



HAL
open science

Imagerie hyperspectrale infrarouge pour l'identification sans marquage de pathogènes sur milieu gélosé

Joël Le Galudec

► To cite this version:

Joël Le Galudec. Imagerie hyperspectrale infrarouge pour l'identification sans marquage de pathogènes sur milieu gélosé. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALS006 . tel-03720569

HAL Id: tel-03720569

<https://theses.hal.science/tel-03720569v1>

Submitted on 12 Jul 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

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

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Joël LE GALUDEC

Thèse dirigée par **Pierre MARCOUX**, Ingénieur chercheur,
Université Grenoble Alpes
et co-encadrée par **Mathieu DUPOY**, CEA

préparée au sein du **Laboratoire Laboratoire d'Electronique et de Technologie de l'Information (LETI - CEA)**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement**

Imagerie hyperspectrale infrarouge pour l'identification sans marquage de pathogènes sur milieu gélosé

Infrared hyperspectral imaging for label-free identification of pathogens on gelose medium

Thèse soutenue publiquement le **4 mars 2022**,
devant le jury composé de :

Monsieur PIERRE MARCOUX

Ingénieur docteur, CEA CENTRE DE GRENOBLE, Directeur de thèse

Monsieur ERIK GOORMAGHTIGH

Professeur, Université Libre de Bruxelles, Rapporteur

Monsieur FREDERIC FOUCHER

Ingénieur de recherche, CNRS CENTRE LIMOUSIN POITOU-CHARENTES, Rapporteur

Madame ALICE CAPLIER

Professeur des Universités, GRENOBLE INP, Présidente

Monsieur MAX MAURIN

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Examineur

Monsieur FREDERIC MALLARD

Ingénieur docteur, BIOMERIEUX, Examineur



Remerciements

En premier lieu, je tiens ici à remercier mes encadrants, Pierre Marcoux et Mathieu Dupoy, sans qui ce travail de thèse n'aurait évidemment jamais existé. Merci à vous deux pour votre motivation, votre investissement et pour vos expertises à la complémentarité précieuse. Je retiendrai toujours votre enthousiasme pour ce projet et votre disponibilité dès que j'avais besoin d'aide, mais aussi votre humour et votre capacité à trouver le jeu de mot qui va bien au milieu d'une conversation très sérieuse. Enfin, je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir confié ce sujet alors même que mon expérience en instrumentation se limitait à appuyer sur des boutons. Votre confiance m'aura offert la chance unique d'apprendre et de découvrir dans les domaines de l'optique et de l'instrumentation, et pour cela vous avez toute ma gratitude.

Je remercie ensuite les membres du jury : les examinateurs Max Maurin et Frédéric Mallard, pour leurs questions et l'intérêt porté au sujet, la présidente Alice Caplier pour son temps et les corrections apportées au manuscrit, et enfin Erik Goormaghtigh et Frédéric Foucher pour leurs relectures détaillées de ces travaux de thèse. Vos remarques, apportées avec bienveillance, auront largement amélioré ce document ou apporté des pistes de réflexion pour la suite des travaux, ce pour quoi je vous remercie encore.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire des capteurs optiques pour leur accueil et pour l'ambiance chaleureuse que vous avez su maintenir tout au long de ces trois années (et qui perdure, je l'espère, encore aujourd'hui). Vos conseils et la découverte de vos sujets respectifs ont été un apport scientifique précieux. Merci en particulier à Laurent Duraffourg, pour son soutien inconditionnel au projet, mais aussi à Loïc, Maryse, Jules, Pierre, Bertrand, Vincent, Christophe et Charlotte pour les explications sur vos sujets et les conversations ayant animé la salle café. Enfin, merci à Olivier Lartigue, pour son inventivité, ses solutions et son inébranlable capacité à trouver *la* pièce qui résoudra tous vos soucis.

Merci ensuite à tous les non-permanents de passage ou encore en poste au LCO : Thomas pour tes encouragements, tes conseils et le soutien contre les blagues de Gabi. Gabi pour tes blagues, mais aussi pour les sorties tacos-bière-bastille, les simulations de gravité toriques et tes remarques plus qu'appréciées sur tout ce que j'ai pu te faire lire de scientifique ou non. Merci à Marine pour les pôtites blagues et à Marine pour les sales blagues. À Boris pour la relecture détaillée de ce manuscrit, à Joris pour avoir été la source et la destination de bon nombre de : « Dis voir, comment t'as fait, toi ? », et à Laris pour m'avoir accompagné dans cette grande aventure qu'est la rédaction de thèse sous Word. Merci à Quentin pour m'avoir initié au ski de rando, mais aussi à Coco, l'enfant du bureau (tu verras, un jour tu seras majeur), à Nicolas, Cyrielle, Greg, Etienne, Maxime, Jhouben, Jade Clément, et re-Nicolas. Un merci commun pour les sorties en montage et les innombrables soirées bières, crêpes, quiches, et viontonfaituneraclettecesoir ? Quant aux nouveaux qui arrivent à présent, je vous souhaite de profiter autant que moi de ce cadre propice à l'apprentissage et aux bons moments.

Stéphan ? Bon courage.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai eu plaisir à collaborer : Frédéric-Xavier Gaillard et Yoko Otsuka, les rois du MEB et du silicium poreux, mais aussi les membres du

LSIV, Véronique, Stéphane et Olivier, pour leurs conseils avisés sur le traitement de données. Merci également à Baptiste Delplanque pour ses capteurs bolométriques et pour m'avoir fait confiance pour l'utilisation du FTIR. À Victor et Zoé, pour avoir défriché l'imagerie multispectrale infrarouge avant mon arrivée.

Ces remerciements ne seraient évidemment pas complets sans un mot pour le soutien indéfectible de ma famille, belle-famille et de mes amis. Merci à tous d'avoir su écouter et râler avec moi quand rien ne marchait, mais aussi d'avoir sorti l'apéro et le barbecue quand l'occasion le méritait (et quand elle ne le méritait pas). Merci également aux télétravailleurs d'un certain salon vocal et à Christophe, mon relecteur favori, pour ses retours aussi pertinents qu'impitoyables sur ce manuscrit. À Chloé pour m'avoir laissé squatter chez elle pendant des semaines entières. Enfin, merci à Anne, pour tout le reste. Pour avoir été là en toutes circonstances, pour n'avoir jamais laissé tomber malgré les kilomètres, avoir été un point fixe dans un océan d'incertitude. Merci. Je ne mesurerai jamais assez la chance que j'ai d'être légalement célibataire à tes côtés.

Enfin, merci à toi, lecteur ou lectrice de passage. J'espère que ces pages t'apporteront une lecture plaisante et intéressante, et te souhaite une excellente continuation.

- Joël

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
CHAPITRE I. IDENTIFICATION OPTIQUE DE MICROORGANISMES	9
I.1. INTRODUCTION A L'IDENTIFICATION MICROBIOLOGIQUE	10
I.1.1. <i>La boîte de Petri et l'identification traditionnelle</i>	10
I.1.2. <i>Domaines d'application et contraintes de l'identification</i>	12
I.1.3. <i>La boîte de Petri : un outil obsolète à l'heure de la génomique ?</i>	14
I.1.4. <i>L'analyse de boîte de Petri 2.0</i>	16
I.1.5. <i>Le MALDI-TOF : un nouveau standard d'identification</i>	17
I.2. L'IDENTIFICATION MICROBIOLOGIQUE PAR ANALYSE OPTIQUE SANS MARQUAGE	18
I.2.1. <i>Intérêt d'une analyse optique sans marquage</i>	18
I.2.2. <i>L'imagerie sans lentille</i>	19
I.2.3. <i>Diffusion élastique dans le visible</i>	20
I.3. IDENTIFICATION ET SPECTROSCOPIES VIBRATIONNELLES	22
I.3.1. <i>Phénomènes de vibration moléculaires</i>	23
I.3.2. <i>Identification par spectroscopie vibrationnelle</i>	24
I.3.3. <i>Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier</i>	29
I.4. L'IDENTIFICATION MICROBIOLOGIQUE PAR DES TECHNIQUES D'IMAGERIE SPECTRALES	31
I.4.1. <i>Imageries spectrales</i>	32
I.4.2. <i>Identification par imagerie hyperspectrale dans l'infrarouge moyen : une étude prometteuse</i> .	34
I.4.3. <i>Lasers à cascade quantique et nouvelles perspectives en imagerie infrarouge</i>	35
I.5. CONCLUSION DE PARTIE	37
CHAPITRE II. IMAGERIE MULTISPECTRALE SANS LENTILLE DANS L'INFRAROUGE MOYEN	39
II.1. IMAGERIE MULTISPECTRALE DANS L'INFRAROUGE MOYEN	40
II.1.1. <i>Principe</i>	40
II.1.2. <i>Longueurs d'ondes d'acquisition</i>	42
II.2. BANC DE MESURE.....	46
II.2.1. <i>Source laser MirCat</i>	47
II.2.2. <i>Trajet optique et présentation générale du banc de mesure</i>	48
II.2.3. <i>Matrice de microbolomètres</i>	50
II.2.4. <i>Réglages du capteur microbolométrique</i>	54
II.2.5. <i>Routines de contrôle Python</i>	57
II.3. MEMBRANES	58
II.3.1. <i>Absorbance de l'eau dans l'infrarouge moyen et solutions envisagées</i>	58
II.3.2. <i>Culture sur membrane d'alumine</i>	60
II.3.3. <i>Considérations pratiques pour les acquisitions sur membranes d'alumine</i>	63
II.4. PROTOCOLE ET NON-DESTRUCTIVITE DE LA METHODE	64
II.4.1. <i>Protocole</i>	64
II.4.2. <i>Intérêt d'une acquisition non invasive et non destructive</i>	65
II.4.3. <i>Acquisitions précoces</i>	66
II.4.4. <i>Impact d'une exposition aux infrarouges sur la concentration minimale inhibitrice</i>	67
II.5. PRETRAITEMENT DES IMAGES.....	70
II.5.1. <i>Correction des images</i>	70
II.5.2. <i>Détection des colonies</i>	72
II.6. CONCLUSION DE CHAPITRE ET EXEMPLES D'IMAGES	74

