'une hémoculture clinique, les limitations liées au fait de réaliser la détection lors de la croissance resteront toujours présentes. Ainsi, avec le type de sondes actuellement employé, il ne sera jamais possible de réaliser la détection de pathogènes non cultivables. Néanmoins, optimiser les conditions de l'hémoculture menée dans le système sera bénéfique pour diminuer le délai avant l'obtention du saut de détection en SPRI.

5.4 Compréhension des mécanismes d'interaction entre peptides et bactéries

Les travaux réalisés au cours de cette thèse visaient principalement à développer une nouvelle solution pour le diagnostic de bactériémies. Toutefois des perspectives ont pu être entrevues pour appliquer les techniques utilisées en dehors du domaine du diagnostic. Si le transfert vers d'autres milieux d'analyse, comme l'alimentaire, l'analyse des sols ou encore la stérilité d'autres liquides biologiques est une première possibilité, il y a également un potentiel intéressant pour une application fondamentale. L'immobilisation de peptides antimicrobiens sur les biopuces utilisées dans l'imageur SPR a en effet permis d'observer l'installation progressive de colonies à la surface de plots affins. La possibilité d'immobiliser en parallèle un grand nombre de peptides avec des séquences ou des orientations différentes fait de l'imagerie SPR une plateforme intéressante pour la sélection de surfaces anti- ou pro-biofilm par exemple.

Le développement de l'imagerie SPR à haute résolution, développée entre autres au CREAB, permet d'apporter des informations sur le comportement de cellules uniques sur la surface du capteur. L'emploi des PAM dans ce contexte, réalisés en collaboration avec Marine Boulade dans le cadre de sa thèse de doctorat, a par exemple permis de confirmer le caractère non lytique des leucocines et de la magainine. Ce type d'expérience pourrait rencontrer un intérêt dans la compréhension des mécanismes d'action de surfaces biocides.

Enfin, l'utilisation de capteur SPRI capable de capturer des bactéries pourrait également trouver un intérêt dans le développement d'agents antibiotiques ou antibiofilms. Il est en effet possible d'intégrer un système fluide aux capteurs SPRI pour injecter des molécules d'intérêt. Nous pouvons alors imaginer fonctionnaliser la surface entière du biocapteur avec un peptide affiné d'une bactérie ciblée, laisser cette dernière se développer sous forme biofilm puis exposer ce dernier à des préparations contenant les molécules candidates à étudier.

5.5 Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont ainsi permis d'étendre le spectre des bactéries reconnaissables à l'aide du système SPRI basé sur la méthode « Culture–Capture–Mesure », grâce à l'introduction des peptides. Ceci a été l'occasion de développer et optimiser des protocoles de fonctionnalisation, aboutissant à des puces répétables et robustes. Les peptides immobilisés sur le capteur SPRI ont permis de détecter avec succès la présence de l'intégralité des souches testées dans des conditions similaires à celles d'une hémoculture clinique. La mise en œuvre d'analyses exploratoires de données sur les résultats ainsi obtenus a permis d'entrevoir le potentiel de ce système pour l'identification de pathogènes, en milieu simple comme complexe. Enfin, si le sang a été pris dans ces travaux comme un milieu modèle de référence, d'autres contextes applicatifs pourraient à l'avenir bénéficier des développements de cette technique d'identification à large spectre. La détection de pathogènes dans d'autres liquides biologiques stériles tels que la synovie, le liquide céphalo-rachidien ou encore l'urine fait partie des évolutions futures du système. L'absence de cellules eucaryotes dans ces liquides pourrait par ailleurs faciliter l'extraction du signal lié aux bactéries alors présentes. Le potentiel entrevu de cette technologie, couplé à son adaptabilité à différents contextes, laisse ainsi présager une grande marge de progression concernant ses performances.

Les perspectives de développement évoquées dans ce chapitre sont l'objet d'un projet financé par l'Agence National de la Recherche, entre le laboratoire SyMMES, accueil principal des travaux de cette thèse, le Département de Chimie Moléculaire, ainsi que le Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble. L'objectif est de parvenir à transposer le système actuel dans un contexte clinique où il pourra être mis à l'épreuve d'échantillons réels. Telles que définies à l'été 2019, les principales étapes pour parvenir à ce résultat passent par la sélection et la synthèse d'un panel de peptides antimicrobiens aux propriétés plus variées que le jeu présenté dans ces travaux. En parallèle, le développement nécessaire à l'obtention d'un imageur SPR adapté à un suivi en interrogation d'angle dans un grand volume homogénéisé est à l'étude. La validation des performances du nouveau panel de sondes avec cet appareil modifié sera à réaliser avec un jeu de pathogènes plus large que celui testé de façon préliminaire dans cette thèse.



Annexes

6	Matériels et méthodes	161
6.1	Matériel expérimental	
6.2	Protocoles	
6.3	Traitement des données issues des suivis SPRI	
	Bibliographie	175

Chapitre 6

Matériels et méthodes

6.1 Matériel expérimental

6.1.1 Appareillages utilisés

- Congélateur -80°C pour la conservation des aliquotes de peptide et du soucier
- Réfrigérateur (2 à 8°C) et congélateur pour la conservation des échantillons
- Distributeur d'eau ultra-pure (18,2MΩ.cm), ELGA PURELAB flex (Veolia Water, France)
- Autoclave Systec DB-23 (Systec, Allemagne)
- Plasma Femto (Diener Electronic, Allemagne)
- Centrifugeuse Sigma (Bioblock Scientific)
- Étuve (Mettler, Allemagne) pour l'imageur SPR
- Étuve avec agitation pour les pré-cultures bactériennes (IKA, Allemagne)
- Étuve (BINDER, Allemagne) pour l'incubation de boîtes de Petri
- Automate de dépôt sciFLEXARRAYER (Sciencen, Allemagne)
- Imageur SPRi-Lab+ (Horiba Scientific-GenOptics, France) – source incohérente à 810 nm
- Cuve en PEEK adaptée à l'imageur SPRi (usinée au laboratoire)
- Poste de sûreté microbiologique safemate 1.2 eco (EuroClone, Italie)
- Poste de sûreté microbiologique (THERMO SCIENTIFIC, États-Unis)
- Micropipettes Research Plus – divers modèles (Eppendorf, Allemagne)
- Microscope de fluorescence Olympus BX60 – source : lampe à décharge au mercure
- Filtre adapté à la phycoérythrine : longueurs d'onde d'excitation de 520 à 550 nm et filtre d'émission 580nm à l'infrarouge – réflecteur dichroïque à 565nm
- Mesure d'angle de contact sur un appareil Windrop++, couplé au logiciel Visiodrop (GBX scientific ltd.)

6.1.2 Consommables

- Prismes en verre NBK7, recouverts de 2nm de titane et 50nm d'or (Horiba Scientific-GenOptics, France)
- Lames de verre recouvertes d'or (Schott, Yverdon, Suisse)
- Tubes de culture de 14 ml, à fond rond (VWR, États-Unis)
- Tubes FALCON de 15 et 50 ml (VWR, États-Unis)
- Boîtes de Petri stériles (Greiner Bio One, Allemagne)
- Tubes Eppendorf (de 0,2 ; 0,5 ; 1,5 et 2,0 ml) (Eppendorf, Allemagne)
- Pointes à micropipettes – divers volumes (Eppendorf, Allemagne)
- Seringues et aiguilles – divers volumes (Terumo, ThermoFisher Scientific, France)

- Filtres seringues stériles en acétate de cellulose (VWR, États-Unis)
- Filtres hydrophiles en PTFE à 0,20 μm (Millex)
- Flacons d'hémoculture BD BACTEC Plus Aerobic/F (Becton Dickinson, France) pour le prélèvement par l'EFS

6.1.3 Réactifs et produits

- Conjugué Streptavidine, R-phycoérythrine (SAPE) (Thermo Fisher Scientific - S866)
- Conjugué Biotine, N-Hydroxysuccinimide (Sigma-Aldrich - 203112)
- Poly(éthylène glycol) méthyl éther thiol : PEG2000-SH & PEG800-SH (Sigma-Aldrich - 729108 (800 Da) - 729140 (2000 Da))
- (11-Mercaptoundécyl)hexa(éthylène glycol), PEG-OH (Sigma-Aldrich - 675105)
- O-(2-Mercaptoéthyl)-O'-méthyl-hexa(éthylène glycol), PEG350 (Sigma-Aldrich - 672572)
- Albumine bovine sérique, *bovine serum albumin*, BSA (Sigma-Aldrich - A7906)

Sauf précision, tout autre composé utilisé au cours de ces travaux a été acheté auprès de Sigma-Aldrich.

Les fournisseurs des synthons nécessaires à la production des peptides sont précisés en partie 6.2.1.1.

6.1.4 Solvants, milieux de culture et tampons

- Bouillon digéré de soja caséine, *tryptic soy broth*, TSB (Sigma-Aldrich - 22092)
- Gélose trypcase soja, TSA (bioMérieux - 41466)
- Tampon phosphate salin, *phosphate buffer saline*, PBS (Sigma-Aldrich - P4417)
- Bouillon tryptone sel (bioMérieux - AEB111499)
- Surtampon phosphate pour milieu d'hémoculture, préparé à 10 x, soit 0,5 M NaH_2PO_4 et 0,22 M KH_2PO_4 . Filtré à 0,22 μm .
- *N,N*-diméthylformamide, DMF (Carlo Erba - 444923)
- Diméthylsulfoxyde, DMSO (Sigma-Aldrich - 34943)

Les fournisseurs des solvants nécessaires à la production des peptides sont précisés en partie 6.2.1.1.

6.1.5 Bactéries

- *Escherichia coli* sérotype O157:H7, achetée à l'Institut Pasteur, numéro de collection CIP105917
- *Escherichia coli* sérotype O1:K1:H7, achetée à l'ATCC, numéro de collection ATCC11775 ou CIP54.8T
- *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), achetée à l'ATCC, numéro de collection ATCC43300
- *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM), achetée à l'ATCC, numéro de collection ATCC25923 ou CIP76.25

6.1.6 Échantillons sanguins et extraction du plasma

L'Établissement Français du Sang (EFS) de Grenoble a fourni les échantillons sanguins utilisés au cours de cette thèse. Une convention est établie dans l'EFS et le CREAB concernant la cession des échantillons. Ceux-ci ne sont libérés par l'EFS uniquement à condition de constater l'absence d'anticorps

dirigés contre les virus de l'hépatite C ainsi que de l'immunodéficience humaine (anticorps anti-VIH1 et VIH2), ainsi que l'absence d'antigène de l'hépatite B. Ces vérifications font que deux jours d'attente sont nécessaires entre le prélèvement des échantillons et leur récupération pour nos expériences de détection. Cette récupération se fait après confirmation téléphonique par l'EFS de leur innocuité. L'échantillon est conservé à +4°C par l'EFS. Le prélèvement est réalisé directement dans des flacons d'hémoculture BACTEC Plus Aerobic/F.

Le flacon ainsi récupéré contient un ratio de 10 millilitres de sang pour 30 millilitres de milieu d'hémoculture BACTEC. Le sang ainsi dilué est prélevé pour être surtamponné avec le tampon phosphate 10x.

Pour l'extraction du plasma, le sang ainsi préparé est transféré en Falcon pour centrifugation à 1300 g, à température ambiante pour 10 minutes. La phase d'accélération est lente et le frein de la centrifugeuse est désactivé. Toutes ces étapes de préparation sont réalisées avec du matériel stérile sous un poste de sécurité microbiologique.

Les échantillons sanguins sont utilisés au maximum jusqu'à 5 jours après leur prélèvement.

6.1.7 Peptides

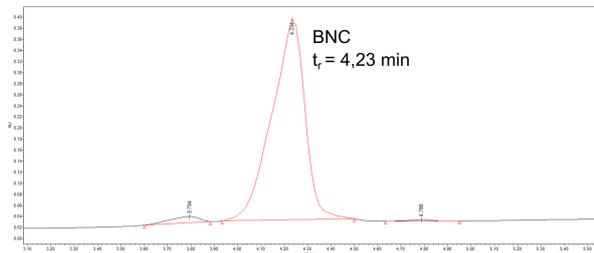
6.1.7.1 Principales caractéristiques des peptides étudiés

Nom (abrégé.)	Séquence	Long.	pI	Charge
<i>Peptides issus d'expériences antérieures au projet de thèse :</i>				
Leucocine A 24 (L)	CSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW	23	7,10	0,5
Leucocine A 24 aléatoire (L. aléa.)	CRGEWFWGNLVVSAASFGNHNAGG	23	7,10	0,5
Magainine I (MC)	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	23	10,01	3,5
<i>Peptides nouvellement introduits dans le projet :</i>				
Bac2A ³⁸³ (BN)	RLARIVVIRVAR-NH ₂	12	12,28	4
Bac2A-Sub3 ³⁸⁵ (BS)	RRWRIVVIRVRR-NH ₂	12	12,31	6
Cecropine-Melitinne 15 ³⁹⁷ (CM)	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	15	10,61	5
Pénétratine ⁴⁰³ (P)	RQIKIWFQNRMMKWKK-NH ₂	16	12,45	7
<i>Pep. à Caractère Hélicoïdal Amphiphile (PàCHA ou Pà)</i>	séquence et propriétés non divulguées			

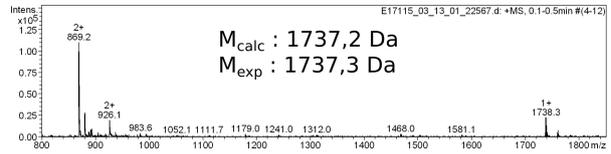
Tableau 6.1 – Propriétés principales des peptides

6.1.7.2 Résultats des synthèses de peptides

Bacténécine naturelle linéarisée – Bac2A

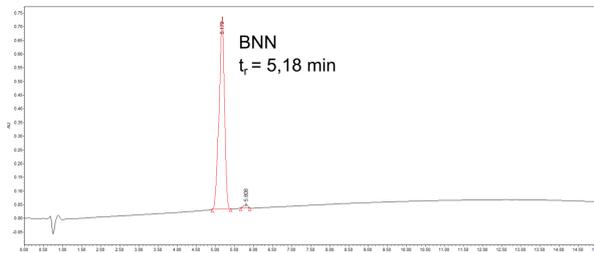


(a) HPLC analytique BNC

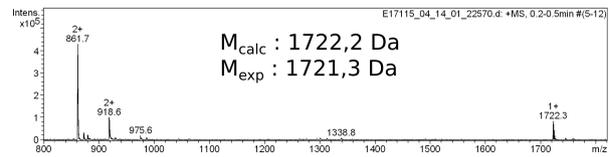


(b) ESI-MS BNC

Figure 6.1 – Analyses de Bac2A synthétisé avec espaceur et ancre en C-ter.



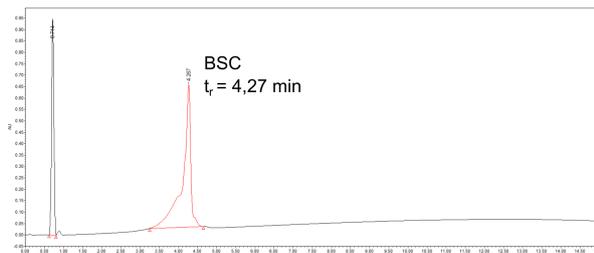
(a) HPLC analytique BNN



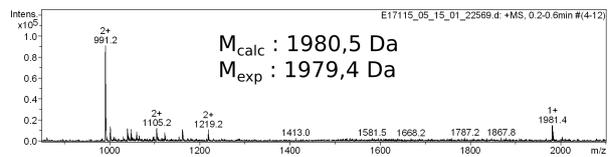
(b) ESI-MS BNN

Figure 6.2 – Analyses de Bac2A synthétisé avec espaceur et ancre en N-ter.

Bacténécine naturelle linéarisée avec substitutions – Bac2A-Sub3



(a) HPLC analytique BSC



(b) ESI-MS BSC

Figure 6.3 – Analyses de Bac2Asub3 synthétisé avec espaceur et ancre en C-ter.

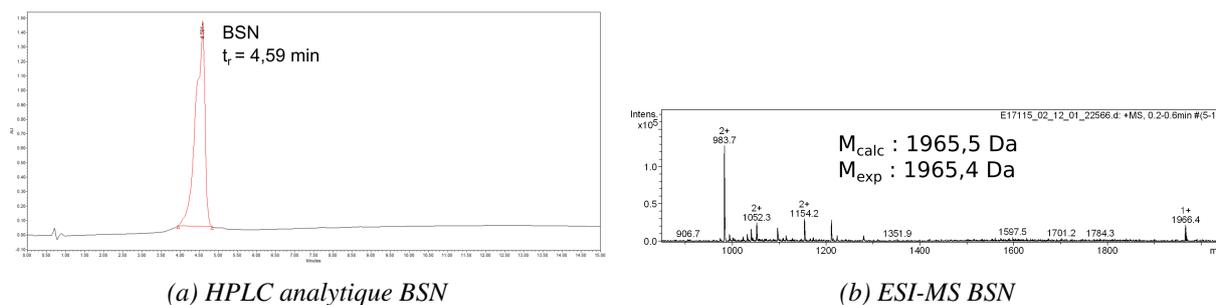


Figure 6.4 – Analyses de Bac2Asub3 synthétisé avec espaceur et ancre en N-ter.

Cécropine-Méiittine 15 – CM (15)

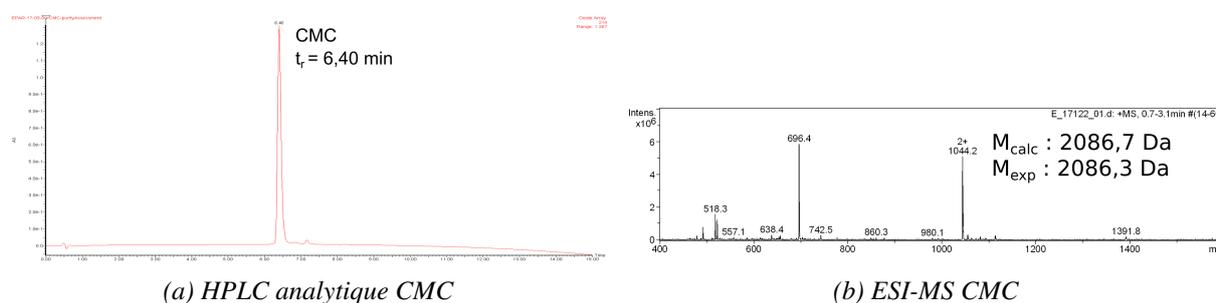


Figure 6.5 – Analyses de la cécropine-méiittine 15 synthétisée avec espaceur et ancre en C-ter.

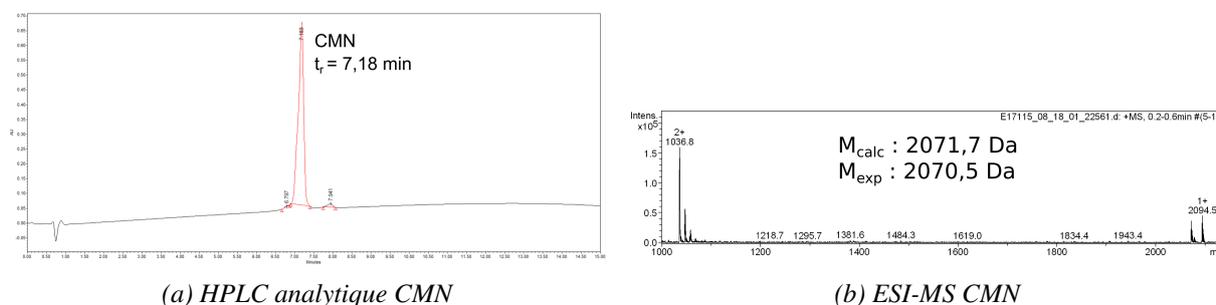


Figure 6.6 – Analyses de la cécropine-méiittine 15 synthétisée avec espaceur et ancre en N-ter.

Peptide à Caractère Hélicoïdal et Amphipathique : PàCHA – conçu *de novo*

De façon intéressante, les résultats obtenus en ESI-MS ont montré que le peptide modèle est présent uniquement sous forme dimérique pour sa version avec ancre C-terminal. Cette dimérisation provient du pontage di-sulfure entre les groupes thiol des cystéines. Toutefois une telle conformation n'entraînera théoriquement pas de problème quant à l'immobilisation sur l'or, celle-ci pouvant se faire à partir de thiols liés dans les ponts disulfure.

Pénétratine – P

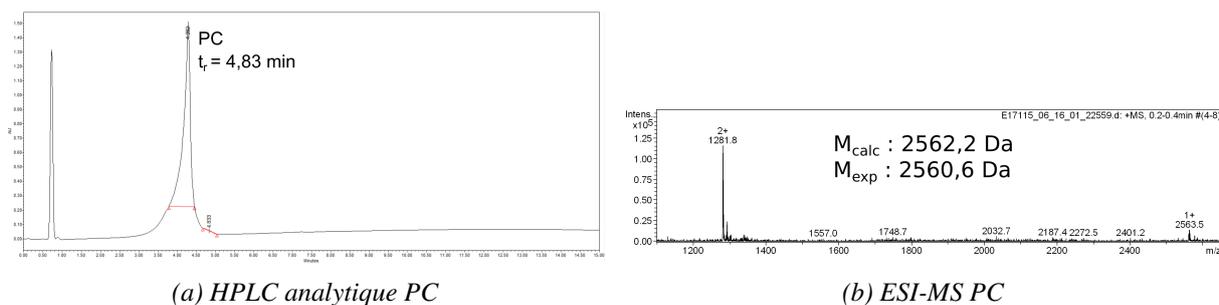


Figure 6.7 – Analyses de la pénétratine synthétisée avec espaceur et ancre en C-ter.

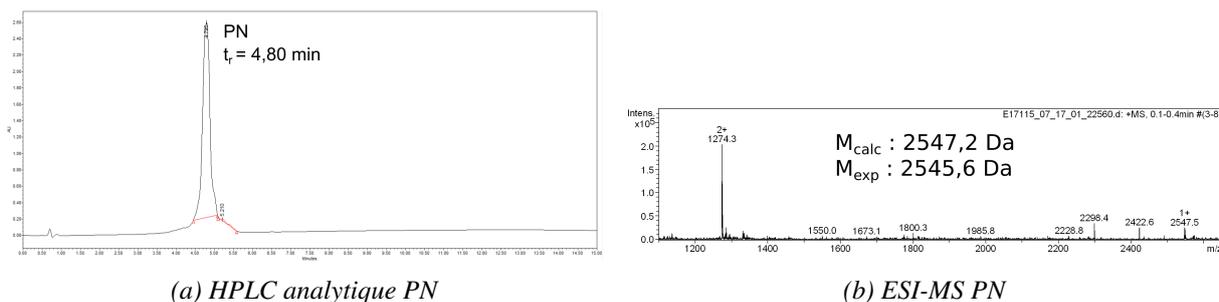


Figure 6.8 – Analyses de la pénétratine synthétisée avec espaceur et ancre en N-ter.

Peptides de références – synthétisés extérieurement

Les peptides issus des travaux préliminaires ont été synthétisés par un prestataire extérieur : Smart Bioscience (Saint Égrève, France - anciennement Smartox). Les puretés de ces peptides sont *a minima* de 90%. Ils ont été utilisés sans purification supplémentaire.