CHAPITRE III. IMAGERIE MULTISPECTRALE ET APPRENTISSAGE MACHINE	76
III.1. INTRODUCTION A LA CLASSIFICATION D'IMAGES PAR APPRENTISSAGE AUTOMATIQUE	77
III.1.1. <i>Un exemple de classification de données : la prédiction du diabète de type 2</i>	77
III.1.2. <i>Le fondement de la preuve de concept : la base de données</i>	79
III.1.3. <i>L'extraction des descripteurs</i>	80
III.1.4. <i>Algorithmes de classification</i>	82
III.1.5. <i>La validation croisée</i>	85
III.2. RESULTATS DE CLASSIFICATION D'IMAGES A L'AIDE DE DESCRIPTEURS <i>AD HOC</i>	88
III.2.1. <i>Descripteurs sélectionnés</i>	88
III.2.2. <i>Préparation des données et premiers résultats de classification</i>	90
III.2.3. <i>Discussion sur les descripteurs</i>	91
III.2.4. <i>Discussion sur les longueurs d'ondes et apport du multispectral</i>	95
III.2.5. <i>Résultats de classification détaillés</i>	98
III.2.6. <i>Conclusion</i>	99
III.3. CLASSIFICATION D'IMAGES PAR RESEAUX DE NEURONES CONVOLUTIFS	100
III.3.1. <i>Introduction aux réseaux de neurones artificiels</i>	100
III.3.1. <i>Apprentissage des réseaux de neurones par descente de gradient et rétropropagation</i>	104
III.3.2. <i>Les réseaux de neurones : des structures organisées en couches</i>	108
III.3.3. <i>Les réseaux de neurones convolutifs et l'analyse d'image</i>	108
III.3.4. <i>Résultats de classification par réseau de neurones convolutifs</i>	111
III.3.5. <i>Résultats de classification</i>	113
III.4. CONCLUSION DE CHAPITRE.....	115
CHAPITRE IV. PERSPECTIVES.....	117
IV.1. ESSAI DE VALIDATION CROISEE DITE « STRICTE » ET SOURCES DE VARIABILITE EXPERIMENTALE	118
IV.1.1. <i>La validation croisée stricte : une question de partition des données</i>	118
IV.1.2. <i>Résultats de classification en validation croisée stricte</i>	120
IV.1.3. <i>Sources de variabilité expérimentale</i>	122
IV.1.4. <i>Évolutions et améliorations envisagées</i>	124
IV.1.5. <i>Conclusion</i>	125
IV.2. ESSAIS DE CULTURE MICROBIOLOGIQUES SUR MEMBRANES EN SILICIUM POREUX	125
IV.2.1. <i>Contexte</i>	125
IV.2.2. <i>Première itération : gravure profonde par procédé Bosch</i>	126
IV.2.3. <i>Seconde itération : Taiko process</i>	128
IV.2.4. <i>Perspectives</i>	130
IV.3. DETECTION D'ANTIBIORESISTANCE PAR MARQUAGE AU DEUTERIUM.....	130
IV.4. POSITIONNEMENT FACE A L'ETAT DE L'ART ET APPLICATIONS ENVISAGEES	133
IV.4.1. <i>Comparaison à l'état de l'art</i>	133
IV.4.2. <i>Application possible pour la surveillance de la qualité de l'eau</i>	133
CONCLUSION GENERALE	136
ANNEXES 138	
ANNEXE A. ORIGINE DES DESSICCATIONS DE COLONIES	138
ANNEXE B. REGLAGES INSTRUMENTAUX POUR LA BASE DE DONNEES	145
ANNEXE C. DISCUSSION SUR LA NORMALISATION DES IMAGES.....	146
ANNEXE D. CLASSIFICATION PAR HISTOGRAMMES DE GRADIENTS ORIENTES	148
ANNEXE E. OPTIMISATION DU NOMBRE DE LONGUEURS D'ONDES SUR DES SOUS-ENSEMBLES DE LA BASE DE	
DONNEES	150
ANNEXE F. CLASSIFICATION PAR INVARIANTS DE ZERNIKE.....	152
ANNEXE G. VERIFICATION DE LA BASE DE DONNEES PAR ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE	155
BIBLIOGRAPHIE.....	156
RESUME - FRANÇAIS	174
ABSTRACT - ANGLAIS	174

Liste des abréviations

	Termes complets	Traduction ou description
ALP	Array Level Packaging	Type de capteur microbolométrique entièrement fermé par une fenêtre unique
ANN	Artificial Neural Network	Réseau de neurones artificiels
AST	Antibiotic Susceptibility Testing	
ATR	Attenuated Total Reflection	Technique de spectroscopie infrarouge
CA	Comité de l'Antibiogramme	
CEA	Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives	
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice	
DFIR	Direct Frequency Infrared Spectroscopy	Technique de spectroscopie infrarouge
ELS	Elastic Light Scattering	
FTIR	Fourier Transformed Infrared Spectroscopy	Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier
LDA	Linear Discriminant Analysis	Analyse discriminante linéaire
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight	Type d'appareil de spectrométrie de masse
MCT	Mercury Cadmium Telluride	Type de capteur infrarouge
MDRO	Multi-Drug Resistant Organism	
MEB	Microscope Électronique à Balayage	
MIR	Infrarouge moyen (Mid-InfraRed)	Gamme de longueurs d'onde allant de 3 à 50 μm
MLPC	Multi-Layer Perceptron Classifier	Perceptron multicouche : type de réseau de neurones artificiel
NUC	Non-Uniformity Correction	Ajustement local des réglages d'une matrice de microbolomètres pour obtenir une image uniforme
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	
PCA	Principal Component Analysis	Analyse en composante principale

PCR	Polymerase Chain Reaction	
PLP	Pixel-Level Packaging	Type de capteur microbolométrique pour lequel chaque pixel est encapsulé indépendamment
QCL	Quantum Cascade Laser	Laser à cascade quantique
QDA	Quadratic Discriminant Analysis	Analyse discriminante quadratique
RF	Random Forest	Forêt aléatoire
ROI	Region Of Interest	
SDK	Software Development Kit	Librairie de fonctions de contrôle d'un instrument fournie par le fabricant
SFM	Société Française de Microbiologie	
SVM	Support Vector Machine	Machine à vecteur support
TSA	Tryptose Soy Agar	Type de milieu de culture classique
UV	UltraViolet	
UVRR	UltraViolet Resonant Raman spectroscopy	

Introduction

L'identification microbiologique regroupe un ensemble de procédés de caractérisation visant à reconnaître l'espèce d'un microorganisme. Elle est aujourd'hui utilisée en routine dans les laboratoires de microbiologie où elle guide le diagnostic en cas de pathologie infectieuse, aide à déterminer un traitement antimicrobien adapté, ou sert encore à retracer l'origine d'une contamination. Cependant, malgré la vaste gamme d'appareils disponibles sur le marché, l'identification reste bien souvent un processus au débit limité et coûteux à mettre en place.

Les rapports décrivant les bénéfices d'une identification rapide et systématique ne manquent pourtant pas. En 2013, une étude montrait qu'en milieu clinique, une diminution de 30 % du temps nécessaire à l'identification du pathogène accélérerait le traitement des infections et faisait chuter le taux de mortalité de 20 % à 14 % (Huang et al. 2013). En 2014, un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé présentait la résistance aux antimicrobiens comme l'une des plus sérieuses menaces contre la santé humaine et la médecine moderne, et préconisait une surveillance accrue et une meilleure connaissance des microorganismes (2014). Une identification précoce permettrait alors d'adapter le traitement au plus vite et ainsi de limiter l'utilisation d'antibiotiques (voir Figure 1, O'Neill, 2016).

Dans ce contexte, les méthodes d'identification traditionnelles sont peu à peu abandonnées. Celles-ci se basent sur une série de tests biochimiques, de colorations et d'observations au microscope ou à l'œil nu réalisées à partir de cultures microbiennes en boîte de Petri. Elles demandent cependant une main d'œuvre nombreuse et qualifiée, et impliquent une part de subjectivité ainsi que des délais de traitement incompatibles avec le nombre d'échantillons à traiter. Aujourd'hui, les acteurs des milieux cliniques, militaires et industriels se tournent donc vers des solutions d'identification plus rapides et/ou plus automatisées, chacun avec son propre cahier des charges, mais toujours avec une volonté de plus grande efficacité des laboratoires.

Ces dernières décennies ont ainsi vu naître des appareils d'identification simplifiés, cherchant soit à se passer de la phase de culture en boîte de Petri, par exemple par des techniques de biologie moléculaire, soit à automatiser et accélérer son analyse. En effet, si l'identification traditionnelle tend à disparaître, la culture sur milieu gélosé reste quant à elle largement employée en laboratoire. Elle est encore aujourd'hui la méthode la plus simple pour multiplier le matériel biologique à bas coût, ce qui reste nécessaire pour certaines analyses comme les tests de susceptibilité aux antibiotiques, mais permet surtout d'isoler les microorganismes par étalement. Cette séparation des cellules, aussi bien de la matrice où elles ont été prélevées que des cellules entre elles, suffit à faire de la boîte de Petri un outil incontournable et omniprésent dans les laboratoires de microbiologie.

L'analyse rapide, précise et non-destructive des colonies cultivées en boîte de Petri est donc l'un des défis auquel tente de répondre une nouvelle génération d'outils d'identification. Celle-ci pourrait naître de méthodes d'analyse optiques dites *sans marquage*, c'est-à-dire sans ajout de réactif préalablement à la mesure optique, ce qui réduit à la fois les coûts et les temps de traitement. Ici, nous nous intéressons à une technique en particulier : l'imagerie multispectrale dans le moyen infrarouge (MIR). Elle permettrait une identification rapide de cultures en boîte

de Petri en analysant un grand champ optique, tout en combinant à la fois des informations sur la morphologie et sur la composition chimique des échantillons. L'objectif à terme est d'aboutir à une méthode d'identification non-destructive et sans prélèvement des colonies.

Après un premier chapitre dédié à l'état de l'art, le chapitre II présentera le principe et les aspects expérimentaux de la méthode. Il s'attardera en particulier sur trois éléments rendant aujourd'hui possible une imagerie infrarouge sur colonies microbiennes : une nouvelle génération de sources infrarouges de haute puissance – les lasers à cascade quantique –, de nouveaux capteurs infrarouges non-refroidis et enfin l'utilisation de membranes en alumine poreuse. Déposées à la surface d'un milieu de culture, ces dernières font office de supports de culture pour les colonies, permettant dès lors de les déplacer hors de la boîte de Petri sans perturber leur croissance ou leur morphologie. Le chapitre III s'intéressera ensuite à une évaluation des performances de différentes méthodes d'apprentissage machine pour la classification d'une base de données d'images multispectrales de colonies. Enfin, le chapitre IV discutera des avantages et des limites de cette technologie en regard de l'état de l'art, et donnera quelques pistes pour la suite des travaux.

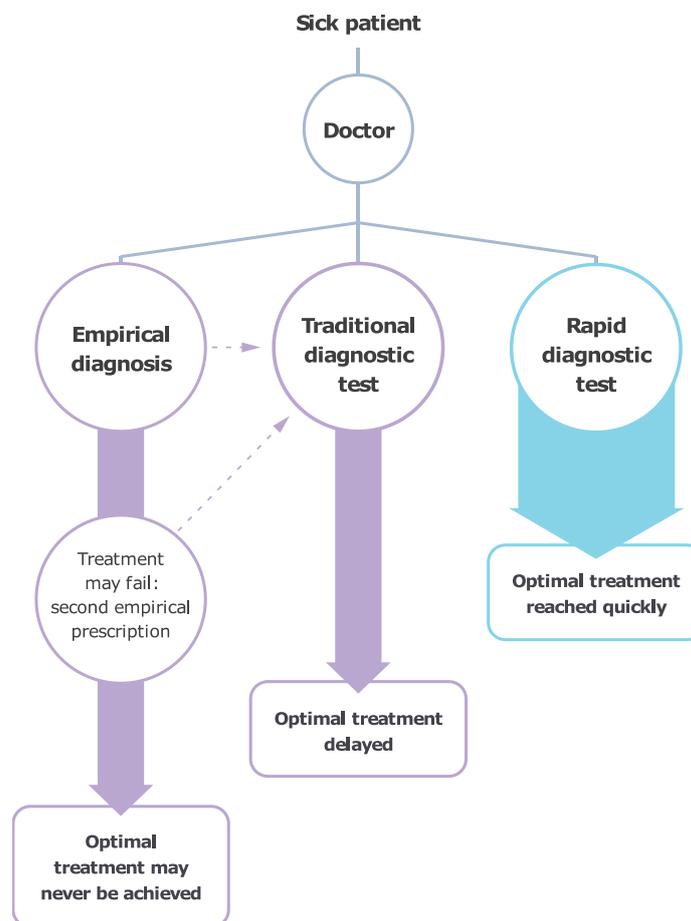


Figure 1. Intérêt des tests de diagnostic rapide en milieu clinique. Adapté de : *The review on antimicrobial resistance (O'Neill 2016)*.