6.2 Protocoles

6.2.1 Synthèses peptidiques

6.2.1.1 Stratégie suivie pour la SPPS

Les solvants et réactifs de synthèse sont achetés auprès de Sigma-Aldrich ou Acros. Les acides aminés protégés, la résine RINK-amide ainsi que les autres synthons sont obtenus auprès d'Advanced ChemTech Europe, Bachem Biochimie ou France Biochem. Les synthèses sont réalisées sur un automate Syro II (Biotage), piloté par le logiciel Syro II XP.

Les synthèses sont réalisées selon la stratégie 9-fluorénylméthoxycarbonyl/*tert*-butyl (Fmoc/*t*Bu) sur résines RINK-amide. Cette stratégie est basée sur un cycle rinçage/déprotection/rinçage/couplage réalisé autant de fois que nécessaire pour obtenir le peptide entier. Le solvant principal est le *N,N*-diméthylformamide (DMF). La déprotection des groupes est réalisée en utilisant une solution à 40% de pipéridine en DMF, pour 10 min. L'activation se fait avec un mélange d'HBTU et de *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA), en solution dans le *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP). Une fois les étapes de couplage terminées, la résine est lavée par le dichlorométhane. Le clivage du peptide depuis la résine est ensuite assuré grâce à un cocktail d'acide trifluoroacétique (TFA), avec comme capteurs le triisopropylsilane (TIS), le 3,6-dioxa-1,8-octane-dithiol (DODT), le 1,4-diméthoxybenzène, *scavenger* et enfin de l'eau. Ce mélange

est réalisé dans les proportions suivantes : 85 % TFA ; 2,5 % TIS ; 3,75 % DODT ; 3,75 % DMB et 5 % d'eau ultra-pure. Ensuite le peptide est précipité par l'éther diéthylique avant d'être purifié.

La purification est réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance, en phase inverse (RP-HPLC) sur un appareil Gilson GX-271 (colonne Macherey-Nagel 100Å, particules C18 de 7 μm , dimensions 250 par 10 mm, opérant à 4,65 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) ou bien GX-281 (colonne Macherey-Nagel 100Å, particules C18 de 7 μm , dimensions 250 par 11 mm, opérant à 20,84 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Les gradients A :B de 5 à 100% de B étaient adaptés au besoin (A = 0,1% d'acide formique dans l'eau ; B = 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile). Les fractions récupérées en sortie de l'appareil HPLC étaient alors concentrées par évaporateur rotatif, avant d'être lyophilisées. L'analyse de la composition des poudres obtenues était menée par HPLC pour la pureté ou ESI-MS pour la masse.

6.2.1.2 Analyses

Les analyses intermédiaires de masse étaient réalisées par RP-UPLC (chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance, en phase inverse), couplé à un module ESI-MS. L'appareil utilisé est un Waters Acquity H-Class Bio UPLC, couplé au spectromètre de masse Waters SQ Detector 2. La colonne analytique employée était un modèle Phenomenex Widepore XB (C18, 300 Å, 3,6 μm , dimensions 2,1 par 50 mm). Le gradient linéaire A :B, de 5 à 100% de B est réalisé en 2,20 minutes, à un débit de 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (A = 0,1% d'acide formique dans l'eau ; B = 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile). La détection est réalisée à 214 nm.

Les analyses de masse par ESI-MS ont été réalisées sur un appareil Esquire 3000 (Bruker) par le Plateau de Spectrométrie de Masse de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble.

L'analyse de pureté des échantillons par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), sur un module de séparation Waters Alliance 2695, équipé d'un détecteur UV-visible Waters 2489. Le débit d'analyse était de 1,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, sur une colonne Nucleosile, C18, 5 μm , dimensions 125 par 3,0 mm. La mesure UV est réalisée à 214 et 250 nm, en suivant un gradient linéaire C :D en 15 minutes entre 5 et 100% de D (C = 0,1% TFA / dans l'eau ; D = 0,1% TFA dans un mélange eau/acétonitrile à 10 :90).

6.2.2 Fonctionnalisation de surfaces

6.2.2.1 Formation de monocouches auto-assemblées sur surfaces d'or

Préparation des surfaces

Les substrats destinés à être fonctionnalisés par des molécules thiolées sont dans un premier temps nettoyés en rinçant la surface à l'éthanol 96% puis à l'eau ultra-pure. Les échantillons sont alors séchés à l'aide d'un pistolet à argon, avant d'être soumis à un traitement oxydatif par plasma. Ce dernier est généré à 0,6 mbar, par un générateur pulsé à 13,56 MHz pour une puissance de 40 watts. Le mélange de gaz ainsi transformé en plasma est constitué à 75% d' O_2 et 25% d'Ar. Les échantillons sont exposés pour 3 minutes à ce traitement, puis conservés à température ambiante avant utilisation 18 à 48 heures après.

Dépôt de plots des peptides à l'automate et blocage

Les aliquotes de peptides sont conservées à -80°C en DMSO, à des concentrations comprises entre 0,5 et 2 mM. Le dépôt se fait en solvant D15G15 (15% DMF ; 15% glycérol ; 70% eau – filtré à 0,2 μm

avec un filtre hydrophile en PTFE). Les solutions de dépôt sont homogénéisées aux ultrasons pour 5 min avant d'être chargées dans la plaque multi puits de l'automate. L'humidité à l'intérieur est maintenue à une humidité relative de 60%. Lorsque le dépôt est terminé, les échantillons sont transférés dans une chambre humide afin que l'auto-assemblage se produise sur la nuit, pour une durée de 18 heures, à 25°C. La chambre humide est réalisée au nitrate de potassium, afin de maintenir l'humidité à 92% (à 25°C).

Les échantillons sont ensuite nettoyés en étant plongés dans des bains successifs, d'abord pour 1 min dans le DMF puis 1 min dans l'eau ultra-pure, avant d'être rincés sous un flux d'eau ultra-pure pour 15 secondes.

En cas de blocage de la puce par des molécules thiolés, celui-ci est alors réalisé pour 3 heures dans les mêmes conditions de température et d'humidité que précédemment. Les solutions de PEG thiolé sont à une concentration de 2 mM en eau ultra-pure. Une fois le blocage terminé, le lavage est alors réalisé uniquement sous flot d'eau ultra-pure pour 30 secondes.

Les échantillons sont alors séchés au pistolet à argon puis stockés en contenant clos à +4°C.

6.2.2.2 Biotinylation sur surface et révélation

La biotine-NHS est préparée à 20 mM en DMSO. Le tampon de couplage est réalisé à partir du couple Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 , équilibré à pH 8,50. La biotine-NHS est reprise à 250 μM dans ce tampon. Cette solution est alors déposée sur la surface à biotinyler pour une incubation de 2 heures à 25°C, en chambre humide. La surface est ensuite rincée sous flux d'eau ultra-pure avant d'être séchée au pistolet à argon.

En cas d'expérience de révélation par la SAPE, cette dernière est reprise à 5% en PBS et incubée en surface de l'échantillon biotinylé pour 10 minutes. L'échantillon est ensuite rincé au PBS puis observé en microscopie de fluorescence avec un filtre adapté à la phycoérythrine.

6.2.3 Bactéries et suivis de détection en croissance

6.2.3.1 Conservation des bactéries

Les souches bactériennes sont conservées durablement sous forme d'aliquotes au -80°C dans un milieu de congélation liquide. Le transfert à l'anse d'une anse d'inoculation vers une gélose TSA permet de constituer un souchier de travail, avec des colonies isolées. La boîte de Petri est incubée pour 18 à 24 heures à 37°C après étalement. Elle est ensuite conservée à +4°C pour utilisation des colonies dans les deux semaines. Il est alors possible de repiquer une colonie pour étalement sur une nouvelle gélose, afin de prolonger la durée de ce souchier de travail pour deux semaines supplémentaires.

6.2.3.2 Cultures bactériennes en milieu liquide

La resuspension d'une colonie bactérienne prélevée depuis le souchier de travail se fait dans 4 millilitres de TSB. Cette suspension est incubée sous agitation (200 tours par minute) à 37°C, généralement sur la nuit pour 18 heures. Le contrôle de la stérilité du TSB est effectué en parallèle, en mettant à l'incubation un tube sans y inoculer de bactéries – ce dernier doit rester limpide après incubation.

Dans le cadre des suivis avec pré-culture en deux temps, un millilitre de la suspension obtenue est alors repiqué dans quatre millilitres milieu frais. L'incubation se fait alors à nouveau pour 4 heures.

6.2.3.3 Méthodologie de dilution et préparation de l'*inoculum* pour suivi SPRI

Une fois la pré-culture terminée, elle est reprise dans une ampoule contenant 0,85% de *NaCl*, afin de mesurer sa turbidité selon les standards de McFarland. Si celle-ci est supérieure à 0,5 McF (soit une concentration d'environ $1,5 \cdot 10^8$ UFC.ml⁻¹), des dilutions en cascade d'un facteur dix sont alors effectuées, jusqu'à 10^{-6} ou 10^{-7} . Ces dilutions se font dans des tubes de tryptone sel. De façon standard, l'inoculation de la suspension bactérienne dans la cuve de la SPRI est réalisée en utilisant un volume de 100 microlitres dans 1900 microlitres de milieu déjà présent dans la chambre. Pour estimer le nombre de bactéries contenues dans cet *inoculum*, 100 microlitres des deux ou trois dernières solutions sont étalés sur gélose TSA pour pouvoir effectuer un comptage après incubation sur la nuit. Trois réplicats au moins de ces étalements sont effectués pour chaque dilution. Les étalements pris en compte pour calculer la concentration initiale sont ceux qui contiennent entre 30 et 300 colonies, conformément aux recommandations usuelles. Des contrôles de stérilité et d'homogénéité des suspensions sont également effectués.

L'imageur SPR utilisé est représenté en figure 6.9. A noter qu'après chaque expérience, seule la cuve en PEEK est réutilisée, après désinfection à l'éthanol 70% puis à l'eau de Javel (15 minutes aux ultrasons à chaque étape), ainsi qu'un rinçage à l'eau ultra-pure.



Figure 6.9 – Dispositif expérimental de l'imageur SPR. A - Ordinateur avec le logiciel pilotant l'appareil. B - Étuve pour la régulation en température du système. C - Emplacement du prisme et de la cuve. D - Source lumineuse, composée d'une diode électroluminescente, couplée au système par une fibre optique. E - Polariseur. F - Miroir pivotant. G - Lentilles. H - Caméra. Nota bene : le système est ici représenté debout, mais était utilisé couché lors des suivis, afin de positionner le prisme avec la surface orientée verticalement.

6.3 Traitement des données issues des suivis SPRI

Les traitements de données présentés dans cette thèse ont été réalisés dans le langage R. Cette annexe n'a cependant pas pour but de donner le détail du code écrit au cours de ces travaux, mais plutôt de présenter quelques-unes des étapes principales de ces traitements de données, principalement concernant les analyses statistiques multidimensionnelles.

6.3.1 Données cinétiques en représentation tuilée nuancée

Les données cinétiques SPR comprennent plusieurs dizaines de courbes à représenter lorsque les plots individuels sont considérés. Le manque de lisibilité a ainsi amené à ne représenter que les données moyennées. Ces données étant encore complexes à visualiser de cette façon, une autre représentation complémentaire a donc été introduite : le couches tuilées nuancées.

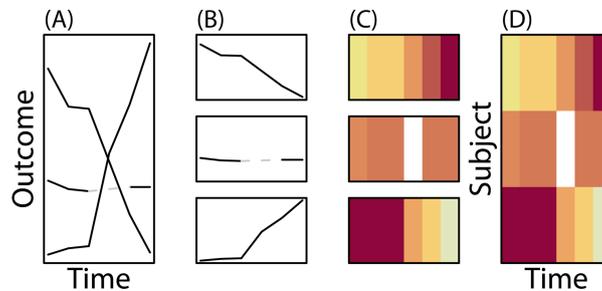


Figure 6.10 – Principe de l'obtention des couches tuilées nuancées à partir de données cinétiques. A – Représentation classique avec superposition de la trajectoire pour trois réponses. B – Séparation des réponses sur des graphes différents : satisfaisant pour un petit nombre d'individus. C – Application d'une échelle colorée en fonction des intensités de réponse. D – Groupement des différentes couches dans un seul graphique, dans lequel la densité d'information est identique au graphe A, mais avec une lisibilité accrue. Figure de SWIHART et al.⁴⁶⁵

Cette représentation tuilée nuancée ou « en lasagnes » est inspirée d'un article de SWIHART et al.⁴⁶⁵ Ces derniers ont suggéré leur emploi en complément de représentations cinétiques linéaires parfois peu claire (ou représentation « en spaghetti »). Le principe, initialement pensé pour être appliqué en immunologie, est présenté en figure 6.10. Il consiste à isoler les représentations des résultats d'un test pour différents individus en couches tuilées et colorées en fonction d'une intensité de réponse à un test (dosage d'anticorps dans le sang par exemple). De plus, cela permet d'organiser les couches entre elles selon un critère particulier. Dans le cas présenté dans la figure 6.10, ce classement est en fonction de l'intensité de réponse finale – la même logique est appliquée pour les suivis SPR représentés ainsi.

Enfin, il convient de préciser que les données présentées sont lissées avant d'être moyennées, suivant une méthode basée sur un filtre passe-bas. Brièvement, celle-ci consiste à échantillonner temporellement les données. Sur chaque intervalle de temps, le signal est décomposé selon une série de Fourier. Les fréquences hautes du signal, correspondant au bruit, sont alors éliminées pour ne conserver que la fondamentale. Cette méthode s'apparente donc à une moyenne locale, additionnée d'une suppression du bruit à haute fréquence.

6.3.2 L'analyse exploratoire de données

Cette partie vise à décrire les méthodes statistiques employées en partie 4.3.4. Dans la présentation, nous supposons que le jeu de données obtenu est résumé par une matrice M de n observations (lignes) selon k descripteurs (colonnes). Les descripteurs peuvent être soit des données expérimentales brutes, soit des grandeurs extraites ou extrapolées depuis celles-ci. Une analogie pour présenter cette notion peut être celle du décathlon : les athlètes sont les observations, tandis que leurs performances dans les différentes épreuves vont être leurs valeurs pour chaque descripteur.

6.3.2.1 Analyse en Composantes Principales (ACP)

La nature homogène ou non des descripteurs va impliquer un traitement différent des données. Dans le cas d'une homogénéité des variables, on peut se contenter de centrer la matrice M , c'est-à-dire de soustraire à chaque colonne de M sa moyenne. Pour des variables inhomogènes, il faut alors centrer puis réduire la matrice initiale. Cela revient pour chaque colonne à soustraire sa moyenne puis diviser chaque valeur par l'écart-type. Ainsi, des grandeurs différentes peuvent être comparées – variation de réflectivité et sensibilité par exemple. Ou pour reprendre l'analogie précédente avec le décathlon, cela permettrait de comparer des temps de course avec des longueurs de lancer ou de saut. C'est donc la nature homogène ou non des descripteurs qui fixe la première transformation à appliquer à la matrice M . Il faut noter cependant que la décision de réduire la matrice peut tout de même être prise dans le cas de données homogènes.

La première étape ensuite nécessaire à la réalisation de l'ACP à partir des matrices centrées et éventuellement réduites est de les multiplier par leur transposée (matrice symétrique de M suivant sa diagonale principale – soit : $M_{n,k} \rightarrow M_{k,n}$). On obtient alors soit une matrice variance-covariance (en absence de réduction) ou bien de corrélation (si M était réduite). Ces matrices carrées, de taille k sont alors diagonalisables afin d'obtenir les vecteurs propres qui serviront à construire les composantes principales. À chacune de ces composantes on peut associer la valeur propre qui représentera la variance associée. Une transformation du nuage de données initial peut alors être effectuée pour le projeter dans un repère formé par les composantes principales. Lorsque les deux à trois premières valeurs propres représentent un pourcentage élevé de la variance totale, les composantes principales associées sont alors suffisantes à décrire les données. En d'autres termes, ces étapes correspondent à projeter les données de la matrice M dans une autre base dans laquelle la variance des données sera maximisée. On peut ainsi reprendre l'analogie d'une représentation spatiale d'un objet tridimensionnel dans un plan à deux dimensions : l'ACP permet de trouver la perspective qui apporte le plus d'information sur la dispersion dans l'espace des points.

Enfin, si on étiquette chaque ligne de la matrice initiale avec la cible observée, on peut alors représenter les ellipses de confiance par rapport au barycentre de chaque groupe. Lors de l'ajout d'un échantillon inconnu, on peut donc l'identifier s'il est compris au sein d'un groupe déjà connu. Toutefois, il arrive que les deux ou trois premières composantes principales ne suffisent pas à discriminer les groupes de données. C'est dans ce cadre d'une classification hiérarchique peut être appliquée aux composantes principales.⁴⁶⁶

6.3.2.2 Classification Hiérarchique sur Composantes Principales (CHCP)

La CHCP consiste à considérer les composantes principales qui portent le plus de variance pour ensuite réaliser un arbre hiérarchique (ou dendrogramme). Le critère fixant le nombre de composantes principales à conserver est appelé critère d'agrégation. Par défaut nous le fixerons à 5. Les observations les plus similaires par rapport aux composantes principales ainsi choisies sont regroupées. La similarité entre observations est déterminée par rapport à la distance les séparant. Les observations sont alors regroupées pour maximiser les différences entre classes. La méthode de Ward⁴⁶⁷ est utilisée, ce qui minimise la variabilité interne aux groupes et maximise la variabilité entre groupes. Brièvement, elle consiste à regrouper par itérations successives les points les plus proches entre eux. Le classement commence donc par un point arbitraire, le second classé est le plus proche de ce premier. Ainsi de suite jusqu'à avoir

classé l'intégralité des points. À noter que la notion de distance utilisée ici peut prendre différentes définitions : celle appliquée est la distance dite euclidienne, correspondant à la norme du vecteur entre les deux points. Pour déterminer les distances inter-groupes, le principe du saut minimum est appliqué : on cherche alors la plus courte distance entre le nouveau point à classer et un des points déjà classés (on ne considère pas les barycentres). L'arbre hiérarchique alors obtenu permet de représenter les similarités en tenant compte de composantes principales au-delà des deux ou trois premières usuellement représentées. Cette classification peut permettre de confirmer ou infirmer la fiabilité de l'ACP, en mettant en avant des observations potentiellement mal classées.

6.3.2.3 Classification « floue » (fuzzy clustering)

Lorsque les résultats de l'ACP classique et de la CHCP sont en désaccord, l'utilisation d'une méthode probabiliste peut s'avérer intéressante. La classification floue nécessite cependant de fournir un nombre de classes k prédéterminé auxquelles assigner les observations. Cette méthode permet d'assigner une probabilité d'appartenance et donc de mettre directement en avant les observations incertaines. Des coefficients d'appartenance proches de 1 correspondront à une classification quasi binaire, tandis qu'une valeur proche de $\frac{1}{k}$ seront floues (appartenance incertaine). Le classement se fait par le calcul de la matrice de dissimilarité, qui répertorie les distances entre les observations. L'affectation des points de mesure aux *clusters* se fait par itérations successives, afin d'affiner la position des centroïdes de chaque classe. Le centre de masse change effectivement à chaque itération pour maximiser la similarité des observations dans chaque classe. La méthode détaillée, utilisée par le package `cluster`⁴⁶⁴ est décrite par KAUFMAN et ROUSSEUW,⁴⁶⁸ elle est appelée par la commande `fanny()`. Brièvement, ce principe d'itération (figuré dans un cas simple à une seule dimension en figure 6.11)

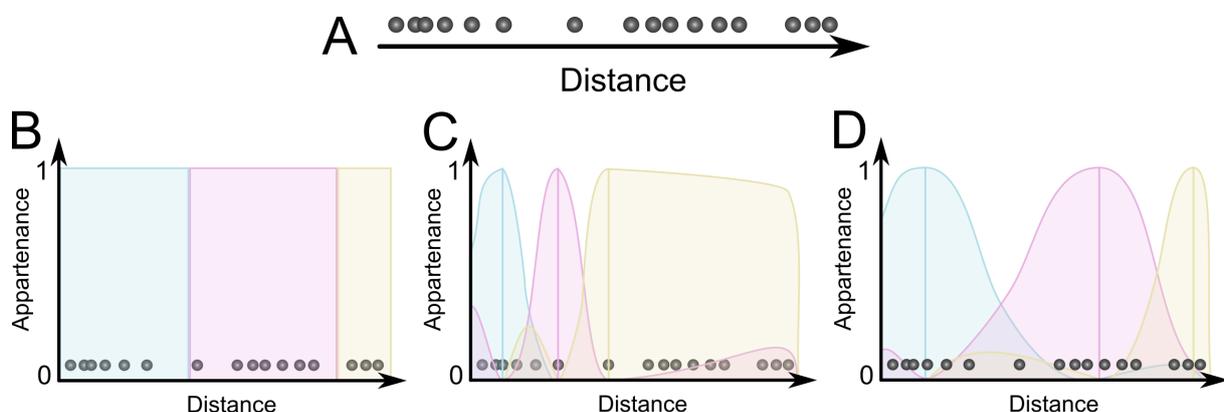


Figure 6.11 – Principe des itérations suivi dans un algorithme de classification floue. A noter qu'il s'agit ici d'une illustration schématique, et non des résultats obtenus sur un réel jeu de données. A – Données initiales mono-dimensionnelles. B – Résultat d'une classification binaire : chaque point de données n'est associé qu'à un seul groupe, avec une probabilité de 1. C – Étape initiale d'une classification floue : les centres de masse de chaque classe ont été attribués aléatoirement et les probabilités d'appartenance aux différents groupes ne sont donc pas encore réparties optimalement. D – Classification floue « satisfaisante » : les groupes de données sont répartis comme attendu par la classification binaire, tout en attribuant des probabilités à peu près équivalentes pour les points situés à la frontière entre deux groupes.

Une fois la classification obtenue, on peut vérifier sa fiabilité à l'aide du coefficient de silhouette. Pour

un point donné, il s'agit de calculer les distances moyennes avec les points des différents groupes. En effectuant la différence entre le groupe d'appartenance et les groupes voisins, on obtient un coefficient compris en -1 et 1. Lorsque la valeur est négative, le point est en moyenne plus loin des autres points de son groupe d'appartenance que de ceux du second groupe le plus probable. Deux raisons peuvent expliquer ceci : soit le nombre d'itérations de la méthode n'a pas été suffisant et les centroïdes utilisés pour définir les classes sont biaisés, soit le point a été mal classé. Deux solutions existent : procéder à des itérations supplémentaires ou définir un nombre de classes différent de celui utilisé, qui avait été déterminé *à priori*. La fiabilité globale de la classification est alors la moyenne de ces valeurs, que l'on appelle coefficient de silhouette.

6.3.2.4 Implémentation de ces méthodes d'analyses grâce au langage R

Les traitements de données ont tous été réalisés grâce au langage R, interfacé par le logiciel RSTUDIO. Les principaux paquets utilisés sont :

- `ggplot2` pour les représentations graphiques ;
- `signal` et la fonction `specgram` pour réaliser le filtre passe-bas appliqué sur les données ;
- `FactoMineR`, interfacé graphiquement par `FactoShiny`, pour réaliser les ACP (commande `PCAshiny`) ainsi que les CHCP (commande `HCPCshiny`) ;
- `cluster`, pour le *fuzzy clustering*, grâce à la commande `fanny`, dont les représentations graphiques sont assurées par la commande `fviz_cluster` et `fviz_silhouette` du paquet `factoextra`.

La documentation des différents paquets est disponible sur le site *Comprehensive R Archive Network* (`cran.r-project.org`). Elle comprend pour chacun une description des fonctions, ainsi que des exemples d'implémentation.

Bibliographie

- (1) DELORT, A.-M.; VAÏTILINGOM, M.; AMATO, P.; SANCELME, M.; PARAZOLS, M.; MAILHOT, G.; LAJ, P.; DE-GUILLAUME, L. A short overview of the microbial population in clouds : Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. *Atmos. Res.* **2010**, *98*, 249-260, DOI : 10.1016/j.atmosres.2010.07.004 (cf. p. 17).
- (2) KATO, C.; LI, L.; NOGI, Y.; NAKAMURA, Y.; TAMAOKA, J.; HORIKOSHI, K. Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 1510-1513 (cf. p. 17).
- (3) SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Are We Really Vastly Outnumbered ? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* **2016**, *164*, 337-340, DOI : 10.1016/j.cell.2016.01.013 (cf. p. 17).
- (4) GILBERT, J. A.; BLASER, M. J.; CAPORASO, J. G.; JANSSON, J. K.; LYNCH, S. V.; KNIGHT, R. Current understanding of the human microbiome. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 392-400, DOI : 10.1038/nm.4517 (cf. p. 17).
- (5) Van ELSLAND, D.; NEEFJES, J. Bacterial infections and cancer. *EMBO reports* **2018**, *19*, e46632, DOI : 10.15252/embr.201846632 (cf. p. 17).
- (6) WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals : Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *39*, 309-317, DOI : 10.1086/421946 (cf. p. 17).
- (7) VITETTA, L.; KENNER, D.; SALI, A. Bacterial Infections in Terminally Ill Hospice Patients. *J. Pain Symptom Manage.* **2000**, *20*, 326-334, DOI : 10.1016/s0885-3924(00)00189-5 (cf. p. 17).
- (8) THAI, V.; LAU, F.; WOLCH, G.; YANG, J.; QUAN, H.; FASSBENDER, K. Impact of Infections on the Survival of Hospitalized Advanced Cancer Patients. *J. Pain Symptom Manage.* **2012**, *43*, 549-557, DOI : 10.1016/j.jpainsymman.2011.04.010 (cf. p. 17).
- (9) KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections : Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2017**, *7*, 478-482, DOI : 10.1016/j.apjtb.2017.01.019 (cf. p. 17).
- (10) PEREZ-CHAPARRO, P.; MEURIC, V.; MELLO, G. D.; BONNAURE-MALLET, M. Bactériémies d'origine buccale. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **2011**, *112*, 300-303, DOI : 10.1016/j.stomax.2011.08.012 (cf. p. 17).
- (11) MINASYAN, H. Sepsis : mechanisms of bacterial injury to the patient. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* **2019**, *27*, DOI : 10.1186/s13049-019-0596-4 (cf. p. 18).
- (12) MINASYAN, H. Mechanisms and pathways for the clearance of bacteria from blood circulation in health and disease. *Pathophysiology* **2016**, *23*, 61-66, DOI : 10.1016/j.pathophys.2016.03.001 (cf. p. 18, 26).
- (13) CHALMEAU, J.; MONINA, N.; SHIN, J.; VIEU, C.; NOIREAUX, V. α -Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, *1808*, 271-278, DOI : 10.1016/j.bbamem.2010.07.027 (cf. p. 18).
- (14) SERRA, M. D.; CORAIOLA, M.; VIERO, G.; COMAI, M.; POTRICH, C.; FERRERAS, M.; BABA-MOUSSA, L.; COLIN, D. A.; MENESTRINA, G.; BHAKDI, S.; PRÉVOST, G. Staphylococcus aureus Bicomponent γ -Hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, Can Form Mixed Pores Containing All Components. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 1539-1545, DOI : 10.1021/ci050175y (cf. p. 18).
- (15) KLIENEBERGER, E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organism in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **1935**, *40*, 93-105, DOI : 10.1002/path.1700400108 (cf. p. 18).
- (16) KLIENEBERGER-NOBEL, E. Origin, Development and Significance of L-forms in Bacterial Cultures. *Journal of General Microbiology* **1949**, *3*, 434-443, DOI : 10.1099/00221287-3-3-434 (cf. p. 18).

- (17) ERRINGTON, J.; MICKIEWICZ, K.; KAWAI, Y.; WU, L. J. L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences* **2016**, *371*, 20150494, DOI : 10.1098/rstb.2015.0494 (cf. p. 18).
- (18) DEVINE, D. A.; MARSH, P. D.; PERCIVAL, R. S.; RANGARAJAN, M.; CURTIS, M. A. Modulation of antibacterial peptide activity by products of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella* spp. *Microbiology* **1999**, *145*, 965-971, DOI : 10.1099/13500872-145-4-965 (cf. p. 18).
- (19) MARKOVA, N.; SLAVCHEV, G.; MICHAILOVA, L. Presence of mycobacterial L-forms in human blood : Challenge of BCG vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **2015**, *11*, 1192-1200, DOI : 10.1080/21645515.2015.1016682 (cf. p. 18).
- (20) SCHEMBRI, M. A.; DALSGAARD, D.; KLEMM, P. Capsule Shields the Function of Short Bacterial Adhesins. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1249-1257, DOI : 10.1128/jb.186.5.1249-1257.2004 (cf. p. 18).
- (21) LAMMERS, A. J.; de PORTO, A. P.; FLORQUIN, S.; de BOER, O. J.; BOOTSMA, H. J.; HERMANS, P. W.; van der POLL, T. Enhanced vulnerability for *Streptococcus pneumoniae* sepsis during asplenia is determined by the bacterial capsule. *Immunobiology* **2011**, *216*, 863-870, DOI : 10.1016/j.imbio.2011.02.004 (cf. p. 18).
- (22) MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology* **2007**, *5*, e307, DOI : 10.1371/journal.pbio.0050307 (cf. p. 18).
- (23) STOODLEY, P.; WILSON, S.; HALL-STOODLEY, L.; BOYLE, J. D.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; COSTERTON, J. W. Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 5608-5613, DOI : 10.1128/aem.67.12.5608-5613.2001 (cf. p. 19).
- (24) JOUENNE, T. Biofilms bactériens. *Techniques de l'ingénieur* **2016**, base documentaire : TIB164DUO. fre (cf. p. 19).
- (25) HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, E.; del CAMPO, R.; TOLEDANO, V.; VALLEJO-CREMADES, M. T.; MUÑOZ, A.; LARGO, C.; ARNALICH, F.; GARCIA-RIO, F.; CUBILLOS-ZAPATA, C.; LÓPEZ-COLLAZO, E. Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth : Which do human macrophages prefer? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441*, 947-952, DOI : 10.1016/j.bbrc.2013.11.012 (cf. p. 19).
- (26) DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 167-193, DOI : 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002 (cf. p. 19).
- (27) HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms : from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 95-108, DOI : 10.1038/nrmicro821 (cf. p. 19).
- (28) KUMAR, A.; ALAM, A.; RANI, M.; EHTESHAM, N. Z.; HASNAIN, S. E. Biofilms : Survival and defense strategy for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **2017**, DOI : 10.1016/j.ijmm.2017.09.016 (cf. p. 19).
- (29) HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 322-332, DOI : 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011 (cf. p. 19).
- (30) DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 277-281, DOI : 10.3201/eid0702.010226 (cf. p. 19, 61).
- (31) DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 114-122, DOI : 10.1038/nrd1008 (cf. p. 19).
- (32) JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* **2018**, *81*, 7-11, DOI : 10.1016/j.jcma.2017.07.012 (cf. p. 19).
- (33) BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* **1992**, *101*, 1644-1655, DOI : 10.1378/chest.101.6.1644 (cf. p. 19).
- (34) BOTERO, J. S. H.; PEREZ, M. C. F. in *Sepsis - An Ongoing and Significant Challenge*; InTech : 2012, DOI : 10.5772/51484 (cf. p. 19).

- (35) BEARMAN, G. M.; WENZEL, R. P. Bacteremias : A Leading Cause of Death. *Arch. Med. Res.* **2005**, *36*, 646-659, DOI : 10.1016/j.arcmed.2005.02.005 (cf. p. 19).
- (36) LAUPLAND, K. B.; GREGSON, D. B.; FLEMONS, W. W.; HAWKINS, D.; ROSS, T.; CHURCH, D. L. Burden of community-onset bloodstream infection : a population-based assessment. *Epidemiol. Infect.* **2006**, *135*, 1037-1042, DOI : 10.1017/s0950268806007631 (cf. p. 19, 23).
- (37) GOTO, M.; AL-HASAN, M. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19*, 501-509, DOI : 10.1111/1469-0691.12195 (cf. p. 19).
- (38) WHO EXECUTIVE BOARD, éd. Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis. http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB140/B140_12-en.pdf (visité le 05/08/2019) (cf. p. 19, 21).
- (39) WORLD HEALTH ORGANIZATION, éd. Sepsis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis> (visité le 05/08/2019) (cf. p. 19).
- (40) FLEISCHMANN, C.; SCHERAG, A.; ADHIKARI, N. K. J.; HARTOG, C. S.; TSAGANOS, T.; SCHLATTMANN, P.; ANGUS, D. C.; REINHART, K. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *193*, 259-272, DOI : 10.1164/rccm.201504-0781oc (cf. p. 19).
- (41) ESPOSITO, S.; SIMONE, G. D.; BOCCIA, G.; CARO, F. D.; PAGLIANO, P. Sepsis and septic shock : New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **2017**, *10*, 204-212, DOI : 10.1016/j.jgar.2017.06.013 (cf. p. 19).
- (42) SCHULTZ, M. J.; DUNSER, M. W.; DONDORP, A. M.; ADHIKARI, N. K. J. Current challenges in the management of sepsis in ICUs in resource-poor settings and suggestions for the future. *Intensive Care Med.* **2017**, *43*, 612-624, DOI : 10.1007/s00134-017-4750-z (cf. p. 19).
- (43) VERGNANO, S.; SHARLAND, M.; KAZMBE, P.; MWANSAMBO, C.; HEATH, P. T. Neonatal sepsis : an international perspective. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* **2005**, *90*, F220-f224, DOI : 10.1136/adc.2002.022863 (cf. p. 19).
- (44) CRÉTEL, E.; VEEN, I.; PIERRES, A.; BONGRAND, P.; GAVAZZI, G. Immunosénescence et infections, mythe ou réalité ? *Médecine et Maladies Infectieuses* **2010**, *40*, 307-318, DOI : 10.1016/j.medmal.2009.12.008 (cf. p. 19).
- (45) INSTITUT PASTEUR, éd. Sepsis / septicémie : informations et traitements. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/sepsis-septicemie> (visité le 06/08/2019) (cf. p. 19).
- (46) VAZQUEZ-MARTINEZ, E. R.; GARCIA-GOMEZ, E.; CAMACHO-ARROYO, I.; GONZALEZ-PEDRAJO, B. Sexual dimorphism in bacterial infections. *Biology of Sex Differences* **2018**, *9*, DOI : 10.1186/s13293-018-0187-5 (cf. p. 19).
- (47) Van der POLL, T.; van de VEERDONK, F. L.; SCICLUNA, B. P.; NETEA, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 407-420, DOI : 10.1038/nri.2017.36 (cf. p. 19).
- (48) SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **2016**, *315*, 801, DOI : 10.1001/jama.2016.0287 (cf. p. 19, 20).
- (49) VINCENT, J.-L.; MORENO, R.; TAKALA, J.; WILLATTS, S.; MENDONÇA, A. D.; BRUINING, H.; REINHART, C. K.; SUTER, P. M.; THUIS, L. G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med.* **1996**, *22*, 707-710, DOI : 10.1007/bf01709751 (cf. p. 20).
- (50) ACCOCEBERRY, I.; CORNET, M.; LAMY, B. in SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE *Rémic 2015 : Référentiel en microbiologie médicale Tomes 1 et 2*, 2015 (cf. p. 20, 26-28, 114).
- (51) LAUPLAND, K. Incidence of bloodstream infection : a review of population-based studies. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19*, 492-500, DOI : 10.1111/1469-0691.12144 (cf. p. 20).

- (52) WEINER, L. M.; WEBB, A. K.; LIMBAGO, B.; DUDECK, M. A.; PATEL, J.; KALLEN, A. J.; EDWARDS, J. R.; SIEVERT, D. M. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections : Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **2016**, *37*, 1288-1301, DOI : 10.1017/ice.2016.174 (cf. p. 21).
- (53) UPPU, D. S.; GHOSH, C.; HALDAR, J. Surviving sepsis in the era of antibiotic resistance : Are there any alternative approaches to antibiotic therapy? *Microb. Pathog.* **2015**, *80*, 7-13, DOI : 10.1016/j.micpath.2015.02.001 (cf. p. 21).
- (54) BABU, M.; MENON, V. P.; P, U. D. Prevalence of Antimicrobial Resistant Pathogens in Severe Sepsis and Septic Shock Patients. *Journal of Young Pharmacists* **2018**, *10*, 358-361, DOI : 10.5530/jyp.2018.10.79 (cf. p. 21).
- (55) O'NEILL, J. Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *London : Review on Antimicrobial Resistance.* **2014** (cf. p. 21, 23).
- (56) De KRAKER, M. E. A.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLOS Medicine* **2016**, *13*, e1002184, DOI : 10.1371/journal.pmed.1002184 (cf. p. 21, 23).
- (57) IWASHYNA, T. J.; ELY, E. W.; SMITH, D. M.; LANGA, K. M. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. *JAMA* **2010**, *304*, 1787, DOI : 10.1001/jama.2010.1553 (cf. p. 21).
- (58) PRESCOTT, H. C.; OSTERHOLZER, J. J.; LANGA, K. M.; ANGUS, D. C.; IWASHYNA, T. J. Late mortality after sepsis : propensity matched cohort study. *BMJ* **2016**, i2375, DOI : 10.1136/bmj.i2375 (cf. p. 21).
- (59) YENDE, S.; AUSTIN, S.; RHODES, A.; FINFER, S.; OPAL, S.; THOMPSON, T.; BOZZA, F. A.; LAROSA, S. P.; RANIERI, V. M.; ANGUS, D. C. Long-Term Quality of Life Among Survivors of Severe Sepsis. *Crit. Care Med.* **2016**, *44*, 1461-1467, DOI : 10.1097/ccm.0000000000001658 (cf. p. 21).
- (60) ADRIE, C.; ALBERTI, C.; CHAIX-COUTURIER, C.; AZOULAY, É.; de LASSENCE, A.; COHEN, Y.; MESHAKA, P.; CHEVAL, C.; THUONG, M.; TROCHÉ, G.; GARROUSTE-ORGEAS, M.; TIMSIT, J.-F. Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France : age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J. Crit. Care* **2005**, *20*, 46-58, DOI : 10.1016/j.jcrc.2004.10.005 (cf. p. 21).
- (61) EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL *The bacterial challenge : time to react*; rapp. tech.; European Union, 2009 (cf. p. 21).
- (62) PLIAKOS, E. E.; ANDREATOS, N.; SHEHADEH, F.; ZIAKAS, P. D.; MYLONAKIS, E. The Cost-Effectiveness of Rapid Diagnostic Testing for the Diagnosis of Bloodstream Infections with or without Antimicrobial Stewardship. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, DOI : 10.1128/cmr.00095-17 (cf. p. 21).
- (63) REINHART, K.; DANIELS, R.; KISSOON, N.; MACHADO, F. R.; SCHACHTER, R. D.; FINFER, S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 414-417, DOI : 10.1056/nejmp1707170 (cf. p. 21).
- (64) RHODES, A. et al. Surviving Sepsis Campaign : International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock : 2016. *Intensive Care Med.* **2017**, *43*, 304-377, DOI : 10.1007/s00134-017-4683-6 (cf. p. 21).
- (65) LEVY, M. M.; EVANS, L. E.; RHODES, A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle : 2018 update. *Intensive Care Med.* **2018**, *44*, 925-928, DOI : 10.1007/s00134-018-5085-0 (cf. p. 21).
- (66) MARIK, P. E. et al. POINT : Should the Surviving Sepsis Campaign Guidelines Be Retired? Yes. *Chest* **2019**, *155*, 12-14, DOI : 10.1016/j.chest.2018.10.008 (cf. p. 21).
- (67) LEVY, M. M. et al. COUNTERPOINT : Should the Surviving Sepsis Campaign Guidelines Be Retired? No. *Chest* **2019**, *155*, 14-17, DOI : 10.1016/j.chest.2018.10.012 (cf. p. 21).
- (68) SCALA, R.; SCHULTZ, M.; BOS, L. D.; ARTIGAS, A. New Surviving Sepsis Campaign guidelines : back to the art of medicine. *Eur. Respir. J.* **2018**, *52*, 1701818, DOI : 10.1183/13993003.01818-2017 (cf. p. 21).

- (69) TABAH, A. et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units : the EUROBACT International Cohort Study. *Intensive Care Med.* **2012**, *38*, 1930-1945, DOI : 10.1007/s00134-012-2695-9 (cf. p. 21, 23).
- (70) EDMISTON, C. E. ; GARCIA, R. ; BARNDEN, M. ; DEBAUN, B. ; JOHNSON, H. B. Rapid diagnostics for bloodstream infections : A primer for infection preventionists. *Am. J. Infect. Control* **2018**, *46*, 1060-1068, DOI : 10.1016/j.ajic.2018.02.022 (cf. p. 21).
- (71) ZASOWSKI, E. J. ; CLAEYS, K. C. ; LAGNF, A. M. ; DAVIS, S. L. ; RYBAK, M. J. Time Is of the Essence : The Impact of Delayed Antibiotic Therapy on Patient Outcomes in Hospital-Onset Enterococcal Bloodstream Infections. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, 1242-1250, DOI : 10.1093/cid/ciw110 (cf. p. 21).
- (72) WILSON, J. ; ELGOHARI, S. ; LIVERMORE, D. ; COOKSON, B. ; JOHNSON, A. ; LAMAGNI, T. ; CHRONIAS, A. ; SHERIDAN, E. Trends among pathogens reported as causing bacteraemia in England, 2004–2008. *Clinical Microbiology and Infection* **2011**, *17*, 451-458, DOI : 10.1111/j.1469-0691.2010.03262.x (cf. p. 22).
- (73) De KRAKER, M. ; JARLIER, V. ; MONEN, J. ; HEUER, O. ; van de SANDE, N. ; GRUNDMANN, H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe : trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19*, 860-868, DOI : 10.1111/1469-0691.12028 (cf. p. 22, 23).
- (74) ROYO-CEBRECOS, C. ; GUDIOL, C. ; ARDANUY, C. ; POMARES, H. ; CALVO, M. ; CARRATALÀ, J. A fresh look at polymicrobial bloodstream infection in cancer patients. *PLOS ONE* **2017**, *12*, sous la dir. de GALDIERO, M., e0185768, DOI : 10.1371/journal.pone.0185768 (cf. p. 22).
- (75) PAVLAKI, M. et al. Polymicrobial bloodstream infections : Epidemiology and impact on mortality. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **2013**, *1*, 207-212, DOI : 10.1016/j.jgar.2013.06.005 (cf. p. 22).
- (76) PAMMI, M. ; ZHONG, D. ; JOHNSON, Y. ; REVELL, P. ; VERSALOVIC, J. Polymicrobial bloodstream infections in the neonatal intensive care unit are associated with increased mortality : a case-control study. *BMC Infectious Diseases* **2014**, *14*, DOI : 10.1186/1471-2334-14-390 (cf. p. 22).
- (77) CLAEYS, K. C. ; HEIL, E. L. ; POGUE, J. M. ; LEPHART, P. R. ; JOHNSON, J. K. The Verigene dilemma : gram-negative polymicrobial bloodstream infections and clinical decision making. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *91*, 144-146, DOI : 10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.012 (cf. p. 23).
- (78) ANDERSON, D. J. ; MOEHRING, R. W. ; SLOANE, R. ; SCHMADER, K. E. ; WEBER, D. J. ; FOWLER, V. G. ; SMATHERS, E. ; SEXTON, D. J. Bloodstream Infections in Community Hospitals in the 21st Century : A Multicenter Cohort Study. *PLoS ONE* **2014**, *9*, sous la dir. de PLANET, P. J., e91713, DOI : 10.1371/journal.pone.0091713 (cf. p. 23).
- (79) LAUPLAND, K. B. ; CHURCH, D. L. Population-Based Epidemiology and Microbiology of Community-Onset Bloodstream Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 647-664, DOI : 10.1128/cmr.00002-14 (cf. p. 23).
- (80) COSGROVE, S. E. The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes : Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, S82-S89, DOI : 10.1086/499406 (cf. p. 23).
- (81) CZAPLEWSKI, L. ; BAX, R. ; CLOKIE, M. ; DAWSON, M. ; FAIRHEAD, H. ; FISCHETTI, V. A. ; FOSTER, S. ; GILMORE, B. F. ; HANCOCK, R. E. W. ; HARPER, D. ; et AL. Alternatives to antibiotics : pipeline portfolio review. *The Lancet Infectious Diseases* **2016**, *16*, 239-251, DOI : 10.1016/s1473-3099(15)00466-1 (cf. p. 23).
- (82) POOLMAN, J. T. ; ANDERSON, A. S. Escherichia coli and Staphylococcus aureus : leading bacterial pathogens of healthcare associated infections and bacteremia in older-age populations. *Expert Rev. Vaccines* **2018**, *17*, 607-618, DOI : 10.1080/14760584.2018.1488590 (cf. p. 23).
- (83) OPOTA, O. ; CROXATTO, A. ; PROD' HOM, G. ; GREUB, G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia : state of the art. *Clinical Microbiology and Infection* **2015**, *21*, 313-322, DOI : 10.1016/j.cmi.2015.01.003 (cf. p. 23, 27, 34).
- (84) ESCHERICH, T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr Med.* **1885**, *3* (cf. p. 24).
- (85) STENUTZ, R. ; WEINTRAUB, A. ; WIDMALM, G. The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews* **2006**, *30*, 382-403, DOI : 10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x (cf. p. 24).