Chapitre 1

L'identification microbiologique par des techniques d'analyse optique

Introduction – La classification du vivant, ou *classification taxonomique*, répertorie les organismes connus en groupes imbriqués appelés *taxons*. Un Règne contient ainsi plusieurs Embranchements, qui contiennent eux-mêmes plusieurs Classes, etc. Dans ce buissonnement de ramifications se trouve tout à l’extrémité des branches un dernier groupe fondamental : l’espèce. Si définir une espèce est loin d’être aisé, particulièrement en microbiologie, contentons-nous ici de dire que chaque espèce regroupe ensemble des organismes aux caractéristiques génétiques et métaboliques proches. L’espèce est donc l’unité fondamentale de la classification, et identifier un microorganisme revient à trouver son espèce. Toutefois, deux espèces peuvent parfois être très similaires si elles appartiennent au même genre ou à la même famille, ce qui complique l’identification. Il faut alors se baser sur des critères de différenciation chimiques, morphologiques ou encore génétiques, mais surtout disposer d’assez de matériel biologique et séparer chaque espèce à analyser. Pour ce faire, le microbiologiste peut compter sur un outil évoqué en introduction et que nous présenterons à présent : la boîte de Petri.

Avant de continuer, précisons qu’il existe un dernier niveau de classification taxonomique. À l’organisation Règne > Classe > Ordre > Famille > Genre > Espèce, s’ajoute ainsi la notion de *Souche* : une sous-population au sein d’une espèce. Ces souches sont génétiquement proches, mais peuvent présenter une importante variabilité en termes de métabolisme, de pathogénicité et de résistance aux traitements antibiotiques. L’identification doit donc parfois aller jusqu’à la souche, auquel cas nous parlerons de *typage*.

I.1. Introduction à l’identification microbiologique

I.1.1. La boîte de Petri et l’identification traditionnelle

Proposée dès 1887 par Julius Richard Petri (Petri 1887), la boîte de Petri s’impose encore aujourd’hui comme un outil fondamental en microbiologie (Lagier et al. 2015). Elle consiste en un réceptacle en plastique ou en verre, servant de support de croissance aux microorganismes *via* l’addition d’un milieu de culture gélifié (Hitchens et Leikind 1939). Une fois étalées à la surface et incubées à la bonne température, les cellules isolées se divisent et s’accumulent sur place. Cette accumulation donne alors naissance à ce que l’on appelle une colonie : un amas de cellules identiques, ou *clones*, liées entre elles par une matrice extracellulaire et pouvant mesurer jusqu’à plusieurs millimètres de diamètre (Figure 2). La culture de colonies, dont le développement peut prendre de 6 à 72 h, permet donc de :

- **Multiplier** le matériel biologique disponible.
- **Cloner** les cellules et s’assurer que toute la colonie provienne d’une même origine. Le milieu solide force en effet les cellules à se diviser et s’accumuler sur place, une colonie est donc constituée d’individus génétiquement identiques.
- **Isoler** les différentes espèces mélangées dans un échantillon liquide *via* l’étalement.
- **Détecter** certaines espèces précises *via* des milieux de culture sélectifs (Orenga et al. 2009).

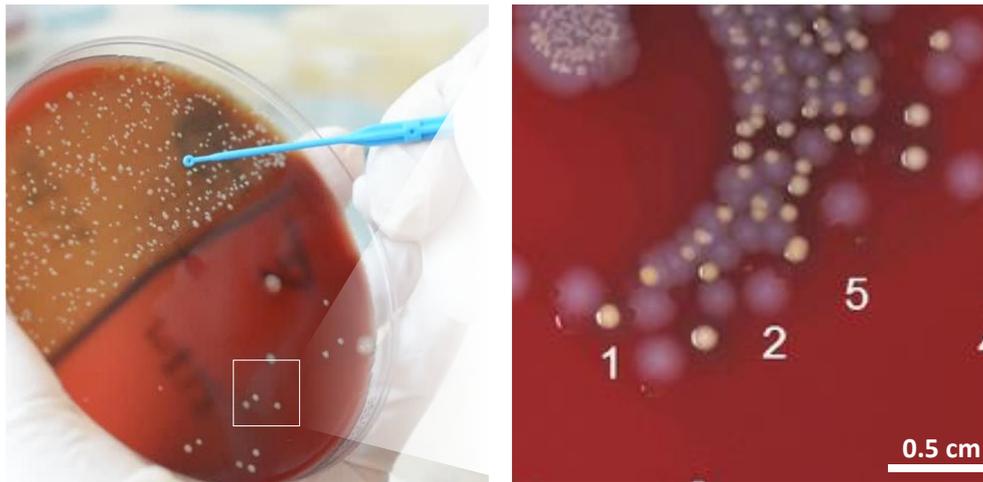


Figure 2. Exemple d'une culture bactérienne sur boîte de Petri. A gauche : boîte entière résultant d'une culture d'une seule espèce microbienne sur un milieu nutritif de type COS (Columbia blood agar). À droite : agrandissement d'une portion de boîte sur laquelle plusieurs espèces sont distinguables grâce à la morphologie de leurs colonies. L'étalement sur la boîte permet non seulement d'augmenter la quantité de matériel biologique disponible, mais également de séparer spatialement les différentes espèces. Crédits photo : Géraldine Durand (Géraldine Durand 2015).

Le phénotype d'une colonie – sa morphologie et sa réponse à la composition chimique d'un environnement – découle de l'organisation et du métabolisme des cellules qui la composent. Or, celui-ci varie d'une espèce à l'autre. Des paramètres comme le rayon, la circularité, l'aspect des bords, la couleur, la texture ou même l'odeur sont autant d'indices sur lesquels une personne entraînée peut s'appuyer pour identifier les colonies d'intérêt (Figure 3). L'étalement ayant au préalable distribué les différentes espèces à la surface du milieu, l'observation d'une boîte de Petri offre donc en un regard un aperçu de la diversité microbienne d'un échantillon (Figure 2, droite).

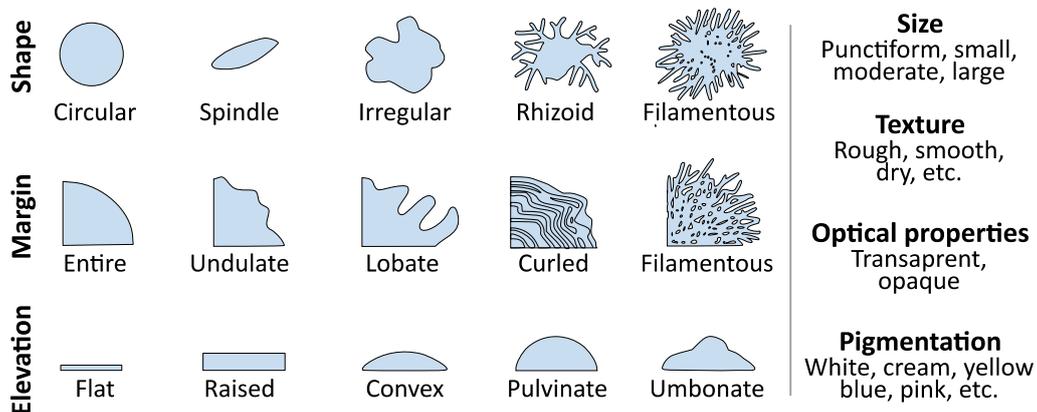


Figure 3. Exemples de critères morphologiques d'intérêt pour l'identification de colonies microbiennes. Extrait et adapté d'après Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. Seventh Edition, Chapter 5 : Microbial nutrition (Willey et al. 2008).

L'observation seule n'est pourtant pas suffisante pour proposer un diagnostic. Pour atteindre une identification à l'espèce, la microbiologie traditionnelle se base sur des analyses comme la coloration de Gram, l'observation microscopique de la forme des cellules, des réactions chimiques, des cartographies de susceptibilité aux antibiotiques ou encore la croissance sur des milieux chargés en réactifs colorés – appelés milieux *chromogéniques* (Perry et Freydière 2007). Ces tests aboutissent à un tableau de caractéristiques qui, par expérience de l'observateur

et comparaison avec des tables de référence, permettent de reconnaître une espèce *via* ses propriétés chimiques, métaboliques et morphologiques. Ils sont cependant lents, nécessitent pour certains des réactifs coûteux ou demandent une préparation d'échantillon secondaire fastidieuse, ce qui ne répond plus aux exigences actuelles.

Remarque 1. Si l'appellation microorganismes regroupe un vaste ensemble d'espèces réparties dans tous les domaines du vivant, elle désignera ici uniquement les organismes unicellulaires les plus fréquemment causes d'infections ou de contaminations industrielle : bactéries et champignons unicellulaires.

I.1.2. Domaines d'application et contraintes de l'identification

Les exigences pour l'identification dépendent de l'application ciblée. Celles-ci se regroupent en quatre secteurs : la santé, la sécurité nationale, le contrôle qualité et l'écologie microbienne (Figure 4).



Figure 4. Résumé graphique des domaines d'application du diagnostic microbiologique. Crédits photo : photothèque CEA.

En milieu clinique, l'identification microbienne se concentre sur la recherche de pathogènes chez un patient. Elle est ainsi utilisée pour poser un diagnostic et apporter un traitement en conséquence. La rapidité de l'analyse est ici un facteur critique, puisque directement lié au taux de survie du patient (Huang et al. 2013). Or, le processus complet, de la prise d'échantillon (sang, urine, salive, etc.) à la réception des résultats d'identification, impose un délai de traitement conséquent (Figure 5). La durée totale varie en fonction des échantillons et de l'organisation de l'organisme clinique, mais est généralement comprise entre 24 et 80 h auxquelles s'ajoutent d'éventuels tests de résistance aux antibiotiques (Huang et al. 2013; Rönnberg et al. 2013).

Dans ce secteur, les risques liés aux bactéries multi-résistantes aux antibiotiques nécessitent également une multiplication des tests de routine. Le dépistage préopératoire de *Staphylococcus aureus* (connu sous le nom vernaculaire de Staphylocoque doré) est, par exemple, fortement recommandé depuis une quinzaine d'années pour certains patients, notamment en cas de séjours répétés à l'hôpital (SFHH 2004; Stenholm et al. 2013; Humphreys et al. 2016).

Les laboratoires médicaux sont donc particulièrement demandeurs en technologies d'identification rapides et capables de traiter un grand nombre d'échantillons en parallèle. Pour limiter les délais liés au transport, des appareils compacts et bon marché pouvant être installés au plus près des unités cliniques seraient également bienvenus. Enfin, le coût par analyse est toujours un facteur intéressant à prendre en compte.

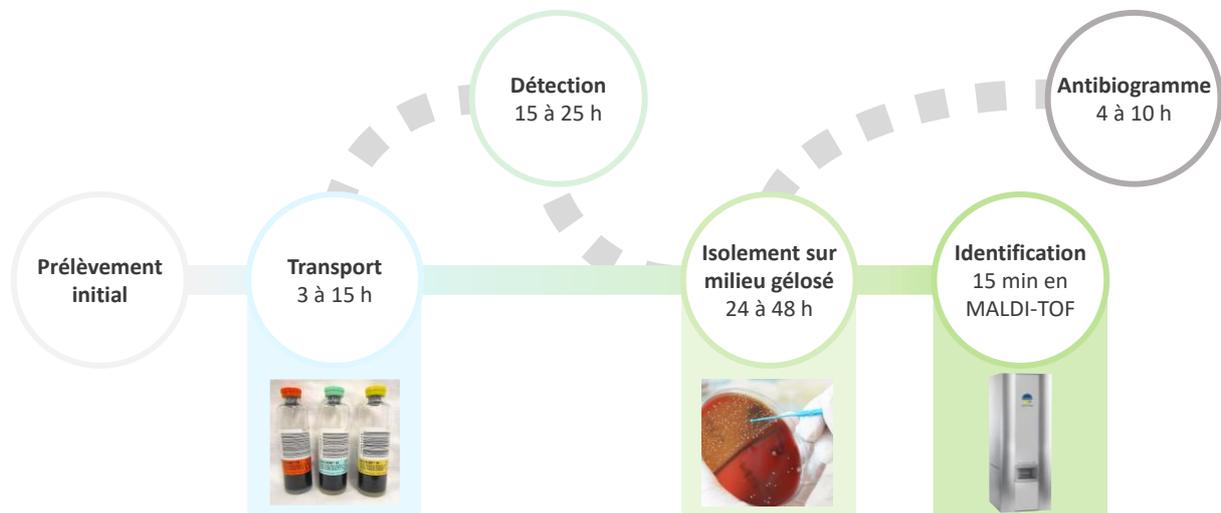


Figure 5. Principales étapes et délais pour l'identification en milieu clinique (Rönnberg et al. 2013). Crédits photos : James Heilman (CC 4.0, wikimédia) et bioMérieux.