- (86) CROSS, A.; ARTENSTEIN, A.; QUE, J.; FREDEKING, T.; FURER, E.; SADOFF, J. C.; ., S. J. C. J. Safety And Immunogenicity Of A Polyvalent Escherichia Coli Vaccine In Human Volunteers. *J. Infect. Dis.* **1994**, *170*, 834-840, DOI : 10.1093/infdis/170.4.834 (cf. p. 24).
- (87) GEUE, L.; MONECKE, S.; ENGELMANN, I.; BRAUN, S.; SLICKERS, P.; EHRLICH, R. Rapid microarray-based DNA genosotyping of Escherichia coli. *Microbiol. Immunol.* **2014**, *58*, 77-86, DOI : 10.1111/1348-0421.12120 (cf. p. 24).
- (88) WHITFIELD, C.; PAIMENT, A. Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in Escherichia coli and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2491-2502, DOI : 10.1016/j.carres.2003.08.010 (cf. p. 24).
- (89) POOLMAN, J. T.; WACKER, M. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen : Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *J Infect Dis.* **2015**, *213*, 6-13, DOI : 10.1093/infdis/jiv429 (cf. p. 24).
- (90) WILLIAMSON, D. A.; LIM, A.; WILES, S.; ROBERTS, S. A.; FREEMAN, J. T. Population-based incidence and comparative demographics of community-associated and healthcare-associated Escherichia coli bloodstream infection in Auckland, New Zealand, 2005 – 2011. *BMC Infectious Diseases* **2013**, *13*, DOI : 10.1186/1471-2334-13-385 (cf. p. 24).
- (91) YANG, S.-C.; LIN, C.-H.; ALJUFFALI, I. A.; FANG, J.-Y. Current pathogenic Escherichia coli foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch. Microbiol.* **2017**, *199*, 811-825, DOI : 10.1007/s00203-017-1393-y (cf. p. 24).
- (92) De KRAKER, M. E. A.; DAVEY, P. G.; GRUNDMANN, H. Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli Bacteremia : Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. *PLoS Medicine* **2011**, *8*, sous la dir. d'OPAL, S. M., e1001104, DOI : 10.1371/journal.pmed.1001104 (cf. p. 24, 26).
- (93) OTTER, J.; GALLETLY, T.; DAVIES, F.; HITCHCOCK, J.; GILCHRIST, M.; DYAKOVA, E.; MOOKERJEE, S.; HOLMES, A.; BRANNIGAN, E. Planning to halve Gram-negative bloodstream infection : getting to grips with healthcare-associated Escherichia coli bloodstream infection sources. *J. Hosp. Infect.* **2019**, *101*, 129-133, DOI : 10.1016/j.jhin.2018.07.033 (cf. p. 24).
- (94) EDELSBERG, J.; WEYCKER, D.; BARRON, R.; LI, X.; WU, H.; OSTER, G.; BADRE, S.; LANGEBERG, W. J.; WEBER, D. J. Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *78*, 255-262, DOI : 10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.011 (cf. p. 24).
- (95) AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL, éd. Les Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC). <https://www.anses.fr/fr/content/les-escherichia-coli-ent%C3%A9roh%C3%A9morragiques-ehec> (visité le 08/08/2019) (cf. p. 25).
- (96) COLLECTION, A. T. C., éd. Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers ATCC®11775. <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/11775.aspx> (visité le 22/11/2016) (cf. p. 25).
- (97) WERTHEIM, H. F.; MELLES, D. C.; VOS, M. C.; van LEEUWEN, W.; van BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A.; NOUWEN, J. L. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *The Lancet Infectious Diseases* **2005**, *5*, 751-762, DOI : 10.1016/s1473-3099(05)70295-4 (cf. p. 25).
- (98) PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; LESUISSE, M.; PIÉRARD, G. E. Deux bactéries et une kyrielle d'infections cutanées communes. *Revue Médicale de Liège* **2012** (cf. p. 25).
- (99) THOMER, L.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections. *Annual Review of Pathology : Mechanisms of Disease* **2016**, *11*, 343-364, DOI : 10.1146/annurev-pathol-012615-044351 (cf. p. 25).

- (100) LAUPLAND, K.; LYTYKÄINEN, O.; SGAARD, M.; KENNEDY, K.; KNUDSEN, J.; OSTERGAARD, C.; GALBRAITH, J.; VALIQUETTE, L.; JACOBSSON, G.; COLLIGNON, P.; SCHNHEYDER, H. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection : a multinational population-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19*, 465-471, DOI : 10.1111/j.1469-0691.2012.03903.x (cf. p. 26).
- (101) YAW, L. K.; ROBINSON, J. O.; HO, K. M. A comparison of long-term outcomes after meticillin-resistant and meticillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteraemia : an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases* **2014**, *14*, 967-975, DOI : 10.1016/s1473-3099(14)70876-x (cf. p. 26).
- (102) MOING, V. L.; ALLA, F.; DOCO-LECOMPTE, T.; DELAHAYE, F.; PIROTH, L.; CHIROUZE, C.; TATTEVIN, P.; LAVIGNE, J.-P.; ERPELDING, M.-L.; HOEN, B.; VANDENESCH, F.; AND, X. D. *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection and Endocarditis - A Prospective Cohort Study. *PLOS ONE* **2015**, *10*, sous la dir. de GREUB, G., e0127385, DOI : 10.1371/journal.pone.0127385 (cf. p. 26).
- (103) TACCONELLI, E.; ANGELIS, G. D.; de WAURE, C.; CATALDO, M. A.; TORRE, G. L.; CAUDA, R. Rapid screening tests for meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission : systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* **2009**, *9*, 546-554, DOI : 10.1016/s1473-3099(09)70150-1 (cf. p. 26).
- (104) JARLIER, V. Curbing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French Hospitals Through a 15-Year Institutional Control Program. *Arch. Intern. Med.* **2010**, *170*, 552, DOI : 10.1001/archinternmed.2010.32 (cf. p. 26).
- (105) ROBOTHAM, J. V.; DEENY, S. R.; FULLER, C.; HOPKINS, S.; COOKSON, B.; STONE, S. Cost-effectiveness of national mandatory screening of all admissions to English National Health Service hospitals for meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* : a mathematical modelling study. *The Lancet Infectious Diseases* **2016**, *16*, 348-356, DOI : 10.1016/s1473-3099(15)00417-x (cf. p. 26).
- (106) FÄTKENHEUER, G.; KAASCH, A. J. How deadly is meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *The Lancet Infectious Diseases* **2014**, *14*, 905-907, DOI : 10.1016/s1473-3099(14)70904-1 (cf. p. 26).
- (107) LAMY, B.; DARGÈRE, S.; ARENDRUP, M. C.; PARIENTI, J.-J.; TATTEVIN, P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, DOI : 10.3389/fmicb.2016.00697 (cf. p. 26, 113).
- (108) PATEL, R.; VETTER, E. A.; HARMSSEN, W. S.; SCHLECK, C. D.; FADEL, H. J.; COCKERILL, F. R. Optimized Pathogen Detection with 30- Compared to 20-Milliliter Blood Culture Draws. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 4047-4051, DOI : 10.1128/jcm.01314-11 (cf. p. 27).
- (109) LEE, A.; MIRRETT, S.; RELLER, L. B.; WEINSTEIN, M. P. Detection of Bloodstream Infections in Adults : How Many Blood Cultures Are Needed? *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 3546-3548, DOI : 10.1128/jcm.01555-07 (cf. p. 27, 112).
- (110) FREDRICKS, D. N.; RELMAN, D. A. Sequence-based identification of microbial pathogens : a reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol. Rev.* **1996**, *9*, 18-33 (cf. p. 27, 33).
- (111) NELSON, A.; SOYZA, A. D.; PERRY, J. D.; SUTCLIFFE, I. C.; CUMMINGS, S. P. Polymicrobial challenges to Koch's postulates : Ecological lessons from the bacterial vaginosis and cystic fibrosis microbiomes. *Innate Immunity* **2012**, *18*, 774-783, DOI : 10.1177/1753425912439910 (cf. p. 27).
- (112) MIRRETT, S.; HANSON, K. E.; RELLER, L. B. Controlled Clinical Comparison of VersaTREK and BacT/ALERT Blood Culture Systems. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *45*, 299-302, DOI : 10.1128/jcm.01697-06 (cf. p. 27).
- (113) NING, Y.; HU, R.; YAO, G.; BO, S. Time to positivity of blood culture and its prognostic value in bloodstream infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **2016**, *35*, 619-624, DOI : 10.1007/s10096-016-2580-5 (cf. p. 28).

- (114) WANG, M.-C.; LIN, W.-H.; YAN, J.-J.; FANG, H.-Y.; KUO, T.-H.; TSENG, C.-C.; WU, J.-J. Early identification of microorganisms in blood culture prior to the detection of a positive signal in the BACTEC FX system using matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **2015**, *48*, 419-424, DOI : 10.1016/j.jmii.2013.10.006 (cf. p. 28).
- (115) WEINBREN, M.; COLLINS, M.; HEATHCOTE, R.; UMAR, M.; NISAR, M.; AINGER, C.; MASTERS, P. Optimization of the blood culture pathway : a template for improved sepsis management and diagnostic antimicrobial stewardship. *J. Hosp. Infect.* **2018**, *98*, 232-235, DOI : 10.1016/j.jhin.2017.12.023 (cf. p. 29).
- (116) PERRY, J.; FREYDIÈRE, A. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 2046-2055, DOI : 10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x (cf. p. 30).
- (117) PERRY, J. D. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 449-479, DOI : 10.1128/cmr.00097-16 (cf. p. 30).
- (118) LIN, J.-N.; LAI, C.-H.; YANG, C.-H.; HUANG, Y.-H.; LIN, H.-F.; LIN, H.-H. Comparison of four automated microbiology systems with 16S rRNA gene sequencing for identification of *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia* species. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, DOI : 10.1038/s41598-017-14244-9 (cf. p. 31).
- (119) BUSZEWSKI, B.; ROGOWSKA, A.; POMASTOWSKI, P.; ZŁOCH, M.; RAILEAN-PLUGARU, V. Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. *Journal of AOAC International* **2017**, *100*, 1607-1623, DOI : 10.5740/jaoacint.17-0207 (cf. p. 32).
- (120) STEVENSON, L. G.; DRAKE, S. K.; MURRAY, P. R. Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *48*, 444-447, DOI : 10.1128/jcm.01541-09 (cf. p. 32).
- (121) MORGENTHALER, N. G.; KOSTRZEWA, M. Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis : Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit. *International Journal of Microbiology* **2015**, *2015*, 1-10, DOI : 10.1155/2015/827416 (cf. p. 32).
- (122) CAMPIGOTTO, A.; GONEAU, L.; MATUKAS, L. M. Direct identification and antimicrobial susceptibility testing of microorganisms from positive blood cultures following isolation by lysis-centrifugation. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *92*, 189-193, DOI : 10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.010 (cf. p. 32).
- (123) IDELEVICH, E.; SPARBIER, K.; KOSTRZEWA, M.; BECKER, K. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. *Clinical Microbiology and Infection* **2018**, *24*, 738-743, DOI : 10.1016/j.cmi.2017.10.016 (cf. p. 33, 37).
- (124) HRABÁK, J.; CHUDÁČKOVÁ, E.; WALKOVÁ, R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms : from Research to Routine Diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 103-114, DOI : 10.1128/cmr.00058-12 (cf. p. 33).
- (125) GE, M.-C.; KUO, A.-J.; LIU, K.-L.; WEN, Y.-H.; CHIA, J.-H.; CHANG, P.-Y.; LEE, M.-H.; WU, T.-L.; CHANG, S.-C.; LU, J.-J. Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry : Success rate, economic analysis, and clinical outcome. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **2017**, *50*, 662-668, DOI : 10.1016/j.jmii.2016.06.002 (cf. p. 33).
- (126) HOU, T.-Y.; CHIANG-NI, C.; TENG, S.-H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J. Food Drug Anal.* **2019**, *27*, 404-414, DOI : 10.1016/j.jfda.2019.01.001 (cf. p. 33).
- (127) GRENGA, L.; PIBLE, O.; ARMENGAUD, J. Pathogen proteotyping : A rapidly developing application of mass spectrometry to address clinical concerns. *Clinical Mass Spectrometry* **2019**, DOI : 10.1016/j.clinms.2019.04.004 (cf. p. 33, 37).
- (128) ARMENGAUD, J. Microbiology and infectious diseases – A wealth of novelty for the clinical laboratory. *Clinical Mass Spectrometry* **2019**, DOI : 10.1016/j.clinms.2019.04.005 (cf. p. 33).

- (129) DOERN, C. D.; BUTLER-WU, S. M. Emerging and Future Applications of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. *The Journal of Molecular Diagnostics* **2016**, *18*, 789-802, DOI : 10.1016/j.jmo1dx.2016.07.007 (cf. p. 33).
- (130) FRICKMANN, H.; ZAUTNER, A. E.; MOTER, A.; KIKHNEY, J.; HAGEN, R. M.; STENDER, H.; POPPERT, S. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory : a review. *Crit. Rev. Microbiol.* **2017**, *43*, 263-293, DOI : 10.3109/1040841x.2016.1169990 (cf. p. 33).
- (131) WOJEWODA, C. M.; SERCIA, L.; NAVAS, M.; TUOHY, M.; WILSON, D.; HALL, G. S.; PROCOP, G. W.; RICHTER, S. S. Evaluation of the Verigene Gram-Positive Blood Culture Nucleic Acid Test for Rapid Detection of Bacteria and Resistance Determinants. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 2072-2076, DOI : 10.1128/jcm.00831-13 (cf. p. 34).
- (132) GUIDO, M.; TUMOLO, M. R.; DE DONNO, A.; VERRI, T.; SERIO, F.; BAGORDO, F.; ZIZZA, A. In vitro diagnosis of sepsis : a review. *Pathology and Laboratory Medicine International* **2016**, *1*, DOI : 10.2147/plmi.s49800 (cf. p. 34).
- (133) LOONEN, A. J. M.; BOS, M. P.; van MEERBERGEN, B.; NEERKEN, S.; CATSBURG, A.; DOBBELAER, I.; PENTERMAN, R.; MAERTENS, G.; van de WIEL, P.; SVELKOUK, P.; van den BRULE, A. J. C. Comparison of Pathogen DNA Isolation Methods from Large Volumes of Whole Blood to Improve Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections. *PLoS ONE* **2013**, *8*, sous la dir. de WILLSON, R. C., e72349, DOI : 10.1371/journal.pone.0072349 (cf. p. 34).
- (134) MAFFERT, P.; REVERCHON, S.; NASSER, W.; ROZAND, C.; ABAIBOU, H. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **2017**, *36*, 1717-1731, DOI : 10.1007/s10096-017-3013-9 (cf. p. 35, 41).
- (135) IDELEVICH, E. A.; REISCHL, U.; BECKER, K. New microbiological techniques in the diagnosis of bloodstream infections. *Deutsches Aerzteblatt Online* **2018**, DOI : 10.3238/arztebl.2018.0822 (cf. p. 35, 37).
- (136) EISENHOFER, R.; MINICH, J. J.; MAROTZ, C.; COOPER, A.; KNIGHT, R.; WEYRICH, L. S. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies : Issues and Recommendations. *Trends Microbiol.* **2019**, *27*, 105-117, DOI : 10.1016/j.tim.2018.11.003 (cf. p. 36, 37).
- (137) WOLK, D. M.; JOHNSON, J. K. Rapid Diagnostics for Blood Cultures : Supporting Decisions for Antimicrobial Therapy and Value-Based Care. *The Journal of Applied Laboratory Medicine* **2018**, *3*, 686-697, DOI : 10.1373/jalm.2018.028159 (cf. p. 36).
- (138) LÓPEZ-CORTÉS, L. E.; de CUETO, M.; RODRIGUEZ-BAÑO, J. How should we best treat patients with bloodstream infections? *Future Microbiology* **2017**, *12*, 927-930, DOI : 10.2217/fmb-2017-0118 (cf. p. 36).
- (139) MADDEN, G. R.; WEINSTEIN, R. A.; SIFRI, C. D. Diagnostic Stewardship for Healthcare-Associated Infections : Opportunities and Challenges to Safely Reduce Test Use. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **2018**, *39*, 214-218, DOI : 10.1017/ice.2017.278 (cf. p. 36).
- (140) JORDANA-LLUCH, E.; GIMÉNEZ, M.; QUESADA, M. D.; AUSINA, V.; MARTRÓ, E. Improving the Diagnosis of Bloodstream Infections : PCR Coupled with Mass Spectrometry. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, 1-8, DOI : 10.1155/2014/501214 (cf. p. 36, 37).
- (141) TASSINARI, M.; ZANNOLI, S.; FARABEGOLI, P.; PEDNA, M. F.; PIERRO, A.; MASTROIANNI, A.; FONTAN, R.; LUONGO, L.; SARNATARO, G.; MENEGATTI, E.; CARUSO, A.; SAMBRI, V. Rapid diagnosis of bloodstream infections in the critically ill : Evaluation of the broad-range PCR/ESI-MS technology. *PLOS ONE* **2018**, *13*, sous la dir. de GALDIERO, M., e0197436, DOI : 10.1371/journal.pone.0197436 (cf. p. 36, 37).
- (142) CENDEJAS-BUENO, E.; ROMERO-GÓMEZ, M. P.; MINGORANCE, J. The challenge of molecular diagnosis of bloodstream infections. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*, DOI : 10.1007/s11274-019-2640-y (cf. p. 37).
- (143) SINHA, M.; JUPE, J.; MACK, H.; COLEMAN, T. P.; LAWRENCE, S. M.; FRALEY, S. I. Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, DOI : 10.1128/cmr.00089-17 (cf. p. 37).
- (144) GRUMAZ, S.; STEVENS, P.; GRUMAZ, C.; DECKER, S. O.; WEIGAND, M. A.; HOFER, S.; BRENNER, T.; von HAESLER, A.; SOHN, K. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Med.* **2016**, *8*, DOI : 10.1186/s13073-016-0326-8 (cf. p. 37).

- (145) HEWITT, F. C. ; GUERTIN, S. L. ; TERNUS, K. L. ; SCHULTE, K. ; KADAVY, D. R. Toward Rapid Sequenced-Based Detection and Characterization of Causative Agents of Bacteremia. **2017**, DOI : 10.1101/162735 (cf. p. 37).
- (146) ZACHARIOUDAKIS, I. ; ZERVOU, F. ; MYLONAKIS, E. T2 Magnetic Resonance Assay : Overview of Available Data and Clinical Implications. *Journal of Fungi* **2018**, 4, 45, DOI : 10.3390/jof4020045 (cf. p. 37).
- (147) CLANCY, C. J. ; NGUYEN, M. H. T2 magnetic resonance for the diagnosis of bloodstream infections : charting a path forward. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, 73, iv2-iv5, DOI : 10.1093/jac/dky050 (cf. p. 37).
- (148) NEELY, L. A. ; AUDEH, M. ; PHUNG, N. A. ; MIN, M. ; SUCHOCKI, A. ; PLOURDE, D. ; BLANCO, M. ; DEMAS, V. ; SKEWIS, L. R. ; ANAGNOSTOU, T. ; COLEMAN, J. J. ; WELLMAN, P. ; MYLONAKIS, E. ; LOWERY, T. J. T2 Magnetic Resonance Enables Nanoparticle-Mediated Rapid Detection of Candidemia in Whole Blood. *Science Translational Medicine* **2013**, 5, 182ra54-182ra54, DOI : 10.1126/scitranslmed.3005377 (cf. p. 37).
- (149) BEYDA, N. D. ; ALAM, M. J. ; GAREY, K. W. Comparison of the T2Dx instrument with T2Candida assay and automated blood culture in the detection of Candida species using seeded blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2013**, 77, 324-326, DOI : 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.007 (cf. p. 37).
- (150) ANGELIS, G. D. ; POSTERARO, B. ; CAROLIS, E. D. ; MENCHINELLI, G. ; FRANCESCHI, F. ; TUMBARELLO, M. ; PASCALE, G. D. ; SPANU, T. ; SANGUINETTI, M. T2Bacteria magnetic resonance assay for the rapid detection of ESKAPEc pathogens directly in whole blood. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, 73, iv20-iv26, DOI : 10.1093/jac/dky049 (cf. p. 37).
- (151) HASSIBI, A. et al. Multiplexed identification, quantification and genotyping of infectious agents using a semiconductor biochip. *Nat. Biotechnol.* **2018**, DOI : 10.1038/nbt.4179 (cf. p. 37).
- (152) ZHANG, Y. ; HU, A. ; ANDINI, N. ; YANG, S. A 'culture' shift : Application of molecular techniques for diagnosing polymicrobial infections. *Biotechnol. Adv.* **2019**, 37, 476-490, DOI : 10.1016/j.biotechadv.2019.02.013 (cf. p. 37).
- (153) YANG, Y. ; LIN, Y. ; CHEN, Z. ; GONG, T. ; YANG, P. ; GIRAULT, H. H. ; LIU, B. ; QIAO, L. Bacterial Whole Cell Typing by Mass Spectra Pattern Matching with Bootstrapping Assessment. *Anal. Chem.* **2017**, DOI : 10.1021/acs.analchem.7b03820 (cf. p. 37).
- (154) IDELEVICH, E. ; GRÜNASTEL, B. ; PETERS, G. ; BECKER, K. Direct blood culturing on solid medium outperforms an automated continuously monitored broth-based blood culture system in terms of time to identification and susceptibility testing. *New Microbes and New Infections* **2016**, 10, 19-24, DOI : 10.1016/j.nmni.2015.12.004 (cf. p. 37).
- (155) PUTTASWAMY, S. ; LEE, B. D. ; SENGUPTA, S. Novel Electrical Method for Early Detection of Viable Bacteria in Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, 49, 2286-2289, DOI : 10.1128/jcm.00369-11 (cf. p. 37, 65).
- (156) BURKLUND, A. ; ZHANG, J. X. J. Microfluidics-Based Organism Isolation from Whole Blood : An Emerging Tool for Bloodstream Infection Diagnosis. *Ann. Biomed. Eng.* **2019**, 47, 1657-1674, DOI : 10.1007/s10439-019-02256-7 (cf. p. 38).
- (157) DEN DULK, R. FlowPad : a generic microfluidics platform for a wide range of applications. https://www.epizone-eu.net/upload_mm/0/c/6/37a1e21a-2e43-42d4-ac53-5dcc6cf732e1_2109%20KEYNOTE%20AM%20DEN%20DULK.pdf (visité le 12/08/2019) (cf. p. 38).
- (158) DAO, T. N. T. ; LEE, E. Y. ; KOO, B. ; JIN, C. E. ; LEE, T. Y. ; SHIN, Y. A microfluidic enrichment platform with a recombinase polymerase amplification sensor for pathogen diagnosis. *Anal. Biochem.* **2018**, 544, 87-92, DOI : 10.1016/j.ab.2017.12.030 (cf. p. 38).
- (159) HOU, H. W. ; BHATTACHARYYA, R. P. ; HUNG, D. T. ; HAN, J. Direct detection and drug-resistance profiling of bacteremias using inertial microfluidics. *Lab. Chip* **2015**, 15, 2297-2307, DOI : 10.1039/c5lc00311c (cf. p. 38).
- (160) KANG, D.-K. ; ALI, M. M. ; ZHANG, K. ; HUANG, S. S. ; PETERSON, E. ; DIGMAN, M. A. ; GRATTON, E. ; ZHAO, W. Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection. *Nat. Commun.* **2014**, 5, DOI : 10.1038/ncomms6427 (cf. p. 38).

- (161) RENNEBERG, R.; PFEIFFER, D.; LISDAT, F.; WILSON, G.; WOLLENBERGER, U.; LIGLER, F.; TURNER, A. P. F. in *Biosensing for the 21st Century*; Springer Berlin Heidelberg : 2008, p. 1-18, DOI : 10.1007/10_2007_086 (cf. p. 39).
- (162) KISSINGER, P. T. Biosensors—a perspective. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2512-2516, DOI : 10.1016/j.bios.2004.10.004 (cf. p. 39).
- (163) SALAM, F.; ULUDAG, Y.; TOTHILL, I. E. Real-time and sensitive detection of Salmonella Typhimurium using an automated quartz crystal microbalance (QCM) instrument with nanoparticles amplification. *Talanta* **2013**, *115*, 761-767, DOI : 10.1016/j.talanta.2013.06.034 (cf. p. 40).
- (164) AHMED, A.; RUSHWORTH, J. V.; HIRST, N. A.; MILLNER, P. A. Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 631-646, DOI : 10.1128/cmr.00120-13 (cf. p. 40).
- (165) XIE, F.; YANG, H.; LI, S.; SHEN, W.; WAN, J.; JOHNSON, M. L.; WIKLE, H. C.; KIM, D.-J.; CHIN, B. A. Amorphous magnetoelastic sensors for the detection of biological agents. *Intermetallics* **2009**, *17*, 270-273, DOI : 10.1016/j.intermet.2008.07.024 (cf. p. 40).
- (166) De DIEU HABIMANA, J.; JI, J.; SUN, X. Minireview : Trends in Optical-Based Biosensors for Point-Of-Care Bacterial Pathogen Detection for Food Safety and Clinical Diagnostics. *Anal. Lett.* **2018**, 1-34, DOI : 10.1080/00032719.2018.1458104 (cf. p. 40, 41).
- (167) MONZÓ, J.; INSUA, I.; FERNANDEZ-TRILLO, F.; RODRIGUEZ, P. Fundamentals, achievements and challenges in the electrochemical sensing of pathogens. *The Analyst* **2015**, *140*, 7116-7128, DOI : 10.1039/c5an01330e (cf. p. 41).
- (168) AMIRI, M.; BEZAATPOUR, A.; JAFARI, H.; BOUKHERROUB, R.; SZUNERITS, S. Electrochemical Methodologies for the Detection of Pathogens. *ACS Sensors* **2018**, *3*, 1069-1086, DOI : 10.1021/acssensors.8b00239 (cf. p. 41).
- (169) KUSS, S.; AMIN, H. M. A.; COMPTON, R. G. Electrochemical Detection of Pathogenic Bacteria—Recent Strategies, Advances and Challenges. *Chem. Asian J.* **2018**, *13*, 2758-2769, DOI : 10.1002/asia.201800798 (cf. p. 41).
- (170) CHOI, J.; SEONG, T. W.; JEUN, M.; LEE, K. H. Field-Effect Biosensors for On-Site Detection : Recent Advances and Promising Targets. *Adv. Healthcare Mater.* **2017**, 1700796, DOI : 10.1002/adhm.201700796 (cf. p. 41).
- (171) KAISTI, M. Detection principles of biological and chemical FET sensors. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *98*, 437-448, DOI : 10.1016/j.bios.2017.07.010 (cf. p. 41).
- (172) THAKUR, B.; ZHOU, G.; CHANG, J.; PU, H.; JIN, B.; SUI, X.; YUAN, X.; YANG, C.-H.; MAGRUDER, M.; CHEN, J. Rapid detection of single E. coli bacteria using a graphene-based field-effect transistor device. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *110*, 16-22, DOI : 10.1016/j.bios.2018.03.014 (cf. p. 41).
- (173) MANNOOR, M. S.; TAO, H.; CLAYTON, J. D.; SENGUPTA, A.; KAPLAN, D. L.; NAIK, R. R.; VERMA, N.; OMENETTO, F. G.; MCALPINE, M. C. Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, DOI : 10.1038/ncomms1767 (cf. p. 41, 62, 64, 67).
- (174) SPYROPOULOS, G. D.; GELINAS, J. N.; KHODAGHOLY, D. Internal ion-gated organic electrochemical transistor : A building block for integrated bioelectronics. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaau7378, DOI : 10.1126/sciadv.aau7378 (cf. p. 41).
- (175) YOO, S. M.; LEE, S. Y. Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 7-25, DOI : 10.1016/j.tibtech.2015.09.012 (cf. p. 41).
- (176) BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Lateral flow assays : Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *82*, 286-306, DOI : 10.1016/j.trac.2016.06.006 (cf. p. 41).
- (177) LI, J.; MACDONALD, J. Multiplexed lateral flow biosensors : Technological advances for radically improving point-of-care diagnoses. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *83*, 177-192, DOI : 10.1016/j.bios.2016.04.021 (cf. p. 41).
- (178) PASHCHENKO, O.; SHELBY, T.; BANERJEE, T.; SANTRA, S. A Comparison of Optical, Electrochemical, Magnetic, and Colorimetric Point-of-Care Biosensors for Infectious Disease Diagnosis. *ACS Infectious Diseases* **2018**, *4*, 1162-1178, DOI : 10.1021/acsinfecdis.8b00023 (cf. p. 41).
- (179) DUDAK, F. C.; HAKKI, B. I. Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon resonance (SPR) biosensors. *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1003-1011, DOI : 10.1002/biot.200800316 (cf. p. 41, 47, 127).

- (180) LOPEZ, G. A.; ESTEVEZ, M.-C.; SOLER, M.; LECHUGA, L. M. Recent advances in nanoplasmonic biosensors : applications and lab-on-a-chip integration. *Nanophotonics* **2016**, *6*, 123-136, DOI : 10.1515/nanoph-2016-0101 (cf. p. 41).
- (181) GUNER, H.; OZGUR, E.; KOKTURK, G.; CELIK, M.; ESEN, E.; TOPAL, A. E.; AYAS, S.; ULUDAG, Y.; ELBUKEN, C.; DANA, A. A smartphone based surface plasmon resonance imaging (SPRi) platform for on-site biodetection. *Sens. Actuators, B* **2017**, *239*, 571-577, DOI : 10.1016/j.snb.2016.08.061 (cf. p. 41).
- (182) SQUIRES, T. M.; MESSINGER, R. J.; MANALIS, S. R. Making it stick : convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 417-426, DOI : 10.1038/nbt1388 (cf. p. 42).
- (183) HUANG, C. J.; KNOLL, W.; SESSITSCH, A.; DOSTALEK, J. SPR bacterial pathogen biosensor : The importance of fluidic conditions and probing depth. *Talanta* **2014**, *122*, 166-171, DOI : 10.1016/j.talanta.2014.01.022 (cf. p. 42, 46).
- (184) HAWKES, J. J.; LONG, M. J.; COAKLEY, W.; MCDONNELL, M. B. Ultrasonic deposition of cells on a surface. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1021-1028, DOI : 10.1016/j.bios.2003.10.003 (cf. p. 42).
- (185) ZOUROB, M.; HAWKES, J. J.; COAKLEY, W. T.; BROWN, B. J. T.; FIELDEN, P. R.; MCDONNELL, M. B.; GODDARD, N. J. Optical Leaky Waveguide Sensor for Detection of Bacteria with Ultrasound Attractor Force. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6163-6168, DOI : 10.1021/ac050605j (cf. p. 42).
- (186) GALL, I.; HERZBERG, M.; OREN, Y. The effect of electric fields on bacterial attachment to conductive surfaces. *Soft Matter* **2013**, *9*, 2443, DOI : 10.1039/c2sm27270a (cf. p. 42).
- (187) TEMPLIER, V.; ROUX, A.; ROUPIOZ, Y.; LIVACHE, T. Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors : A review. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 71-79, DOI : 10.1016/j.trac.2015.10.015 (cf. p. 42).
- (188) JAYASENA, S. D. Aptamers : An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628-1650 (cf. p. 42).
- (189) TENG, J.; YUAN, F.; YE, Y.; ZHENG, L.; YAO, L.; XUE, F.; CHEN, W.; LI, B. Aptamer-Based Technologies in Foodborne Pathogen Detection. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, DOI : 10.3389/fmicb.2016.01426 (cf. p. 42).
- (190) ALIZADEH, N.; MEMAR, M. Y.; MOADDAB, S. R.; KAFIL, H. S. Aptamer-assisted novel technologies for detecting bacterial pathogens. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *93*, 737-745, DOI : 10.1016/j.biopha.2017.07.011 (cf. p. 42).
- (191) GRAZIANI, A. C.; STETS, M. I.; LOPES, A. L. K.; SCHLUGA, P. H. C.; MARTON, S.; MENDES, I. F.; de ANDRADE, A. S. R.; KRIEGER, M. A.; CARDOSO, J. High Efficiency Binding Aptamers for a Wide Range of Bacterial Sepsis Agents. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 838-843, DOI : 10.4014/jmb.1611.11004 (cf. p. 43).
- (192) RICHTER, Ł.; JANCZUK-RICHTER, M.; NIEDZIÓŁKA-JÖNSSON, J.; PACZESNY, J.; HOŁYST, R. Recent advances in bacteriophage-based methods for bacteria detection. *Drug Discovery Today* **2018**, *23*, 448-455, DOI : 10.1016/j.drudis.2017.11.007 (cf. p. 43).
- (193) BULARD, E.; BOUCHET-SPINELLI, A.; CHAUD, P.; ROGET, A.; CALEM CZUK, R.; FORT, S.; LIVACHE, T. Carbohydrates as New Probes for the Identification of Closely Related Escherichia coli Strains Using Surface Plasmon Resonance Imaging. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 1804-1811, DOI : 10.1021/ac5037704 (cf. p. 43).
- (194) RIDER, T. H. A B Cell-Based Sensor for Rapid Identification of Pathogens. *Science* **2003**, *301*, 213-215, DOI : 10.1126/science.1084920 (cf. p. 43).
- (195) COHEN, T.; STAROSVETSKY, J.; CHERUTI, U.; ARMON, R. Whole Cell Imprinting in Sol-Gel Thin Films for Bacterial Recognition in Liquids : Macromolecular Fingerprinting. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11*, 1236-1252, DOI : 10.3390/ijms11041236 (cf. p. 43).
- (196) PAVAN, S.; BERTI, F. Short peptides as biosensor transducers. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *402*, 3055-3070, DOI : 10.1007/s00216-011-5589-8 (cf. p. 43, 61).

- (197) STERN, E.; VACIC, A.; RAJAN, N. K.; CRISCIONE, J. M.; PARK, J.; ILIC, B. R.; MOONEY, D. J.; REED, M. A.; FAHMY, T. M. Label-free biomarker detection from whole blood. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *5*, 138-142, DOI : 10.1038/nnano.2009.353 (cf. p. 44).
- (198) MIN, J.; NOTHING, M.; COBLE, B.; ZHENG, H.; PARK, J.; IM, H.; WEBER, G. F.; CASTRO, C. M.; SWIRSKI, F. K.; WEISSELEDER, R.; LEE, H. Integrated Biosensor for Rapid and Point-of-Care Sepsis Diagnosis. *ACS Nano* **2018**, *12*, 3378-3384, DOI : 10.1021/acsnano.7b08965 (cf. p. 44).
- (199) KUMAR, S.; TRIPATHY, S.; JYOTI, A.; SINGH, S. G. Recent advances in biosensors for diagnosis and detection of sepsis : A comprehensive review. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *124-125*, 205-215, DOI : 10.1016/j.bios.2018.10.034 (cf. p. 44).
- (200) KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. et al. Direct detection of bacteremia by exploiting host-pathogen interactions of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, DOI : 10.1038/s41598-019-42502-5 (cf. p. 44).
- (201) WEBSTER, T. A.; SISMAET, H. J.; CONTE, J. L.; CHAN, I.-p. J.; GOLUCH, E. D. Electrochemical detection of *Pseudomonas aeruginosa* in human fluid samples via pyocyanin. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *60*, 265-270, DOI : 10.1016/j.bios.2014.04.028 (cf. p. 44).
- (202) BACHINGER, T. Gas sensor arrays for early detection of infection in mammalian cell culture. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 395-403, DOI : 10.1016/s0956-5663(01)00315-3 (cf. p. 44).
- (203) CAREY, J. R.; SUSLICK, K. S.; HULKOWER, K. I.; IMLAY, J. A.; IMLAY, K. R. C.; INGISON, C. K.; PONDER, J. B.; SEN, A.; WITTRIG, A. E. Rapid Identification of Bacteria with a Disposable Colorimetric Sensing Array. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7571-7576, DOI : 10.1021/ja201634d (cf. p. 44).
- (204) CHU, Y. W.; WANG, B. Y.; ENGBRETSON, D. A.; CAREY, J. R. Single step, rapid identification of pathogenic microorganisms in a culture bottle. *The Analyst* **2013**, *138*, 5879, DOI : 10.1039/c3an01175e (cf. p. 44).
- (205) LIM, S. H.; MIX, S.; XU, Z.; TABA, B.; BUDVYTIENE, I.; BERLINER, A. N.; QUERALTO, N.; CHURI, Y. S.; HUANG, R. S.; EIDEN, M.; MARTINO, R. A.; RHODES, P.; BANAEI, N.; LAND, G. A. Colorimetric Sensor Array Allows Fast Detection and Simultaneous Identification of Sepsis-Causing Bacteria in Spiked Blood Culture. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *52*, 592-598, DOI : 10.1128/jcm.02377-13 (cf. p. 44).
- (206) LIM, S. H.; MIX, S.; ANIKST, V.; BUDVYTIENE, I.; EIDEN, M.; CHURI, Y.; QUERALTO, N.; BERLINER, A.; MARTINO, R. A.; RHODES, P. A.; BANAEI, N. Bacterial culture detection and identification in blood agar plates with an optoelectronic nose. *The Analyst* **2016**, *141*, 918-925, DOI : 10.1039/c5an01990g (cf. p. 44, 149).
- (207) BURKLUND, A.; SATURLEY-HALL, H. K.; FRANCHINA, F. A.; HILL, J. E.; ZHANG, J. X. Printable QR code paper microfluidic colorimetric assay for screening volatile biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *128*, 97-103, DOI : 10.1016/j.bios.2018.12.026 (cf. p. 44).
- (208) SHI, X.; ZHANG, X.; YAO, Q.; HE, F. A novel method for the rapid detection of microbes in blood using pleurocidin antimicrobial peptide functionalized piezoelectric sensor. *J. Microbiol. Methods* **2016**, DOI : 10.1016/j.mimet.2016.12.005 (cf. p. 44, 63-65, 68).
- (209) GAO, J.; JEFFRIES, L.; MACH, K. E.; CRAFT, D. W.; THOMAS, N. J.; GAU, V.; LIAO, J. C.; WONG, P. K. A Multiplex Electrochemical Biosensor for Bloodstream Infection Diagnosis. *SLAS TECHNOLOGY : Translating Life Sciences Innovation* **2016**, *22*, 466-474, DOI : 10.1177/2211068216651232 (cf. p. 44).
- (210) HEWAGE, E. M. K. K.; SPEAR, D.; UMSTEAD, T. M.; HU, S.; WANG, M.; WONG, P. K.; CHRONEOS, Z. C.; HALSTEAD, E. S.; THOMAS, N. J. An Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of Pediatric Bloodstream Infections. *SLAS TECHNOLOGY : Translating Life Sciences Innovation* **2017**, *22*, 616-625, DOI : 10.1177/2472630317727704 (cf. p. 44).
- (211) TEMPLIER, V.; LIVACHE, T.; BOISSET, S.; MAURIN, M.; SLIMANI, S.; MATHEY, R.; ROUPIOZ, Y. Biochips for Direct Detection and Identification of Bacteria in Blood Culture-Like Conditions. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, DOI : 10.1038/s41598-017-10072-z (cf. p. 44, 45, 47, 74, 99, 127).

- (212) WOOD, R. W. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proc. Phys. Soc. London* **1902**, *18*, 269-275, DOI : 10.1088/1478-7814/18/1/325 (cf. p. 45).
- (213) FANO, U. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves). *J. Opt. Soc. Am.* **1941**, *31*, 213, DOI : 10.1364/josa.31.000213 (cf. p. 45).
- (214) OTTO, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei* **1968**, *216*, 398-410, DOI : 10.1007/bf01391532 (cf. p. 45).
- (215) KRETSCHMANN, E.; RAETHER, H. Notizen : Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Zeitschrift für Naturforschung A* **1968**, *23*, DOI : 10.1515/zna-1968-1247 (cf. p. 45).
- (216) NYLANDER, C.; LIEDBERG, B.; LIND, T. Gas detection by means of surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators* **1982**, *3*, 79-88, DOI : 10.1016/0250-6874(82)80008-5 (cf. p. 45).
- (217) LIEDBERG, B.; NYLANDER, C.; LUNSTRÖM, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, *4*, 299-304, DOI : 10.1016/0250-6874(83)85036-7 (cf. p. 45).
- (218) LIEDBERG, B.; NYLANDER, C.; LUNDSTRÖM, I. Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started. *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, i-ix, DOI : 10.1016/0956-5663(95)96965-2 (cf. p. 45).
- (219) HOMOLA, J. in *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*; Springer Berlin Heidelberg : 2006, p. 3-44, DOI : 10.1007/5346_013 (cf. p. 45).
- (220) LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1170, DOI : 10.1021/cr0300789 (cf. p. 46).
- (221) BARDIN, F.; BELLEMAIN, A.; ROGER, G.; CANVA, M. Surface plasmon resonance spectro-imaging sensor for biomolecular surface interaction characterization. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2100-2105, DOI : 10.1016/j.bios.2008.10.023 (cf. p. 46).
- (222) BOUGUELIA, S.; ROUPIOZ, Y.; SLIMANI, S.; MONDANI, L.; CASABONA, M. G.; DURMORT, C.; VERNET, T.; CALEM CZUK, R.; LIVACHE, T. On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria. *Lab. Chip* **2013**, *13*, 4024, DOI : 10.1039/c3lc50473e (cf. p. 47, 72, 127).
- (223) MONDANI, L.; ROUPIOZ, Y.; DELANNOY, S.; FACH, P.; LIVACHE, T. Simultaneous enrichment and optical detection of low levels of stressed *Escherichia coli* O157:H7 in food matrices. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 537-546, DOI : 10.1111/jam.12522 (cf. p. 47, 127).
- (224) TEMPLIER, V. Exploration de méthodes alternatives pour la détection de bactéries dans le sang., Thèse de doctorat dirigée par Livache, Thierry Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement Grenoble Alpes 2016, thèse de doct., École Doctorale Ingénierie pour la santé, la cognition, l'environnement - Grenoble, 2016 (cf. p. 48, 74, 99, 115, 136, 143).
- (225) ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389-395, DOI : 10.1038/415389a (cf. p. 53).
- (226) TAM, J.; WANG, S.; WONG, K.; TAN, W. Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 711-757, DOI : 10.3390/ph8040711 (cf. p. 53).
- (227) BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.-L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects : structure and function. *Developmental & Comparative Immunology* **1999**, *23*, 329-344, DOI : 10.1016/s0145-305x(99)00015-4 (cf. p. 53).
- (228) WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3 : the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *44*, D1087-D1093, DOI : 10.1093/nar/gkv1278 (cf. p. 53, 77).
- (229) KANG, X.; DONG, F.; SHI, C.; LIU, S.; SUN, J.; CHEN, J.; LI, H.; XU, H.; LAO, X.; ZHENG, H. DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides. *Sci. Data* **2019**, *6*, DOI : 10.1038/s41597-019-0154-y (cf. p. 53).

- (230) AGUILERA-MENDOZA, L.; MARRERO-PONCE, Y.; TELLEZ-IBARRA, R.; LLORENTE-QUESADA, M. T.; SALGADO, J.; BARIGYE, S. J.; LIU, J. Overlap and diversity in antimicrobial peptide databases : compiling a non-redundant set of sequences. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2553-2559, DOI : 10.1093/bioinformatics/btv180 (cf. p. 53, 55).
- (231) FJELL, C. D.; HISS, J. A.; HANCOCK, R. E. W.; SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides : form follows function. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, DOI : 10.1038/nrd3591 (cf. p. 54, 76, 79).
- (232) TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **2000**, *55*, 4-30, DOI : 10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::aid-bip30>3.0.co;2-m (cf. p. 54).
- (233) HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides : relationships of structure and function. *Protein & Cell* **2010**, *1*, 143-152, DOI : 10.1007/s13238-010-0004-3 (cf. p. 54).
- (234) CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides : Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*, 1184-1202, DOI : 10.1016/j.bbmem.2006.04.006 (cf. p. 54, 82).
- (235) SCOCCHI, M.; TOSSI, A.; GENNARO, R. Proline-rich antimicrobial peptides : converging to a non-lytic mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2011**, *68*, 2317-2330, DOI : 10.1007/s00018-011-0721-7 (cf. p. 54).
- (236) CASTEELS, P.; AMPE, C.; JACOBS, F.; VAECK, M.; TEMPST, P. Apidaecins : antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO journal* **1989**, *8*, 2387 (cf. p. 54).
- (237) KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends in Pharmacological Sciences* **2019**, *40*, 517-528, DOI : 10.1016/j.tips.2019.04.012 (cf. p. 55).
- (238) HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43*, 1317-1323, DOI : 10.1128/aac.43.6.1317 (cf. p. 55).
- (239) BLONDELLE, S. E.; HOUGHTEN, R. A. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry (Mosc.)* **1992**, *31*, 12688-12694, DOI : 10.1021/bi00165a020 (cf. p. 55).
- (240) NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 464-472, DOI : 10.1016/j.tibtech.2011.05.001 (cf. p. 56).
- (241) MELO, M. N.; FERRE, R.; CASTANHO, M. A. R. B. Antimicrobial peptides : linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 245-250, DOI : 10.1038/nrmicro2095 (cf. p. 55, 79).
- (242) ROVERSI, D.; LUCA, V.; AURELI, S.; PARK, Y.; MANGONI, M. L.; STELLA, L. How Many Antimicrobial Peptide Molecules Kill a Bacterium ? The Case of PMAP-23. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9*, 2003-2007, DOI : 10.1021/cb500426r (cf. p. 55, 79).
- (243) TORRENT, M.; VALLE, J.; NOGUES, M. V.; BOIX, E.; ANDREU, D. The Generation of Antimicrobial Peptide Activity : A Trade-off between Charge and Aggregation ? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10686-10689, DOI : 10.1002/anie.201103589 (cf. p. 56, 79).
- (244) MERGAERT, P. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, DOI : 10.1039/c7np00056a (cf. p. 56, 57).
- (245) OPPEDIJK, S. F.; MARTIN, N. I.; BREUKINK, E. Hit'em where it hurts : The growing and structurally diverse family of peptides that target lipid-II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2016**, *1858*, 947-957, DOI : 10.1016/j.bbmem.2015.10.024 (cf. p. 56).
- (246) HASPER, H. E.; KRAMER, N. E.; SMITH, J. L.; HILLMAN, J. D.; ZACHARIAH, C.; KUIPERS, O. P.; de KRUIJFF, B.; BREUKINK, E. An Alternative Bactericidal Mechanism of Action for Lantibiotic Peptides That Target Lipid II. *Science* **2006**, *313*, 1636-1637, DOI : 10.1126/science.1129818 (cf. p. 56).
- (247) POGLIANO, J.; POGLIANO, N.; SILVERMAN, J. A. Daptomycin-Mediated Reorganization of Membrane Architecture Causes Mislocalization of Essential Cell Division Proteins. *Journal of Bacteriology* **2012**, *194*, 4494-4504, DOI : 10.1128/jb.00011-12 (cf. p. 56).