Les mêmes contraintes se retrouvent dans le secteur industriel, où les normes de qualité imposent des suivis microbiologiques réguliers. Ceux-ci attestent de la stérilité d'un équipement ou d'un procédé de fabrication, ou encore de l'absence de contaminant dans un produit fini. On peut citer en exemple la recherche de pathogènes dans des produits alimentaires (Gowen et al. 2015; Saravanan et al. 2020; Spyrelli et al. 2020), mais les industries non-alimentaires, comme la pharmacologie ou la cosmétologie, sont également exposés. Celles-ci posent des difficultés spécifiques, notamment une grande variété d'espèces à identifier et une grande marge de progression à réaliser en termes de nombre d'échantillons analysés.

Entre 2005 et 2018, 49 % des contaminations reportées étaient dues à des agents non-identifiés (Cunningham-Oakes et al. 2019). En effet, les tests de routine ciblent quelques pathogènes communs imposés par la législation, mais ignorent par exemple des opportunistes comme les *Enterobacter*. Or, à terme, l'identification pourrait devenir obligatoire en cas de contamination, tout comme les tests de susceptibilité aux antibiotiques. Dans les années à venir, la demande d'outils d'identification bon marché en provenance de l'industrie pourrait donc fortement augmenter.

Enfin, les domaines de la défense nationale et de l'écologie ont chacun des contraintes et des objectifs extrêmement spécifiques, le premier exigeant des résultats immédiats sans souci de coût ; le second s'intéressant à de larges volumes d'espèces souvent inconnues. Ces deux domaines utilisent donc des outils bien précis qui seront évoqués en Remarque 2 (page 15), mais qui ne correspondent pas aux cahiers des charges des deux autres domaines. Ici, nous discuterons donc principalement du diagnostic infectieux et du contrôle qualité.

En résumé, les laboratoires de microbiologie modernes demandent des solutions d'identification plus rapides que la méthode traditionnelle, bon marché, et surtout le plus

automatisé possible (Park et Kricka 2017). Dans ce contexte, la boîte de Petri semble perdre de son intérêt face à des technologies concurrentes comme la biologie moléculaire.

I.1.3. La boîte de Petri : un outil obsolète à l'heure de la génomique ?

Malgré ses avantages, la boîte de Petri demande une période d'incubation de 6 à 72 heures avant de voir se former des colonies. Pour réduire les délais d'identification, une approche consiste à se passer ou à restreindre au maximum cette étape de culture pour identifier directement les cellules prélevées, généralement via des techniques de biologie moléculaire, comme le séquençage d'ADN.

Le séquençage d'ADN, ou séquençage génétique, consiste à décoder l'information du génome – ou d'une portion du génome – d'un organisme. Dans le cas de l'identification, comparer la séquence obtenue à celles répertoriées dans une banque de données génomiques permet de rapprocher un échantillon d'un genre, d'une espèce, voire d'une souche. On parle alors d'identification *génotypique* ; par opposition à l'identification *phénotypique* qui se base sur l'ensemble des caractéristiques affichées par l'organisme, qu'elles soient morphologiques ou chimiques.

Pour accélérer les analyses, le séquençage se concentre généralement sur des gènes présents chez la majorité des organismes, mais dont la séquence exacte varie légèrement d'une espèce à l'autre. C'est par exemple le cas des gènes codants pour certains ARN ribosomiaux, en particulier l'ARNr 16s (Janda et Abbott 2007). Ceux-ci sont considérés comme universels, et permettent l'identification d'organismes n'ayant pas été reconnus par d'autres méthodes biochimiques classiques (James 2010). Le séquençage 16s est cependant un procédé relativement lent, nécessitant une instrumentation et une main d'œuvre conséquentes, ainsi qu'une amplification préalable de l'ADN à séquencer par PCR.

La PCR – ou *réaction en chaîne par polymérase* (Saiki et al. 1988) – est une technique d'*amplification* du nombre de copies d'ADN en présence de courtes séquences d'acide nucléique monobrin, appelées *amorces* (Figure 6). Elle est utilisée pour augmenter la quantité d'ADN avant un séquençage, mais permet également d'identifier un échantillon sans même séquencer. En effet, les amorces ne peuvent se lier à l'ADN que si leur séquence est complémentaire de celui-ci (on parle d'*hybridation*). Dans le cas d'une identification, les amorces sont conçues pour reconnaître une portion d'ADN spécifique à une espèce donnée. Si la reconnaissance se fait, la réaction de polymérisation peut avoir lieu et duplique la quantité d'acide nucléique. À l'issue de n cycles de PCR, la quantité d'ADN initiale a donc été multiplié par 2^n . La quantification du nombre de copie à l'aide d'un marqueur fluorescent permet alors de confirmer ou non la présence d'une seule espèce.

Pour tester n espèces, on place l'échantillon en présence de n types d'amorces nucléotidiques différentes, chaque amorce ciblant spécifiquement l'une des espèces dont on cherche à détecter la présence. L'une des forces de cette méthode découle de la conception des amorces qui permettent, selon la spécificité des séquences ciblées, d'identifier des espèces parfois proches (Morot-Bizot et al. 2004) et, dans certains cas, d'aller jusqu'au typage de souches résistantes aux antibiotiques (Vannuffel et al. 1995). De plus, la PCR ne s'intéressant qu'à l'ADN, elle détecte indistinctement les cellules vivantes, mortes ou même viables mais non cultivables.

Des appareils comme le FilmArray® (Biofire) utilisent ce principe pour détecter certaines espèces en moins d'une heure, et sans culture préalable. Cette accélération des vitesses d'analyse est particulièrement intéressante dans les milieux hospitaliers et militaires (voir Remarque 2), mais nécessite en contrepartie des consommables pouvant coûter jusqu'à 120 \$ par échantillon (Xu et al. 2013). De plus, les tests par PCR ne détectent qu'un petit nombre d'espèces, prédéterminé par les amorces ADN (en général, entre 8 et 10). L'identification se fait donc *a priori*, et un pathogène inattendu restera indétectable.

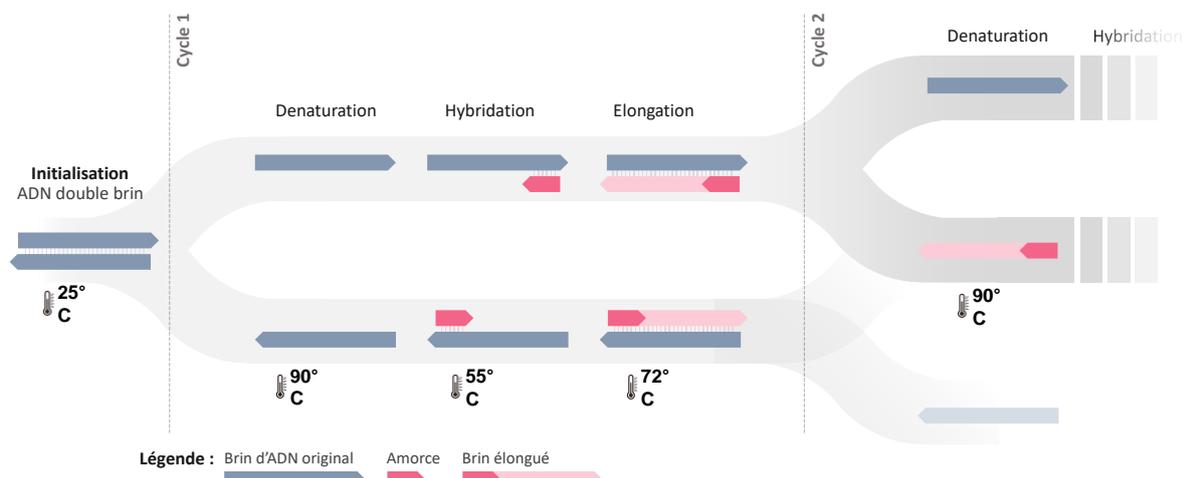


Figure 6. Étapes d'un cycle d'amplification PCR. La réaction part d'une séquence d'ADN double brin, placée dans un tapon à 25°C. La température du bain est tout d'abord augmentée jusqu'à 90°C, température à laquelle les deux brins d'ADN se séparent : c'est l'étape de dénaturation. En redescendant en température, les brins d'ADN s'hybrident à nouveau, en commençant par les amorces. La température est ensuite remontée jusqu'à 72°C, température de fonctionnement de certaines polymérases à ADN dites thermostables, qui vont répliquer l'ADN guide à partir des amorces (Gelfand 1989). À l'issue de l'élongation, la réaction aboutit à la création de deux séquences d'ADN double brin à partir d'une unique séquence initialement présente. Le cycle dénaturation, hybridation, élongation est ensuite répété autant de fois que nécessaire.

Cette approche génomique, bien que rapide et précise, n'est donc pas adaptée à tous les tests. En conséquence, la boîte de Petri est toujours largement employée à la fois en industrie, mais aussi dans les hôpitaux où elle reste nécessaire pour les tests de susceptibilité aux antibiotiques (AST) (van Belkum et al. 2013; Lagier et al. 2015). De plus, la séparation spatiale offerte par la boîte de Petri offre une première étape de sélection basée sur des critères morphologiques. Ce tri grossier oriente les analyses approfondies vers les colonies les plus suspectes. Une boîte de Petri avec un milieu gélosés standard coûtant environ 0.5 €, cette phase de croissance est un moyen bon marché de limiter des tests secondaires coûteux. Elle évite également de tester des échantillons négatifs, c'est-à-dire sans micro-organismes cultivables.

Remarque 2. Dans le secteur militaire, l'identification ne cible que quelques agents de menace biologique précis, comme l'Anthrax ou la peste, ce qui fait de la PCR un outil tout désigné. Des instruments de terrain automatisés comme le FilmArray BioSurveillance ou le RAZOR EX fournissent aujourd'hui des résultats en une heure et, compte tenu des enjeux, sont difficilement concurrentiels malgré un coût de 120 à 200€ par analyse (Biofire defense 2019).

L'étude des écosystèmes microbiens quant à elle utilise abondamment des techniques dérivées de la PCR, comme la PCR environnementale (ePCR) ou la PCR quantitative (Q-PCR) (Smith et Osborn 2009). Ces méthodes détectent de nombreuses espèces en parallèle, souvent inconnues et dont l'immense majorité est incultivable en laboratoire, ce qui reste aujourd'hui impossible *via* d'autres technologies.

La plupart des techniques d'identification modernes ne visent donc pas à supprimer la boîte de Petri, mais à rendre son analyse plus rapide, plus fiable, et surtout automatisée.

I.1.4. L'analyse de boîte de Petri 2.0

Si quelques évolutions originales de la boîte de Petri ont été proposées, par exemple pour augmenter le nombre d'échantillons par culture (Ingham et al. 2007, 2010), ou encore cultiver des espèces jusqu'ici incultivables (Nichols et al. 2010), les travaux actuels se concentrent plutôt sur l'automatisation. Ce dernier axe de recherche conserve ainsi les avantages de la boîte de Petri (bas coût, représentation globale d'un échantillon, préparation pour l'AST), tout en visant une analyse facilitée. L'automatisation permet non seulement d'alléger la charge de travail sur la préparation et l'analyse des échantillons, et donc d'accélérer leur traitement, mais est surtout aujourd'hui critique pour garantir le suivi des lots et ainsi répondre aux normes de qualité

Les différentes étapes du travail sur boîte de Petri ont ainsi été automatisées séparément (Park et Kricka 2017). L'ensemencement, l'incubation, le comptage (Mansberg 1957; Puchkov 2010) et aujourd'hui le repiquage (COLIBRI, BioMérieux) peuvent tous se faire au sein de laboratoires de microbiologie intégrés, comme présenté en Figure 7.a. Ces laboratoires automatiques se servent d'imageurs (Figure 7, b et c) et d'un large panel de capteurs et de modalités d'éclairage pour observer l'évolution des colonies (Biomérieux 2016; Kirn 2016; Bona et al. 2017; Copan). Seul le repiquage des colonies, encore récent sur le marché, ainsi que certaines préparations d'échantillons nécessitent toujours une intervention humaine.

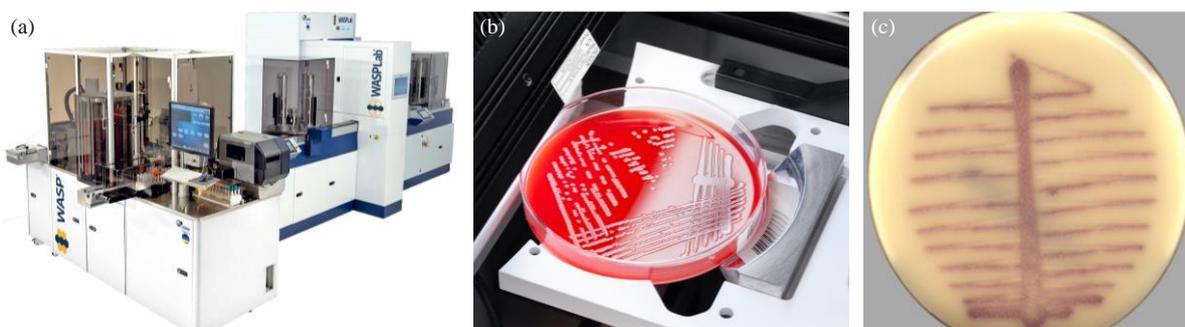


Figure 7. Laboratoire de microbiologie intégré WASPLab®, avec système d'imagerie automatisé. (a) : vue générale du laboratoire, extrait du site de BioMérieux (Biomérieux 2016). (b) : boîte de Petri en place pour imagerie, après étalement automatique (Copan). (c) : image de culture sur milieu chromogénique telle que fournie par le logiciel WASPLab (Faron et al. 2016b). L'apparition de colonies (dite culture positive) est aisément détectée avec un tel système, et ce avec une intervention humaine minimale.

Toutefois, malgré des évolutions dans le domaine de l'imagerie, qui seront discutées à partir de la section I.4 (p.31), les imageurs actuels restent limités à des informations parcellaires, comme la couleur, le rayon, ou encore la mesure de la vitesse de croissance (Ancin-Murguzur et al. 2018). Pour dépasser ces limitations, des milieux chromogéniques sélectifs peuvent être utilisés. Ceux-ci sont conçus pour démontrer la présence d'une espèce, d'une souche ou encore d'un organisme résistant aux antibiotiques (Faron et al. 2016b, 2016a), mais se limitent à une

cible précise. C'est pourquoi d'autres technologies sont intégrées à la chaîne pour obtenir une identification fiable à partir d'une culture, comme les galeries de tests enzymatiques (Humble et al. 1977; Pincus 2006) et surtout la spectrométrie de masse (BioMérieux, 2016).

I.1.5. Le MALDI-TOF : un nouveau standard d'identification

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse consistant à ioniser un échantillon, puis mesurer le rapport masse / charge et l'abondance des ions ainsi générés (Gross 2006). En biologie, la spectrométrie de masse est l'outil privilégié pour l'analyse des protéines et leur séquençage (Hunt et al. 1986), mais est aussi devenue une méthode de référence pour l'identification de microorganismes. En effet, la signature en spectroscopie de masse d'un microorganisme dépend de sa composition, donc de son espèce. Par comparaison des spectres avec une base de référence, le MALDI-TOF permet de remonter à une identification à l'espèce, voire à la souche (Seng et al. 2009; Branda et al. 2014).

Si plusieurs méthodes existent pour fragmenter et ioniser les échantillons, le MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) s'est imposé au début des années 2000 comme la méthode de référence pour la microbiologie diagnostique. Cette fragmentation, couplée à un analyseur dit TOF – pour Time-Of-Flight – a donné naissance à des appareils commerciaux comme le Vitek-MS de BioMérieux ou le MALDI Biotyper de Bruker. Ceux-ci sont aujourd'hui approuvés pour un usage clinique et industriel, grâce entre autres à :

- **Des bases de données étendues**, permettant pour certaines d'identifier jusqu'à 3000 espèces de microorganismes (BioMérieux, 2021; Welker et al., 2019) ;
- **Une analyse rapide** des colonies prélevées sur boîte de Petri (entre 15 minutes et une heure, selon la machine et le degré d'automatisation de la préparation d'échantillons) ;
- **Une identification à l'espèce** plus fiable que via des tests biochimiques (Guo et al. 2014; Patel 2015).

Le MALDI-TOF est particulièrement utilisé en hôpitaux. Une méta-étude conclue que la spectrométrie de masse permet l'identification à l'espèce d'environ 85 % des échantillons cliniques testés, et 90 % si l'on ne s'intéresse qu'au genre (Zhou et al. 2017). D'autres travaux s'intéressent aujourd'hui au typage (Oberle et al. 2016) ou à la détection de résistance aux antibiotiques avec des résultats prometteurs (Cameoz et al. 2016; Weis et al. 2020).

Cependant, cette technologie a également des désavantages, les principaux étant une instrumentation coûteuse et un fonctionnement colonie par colonie impliquant le prélèvement destructif de chaque échantillon à analyser. La préparation d'échantillons demande de plus soit un personnel qualifié, soit un automate de préparation ajoutant encore à la valeur totale du système. Enfin, les pompes qui maintiennent le vide dans le tube de vol, le laser, ainsi que la cible MALDI demandent une maintenance conséquente et onéreuse.

Outre les efforts d'amélioration du MALDI-TOF, des travaux se tournent vers d'autres techniques d'identification basées sur une instrumentation plus simple et plus accessible. Celles-ci doivent idéalement offrir une analyse rapide, non-destructive, mais également ouverte vers le typage et l'AST. Dans ce domaine, les principaux concurrents au MALDI-TOF sont des technologies d'analyse optique sans marquage.

I.2. L'identification microbiologique par analyse optique sans marquage

I.2.1. Intérêt d'une analyse optique sans marquage

Sont groupées sous le nom d'analyses optiques sans marquage les technologies utilisant une lecture de la lumière transmise ou réfléchiée par un échantillon, sans modification préalable par un marqueur chimique ou fluorescent. Nous citerons parmi celles-ci les spectroscopies infrarouge et Raman (Maquelin et al. 2002; Espagnon et al. 2014; Rousseau et al. 2021), l'imagerie par diffraction (Bae et al. 2009; Genuer et al. 2016; Buzalewicz et al. 2021), et l'imagerie sans lentille (Maeda et al. 2017), dont les principes sont schématisés en Figure 8.

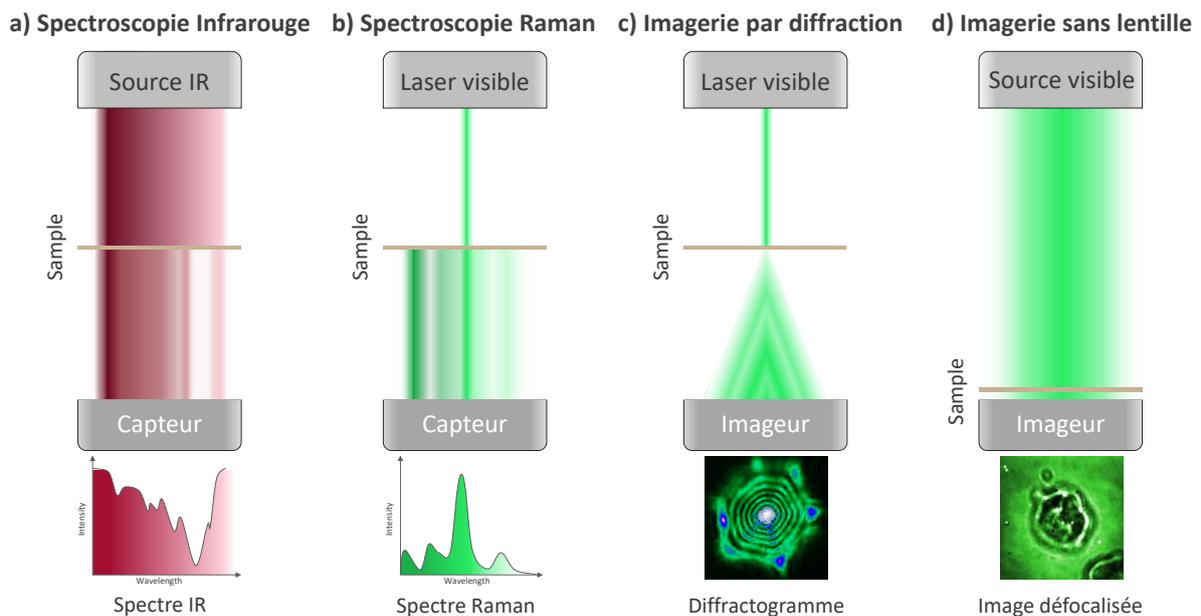


Figure 8. Quelques techniques d'identification optiques sans marquage et exemples de résultats. Diffractogramme modifié d'après (Marcoux et al. 2014).

Ces technologies font l'objet d'un développement parallèle, avec chacune ses propres arguments pour concurrencer les techniques déjà établies sur le marché. Toutes ont cependant comme avantage commun d'être :

- **Sans marquage** : c'est-à-dire qu'elles ne reposent pas sur un colorant, une enzyme ou un anticorps fluorescent pour reconnaître un échantillon. Cet affranchissement simplifie la préparation d'échantillon et réduit les coûts d'analyse.
- **Peu coûteuses** : outre l'absence de consommables chimiques, les dispositifs optiques, en particulier d'imagerie, sont largement démocratisés. En conséquence, des appareils bon marché sont bien plus facilement envisageables qu'avec des technologies comme la spectrométrie de masse.
- **Non-destructives** : les méthodes basées sur l'utilisation d'un laser, d'une source infrarouge, ou sur une simple observation, ne modifient pas l'échantillon comme peut le faire une PCR ou un marquage chimique. En conséquence, un échantillon peut être réutilisé pour plusieurs analyses successives, par exemple une identification, puis un test AST. Cet avantage doit toutefois être tempéré selon la méthode et la durée

d'exposition aux rayonnements : la spectroscopie Raman, en particulier, est connue pour altérer les échantillons lors d'expositions laser prolongées.

- **Rapides** : les durées d'acquisition sont extrêmement variables d'une technologie à l'autre, allant de quelques millisecondes à plusieurs heures pour de très grands échantillons, mais la plupart de ces méthodes (sinon toutes) réduisent les délais d'obtention des résultats. Cette réduction passe par une préparation d'échantillons simplifiée, voire une analyse *in situ*, mais aussi par un travail sur des échantillons plus précoces. Citons par exemple l'imagerie par diffraction, permettant une classification sur colonies après seulement 6 h de croissance, au lieu des traditionnelles 24 h (Marcoux et al. 2014).

Pour aborder ce domaine, nous commencerons par la méthode la plus simple d'un point de vue instrumental : l'imagerie sans lentille dans le visible.

Remarque 3. Les techniques présentées ci-après reposent toutes sur des algorithmes d'apprentissage supervisé pour classifier les données, c'est-à-dire pour associer un nom de souche, d'espèce ou une autre étiquette pertinente à chaque échantillon. Pour des raisons de clarté, ces algorithmes seront ici passé sous silence au profit d'une présentation des différentes techniques optiques. Ils seront décrits plus en détail dans le chapitre III, à partir de la page 76.