- (248) LEE, E. Y.; LEE, M. W.; FULAN, B. M.; FERGUSON, A. L.; WONG, G. C. L. What can machine learning do for antimicrobial peptides, and what can antimicrobial peptides do for machine learning? *Interface Focus* **2017**, *7*, 20160153, DOI : 10.1098/rsfs.2016.0153 (cf. p. 56, 57, 79).
- (249) SCOCCHI, M.; MARDIROSSIAN, M.; RUNTI, G.; BENINCASA, M. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2015**, *16*, 76-88, DOI : 10.2174/1568026615666150703121009 (cf. p. 56).
- (250) MATTIUZZO, M.; BANDIERA, A.; GENNARO, R.; BENINCASA, M.; PACOR, S.; ANTICHEVA, N.; SCOCCHI, M. Role of the Escherichia coli SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Molecular Microbiology* **2007**, *66*, 151-163, DOI : 10.1111/j.1365-2958.2007.05903.x (cf. p. 57).
- (251) HANDLER, A. A.; LIM, J. E.; LOSICK, R. Peptide inhibitor of cytokinesis during sporulation in Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology* **2008**, *68*, 588-599, DOI : 10.1111/j.1365-2958.2008.06173.x (cf. p. 57).
- (252) YADAVALLI, S. S.; CAREY, J. N.; LEIBMAN, R. S.; CHEN, A. I.; STERN, A. M.; ROGGIANI, M.; LIPPA, A. M.; GOULIAN, M. Antimicrobial peptides trigger a division block in Escherichia coli through stimulation of a signalling system. *Nature Communications* **2016**, *7*, DOI : 10.1038/ncomms12340 (cf. p. 57).
- (253) OTTO, M. in *Contributions to Microbiology*; KARGER : 2009, p. 136-149, DOI : 10.1159/000219377 (cf. p. 57).
- (254) COLE, J. N.; NIZET, V. in *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*; American Society of Microbiology : 2016, p. 413-443, DOI : 10.1128/microbiolspec.vmbf-0006-2015 (cf. p. 57, 59).
- (255) STACY, A.; BELKAID, Y. Microbial guardians of skin health. *Science* **2019**, *363*, 227-228, DOI : 10.1126/science.aat4326 (cf. p. 57).
- (256) BOUCHER, H.; TALBOT, G.; BRADLEY, J.; EDWARDS, J.; GILBERT, D.; RICE, L.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad Bugs, No Drugs : No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **2009**, *48*, 1-12, DOI : 10.1086/595011 (cf. p. 57).
- (257) GIULIANI, A.; PIRRI, G.; BOZZI, A.; GIULIO, A. D.; ASCHI, M.; RINALDI, A. C. Antimicrobial peptides : natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, *65*, 2450-2460, DOI : 10.1007/s00018-008-8188-x (cf. p. 57).
- (258) GOULD, K. Antibiotics : from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2016**, *71*, 572-575, DOI : 10.1093/jac/dkv484 (cf. p. 57).
- (259) LOOSE, C.; JENSEN, K.; RIGOUTSOS, I.; STEPHANOPOULOS, G. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. *Nature* **2006**, *443*, 867-869, DOI : 10.1038/nature05233 (cf. p. 57, 79).
- (260) PORTO, W.; PIRES, A.; FRANCO, O. Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides. *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 337-349, DOI : 10.1016/j.biotechadv.2017.02.001 (cf. p. 57).
- (261) PORTO, W. F.; FENSTERSEIFER, I. C.; RIBEIRO, S. M.; FRANCO, O. L. Joker : An algorithm to insert patterns into sequences for designing antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2018**, *1862*, 2043-2052, DOI : 10.1016/j.bbagen.2018.06.011 (cf. p. 57).
- (262) TORRES, M. D.; SOTHISELVAM, S.; LU, T. K.; de la FUENTE-NUNEZ, C. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *J. Mol. Biol.* **2019**, DOI : 10.1016/j.jmb.2018.12.015 (cf. p. 58, 79).
- (263) LI, J.; KOH, J.-J.; LIU, S.; LAKSHMINARAYANAN, R.; VERMA, C. S.; BEUERMAN, R. W. Membrane Active Antimicrobial Peptides : Translating Mechanistic Insights to Design. *Frontiers in Neuroscience* **2017**, *11*, DOI : 10.3389/fnins.2017.00073 (cf. p. 58).
- (264) CHERKASOV, A.; HILPERT, K.; JENSSSEN, H.; FJELL, C. D.; WALDBROOK, M.; MULLALY, S. C.; VOLKMER, R.; HANCOCK, R. E. Use of Artificial Intelligence in the Design of Small Peptide Antibiotics Effective against a Broad Spectrum of Highly Antibiotic-Resistant Superbugs. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 65-74, DOI : 10.1021/cb800240j (cf. p. 58, 80).

- (265) HÄNCHEN, A.; RAUSCH, S.; LANDMANN, B.; TOTI, L.; NUSSER, A.; SÜSSMUTH, R. D. Alanine Scan of the Peptide Antibiotic Feglymycin : Assessment of Amino Acid Side Chains Contributing to Antimicrobial Activity. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 625-632, DOI : 10.1002/cbic.201300032 (cf. p. 58).
- (266) SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. *Japan Medical Association Journal* **2009**, *52*, 103-108 (cf. p. 58).
- (267) BELL, G.; GOUYON, P.-H. Arming the enemy : the evolution of resistance to self-proteins. *Microbiology* **2003**, *149*, 1367-1375, DOI : 10.1099/mic.0.26265-0 (cf. p. 59).
- (268) BUCKLING, A.; BROCKHURST, M. RAMP resistance. *Nature* **2005**, *438*, 170-171, DOI : 10.1038/438170a (cf. p. 59).
- (269) HANCOCK, R. E. W. Concerns regarding resistance to self-proteins. *Microbiology* **2003**, *149*, 3343-3344, DOI : 10.1099/mic.0.c0122-0 (cf. p. 59).
- (270) FLEITAS, O.; FRANCO, O. L. Induced Bacterial Cross-Resistance toward Host Antimicrobial Peptides : A Worrying Phenomenon. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*, DOI : 10.3389/fmicb.2016.00381 (cf. p. 59).
- (271) MARIA-NETO, S.; de ALMEIDA, K. C.; MACEDO, M. L. R.; FRANCO, O. L. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides : From the surface to deep inside. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848*, 3078-3088, DOI : 10.1016/j.bbamem.2015.02.017 (cf. p. 59).
- (272) KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z.; LOFTON, H.; VESTERGAARD, M.; HJORT, K.; INGMER, H.; ANDERSSON, D. I. Antimicrobial peptide exposure selects for *Staphylococcus aureus* resistance to human defence peptides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2016**, *72*, 115-127, DOI : 10.1093/jac/dkw381 (cf. p. 59).
- (273) BAUER, M. E.; SHAFER, W. M. On the in vivo significance of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848*, 3101-3111, DOI : 10.1016/j.bbamem.2015.02.012 (cf. p. 59).
- (274) YU, G.; BAEDER, D. Y.; REGOES, R. R.; ROLFF, J. Predicting drug resistance evolution : insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences* **2018**, *285*, 20172687, DOI : 10.1098/rspb.2017.2687 (cf. p. 59).
- (275) RODRIGUEZ-ROJAS, A.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Antimicrobials, Stress and Mutagenesis. *PLoS Pathogens* **2014**, *10*, sous la dir. de ZASLOFF, M., e1004445, DOI : 10.1371/journal.ppat.1004445 (cf. p. 59).
- (276) AMSO, Z.; HAYOUKA, Z. Antimicrobial random peptide cocktails : a new approach to fight pathogenic bacteria. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 2007-2014, DOI : 10.1039/c8cc09961h (cf. p. 59).
- (277) Da CUNHA, N. B.; COBACHO, N. B.; VIANA, J. F.; LIMA, L. A.; SAMPAIO, K. B.; DOHMS, S. S.; FERREIRA, A. C.; de la FUENTE-NUNEZ, C.; COSTA, F. F.; FRANCO, O. L.; DIAS, S. C. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discovery Today* **2017**, *22*, 234-248, DOI : 10.1016/j.drudis.2016.10.017 (cf. p. 59).
- (278) ZHU, X.; DONG, N.; WANG, Z.; MA, Z.; ZHANG, L.; MA, Q.; SHAN, A. Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 244-257, DOI : 10.1016/j.actbio.2013.08.043 (cf. p. 59).
- (279) PIOTROWSKA, U.; SOB CZAK, M.; OLE DZKA, E. Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides – Therapeutic agents and promising delivery vectors. *Chemical Biology & Drug Design* **2017**, DOI : 10.1111/cbdd.13031 (cf. p. 59).
- (280) BISWARO, L. S.; da COSTA SOUSA, M. G.; REZENDE, T. M. B.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges. *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*, DOI : 10.3389/fmicb.2018.00855 (cf. p. 59).
- (281) GOMES, B.; AUGUSTO, M. T.; FELICIO, M. R.; HOLLMANN, A.; FRANCO, O. L.; GONÇALVES, S.; SANTOS, N. C. Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. *Biotechnology Advances* **2018**, *36*, 415-429, DOI : 10.1016/j.biotechadv.2018.01.004 (cf. p. 59).

- (282) GHOSH, C.; SARKAR, P.; ISSA, R.; HALDAR, J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology* **2019**, *27*, 323-338, DOI : 10.1016/j.tim.2018.12.010 (cf. p. 59).
- (283) BRANDENBURG, L.-O.; MERRES, J.; ALBRECHT, L.-J.; VAROGA, D.; PUFE, T. Antimicrobial Peptides : Multifunctional Drugs for Different Applications. *Polymers* **2012**, *4*, 539-560, DOI : 10.3390/polym4010539 (cf. p. 59).
- (284) Da SILVA, F. P.; MACHADO, M. C. C. Antimicrobial peptides : Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides* **2012**, *36*, 308-314, DOI : 10.1016/j.peptides.2012.05.014 (cf. p. 59).
- (285) OYINLOYE, B.; ADENOWO, A.; KAPPO, A. Reactive Oxygen Species, Apoptosis, Antimicrobial Peptides and Human Inflammatory Diseases. *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 151-175, DOI : 10.3390/ph8020151 (cf. p. 59).
- (286) MANGONI, M. L.; MCDERMOTT, A. M.; ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides and wound healing : biological and therapeutic considerations. *Experimental Dermatology* **2016**, *25*, 167-173, DOI : 10.1111/exd.12929 (cf. p. 59).
- (287) MAI, S.; MAUGER, M. T.; NIU, L.-n.; BARNES, J. B.; KAO, S.; BERGERON, B. E.; LING, J.-q.; TAY, F. R. Potential applications of antimicrobial peptides and their mimics in combating caries and pulpal infections. *Acta Biomaterialia* **2017**, *49*, 16-35, DOI : 10.1016/j.actbio.2016.11.026 (cf. p. 59).
- (288) SCHUERHOLZ, T.; BRANDENBURG, K.; MARX, G. Antimicrobial peptides and their potential application in inflammation and sepsis. *Critical Care* **2012**, *16*, 207, DOI : 10.1186/cc11220 (cf. p. 60).
- (289) ZHARKOVA, M. S.; ORLOV, D. S.; GOLUBEVA, O. Y.; CHAKCHIR, O. B.; ELISEEV, I. E.; GRINCHUK, T. M.; SHAMOVA, O. V. Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics – A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance ? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2019**, *9*, DOI : 10.3389/fcimb.2019.00128 (cf. p. 60).
- (290) GASPAR, D.; VEIGA, A. S.; CASTANHO, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology* **2013**, *4*, DOI : 10.3389/fmicb.2013.00294 (cf. p. 60).
- (291) THAKUR, N.; QURESHI, A.; KUMAR, M. AVPPred : collection and prediction of highly effective antiviral peptides. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, W199-W204, DOI : 10.1093/nar/gks450 (cf. p. 60).
- (292) RAUTENBACH, M.; TROSKIE, A. M.; VOSLOO, J. A. Antifungal peptides : To be or not to be membrane active. *Biochimie* **2016**, *130*, 132-145, DOI : 10.1016/j.biochi.2016.05.013 (cf. p. 60).
- (293) SINHA, S.; SINGH, A.; MEDHI, B.; SEHGAL, R. Systematic Review : Insight into Antimalarial Peptide. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2016**, *22*, 325-340, DOI : 10.1007/s10989-016-9512-1 (cf. p. 60).
- (294) GIOVATI, L.; CIOCIOLA, T.; MAGLIANI, W.; CONTI, S. Antimicrobial peptides with antiprotozoal activity : current state and future perspectives. *Future Medicinal Chemistry* **2018**, *10*, 2569-2572, DOI : 10.4155/fmc-2018-0460 (cf. p. 60).
- (295) MONTESINOS, E.; BARDAJI, E. Synthetic Antimicrobial Peptides as Agricultural Pesticides for Plant-Disease Control. *Chemistry & Biodiversity* **2008**, *5*, 1225-1237, DOI : 10.1002/cbdv.200890111 (cf. p. 60).
- (296) RAI, M.; PANDIT, R.; GAIKWAD, S.; KÖVICS, G. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *Journal of Food Science and Technology* **2016**, *53*, 3381-3394, DOI : 10.1007/s13197-016-2318-5 (cf. p. 60).
- (297) HOYOS-NOGUÉS, M.; BUXADERA-PALOMERO, J.; GINEBRA, M.-P.; MANERO, J. M.; GIL, F.; MAS-MORUNO, C. All-in-one trifunctional strategy : A cell adhesive, bacteriostatic and bactericidal coating for titanium implants. *Colloids Surf., B* **2018**, *169*, 30-40, DOI : 10.1016/j.colsurfb.2018.04.050 (cf. p. 60, 61).
- (298) GLINEL, K.; THEBAULT, P.; HUMBLLOT, V.; PRADIER, C.; JOUENNE, T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1670-1684, DOI : 10.1016/j.actbio.2012.01.011 (cf. p. 60, 84).
- (299) YU, K.; LO, J. C.; YAN, M.; YANG, X.; BROOKS, D. E.; HANCOCK, R. E.; LANGE, D.; KIZHAKKEDATHU, J. N. Anti-adhesive antimicrobial peptide coating prevents catheter associated infection in a mouse urinary infection model. *Biomaterials* **2017**, *116*, 69-81, DOI : 10.1016/j.biomaterials.2016.11.047 (cf. p. 61).

- (300) RAI, A. ; PINTO, S. ; EVANGELISTA, M. B. ; GIL, H. ; KALLIP, S. ; FERREIRA, M. G. ; FERREIRA, L. High-density antimicrobial peptide coating with broad activity and low cytotoxicity against human cells. *Acta Biomater.* **2016**, *33*, 64-77, DOI : 10.1016/j.actbio.2016.01.035 (cf. p. 61).
- (301) GABRIEL, M. ; NAZMI, K. ; VEERMAN, E. C. ; NIEUW AMERONGEN, A. V. ; ZENTNER, A. Preparation of LL-37-Grafted Titanium Surfaces with Bactericidal Activity. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 548-550, DOI : 10.1021/bc050091v (cf. p. 61, 84).
- (302) GODOY-GALLARDO, M. ; MAS-MORUNO, C. ; FERNANDEZ-CALDERON, M. C. ; PEREZ-GIRALDO, C. ; MANERO, J. M. ; ALBERICIO, F. ; GIL, F. J. ; RODRIGUEZ, D. Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 3522-3534, DOI : 10.1016/j.actbio.2014.03.026 (cf. p. 61).
- (303) TAN, X. W. ; GOH, T. W. ; SARASWATHI, P. ; NYEIN, C. L. ; SETIAWAN, M. ; RIAU, A. ; LAKSHMINARAYANAN, R. ; LIU, S. ; TAN, D. ; BEUERMAN, R. W. ; MEHTA, J. S. Effectiveness of Antimicrobial Peptide Immobilization for Preventing Perioperative Cornea Implant-Associated Bacterial Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5229-5238, DOI : 10.1128/aac.02859-14 (cf. p. 61).
- (304) BUCKHOLTZ, G. A. ; REGER, N. A. ; ANDERTON, W. D. ; SCHIMOLER, P. J. ; ROUDEBUSH, S. L. ; MENG, W. S. ; MILLER, M. C. ; GAWALT, E. S. Reducing Escherichia coli growth on a composite biomaterial by a surface immobilized antimicrobial peptide. *Materials Science and Engineering : C* **2016**, *65*, 126-134, DOI : 10.1016/j.msec.2016.04.021 (cf. p. 61).
- (305) JEONG, G. M. ; SEONG, H. ; IM, S. G. ; SUNG, B. H. ; KIM, S. C. ; JEONG, K. J. Coating of an antimicrobial peptide on solid substrate via initiated chemical vapor deposition. *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, DOI : 10.1016/j.jiec.2017.09.006 (cf. p. 61).
- (306) WELLING, M. M. ; LUPETTI, A. ; BALTER, H. S. ; LANZZERI, S. ; SOUTO, B. ; REY, A. M. ; SAVIO, E. O. ; PAULUSMA-ANNEMA, A. ; PAUWELS, E. K. ; NIBBERING, P. H. 99mTc-labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and Candida albicans infections. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **2001**, *42*, 788-794 (cf. p. 61).
- (307) AKHTAR, M. S. ; IMRAN, M. B. ; NADEEM, M. A. ; SHAHID, A. Antimicrobial Peptides as Infection Imaging Agents : Better Than Radiolabeled Antibiotics. *International Journal of Peptides* **2012**, *2012*, 1-19, DOI : 10.1155/2012/965238 (cf. p. 61).
- (308) WELLING, M. M. ; HENSBERGEN, A. W. ; BUNSCHOTEN, A. ; VELDEERS, A. H. ; SCHEPER, H. ; SMITS, W. K. ; ROESTENBERG, M. ; van LEEUWEN, F. W. B. Fluorescent imaging of bacterial infections and recent advances made with multimodal radiopharmaceuticals. *Clinical and Translational Imaging* **2019**, *7*, 125-138, DOI : 10.1007/s40336-019-00322-7 (cf. p. 61).
- (309) SHRIVER-LAKE, L. C. ; NORTH, S. H. ; DEAN, S. N. ; TAITT, C. R. Antimicrobial Peptides for Detection and Diagnostic Assays. *Designing Receptors for the Next Generation of Biosensors* **2012**, 85-104, DOI : 10.1007/5346_2012_19 (cf. p. 61).
- (310) SILVA, R. R. ; AVELINO, K. Y. P. S. ; RIBEIRO, K. L. ; FRANCO, O. L. ; OLIVEIRA, M. D. L. ; ANDRADE, C. A. S. Optical and dielectric sensors based on antimicrobial peptides for microorganism diagnosis. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, DOI : 10.3389/fmicb.2014.00443 (cf. p. 61).
- (311) HOYOS-NOGUÉS, M. ; GIL, F. J. ; MAS-MORUNO, C. Antimicrobial Peptides : Powerful Biorecognition Elements to Detect Bacteria in Biosensing Technologies. *Molecules* **2018**, *23*, 1683, DOI : 10.3390/molecules23071683 (cf. p. 61, 62).
- (312) DOVER, J. E. ; HWANG, G. M. ; MULLEN, E. H. ; PROROK, B. C. ; SUH, S.-J. Recent advances in peptide probe-based biosensors for detection of infectious agents. *J. Microbiol. Methods* **2009**, *78*, 10-19, DOI : 10.1016/j.mimet.2009.04.008 (cf. p. 61).

- (313) SOARES, J.; MORIN, K.; MELLO, C. Antimicrobial peptides for use in biosensing applications. sous la dir. de CENTER, D. T. I., <https://www.semanticscholar.org/paper/ANTIMICROBIAL-PEPTIDES-FOR-USE-IN-BIOSENSING-Soares-Morin/76bfeea21b2639f29b4f0b906dc542106e08b72f> (visité le 22/08/2019) (cf. p. 61, 62, 82).
- (314) KULAGINA, N. V.; LASSMAN, M. E.; LIGLER, F. S.; TAITT, C. R. Antimicrobial Peptides for Detection of Bacteria in Biosensor Assays. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6504-6508, DOI : 10.1021/ac050639r (cf. p. 61, 62, 70).
- (315) KULAGINA, N. V.; SHAFFER, K. M.; ANDERSON, G. P.; LIGLER, F. S.; TAITT, C. R. Antimicrobial peptide-based array for *Escherichia coli* and Salmonella screening. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *575*, 9-15, DOI : 10.1016/j.aca.2006.05.082 (cf. p. 62, 64).
- (316) KULAGINA, N.; SHAFFER, K.; LIGLER, F.; TAITT, C. Antimicrobial peptides as new recognition molecules for screening challenging species. *Sens. Actuators, B* **2007**, *121*, 150-157, DOI : 10.1016/j.snb.2006.09.044 (cf. p. 62, 64, 81, 82).
- (317) KULAGINA, N.; TAITT, C.; ANDERSON, G.; LIGLER, F. Affinity-based detection of biological targets., US8658372 B2, US Patent 8,658,372, 2014 (cf. p. 62, 81, 82).
- (318) ARCIDIACONO, S.; PIVARNIK, P.; MELLO, C. M.; SENEAL, A. Cy5 labeled antimicrobial peptides for enhanced detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1721-1727, DOI : 10.1016/j.bios.2008.02.005 (cf. p. 62, 70, 72).
- (319) MANNOOR, M. S.; ZHANG, S.; LINK, A. J.; MCALPINE, M. C. Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 19207-19212, DOI : 10.1073/pnas.1008768107 (cf. p. 62, 64, 65, 67, 70).
- (320) YONEKITA, T.; OHTSUKI, R.; HOJO, E.; MORISHITA, N.; MATSUMOTO, T.; AIZAWA, T.; MORIMATSU, F. Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods* **2013**, *93*, 251-256, DOI : 10.1016/j.mimet.2013.03.006 (cf. p. 62, 64).
- (321) ZAMPA, M. F.; ARAÚJO, I. M.; COSTA, V.; COSTA, C. H. N.; SANTOS, J. R.; ZUCOLOTTI, V.; EIRAS, C.; LEITE, J. R. S. Leishmanicidal Activity and Immobilization of dermaseptin O1 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2009**, *5*, 352-358, DOI : 10.1016/j.nano.2008.11.001 (cf. p. 62).
- (322) LI, Y.; AFRASIABI, R.; FATHI, F.; WANG, N.; XIANG, C.; LOVE, R.; SHE, Z.; KRAATZ, H.-B. Impedance based detection of pathogenic *E. coli* O157:H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 193-199, DOI : 10.1016/j.bios.2014.02.045 (cf. p. 62, 67).
- (323) JIANG, K.; ETAYASH, H.; AZMI, S.; NAICKER, S.; HASSANPOURFARD, M.; SHAIBANI, P. M.; THAKUR, G.; KAUR, K.; THUNDAT, T. Rapid label-free detection of *E. coli* using antimicrobial peptide assisted impedance spectroscopy. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 9744-9748, DOI : 10.1039/c5ay01917f (cf. p. 62, 68).
- (324) LV, E.; DING, J.; QIN, W. Potentiometric Detection of *Listeria monocytogenes* via a Short Antimicrobial Peptide Pair-Based Sandwich Assay. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 13600-13606, DOI : 10.1021/acs.analchem.8b03809 (cf. p. 62, 69).
- (325) LILLEHOJ, P. B.; HO, C.-M.; SHI, W.; KAPLAN, C.; HE, J. in *2012 IEEE 6th International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NANOMED)*, IEEE : 2012, DOI : 10.1109/nanomed.2012.6509136 (cf. p. 62).
- (326) LILLEHOJ, P. B.; KAPLAN, C. W.; HE, J.; SHI, W.; HO, C.-M. Rapid, Electrical Impedance Detection of Bacterial Pathogens Using Immobilized Antimicrobial Peptides. *Journal of Laboratory Automation* **2013**, *19*, 42-49, DOI : 10.1177/2211068213495207 (cf. p. 62, 67).
- (327) ETAYASH, H.; JIANG, K.; THUNDAT, T.; KAUR, K. Impedimetric Detection of Pathogenic Gram-Positive Bacteria Using an Antimicrobial Peptide from Class IIa Bacteriocins. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1693-1700, DOI : 10.1021/ac4034938 (cf. p. 62, 63, 65, 67, 73).