I.2.2. L'imagerie sans lentille

L'imagerie sans lentille consiste à approcher un capteur d'image (imageur) au plus proche d'un échantillon éclairé en transmittance, et ce sans élément optique intermédiaire (Ozcan et McLeod 2016). En comparaison à un microscope utilisant lentilles de tube, objectifs et platines trois axes pour la focalisation, l'imagerie sans lentille ne nécessite qu'un capteur d'appareil photo classique. Cette approche simplifie donc drastiquement le système, ce qui en réduit le coût et l'encombrement.

En l'absence de lentille, le grandissement optique du système est considéré comme étant égal à 1 pour un échantillon à moins d'un millimètre du capteur. Ce grandissement garantit un champ optique équivalent à la surface du capteur (entre 22 x 15 mm² et 43 x 32 mm² pour un appareil photo numérique commercial). La résolution est également équivalente à celle du capteur (entre 2 et 4 µm par pixel). Les images obtenues, parfois qualifiées d'images en *ombroscopie*, sont légèrement défocalisées par rapport à une image au microscope (Figure 9), mais permettent l'identification de microorganismes avec une précision équivalente (Maeda et al. 2017).

L'imagerie sans lentille a été utilisée pour l'identification de colonies à l'espèce, même dans des cas relativement difficiles comme la discrimination entre différents types de Staphylocoques ou d'Aspergillus (Maeda et al. 2018, 2019). Compte tenu de la compacité du système et de son coût moindre, les capteurs pourraient être laissés directement dans l'incubateur pour observer les cultures en temps réel, ou être simplement multipliés à bas coût pour augmenter le débit de lecture des plaques, même hors d'un laboratoire automatisé. Le grand champ optique permet également l'acquisition de plusieurs colonies en simultanée, et peut être déplacé pour couvrir rapidement la surface d'un objet comme une boîte de Petri.

Cependant, le système actuel n'a été testé que sur des géloses fines, de quelques centaines de microns d'épaisseur. L'imagerie en transmission à travers les 7 mm d'épaisseur des milieux de culture gélosés standards n'a pas été testée, mais il est probable que l'accroissement de la

distance objet-capteur et la diffusion qui en découle limitent l'efficacité de telles acquisitions. En conséquence, une application pratique de l'imagerie sans lentille exigera soit un changement de protocole, soit d'utiliser le système en réflexion. Ce dernier point reste lui aussi à explorer et soulèvera de nouvelles difficultés, par exemple au niveau de l'éclairage, censé se trouver du même côté que le capteur ce qui pose des problèmes d'encombrement.

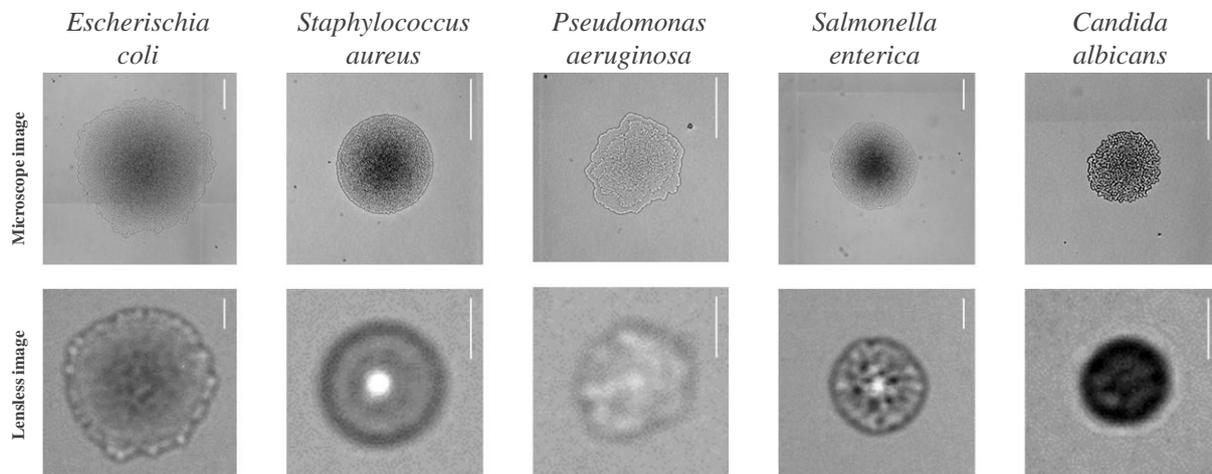


Figure 9. Comparaison d'observations de colonies en microscopie et imagerie sans lentille, illuminées par une LED à 465 nm. Les ombres imagées en transmission rendent compte de la morphologie de la colonie, y compris de son organisation 3D. Barre d'échelle : 100 μm . Adapté d'après Maeda et al., 2017.

De plus, si l'imagerie sans lentille offre des avantages intéressants d'un point de vue instrumental, elle ne fournit pas plus d'informations qu'une imagerie classique au microscope ce qui limite le potentiel pour l'identification (Figure 9). En particulier, la méthode rend difficilement compte de l'organisation tridimensionnelle de la colonie. Pour tenir compte d'informations comme l'épaisseur ou les irrégularités de surface, il faudrait réaliser un scan en z , ce qui complexifie le système, ou se tourner vers une autre technique d'imagerie.

I.2.3. Diffusion élastique dans le visible

Pour obtenir des informations plus détaillées qu'en imagerie classique, il a été proposé de s'intéresser aux formes de diffraction causées par une colonie microbienne sur un trajet laser (Bae 2006; Genuer et al. 2016), comme présenté en Figure 10.a. On parle alors d'*imagerie en diffusion élastique* ou *elastic light scattering* (ELS, voir Remarque 4). Les images obtenues en ELS présentent des motifs complexes d'anneaux et de franges d'interférences (Figure 10.b). Leur organisation dépend de la taille de la colonie, mais aussi de son épaisseur, de sa rugosité, de son indice de réfraction, ainsi que de l'aspect de ses bords. Elles rendent ainsi compte du morphotype d'un échantillon, et permettent d'identifier des espèces indifférenciables à l'œil nu, en particulier sur le genre *Listeria* (Banada et al. 2006), mais aussi sur souches de *E. coli* (Marcoux et al. 2014).

Remarque 4 : La diffusion élastique, aussi appelée diffusion de Rayleigh, consiste en une déviation de la lumière par la matière, sans transfert d'énergie. Elle s'oppose en cela à la diffusion *inélastique*, qui sera décrite en section I.3.2 lors de la discussion sur la spectroscopie Raman.

L'acquisition de diffractogramme sur boîte de Petri a été automatisée en vue d'un système commercial (Bae et al. 2009). Dans ce domaine, l'ELS présente d'importants avantages pratiques : une acquisition en transmission sans ouvrir la boîte de Petri, ce qui limite les risques

de contamination, mais également une capacité à fournir des informations détaillées sur des objets de quelques centaines de microns de diamètre. Ce dernier point offre des perspectives pour l'identification de microcolonies, des amas cellulaires obtenus après seulement 6 à 12h d'incubation, ce qui réduirait considérablement les délais d'identification (Bae et al. 2011; Marcoux et al. 2014; Genuer et al. 2016). La classification de diffractogrammes de microcolonies de souches à Gram négatif, imagées après 6h d'incubation, a mené à un taux d'identification correcte moyen de 80% (Marcoux et al. 2014).

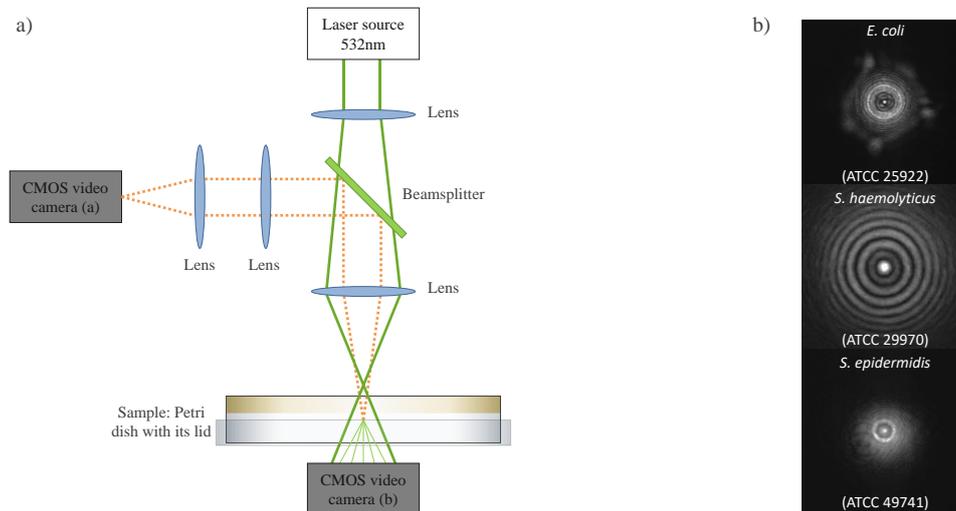


Figure 10. Principe de l'identification de colonies par diffraction dans le visible. a) schéma optique d'un système de diffraction en transmission, avec imagerie directe en réflexion. b) diffractogrammes représentatifs de quelques espèces, obtenus sur microcolonies après 6h de croissance. Adapté de Genuer et al. 2016.

Ces résultats encourageants doivent toutefois être tempérés. En effet, des études menées sur d'autres souches ont rapporté des taux d'identification correcte variable, allant de 94 % à seulement 66 % (Bayraktar et al. 2006). La principale source d'erreur proviendrait de l'analyse des diffractogrammes, basée sur un fit des invariants de Zernike, ce qui génère un grand nombre de variables à classifier (voir Annexe F, page 152). Des études plus récentes utilisent d'autres méthodes d'extraction de données, comme une comparaison aux moments de Fourier-Bessel (Genuer et al. 2016), mais se heurtent encore à des problèmes d'ordre pratique.

En effet, la forte absorbance de certains milieux ou colonies interdit toute imagerie en transmission. Pour contourner le problème, des systèmes de diffraction en réflexion – ou backward light scattering – ont été proposés (Kim et al. 2016; Genuer et al. 2019). Les figures de diffraction ainsi observées diffèrent largement des scatterogrammes obtenus en transmission, mais fournissent 90% d'identification correcte sur une base de données constituée de quatre espèces éloignées (*E. coli*, *L. innocua*, *S. typhimurium*, et *S. aureus*). Les performances sur des espèces plus proches restent à être publiées, mais des études récentes suggèrent une baisse significative des performances lorsque la technique est confrontée à un grand nombre d'espèces ou à des espèces taxonomiquement proches (Kim et al. 2017).

L'ELS offre donc des performances d'identification extrêmement variables, et voit son efficacité limitée par des paramètres parfois difficiles à contrôler, comme la diffusion du milieu de culture ou l'opacité des colonies. Si elle ne demande pas de prélever les échantillons, les analyses colonie par colonie ralentissent les acquisitions. Ce dernier point peut être modéré par

la localisation automatique des colonies sur la boîte de Petri, mais reste une difficulté à prendre en compte. De plus, ce type d'imagerie n'apporte des informations que sur le morphotype des échantillons, ce qui restreint les données fournies aux algorithmes de classification.

Pour apporter plus d'informations, la méthode tend donc aujourd'hui vers une acquisition multiparamétrique. Elle peut être réalisée à plusieurs longueurs d'ondes (Kim et al. 2015, 2017; Bae et al. 2016), ou couplée à d'autres mesures comme de la spectroscopie d'absorbance (Buzalewicz et al. 2021). Ces nouvelles approches démontrent un besoin d'apporter plus d'informations que celles fournies par une unique image. En 2017, l'équipe de l'université de Purdue (Indiana, États-Unis) a montré que, pour un même nombre de paramètres, une série de diffractogrammes enregistrés à trois longueurs d'ondes différentes (405, 635 et 904 nm) donnait de meilleures performances de classification qu'un diffractogramme acquis à une longueur d'onde unique (Kim et al. 2017).

À l'origine basée sur une analyse du morphotype à une seule longueur d'onde, l'ELS tend aujourd'hui à incorporer des données spectrales dans le visible et dans l'infrarouge proche (vis-NIR). L'absorbance des microorganismes varie toutefois assez peu dans la gamme vis-NIR (Alharbi et al. 2020). Pour obtenir plus d'informations sur la réponse spectrale des microorganismes, et donc sur leur composition chimique, il faut s'intéresser à l'absorbance dans différentes gammes de longueurs d'ondes ou à d'autres phénomènes optiques, comme la diffusion. Dans le cas de l'identification, les techniques basées sur ce principe générant les résultats les plus encourageants sont une famille de spectroscopies dites *vibrationnelles*.

I.3. Identification et spectroscopies vibrationnelles

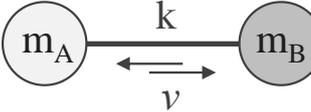
En optique, on appelle *spectre* la décomposition d'un phénomène d'interaction lumière-matière, comme l'absorption, la transmission ou encore la réflexion, en fonction de l'énergie du rayonnement émis ou reçu. L'exemple de spectre le plus connu est celui de la dispersion de la lumière blanche à travers un prisme, mais il existe une large gamme de phénomènes susceptibles de donner naissance à un spectre. Celui-ci dépend alors de la lumière et du phénomène considéré, mais également de la nature chimique de l'objet analysé. En cela, l'étude des spectres, appelée spectroscopie ou spectrométrie (voir Remarque 5), apporte des informations sur la composition chimique et la structure d'un échantillon.

Ici, nous nous intéressons au cas particulier des spectroscopies vibrationnelles et à leurs objets d'étude : les liaisons moléculaires.

Remarque 5 : Spectrométrie ou spectroscopie ? Si l'usage courant considère aujourd'hui les deux termes comme équivalents, l'Académie Française propose de définir la spectrométrie comme : « l'ensemble des méthodes d'analyse permettant d'accéder à la structure ou à la composition de la matière », tandis que la spectroscopie se restreindrait à « l'analyse des interactions moléculaires ou des liaisons » (voir Annexe A, page 138). Cette deuxième définition plus restrictive correspondant aux méthodes d'analyse ici discutées, le terme spectroscopie sera privilégié.

I.3.1. Phénomènes de vibration moléculaires

Une liaison covalente est une interaction entre atomes résultant d'une mise en commun d'électrons. Elle peut être représentée de façon simplifiée comme un ressort reliant deux masses entre elles (Servant et al. 2011). Le système complet, masses plus ressort, constitue alors un oscillateur harmonique, pouvant être mis en mouvement par une énergie externe apportée sous forme d'un photon. La fréquence des oscillations d'un atome par rapport à l'autre est alors régie par la relation suivante :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\left(\frac{m_A * m_B}{m_A + m_B}\right)}}$$


Équation 1. Fréquence de vibration d'un oscillateur harmonique et schéma simplifié. Avec ν la fréquence de vibration, k la constante de raideur de la liaison (*i.e.* sa multiplicité) et m_A , m_B , les masses respectives des deux atomes.

D'après l'Équation 1, la fréquence de résonance diminue lorsque la liaison implique des atomes de masse importante, et augmente avec sa raideur (une liaison double résonne à une fréquence $\sqrt{2}$ fois plus élevée qu'une liaison simple, $\sqrt{3}$ pour une liaison triple). Cette simplification ignore toutefois l'aspect quantique d'une liaison moléculaire. En réalité, l'énergie du système ne peut prendre que quelques valeurs discrètes, celles-ci devant répondre à la relation : $E = h\nu \left(V + \frac{1}{2}\right)$, avec h la constante de Planck, ν la fréquence de vibration de la liaison, et V le nombre quantique de vibration (1, 2, 3...). L'énergie du système est donc quantifiée ; seuls certains modes de vibration sont autorisés (Griffiths 2010).

En conséquence, un photon ne peut transférer son énergie à une liaison (*i.e.* être absorbé) que s'il porte exactement l'énergie nécessaire à sa mise en vibration. Pour que cette absorption soit détectable, elle doit également faire varier la répartition des charges électriques de la molécule (Servant et al. 2011). On parle alors d'une variation du moment dipolaire. Celle-ci peut être causée par l'un des six modes de vibration moléculaires décrits ci-dessous.

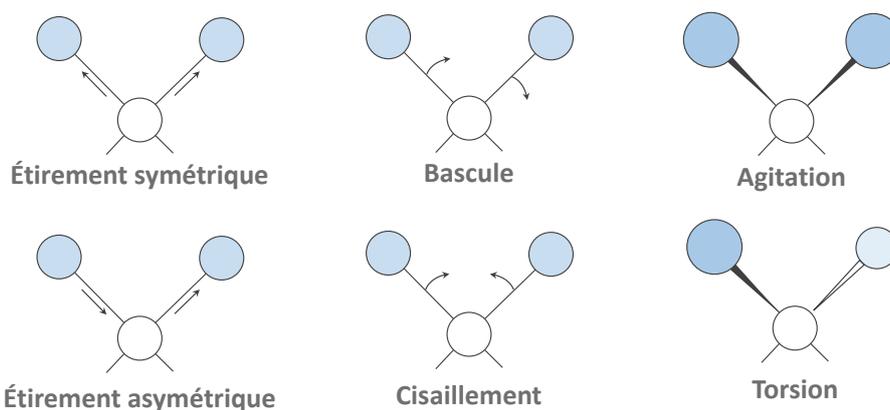


Figure 11. Modes de vibrations moléculaires.

Chacun de ces modes est activé par certaines énergies précises, dépendant à la fois du type de vibration, de la multiplicité de la liaison et des atomes qui y sont impliqués, mais également des atomes voisins. Par exemple, les vibrations d'une liaison carbonyle (C=O) n'auront pas exactement les mêmes énergies d'activation au sein d'un ester, d'un acide carbonique, ou d'un

acide nucléique (Maquelin et al. 2002). Dans le cas des protéines, la conformation moléculaire – c'est-à-dire l'organisation tridimensionnelle des atomes – est également connue pour avoir un impact sur les spectres (De Meutter et Goormaghtigh 2021).

En résumé, une liaison chimique peut entrer en vibration en absorbant certains photons portant des énergies bien précises. Ces énergies sont liées à la nature de la liaison et à son environnement moléculaire. C'est ce principe qu'exploitent les spectroscopies vibrationnelles pour obtenir des indices sur les liaisons chimiques composant les molécules, ainsi que sur leur organisation dans l'espace.

En pratique, ces spectroscopies excitent un échantillon *via* différentes méthodes d'illumination qui seront présentées en section suivante. Elles enregistrent ensuite la réponse spectrale de l'échantillon, c'est-à-dire la quantité de photons transmise, réfléchi ou réémise à chaque énergie. Une variation d'intensité du spectre, sous la forme d'un pic ou d'une bande, indique alors que des photons ont interagi avec une liaison moléculaire. Des tables de référence associent les modes de vibrations des fonctions chimiques les plus courantes à leurs longueurs d'ondes de résonance (Maquelin et al. 2002). La lecture des pics d'un spectre permet ainsi d'associer un échantillon à certaines fonctions chimiques, voire de remonter à une structure moléculaire.

Avant de passer à l'application de ces techniques au cas particulier de l'indentification, précisons que, pour des raisons pratiques, les spectres vibrationnels sont tracés en fonction de la longueur d'onde d'excitation ou d'émission lumineuse plutôt qu'en fonction de l'énergie des photons. Ces deux grandeurs sont liées par la relation de Planck-Einstein :

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda} = h \cdot \nu$$

Équation 2 : relation de Planck-Einstein, reliant l'énergie d'un photon à sa fréquence. Avec E : l'énergie du photon (en joules), h : la constante de Planck (en J.s), c : la vitesse de la lumière dans le vide (en m.s⁻¹), λ : la longueur d'onde du photon (en m), et ν la fréquence (en s⁻¹).

I.3.2. Identification par spectroscopie vibrationnelle

Dans le cas d'objets complexes comme une colonie bactérienne, le spectre résulte de la superposition de très nombreuses signatures vibrationnelles. S'il est alors impossible de remonter aux structures des molécules, le spectre reste une source d'informations sur la chimie de l'échantillon. Or, la composition chimique d'un microorganisme (protéines, acides nucléiques, etc.) est conditionnée par son environnement, mais également par son génome. En conséquence, deux organismes d'espèces différentes, même cultivés sur le même milieu et dans les mêmes conditions, présenteront des signatures spectrales distinctes (Figure 12). Comparer le spectre d'un organisme inconnu à celui d'organismes de référence permet ainsi de l'identifier.

Quatre spectroscopies vibrationnelles ont démontré leurs performances à des fins d'identification (voir Figure 16, p.29).

La spectroscopie moyen infrarouge s'intéresse à l'absorption – ou la réflexion – de rayonnements faiblement énergétiques, c'est-à-dire de longueur d'onde généralement comprise entre 3 et 8 μm (soit 0,15 à 0,4 eV). Cette gamme correspond aux énergies mises en jeu dans les phénomènes d'excitation vibrationnelle, ce qui fait du rayonnement infrarouge un candidat

tout désigné pour sonder les sous-niveaux vibrationnels des liaisons covalentes. Ce constat est néanmoins tempéré par deux défauts majeurs : des sources lumineuses infrarouge de faible puissance (les spectromètres infrarouges classiques utilisent des source type corps noir, voir p.29), et surtout la forte absorbance de l'eau dans ces gammes de longueurs d'onde. Quelques centaines de microns d'épaisseur suffisent en effet à absorber la quasi-totalité d'un rayonnement infrarouge (Wenning et Scherer 2013). Malgré tout, la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, dont le fonctionnement et les performances seront détaillés en section suivante (p.29), apparait aujourd'hui sur le marché comme un outil d'identification rapide (Wenning et Scherer 2013; Bruker). La possibilité de réaliser du typage en fait un concurrent sérieux au MALDI-TOF (Novais et al. 2019; Vogt et al. 2019; Silva et al. 2020; Lombardo et al. 2021).

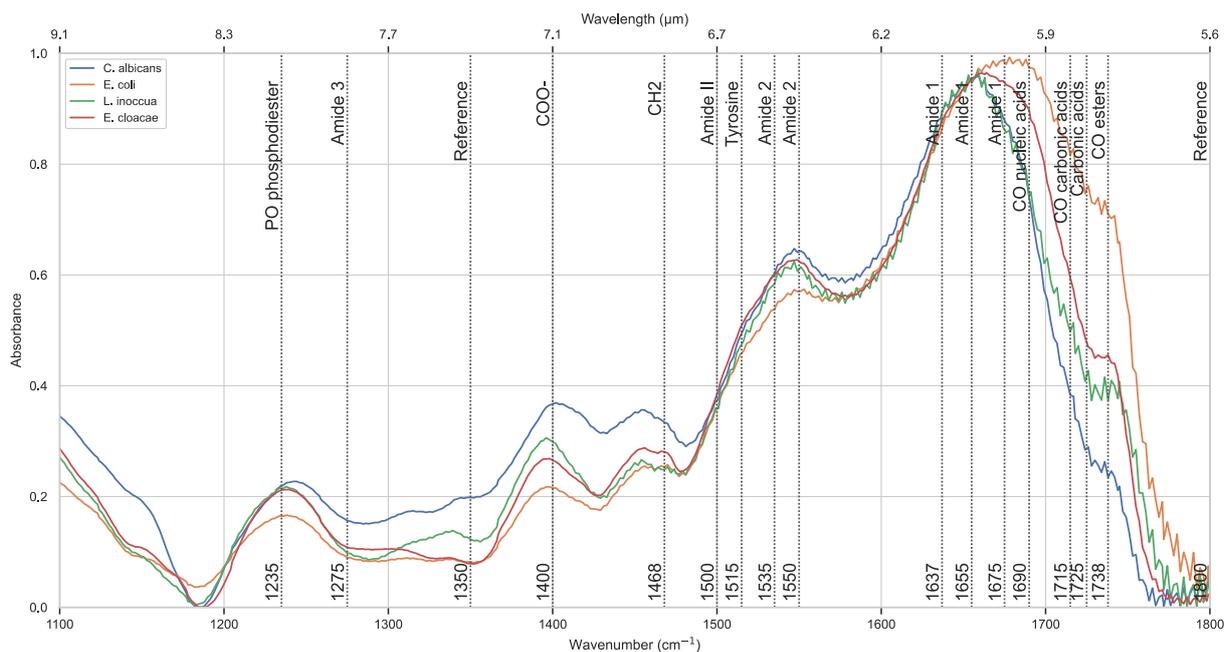


Figure 12. Exemples de spectres FTIR de quelques colonies bactériennes. Les lignes verticales marquent les longueurs d'ondes de vibration de quelques liaisons chimiques communes (tirées de Maquelin et al. 2002).