- (328) ANDRADE, C. A.; NASCIMENTO, J. M.; OLIVEIRA, I. S.; de OLIVEIRA, C. V.; de MELO, C. P.; FRANCO, O. L.; OLIVEIRA, M. D. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection. *Colloids Surf., B* **2015**, *135*, 833-839, DOI : 10.1016/j.colsurfb.2015.03.037 (cf. p. 62, 65, 67, 70, 71).
- (329) HOYOS-NOGUES, M.; BROSEL-OLIU, S.; ABRAMOVA, N.; MUÑOZ, F.-X.; BRATOV, A.; MAS-MORUNO, C.; GIL, F.-J. Impedimetric antimicrobial peptide-based sensor for the early detection of periodontopathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *86*, 377-385, DOI : 10.1016/j.bios.2016.06.066 (cf. p. 62, 68).
- (330) LIU, X.; MARRAKCHI, M.; XU, D.; DONG, H.; ANDREESCU, S. Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *80*, 9-16, DOI : 10.1016/j.bios.2016.01.041 (cf. p. 62, 68).
- (331) De MIRANDA, J. L.; OLIVEIRA, M. D.; OLIVEIRA, I. S.; FRIAS, I. A.; FRANCO, O. L.; ANDRADE, C. A. A Simple Nanostructured Biosensor Based on Clavanin A Antimicrobial Peptide for Gram-Negative Bacteria Detection. *Biochem. Eng. J.* **2017**, DOI : 10.1016/j.bej.2017.04.013 (cf. p. 62, 65, 66, 68, 71).
- (332) JUNIOR, A. G. S.; OLIVEIRA, M. D.; OLIVEIRA, I. S.; LIMA-NETO, R. G.; SÁ, S. R.; FRANCO, O. L.; ANDRADE, C. A. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin A peptide for bacterial detection. *Sens. Actuators, B* **2018**, *255*, 3267-3274, DOI : 10.1016/j.snb.2017.09.153 (cf. p. 62, 65, 69, 71, 76).
- (333) WILSON, D.; MATERÓN, E. M.; IBÁÑEZ-REDÍN, G.; FARIA, R. C.; CORREA, D. S.; OLIVEIRA, O. N. Electrical detection of pathogenic bacteria in food samples using information visualization methods with a sensor based on magnetic nanoparticles functionalized with antimicrobial peptides. *Talanta* **2019**, *194*, 611-618, DOI : 10.1016/j.talanta.2018.10.089 (cf. p. 62, 65, 69, 82).
- (334) DONG, Z.-M.; ZHAO, G.-C. Label-free detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. *Talanta* **2015**, *137*, 55-61, DOI : 10.1016/j.talanta.2015.01.015 (cf. p. 62, 67).
- (335) CHEN, Y.; MICHAEL, Z. P.; KOTCHEY, G. P.; ZHAO, Y.; STAR, A. Electronic Detection of Bacteria Using Holey Reduced Graphene Oxide. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6*, 3805-3810, DOI : 10.1021/am500364f (cf. p. 62, 67, 70).
- (336) MCALPINE, M. C.; MANNOOR, M. S. Use and making of biosensors utilizing antimicrobial peptides for highly sensitive biological monitoring., US Patent 9,029,168, 2015 (cf. p. 62).
- (337) JOHNSON, B. J.; TAITT, C. R.; GLEAVES, A.; NORTH, S. H.; MALANOSKI, A. P.; LESKA, I. A.; ARCHIBONG, E.; MONK, S. M. Porphyrin-modified antimicrobial peptide indicators for detection of bacteria. *Sens. Bio-Sens. Res.* **2016**, *8*, 1-7, DOI : 10.1016/j.sbsr.2016.02.005 (cf. p. 65, 81, 82).
- (338) YUAN, K. et al. Antimicrobial peptide based magnetic recognition elements and Au@Ag-GO SERS tags with stable internal standards : a three in one biosensor for isolation, discrimination and killing of multiple bacteria in whole blood. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 8781-8795, DOI : 10.1039/c8sc04637a (cf. p. 65).
- (339) CHEN, Q.; ZHANG, L.; FENG, Y.; SHI, F.; WANG, Y.; WANG, P.; LIU, L. Dual-functional peptide conjugated gold nanorods for the detection and photothermal ablation of pathogenic bacteria. *J. Mater. Chem. B* **2018**, DOI : 10.1039/c8tb01835a (cf. p. 65).
- (340) DAO, T. N. T.; YOON, J.; JIN, C. E.; KOO, B.; HAN, K.; SHIN, Y.; LEE, T. Y. Rapid and sensitive detection of Salmonella based on microfluidic enrichment with a label-free nanobiosensing platform. *Sens. Actuators, B* **2018**, *262*, 588-594, DOI : 10.1016/j.snb.2017.12.190 (cf. p. 65).
- (341) TENENBAUM, E.; SEGAL, E. Optical biosensors for bacteria detection by a peptidomimetic antimicrobial compound. *Analyst* **2015**, *140*, 7726-7733, DOI : 10.1039/c5an01717c (cf. p. 65).
- (342) GURALP, S. A.; GUBBUK, I. H.; KUCUKKOLBASI, S.; GULARI, E. Universal cell capture by immobilized antimicrobial peptide plantaricin. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *101*, 18-22, DOI : 10.1016/j.bej.2015.04.018 (cf. p. 65, 84).
- (343) XIONG, J.; WANG, W.; FU, Z. Fluorimetric sandwich affinity assay for *Staphylococcus aureus* based on dual-peptide recognition on magnetic nanoparticles. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 4197-4202, DOI : 10.1007/s00604-017-2396-8 (cf. p. 65, 76).

- (344) CHANG, M.-S.; YOO, J. H.; WOO, D. H.; CHUN, M.-S. Efficient detection of *Escherichia coli* O157:H7 using a reusable microfluidic chip embedded with antimicrobial peptide-labeled beads. *The Analyst* **2015**, *140*, 7997-8006, DOI : 10.1039/c5an01307k (cf. p. 65, 70).
- (345) YOO, J. H.; WOO, D. H.; CHANG, M.-S.; CHUN, M.-S. Microfluidic based biosensing for *Escherichia coli* detection by embedding antimicrobial peptide-labeled beads. *Sens. Actuators, B* **2014**, *191*, 211-218, DOI : 10.1016/j.snb.2013.09.105 (cf. p. 65).
- (346) LI, N. N.; LI, J. Z.; LIU, P.; PRANANTYO, D.; LUO, L.; CHEN, J. C.; KANG, E.-T.; HU, X. F.; LI, C. M.; XU, L. Q. An antimicrobial peptide with an aggregation-induced emission (AIE) luminogen for studying bacterial membrane interactions and antibacterial actions. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3315-3318, DOI : 10.1039/c6cc09408b (cf. p. 65).
- (347) HAN, J.; CHENG, H.; WANG, B.; BRAUN, M. S.; FAN, X.; BENDER, M.; HUANG, W.; DOMHAN, C.; MIER, W.; LINDNER, T.; SEEHAFFER, K.; WINK, M.; BUNZ, U. H. F. A Polymer/Peptide Complex-Based Sensor Array That Discriminates Bacteria in Urine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15246-15251, DOI : 10.1002/anie.201706101 (cf. p. 65).
- (348) WANG, J.; MORTON, M. J.; ELLIOTT, C. T.; KAROONUTHAISIRI, N.; SEGATORI, L.; BISWAL, S. L. Rapid Detection of Pathogenic Bacteria and Screening of Phage-Derived Peptides Using Microcantilevers. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1671-1678, DOI : 10.1021/ac403437x (cf. p. 67).
- (349) SCHWARTZ, O.; BERCOVICI, M. Microfluidic Assay for Continuous Bacteria Detection Using Antimicrobial Peptides and Isotachopheresis. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10106-10113, DOI : 10.1021/ac5017776 (cf. p. 67).
- (350) AZMI, S.; JIANG, K.; STILES, M.; THUNDAT, T.; KAUR, K. Detection of *Listeria monocytogenes* with Short Peptide Fragments from Class IIa Bacteriocins as Recognition Elements. *ACS Combinatorial Science* **2015**, *17*, 156-163, DOI : 10.1021/co500079k (cf. p. 68, 70, 72, 73, 76).
- (351) LI, Z.; YANG, H.; SUN, L.; QI, H.; GAO, Q.; ZHANG, C. Electrogenated chemiluminescence biosensors for the detection of pathogenic bacteria using antimicrobial peptides as capture/signal probes. *Sens. Actuators, B* **2015**, *210*, 468-474, DOI : 10.1016/j.snb.2015.01.011 (cf. p. 68).
- (352) ZHOU, C.; ZOU, H.; LI, M.; SUN, C.; REN, D.; LI, Y. Fiber optic surface plasmon resonance sensor for detection of *E. coli* O157:H7 based on antimicrobial peptides and AgNPs-rGO. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *117*, 347-353, DOI : 10.1016/j.bios.2018.06.005 (cf. p. 68).
- (353) PARDOUX, É.; ROUX, A.; MATHEY, R.; BOTURYN, D.; ROUPIOZ, Y. Antimicrobial peptide arrays for wide spectrum sensing of pathogenic bacteria. *Talanta* **2019**, *203*, 322-327, DOI : 10.1016/j.talanta.2019.05.062 (cf. p. 69, 77).
- (354) ETAYASH, H.; NORMAN, L.; THUNDAT, T.; KAUR, K. Peptide-Bacteria Interactions using Engineered Surface-Immobilized Peptides from Class IIa Bacteriocins. *Langmuir* **2013**, *29*, 4048-4056, DOI : 10.1021/la3041743 (cf. p. 70, 73).
- (355) ETAYASH, H.; NORMAN, L.; THUNDAT, T.; STILES, M.; KAUR, K. Surface-Conjugated Antimicrobial Peptide Leucocin A Displays High Binding to Pathogenic Gram-Positive Bacteria. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6*, 1131-1138, DOI : 10.1021/am404729c (cf. p. 70, 73, 76).
- (356) LEE, I. H.; ZHAO, C.; CHO, Y.; HARWIG, S. S. L.; COOPER, E. L.; LEHRER, R. I. Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Letters* **1997**, *400*, 158-162, DOI : 10.1016/s0014-5793(96)01374-9 (cf. p. 71).
- (357) LEE, I. H.; CHO, Y.; LEHRER, R. I. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 2898-2903 (cf. p. 71).
- (358) Van KAN, E. J. M.; GANCHEV, D. N.; SNEL, M. M. E.; CHUPIN, V.; van der BENT, A.; de KRUIJFF, B. The Peptide Antibiotic Clavanin A Interacts Strongly and Specifically with Lipid Bilayers†. *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42*, 11366-11372, DOI : 10.1021/bi0349017 (cf. p. 71).

- (359) ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin : isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84*, 5449-5453 (cf. p. 71).
- (360) HUMBLLOT, V.; YALA, J.-F.; THEBAULT, P.; BOUKERMA, K.; HÉQUET, A.; BERJEAUD, J.-M.; PRADIER, C.-M. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3503-3512, DOI : 10.1016/j.biomaterials.2009.03.025 (cf. p. 71, 84, 101).
- (361) PEYRE, J.; HUMBLLOT, V.; MÉTHIVIER, C.; BERJEAUD, J.-M.; PRADIER, C.-M. Co-Grafting of Amino-Poly(ethylene glycol) and Magainin I on a TiO₂ Surface : Tests of Antifouling and Antibacterial Activities. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 13839-13847, DOI : 10.1021/jp305597y (cf. p. 71).
- (362) MATSUZAKI, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1998**, *1376*, 391-400, DOI : 10.1016/s0304-4157(98)00014-8 (cf. p. 71).
- (363) MOORE, K. S.; BEVINS, C. L.; BRASSEUR, M. M.; TOMASSINI, N.; TURNER, K.; ECK, H.; ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*. *The Journal of biological chemistry* **1991**, *266*, 19851-19857 (cf. p. 71).
- (364) ALVAREZ-SIEIRO, P.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; MU, D.; KUIPERS, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria : extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 2939-2951, DOI : 10.1007/s00253-016-7343-9 (cf. p. 72).
- (365) PAPAGIANNI, M.; ANASTASIADOU, S. Pediocins : The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb. Cell Fact.* **2009**, *8*, 3, DOI : 10.1186/1475-2859-8-3 (cf. p. 72).
- (366) ZACHAROF, M.; LOVITT, R. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* **2012**, *2*, 50-56, DOI : 10.1016/j.apcbee.2012.06.010 (cf. p. 72).
- (367) HENDERSON, J. T.; CHOPKO, A. L.; van WASSENAAR, P. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *295*, 5-12, DOI : 10.1016/0003-9861(92)90480-k (cf. p. 72).
- (368) CHIKINDAS, M. L.; GARCÍA-GARCERÁ, M. J.; DRIESSEN, A. J.; LEDEBOER, A. M.; NISSEN-MEYER, J.; NES, I. F.; ABEE, T.; KONINGS, W. N.; VENEMA, G. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3577-3584 (cf. p. 72).
- (369) FIMLAND, G.; BLINGSMO, O. R.; SLETTEN, K.; JUNG, G.; NES, I. F.; NISSEN-MEYER, J. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins : the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3313-3318 (cf. p. 72).
- (370) HASTINGS, J. W.; SAILER, M.; JOHNSON, K.; ROY, K. L.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 7491-7500, DOI : 10.1128/jb.173.23.7491-7500.1991 (cf. p. 73).
- (371) MOJSOSKA, B.; JENSSEN, H. Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 366-415, DOI : 10.3390/ph8030366 (cf. p. 79).
- (372) HANEY, E. F.; BRITO-SÁNCHEZ, Y.; TRIMBLE, M. J.; MANSOUR, S. C.; CHERKASOV, A.; HANCOCK, R. E. W. Computer-aided Discovery of Peptides that Specifically Attack Bacterial Biofilms. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, DOI : 10.1038/s41598-018-19669-4 (cf. p. 79).
- (373) VISHNEPOLSKY, B.; PIRTSKHALAVA, M. Prediction of Linear Cationic Antimicrobial Peptides Based on Characteristics Responsible for Their Interaction with the Membranes. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 1512-1523, DOI : 10.1021/ci4007003 (cf. p. 79).
- (374) BELTRAN, J. A.; AGUILERA-MENDOZA, L.; BRIZUELA, C. A. Optimal selection of molecular descriptors for antimicrobial peptides classification : an evolutionary feature weighting approach. *BMC Genomics* **2018**, *19*, DOI : 10.1186/s12864-018-5030-1 (cf. p. 79).

- (375) LIRA, F.; PEREZ, P. S.; BARANAUSKAS, J. A.; NOZAWA, S. R. Prediction of Antimicrobial Activity of Synthetic Peptides by a Decision Tree Model. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 3156-3159, DOI : 10.1128/aem.02804-12 (cf. p. 79).
- (376) GLUKHOV, E.; BURROWS, L. L.; DEBER, C. M. Membrane interactions of designed cationic antimicrobial peptides : The two thresholds. *Biopolymers* **2008**, *89*, 360-371, DOI : 10.1002/bip.20917 (cf. p. 79).
- (377) FERNÁNDEZ-VIDAL, M.; JAYASINGHE, S.; LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. Folding Amphipathic Helices Into Membranes : Amphiphilicity Trumps Hydrophobicity. *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 459-470, DOI : 10.1016/j.jmb.2007.05.016 (cf. p. 79).
- (378) TIAN, X.; SUN, F.; ZHOU, X.-R.; LUO, S.-Z.; CHEN, L. Role of peptide self-assembly in antimicrobial peptides. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 530-539, DOI : 10.1002/pssc.2788 (cf. p. 79).
- (379) ROMEO, D.; SKERLAVAJ, B.; BOLOGNESI, M.; GENNARO, R. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **1988**, *263*, 9573-9575 (cf. p. 80).
- (380) HILPERT, K.; ELLIOTT, M. R.; VOLKMER-ENGERT, R.; HENKLEIN, P.; DONINI, O.; ZHOU, Q.; WINKLER, D. F.; HANCOCK, R. E. Sequence Requirements and an Optimization Strategy for Short Antimicrobial Peptides. *Chemistry & Biology* **2006**, *13*, 1101-1107, DOI : 10.1016/j.chembio.2006.08.014 (cf. p. 80).
- (381) HILPERT, K.; VOLKMER-ENGERT, R.; WALTER, T.; HANCOCK, R. E. W. High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1008-1012, DOI : 10.1038/nbt1113 (cf. p. 80).
- (382) MIKUT, R.; RUDEN, S.; REISCHL, M.; BREITLING, F.; VOLKMER, R.; HILPERT, K. Improving short antimicrobial peptides despite elusive rules for activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2016**, *1858*, 1024-1033, DOI : 10.1016/j.bbamem.2015.12.013 (cf. p. 80).
- (383) WU, M.; HANCOCK, R. E. Improved derivatives of bactenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1274-1276 (cf. p. 80, 163).
- (384) FRANK, R. The SPOT-synthesis technique. *J. Immunol. Methods* **2002**, *267*, 13-26, DOI : 10.1016/s0022-1759(02)00137-0 (cf. p. 80).
- (385) HILPERT, K.; ELLIOTT, M.; JENSSEN, H.; KINDRACHUK, J.; FJELL, C. D.; KÖRNER, J.; WINKLER, D. F.; WEAVER, L. L.; HENKLEIN, P.; ULRICH, A. S.; et AL. Screening and Characterization of Surface-Tethered Cationic Peptides for Antimicrobial Activity. *Chemistry & Biology* **2009**, *16*, 58-69, DOI : 10.1016/j.chembio.2008.11.006 (cf. p. 80, 163).
- (386) Van der WEERDEN, N. L.; HANCOCK, R. E. W.; ANDERSON, M. A. Permeabilization of Fungal Hyphae by the Plant Defensin NaD1 Occurs through a Cell Wall-dependent Process. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 37513-37520, DOI : 10.1074/jbc.M110.134882 (cf. p. 80).
- (387) KULAGINA, N.; ANDERSON, G.; LIGLER, F.; SHAFFER, K.; TAITT, C. Antimicrobial Peptides : New Recognition Molecules for Detecting Botulinum Toxins. *Sensors* **2007**, *7*, 2808-2824, DOI : 10.3390/s7112808 (cf. p. 81, 82).
- (388) STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, Å.; BENNICH, H.; BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **1981**, *292*, 246-248, DOI : 10.1038/292246a0 (cf. p. 81).
- (389) BOMAN, H.; WADE, D.; BOMAN, I.; WÅHLIN, B.; MERRIFIELD, R. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Letters* **1989**, *259*, 103-106, DOI : 10.1016/0014-5793(89)81505-4 (cf. p. 81).
- (390) WADE, D.; BOMAN, A.; WAHLIN, B.; DRAIN, C. M.; ANDREU, D.; BOMAN, H. G.; MERRIFIELD, R. B. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990**, *87*, 4761-4765, DOI : 10.1073/pnas.87.12.4761 (cf. p. 81).
- (391) HABERMANN, E.; JENTSCH, J. [Sequence analysis of melittin from tryptic and peptic degradation products]. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1967**, *348*, 37-50 (cf. p. 81).

- (392) ANDREU, D.; UBACH, J.; BOMAN, A.; WÄHLIN, B.; WADE, D.; MERRIFIELD, R.; BOMAN, H. G. Shortened cecropin A-melittin hybrids Significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Letters* **1992**, *296*, 190-194, DOI : 10.1016/0014-5793(92)80377-s (cf. p. 81).
- (393) JUVVADI, P.; VUNNAM, S.; MERRIFIELD, E. L.; BOMAN, H. G.; MERRIFIELD, R. B. Hydrophobic Effects on Antibacterial and Channel-forming Properties of Cecropin A–Melittin Hybrids. *J. Pept. Sci.* **1996**, *2*, 223-232, DOI : 10.1002/pssc.63 (cf. p. 82).
- (394) ABRUNHOSA, F.; FARIA, S.; GOMES, P.; TOMAZ, I.; PESSOA, J. C.; ANDREU, D.; BASTOS, M. Interaction and Lipid-Induced Conformation of Two Cecropin-Melittin Hybrid Peptides Depend on Peptide and Membrane Composition. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 17311-17319, DOI : 10.1021/jp051572e (cf. p. 82).
- (395) SAUGAR, J. M.; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, M. J.; de la TORRE, B. G.; PACHON-IBANEZ, M. E.; FERNANDEZ-REYES, M.; ANDREU, D.; PACHON, J.; RIVAS, L. Activity of Cecropin A-Melittin Hybrid Peptides against Colistin-Resistant Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii* : Molecular Basis for the Differential Mechanisms of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1251-1256, DOI : 10.1128/aac.50.4.1251-1256.2006 (cf. p. 82).
- (396) OH, H.; HEDBERG, M.; WADE, D.; EDLUND, C. Activities of Synthetic Hybrid Peptides against Anaerobic Bacteria : Aspects of Methodology and Stability. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 68-72, DOI : 10.1128/aac.44.1.68-72.2000 (cf. p. 82).
- (397) RAI, A.; PINTO, S.; VELHO, T. R.; FERREIRA, A. F.; MOITA, C.; TRIVEDI, U.; EVANGELISTA, M.; COMUNE, M.; RUMBAUGH, K. P.; SIMOES, P. N.; MOITA, L.; FERREIRA, L. One-step synthesis of high-density peptide-conjugated gold nanoparticles with antimicrobial efficacy in a systemic infection model. *Biomaterials* **2016**, *85*, 99-110, DOI : 10.1016/j.biomaterials.2016.01.051 (cf. p. 82, 163).
- (398) GREGORY, K.; MELLO, C. M. Immobilization of *Escherichia coli* Cells by Use of the Antimicrobial Peptide Cecropin P1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1130-1134, DOI : 10.1128/aem.71.3.1130-1134.2005 (cf. p. 82).
- (399) STEINER, H.; ANDREU, D.; MERRIFIELD, R. Binding and action of cecropin and cecropin analogues : Antibacterial peptides from insects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1988**, *939*, 260-266, DOI : 10.1016/0005-2736(88)90069-7 (cf. p. 82).
- (400) DEROSI, D.; JOLIOT, A. H.; CHASSAING, G.; PROCHIANTZ, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269*, 10444-10450 (cf. p. 82).
- (401) DEROSI, D.; CHASSAING, G.; PROCHIANTZ, A. Trojan peptides : the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 84-87, DOI : 10.1016/s0962-8924(98)80017-2 (cf. p. 82).
- (402) LAST, N. B.; SCHLAMADINGER, D. E.; MIRANKER, A. D. A common landscape for membrane-active peptides. *Protein Sci.* **2013**, *22*, 870-882, DOI : 10.1002/pro.2274 (cf. p. 82).
- (403) BAHNSEN, J. S.; FRANZYK, H.; SANDBERG-SCHAAL, A.; NIELSEN, H. M. Antimicrobial and cell-penetrating properties of penetratin analogs : Effect of sequence and secondary structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828*, 223-232, DOI : 10.1016/j.bbamem.2012.10.010 (cf. p. 82, 163).
- (404) A. D. GARRO AND M. S. OLIVELLA AND J. A. BOMBASARO AND B. LIMA AND A. TAPIA AND G. FERESIN AND A. PERCZEL AND C. SOMLAI AND B. PENKE AND J. LÓPEZ CASCALES AND A. M. RODRÍGUEZ AND R. D. ENRIZ Penetratin and Derivatives Acting as Antibacterial Agents. *Chemical Biology & Drug Design* **2013**, *82*, 167-177, DOI : 10.1111/cbdd.12143 (cf. p. 82).
- (405) BAHNSEN, J. S.; FRANZYK, H.; SAYERS, E. J.; JONES, A. T.; NIELSEN, H. M. Cell-Penetrating Antimicrobial Peptides – Prospectives for Targeting Intracellular Infections. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 1546-1556, DOI : 10.1007/s11095-014-1550-9 (cf. p. 82).
- (406) NUZZO, R. G.; ALLARA, D. L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481-4483, DOI : 10.1021/ja00351a063 (cf. p. 83).
- (407) BAIN, C. D.; WHITESIDES, G. M. Molecular-Level Control over Surface Order in Self-Assembled Monolayer Films of Thiols on Gold. *Science* **1988**, *240*, 62-63, DOI : 10.1126/science.240.4848.62 (cf. p. 83).

- (408) LOVE, J. C. ; ESTROFF, L. A. ; KRIEBEL, J. K. ; NUZZO, R. G. ; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1170 (cf. p. 84, 104).
- (409) ONAIZI, S. A. ; LEONG, S. S. Tethering antimicrobial peptides : Current status and potential challenges. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 67-74, DOI : 10.1016/j.biotechadv.2010.08.012 (cf. p. 84).
- (410) KINGSHOTT, P. ; WEI, J. ; BAGGE-RAVN, D. ; GADEGAARD, N. ; GRAM, L. Covalent Attachment of Poly(ethylene glycol) to Surfaces, Critical for Reducing Bacterial Adhesion. *Langmuir* **2003**, *19*, 6912-6921, DOI : 10.1021/1a034032m (cf. p. 84).
- (411) LI, L. ; CHEN, S. ; ZHENG, J. ; RATNER, B. D. ; JIANG, S. Protein Adsorption on Oligo(ethylene glycol)-Terminated Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers : The Molecular Basis for Nonfouling Behavior. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 2934-2941, DOI : 10.1021/jp0473321 (cf. p. 84).
- (412) REIMHULT, K. ; PETERSSON, K. ; KROZER, A. QCM-D Analysis of the Performance of Blocking Agents on Gold and Polystyrene Surfaces. *Langmuir* **2008**, *24*, 8695-8700, DOI : 10.1021/1a800224s (cf. p. 84).
- (413) ANDREA, A. ; MOLCHANOVA, N. ; JENSSEN, H. Antibiofilm Peptides and Peptidomimetics with Focus on Surface Immobilization. *Biomolecules* **2018**, *8*, 27, DOI : 10.3390/biom8020027 (cf. p. 84).
- (414) SILVA, R. R. ; AVELINO, K. Y. P. S. ; RIBEIRO, K. L. ; FRANCO, O. L. ; OLIVEIRA, M. D. L. ; ANDRADE, C. A. S. Chemical immobilization of antimicrobial peptides on biomaterial surfaces. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* **2016**, *8*, 129-142 (cf. p. 84).
- (415) GREEN, J.-B. D. ; FULGHUM, T. ; NORDHAUS, M. A. A review of immobilized antimicrobial agents and methods for testing. *Biointerphases* **2011**, *6*, MR13-MR28, DOI : 10.1116/1.3645195 (cf. p. 84).
- (416) COSTA, F. ; CARVALHO, I. F. ; MONTELARO, R. C. ; GOMES, P. ; MARTINS, M. C. L. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1431-1440, DOI : 10.1016/j.actbio.2010.11.005 (cf. p. 84).
- (417) MISHRA, B. ; LUSHNIKOVA, T. ; GOLLA, R. M. ; WANG, X. ; WANG, G. Design and surface immobilization of short anti-biofilm peptides. *Acta Biomater.* **2016**, DOI : 10.1016/j.actbio.2016.11.061 (cf. p. 84).
- (418) RAPSCH, K. ; BIER, F. F. ; TADROS, M. ; von NICKISCH-ROSENEGK, M. Identification of Antimicrobial Peptides and Immobilization Strategy Suitable for a Covalent Surface Coating with Biocompatible Properties. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 308-319, DOI : 10.1021/bc4004469 (cf. p. 84).
- (419) NORTH, S. H. ; WOJCIECHOWSKI, J. ; CHU, V. ; TAITT, C. R. Surface immobilization chemistry influences peptide-based detection of lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *J. Pept. Sci.* **2012**, *18*, 366-372, DOI : 10.1002/psc.2399 (cf. p. 84).
- (420) BAGHERI, M. ; BEYERMANN, M. ; DATHE, M. Immobilization Reduces the Activity of Surface-Bound Cationic Antimicrobial Peptides with No Influence upon the Activity Spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *53*, 1132-1141, DOI : 10.1128/aac.01254-08 (cf. p. 84).
- (421) LI, Y. ; WEI, S. ; WU, J. ; JASENSKY, J. ; XI, C. ; LI, H. ; XU, Y. ; WANG, Q. ; MARSH, E. N. G. ; BROOKS, C. L. ; et AL. Effects of Peptide Immobilization Sites on the Structure and Activity of Surface-Tethered Antimicrobial Peptides. *The Journal of Physical Chemistry C* **2015**, *119*, 7146-7155, DOI : 10.1021/jp5125487 (cf. p. 84).
- (422) BAGHERI, M. ; BEYERMANN, M. ; DATHE, M. Mode of Action of Cationic Antimicrobial Peptides Defines the Tethering Position and the Efficacy of Biocidal Surfaces. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 66-74, DOI : 10.1021/bc200367f (cf. p. 84).
- (423) SOARES, J. W. ; KIRBY, R. ; DOHERTY, L. A. ; MEEHAN, A. ; ARCIDIACONO, S. Immobilization and orientation-dependent activity of a naturally occurring antimicrobial peptide. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 669-679, DOI : 10.1002/psc.2787 (cf. p. 84).
- (424) IVANOV, I. E. ; MORRISON, A. E. ; COBB, J. E. ; FAHEY, C. A. ; CAMESANO, T. A. Creating Antibacterial Surfaces with the Peptide Chrysopsin-1. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2012**, *4*, 5891-5897, DOI : 10.1021/am301530a (cf. p. 84, 104, 129).

- (425) HAN, X.; LIU, Y.; WU, F.-G.; JANSENSKY, J.; KIM, T.; WANG, Z.; BROOKS, C. L.; WU, J.; XI, C.; MELLO, C. M.; CHEN, Z. Different Interfacial Behaviors of Peptides Chemically Immobilized on Surfaces with Different Linker Lengths and via Different Termini. *The Journal of Physical Chemistry B* **2014**, *118*, 2904-2912, DOI : 10.1021/jp4122003 (cf. p. 84).
- (426) YU, K.; LO, J. C. Y.; MEI, Y.; HANEY, E. F.; SIREN, E.; KALATHOTTUKAREN, M. T.; HANCOCK, R. E.; LANGE, D.; KIZHAKKEDATHU, J. N. Toward Infection-Resistant Surfaces : Achieving High Antimicrobial Peptide Potency by Modulating the Functionality of Polymer Brush and Peptide. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7*, 28591-28605, DOI : 10.1021/acsami.5b10074 (cf. p. 84).
- (427) SHRIVER-LAKE, L. C.; ANDERSON, G. P.; TAITT, C. R. Effect of Linker Length on Cell Capture by Poly(ethylene glycol)-Immobilized Antimicrobial Peptides. *Langmuir* **2017**, *33*, 2878-2884, DOI : 10.1021/acs.langmuir.6b04481 (cf. p. 84, 85).
- (428) HAN, X.; ZHENG, J.; LIN, F.; KURODA, K.; CHEN, Z. Interactions between Surface-Immobilized Antimicrobial Peptides and Model Bacterial Cell Membranes. *Langmuir* **2017**, *34*, 512-520, DOI : 10.1021/acs.langmuir.7b03411 (cf. p. 85).
- (429) KÜGLER, R.; BOULOUSA, O.; RONDELEZ, F. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology* **2005**, *151*, 1341-1348, DOI : 10.1099/mic.0.27526-0 (cf. p. 85).
- (430) BEHRENDT, R.; WHITE, P.; OFFER, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 4-27, DOI : 10.1002/pssc.2836 (cf. p. 85).
- (431) MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154, DOI : 10.1021/ja00897a025 (cf. p. 85).
- (432) BOULADE, M. Imagerie SPR optimisée en résolution pour l'étude et la détection de bactéries., thèse de doct., Université Grenoble Alpes, 2019 (cf. p. 92).
- (433) MIDURA, R.; YANAGISHITA, M. Chaotropic Solvents Increase the Critical Micellar Concentrations of Detergents. *Anal. Biochem.* **1995**, *228*, 318-322, DOI : 10.1006/abio.1995.1357 (cf. p. 96).
- (434) DANIEL, C.; ROUPIOZ, Y.; GASPARUTTO, D.; LIVACHE, T.; BUHOT, A. Solution-Phase vs Surface-Phase Aptamer-Protein Affinity from a Label-Free Kinetic Biosensor. *PLoS ONE* **2013**, *8*, sous la dir. de WANUNU, M., e75419, DOI : 10.1371/journal.pone.0075419 (cf. p. 101, 104).
- (435) BOS, R.; van der MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* **1999**, *23*, 179-230, DOI : 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x (cf. p. 102).
- (436) TUSON, H. H.; WEIBEL, D. B. Bacteria–surface interactions. *Soft Matter* **2013**, *9*, 4368, DOI : 10.1039/c3sm27705d (cf. p. 102).
- (437) BOMAN, H. G. Antibacterial peptides : basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* **2003**, *254*, 197-215, DOI : 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x (cf. p. 107).
- (438) BAUDIN, B. Les tests de diagnostic rapide en biochimie médicale : intérêts, limites et dangers. *Revue Francophone des Laboratoires* **2015**, *2015*, 31-38, DOI : 10.1016/s1773-035x(15)30247-1 (cf. p. 111).
- (439) REECE, J. B.; CAMPBELL, N. A. Biology., eng, Jane B. Reece ... [et al.], Rev. ed. of : Biology / Neil A. Campbell, Jane B. Reece. 8th ed. c2009., Boston, 2011 (cf. p. 111).
- (440) JOHNSON, M. D. Human biology., eng, Michael D. Johnson., Includes bibliographical references and index., Boston, 2012 (cf. p. 111).
- (441) COCKERILL, F. R.; HUGHES, J. G.; VETTER, E. A.; MUELLER, R. A.; WEAVER, A. L.; ILSTRUP, D. M.; ROSENBLATT, J. E.; WILSON, W. R. Analysis of 281,797 Consecutive Blood Cultures Performed over an Eight-Year Period : Trends in Microorganisms Isolated and the Value of Anaerobic Culture of Blood. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24*, 403-418, DOI : 10.1093/clinids/24.3.403 (cf. p. 113).

- (442) KIRN, T.; WEINSTEIN, M. Update on blood cultures : how to obtain, process, report, and interpret. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19*, 513-520, DOI : 10.1111/1469-0691.12180 (cf. p. 113).
- (443) SPAARGAREN, J.; van BOVEN, C. P.; VOORN, G. P. Effectiveness of resins in neutralizing antibiotic activities in bactec plus Aerobic/F culture medium. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 3731-3733 (cf. p. 113).
- (444) FLAYHART, D.; BOREK, A. P.; WAKEFIELD, T.; DICK, J.; CARROLL, K. C. Comparison of BACTEC PLUS Blood Culture Media to BacT/Alert FA Blood Culture Media for Detection of Bacterial Pathogens in Samples Containing Therapeutic Levels of Antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *45*, 816-821, DOI : 10.1128/jcm.02064-06 (cf. p. 113).
- (445) MILLER, N. S.; ROGAN, D.; ORR, B. L.; WHITNEY, D. Comparison of BD Bactec Plus Blood Culture Media to VersaTREK Redox Blood Culture Media for Detection of Bacterial Pathogens in Simulated Adult Blood Cultures Containing Therapeutic Concentrations of Antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 1624-1627, DOI : 10.1128/jcm.01958-10 (cf. p. 113).
- (446) CLSI, *Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline : Vol.27 No.17*; NAT'L COMM CLINICAL LAB STANDARDS : 2007 (cf. p. 114).
- (447) ENG, J. Effect of sodium polyanethol sulfonate in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **1975**, *1*, 119-123 (cf. p. 114).
- (448) WALKER, F. J.; ESMON, C. T. The molecular mechanisms of heparin action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *83*, 1339-1346, DOI : 10.1016/0006-291x(78)91368-2 (cf. p. 114).
- (449) TRAUB, W. H.; LOWRANCE, B. L. Anticomplementary, anticoagulatory, and serum-protein precipitating activity of sodium polyanetholsulfonate. *Appl. Microbiol.* **1970**, *20*, 465-468 (cf. p. 114).
- (450) HAEBLER, T. V.; MILES, A. A. The action of sodium polyanethol sulphonate ("liquoid") on blood cultures. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **1938**, *46*, 245-252, DOI : 10.1002/path.1700460204 (cf. p. 114).
- (451) BELDING, M. E.; KLEBANOFF, S. J. Effect of sodium polyanetholsulfonate on antimicrobial systems in blood. *Appl. Microbiol.* **1972**, *24*, 691-698 (cf. p. 114).
- (452) ENG, J.; IVELAND, H. Inhibitory effect in vitro of sodium polyanethol sulfonate on the growth of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* **1975**, *1*, 444-447 (cf. p. 114).
- (453) KROGSTAD, D. J.; MURRAY, P. R.; GRANICH, G. G.; NILES, A. C.; LADENSON, J. H.; DAVIS, J. E. Sodium polyanethol sulfonate inactivation of aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *20*, 272-274, DOI : 10.1128/aac.20.2.272 (cf. p. 114).
- (454) ZHU, B.; EURELL, T.; GUNAWAN, R.; LECKBAND, D. Chain-length dependence of the protein and cell resistance of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *56*, 406-416, DOI : 10.1002/1097-4636(20010905)56:3<406::aid-jbm1110>3.0.co;2-r (cf. p. 120).
- (455) NORDE, W.; GAGE, D. Interaction of Bovine Serum Albumin and Human Blood Plasma with PEO-Tethered Surfaces : Influence of PEO Chain Length, Grafting Density, and Temperature. *Langmuir* **2004**, *20*, 4162-4167, DOI : 10.1021/1a030417t (cf. p. 120).
- (456) RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162*, 87-106, DOI : 10.1016/j.cis.2010.12.007 (cf. p. 124).
- (457) FANG, F.; SZLEIFER, I. Competitive adsorption in model charged protein mixtures : Equilibrium isotherms and kinetics behavior. *The Journal of Chemical Physics* **2003**, *119*, 1053-1065, DOI : 10.1063/1.1578992 (cf. p. 124).
- (458) SHIN, D.-S.; LIU, Y.; GAO, Y.; KWA, T.; MATHARU, Z.; REVZIN, A. Micropatterned Surfaces Functionalized with Electroactive Peptides for Detecting Protease Release from Cells. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 220-227, DOI : 10.1021/ac302547p (cf. p. 129).
- (459) ALBERT, K. J.; LEWIS, N. S.; SCHAUER, C. L.; SOTZING, G. A.; STITZEL, S. E.; VAID, T. P.; WALT, D. R. Cross-Reactive Chemical Sensor Arrays. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2595-2626, DOI : 10.1021/cr980102w (cf. p. 140).

- (460) BRENET, S.; JOHN-HERPIN, A.; GALLAT, F.-X.; MUSNIER, B.; BUHOT, A.; HERRIER, C.; ROUSSELLE, T.; LIVACHE, T.; HOU, Y. Highly-Selective Optoelectronic Nose Based on Surface Plasmon Resonance Imaging for Sensing Volatile Organic Compounds. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 9879-9887, DOI : 10.1021/acs.analchem.8b02036 (cf. p. 140, 142).
- (461) HUSSON, F.; LÊ, S.; PAGÈS, J., *Analyse de données avec R*; PU Rennes : 2016 (cf. p. 141).
- (462) GOODNER, K. L.; DREHER, J.; ROUSEFF, R. L. The dangers of creating false classifications due to noise in electronic nose and similar multivariate analyses. *Sens. Actuators, B* **2001**, *80*, 261-266, DOI : 10.1016/S0925-4005(01)00917-0 (cf. p. 141).
- (463) LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* **2008**, *25*, DOI : 10.18637/jss.v025.i01 (cf. p. 141).
- (464) MÄCHLER, M.; ROUSSEEUW, P.; STRUYF, A.; HUBERT, M.; HORNİK, K.; STUDER, M.; ROUDIER, P.; GONZALEZ, J. "Finding Groups in Data" : Cluster Analysis Extended. *CRAN* **2019** (cf. p. 141, 172).
- (465) SWIHART, B. J.; CAFFO, B.; JAMES, B. D.; STRAND, M.; SCHWARTZ, B. S.; PUNJABI, N. M. Lasagna Plots. *Epidemiology* **2010**, *21*, 621-625, DOI : 10.1097/ede.0b013e3181e5b06a (cf. p. 170).
- (466) HUSSON, F.; JOSSE, J.; PAGES, J. Principal component methods-hierarchical clustering-partitional clustering : why would we need to choose for visualizing data? *Technical Report – Agrocampus* **2010**, 1-17 (cf. p. 171).
- (467) WARD, J. H. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* **1963**, *58*, 236-244, DOI : 10.1080/01621459.1963.10500845 (cf. p. 171).
- (468) *Finding Groups in Data*; KAUFMAN, L., ROUSSEEUW, P. J., éd.; John Wiley & Sons, Inc. : 1990, DOI : 10.1002/9780470316801 (cf. p. 172).

Résumé :

L'analyse microbiologique pour confirmer l'absence de bactéries dans des échantillons biologiques normalement sains, comme le sang, est une routine dans de nombreux laboratoires. En effet, la présence de bactéries dans le sang, appelée bactériémie, peut avoir des conséquences très graves, voire mortelles pour le patient. Le protocole standard pour la détection des bactériémies repose jusqu'ici sur l'enrichissement des échantillons sanguins prélevés sur les patients lors de l'hémoculture, afin d'obtenir une population suffisante pour analyse. La lenteur de ce procédé retarde ainsi de parfois plusieurs jours le diagnostic et donc l'adaptation du traitement antibiotique administré au patient. Ces dernières décennies, des techniques comme l'identification par spectrométrie de masse ou les analyses moléculaires, ont permis de diminuer le délai requis pour identifier les pathogènes en cause. Dans ce contexte, l'emploi de biocapteurs est également une alternative. Ce travail propose d'inclure des sondes à large spectre dans un capteur optique par imagerie SPR (résonance de plasmons de surface). Ce système est déjà développé pour la reconnaissance spécifique de pathogènes au cours de leur croissance dans le sang. Les nouveaux ligands proposés et évalués sont les peptides antimicrobiens (PAM). Ces courts peptides cationiques et amphiphiles, présentent l'avantage d'un large spectre d'interaction couplé à une haute stabilité (chimique, thermique et séchage) comparativement aux anticorps employés jusqu'ici. Leur immobilisation sur des prismes SPRI permet d'évaluer simultanément l'affinité de plusieurs PAM à la même souche bactérienne. Les biocapteurs ainsi préparés ont permis de détecter des souches pathogènes d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* en milieu de culture simple, comme en plasma et en sang dilué au milieu d'hémoculture. Le système obtenu permet la détection des pathogènes présents à une concentration initiale de l'ordre de 1 UFC.ml⁻¹, en moins de 24 heures et quel que soit le milieu. Enfin, la mise en place d'analyses statistiques multidimensionnelles a abouti à une classification cohérente des espèces ciblées en milieu simple, comme en sang. Ces résultats montrent le potentiel de ce système pour parvenir à développer un biocapteur à large spectre capable à la fois de détecter, mais aussi d'identifier par affinité croisée des pathogènes bactériens.

Mots-clés : peptides antimicrobiens (PAM), imagerie par résonance de plasmons de surface (SPRI), détection de pathogènes, bactériémie, sang, *E. coli* & *S. aureus*.

Abstract :

Microbiological analysis to confirm the absence of bacteria in normally sterile biological samples, such as blood, is routine in many laboratories. The presence of bacteria in blood, called bacteraemia, can have very serious, and even fatal consequences for the patient. So far, the standard protocol for their detection has been based on the enrichment of blood samples collected from patients, thanks to blood culture, in order to obtain a sufficient population for analysis. These procedures are time consuming which sometimes lead to delays in diagnosis and subsequent adaptation of antibiotic treatments by several days. In recent decades, techniques such as mass spectrometry identification or molecular analyses have reduced the time required to identify the pathogens involved. In this context, the use of biosensors is another promising alternative. This work proposes to include wide spectrum probes in an optical sensor using SPR imaging (surface plasmon resonance). This system is already developed for the specific recognition of pathogens during their growth in the blood. The new ligands we propose to evaluate are antimicrobial peptides (AMP). These short, cationic and amphiphilic peptides have the advantage of having a broad spectrum of interaction with bacteria, coupled with high stability (chemical, thermal and drying), especially compared to the antibodies used so far in this technique. Their immobilization on SPRI prisms allows the simultaneous evaluation of the affinity of several AMP to the same bacterial strain. The biosensors based on AMP were able to detect pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in simple culture medium, such as plasma and diluted blood in blood culture medium. The system obtained allows the detection of pathogens present at an initial concentration of about 1 CFU.ml⁻¹, in less than 24 hours and in all assayed media. Finally, the implementation of multidimensional statistical analyses has resulted in a consistent classification of targeted species, in simple culture medium, such as blood. These results show the potential of this system to develop a wide-spectrum biosensor capable of both detecting and cross-referencing bacterial pathogens.

Keywords : antimicrobial peptides (AMP), surface plasmon resonance imaging (SPRI), pathogen detection, bacteraemia, blood, *E. coli* & *S. aureus*.