La spectroscopie Raman exploite les mêmes vibrations moléculaires que la spectroscopie infrarouge, mais via une modalité différente (Ashton et al. 2011). En effet, au lieu d'un phénomène d'absorption et de relaxation non-radiative (Figure 13, Absorption infrarouge), cette seconde spectroscopie utilise une diffusion inélastique de la lumière, aussi appelée *effet Raman* (Figure 13, Raman) (Raman et Krishnan 1928). La diffusion *élastique*, ou diffusion de Rayleigh, consiste en l'absorption d'un photon par une molécule, suivie de la réémission d'un photon de même énergie. Dans le cas d'une diffusion inélastique dite de *Stokes*, une partie de l'énergie du photon est conservée par la molécule qui passe dans un état d'excitation vibrationnelle. Le photon réémis porte donc une énergie, et donc une fréquence, plus faible. À l'inverse, si la molécule est déjà à un niveau énergétique supérieur à l'état fondamental, un photon peut être réémit à une fréquence supérieure à la fréquence initiale. On parle alors de diffusion anti-Stokes.

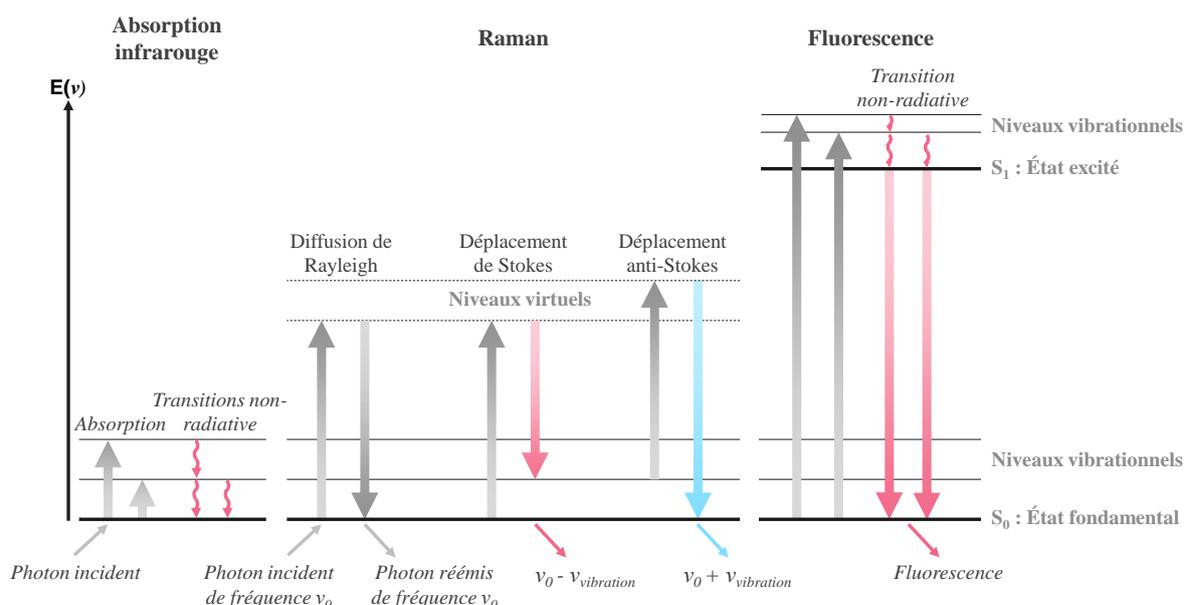


Figure 13. Schématisation des transitions énergétiques impliquées dans les spectrométries vibrationnelles.
Recréé d'après (Panetier 2019).

Les spectroscopies Raman et infrarouge sondent donc les mêmes vibrations, et certaines longueurs d'ondes de résonance sont d'ailleurs retrouvées avec les deux techniques (Neugebauer et al. 2007b). Toutefois, la spectroscopie Raman ne repose pas sur un phénomène d'absorption directe mais implique un état énergétique intermédiaire, dit *virtuel*. Cette transition permet l'exploration de vibrations moléculaires de faible énergie *via* une excitation de plus haute énergie ; de sonder les vibrations normalement associées à l'infrarouge *via* une excitation dans le visible. L'excitation dans le visible apporte principalement deux avantages : il devient possible d'analyser des objets de plus petite taille que dans l'infrarouge (jusqu'à la cellule unique), mais affranchit surtout le Raman de la contrainte de l'eau, faiblement active dans cette gamme de longueurs d'onde.

En contrepartie, la spectroscopie Raman souffre de deux défauts. Tout d'abord, la diffusion Raman concerne 1 sur 10^6 à 1 sur 10^{10} photons diffusés, ce qui mène à un signal Raman très peu intense (Shipp et al. 2017). Celui-ci est compensé par des temps d'exposition et des puissances laser plus importants, ce qui pose des risques de dégradation des échantillons. De plus, l'intensité du signal dépend de l'intensité de diffusion, qui est elle-même inversement proportionnelle à la longueur d'onde d'excitation à la puissance quatre (Shipp 2017, équation 12). Le signal Raman est donc très faible dans l'infrarouge, et gagne en intensité à mesure que la longueur d'excitation se rapproche de l'UV. Or, une excitation de haute énergie dans l'UV augmente encore les risques de dégradation de l'échantillon, et excite également un autre phénomène plus intense que le signal Raman : la fluorescence (voir paragraphe Fluorescence intrinsèque en page suivante). Celle-ci peut, dans certains cas, complètement masquer les pics Raman (Figure 14).

Il y a donc un compromis à trouver entre un signal faible et une fluorescence trop importante. L'excitation Raman se fait ainsi généralement dans le vert (≈ 535 nm), mais est aussi possible dans le rouge (633 nm) et le proche infrarouge (785 nm) (Ashton et al. 2011). L'un des avantages de la spectroscopie Raman est que les mêmes pics sont observés avec différentes

sources lasers (Spiro 1974; Jehlička et Vandenabeele 2015). Celles-ci peuvent donc être choisies en fonction de l'échantillon à analyser.

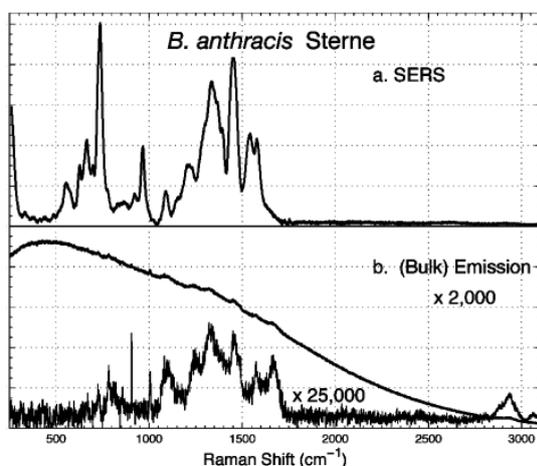


Figure 14. Illustration du phénomène de fluorescence sur un spectre Raman de *Bacillus anthracis*. a : spectre de référence sans fluorescence obtenu par SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy, non discuté ici). b : spectre Raman classique. Sont présentés à la fois le signal brut masqué par la fluorescence (ligne supérieure), et le spectre obtenu après retrait de la ligne de base. Le bruit observé sur le deuxième spectre est dû à la faible intensité du signal. Extrait de *Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria* (Premasiri et al. 2005).

La spectroscopie Raman est particulièrement sensible aux molécules organiques (Foucher 2019), ce qui en fait un outil de choix pour les analyses microbiologiques. L'identification a ainsi largement été documentée (Ashton et al. 2011; Espagnon et al. 2014; Douet et al. 2016), tout comme la possibilité d'effectuer un test de susceptibilité aux antibiotiques sur cellule unique (Novelli-Rousseau et al. 2018; Rousseau et al. 2021). Toutefois, en plus des problèmes de fluorescence et de destructivité, la spectrométrie Raman se base sur une instrumentation relativement coûteuse. De plus, le transfert des bases de données de spectres Raman pose des problèmes de calibration, le signal acquis étant extrêmement dépendant de l'instrument (Pahlow et al. 2015). Malgré des résultats prometteurs, y compris sur cellule unique, il n'existe donc pas à l'heure actuel de système d'identification commercial basé sur la spectrométrie Raman.

Le Raman résonant dans l'ultraviolet (UVR), est une technique particulière de spectroscopie connue pour amplifier le signal Raman de certaines molécules (Spiro 1974). Elle utilise une source lumineuse dans l'UV (généralement entre 229 et 244 nm) pour exciter sélectivement certaines sections chromophores d'acides nucléiques ou d'acides aminés, pour lesquelles la diffusion Raman est facilitée par une transition électronique. Cette méthode a démontré ses performances pour l'identification de pathogènes (Jarvis et Goodacre 2004; Rösch et al. 2006), mais les énergies mises en jeu dans l'UV sont susceptibles de provoquer des altérations thermiques et photochimiques, et exciter la fluorescence (Chen et al. 1993). Ces derniers points constituent de sérieux désavantages par rapport à d'autres spectroscopies vibrationnelles.

Notons cependant que la spécificité de cette méthode pour les acides nucléiques et certains acides aminés permet l'investigation de mécanismes cellulaires, par exemple en réponse à une exposition aux antibiotiques (Neugebauer et al. 2007a).

La spectroscopie de fluorescence intrinsèque. Le terme de fluorescence définit la propriété de certaines molécules à absorber un photon incident, puis à réémettre un photon d'énergie plus faible et donc de longueur d'onde plus élevée (voir Figure 13, fluorescence). Certaines biomolécules présentent une fluorescence naturelle dans l'UV-visible (250 – 450 nm), en particulier des acides aminés (tryptophane, tyrosine et phénylalanine), quelques coenzymes

(NADH, DAPH, FAD), ainsi que les nucléotides et acides nucléiques (Ammor 2007). Or, la longueur d'onde d'émission de ces fluorophores dépend de leur environnement chimique : le tryptophane est par exemple sensible à la modification des protéines où il est impliqué (Lakowicz 1999). Contrairement au signal Raman, la réponse en longueur d'onde de la fluorescence est constante selon la longueur d'onde d'excitation (Spiro 1974). Toutefois, l'intensité de cette réponse varie en fonction de la lumière d'excitation. Analyser l'intensité de fluorescence émise à chaque longueur d'onde en fonction de la longueur d'onde d'excitation aboutit à des cartographies de fluorescence, comme visibles en Figure 15. Ces cartographies dépendant des fluorophores présents dans l'échantillon, elles sont distinctes pour chaque microorganisme, ce qui permet une identification à l'espèce (Walsh et al. 2013; Hyman et al. 2016).

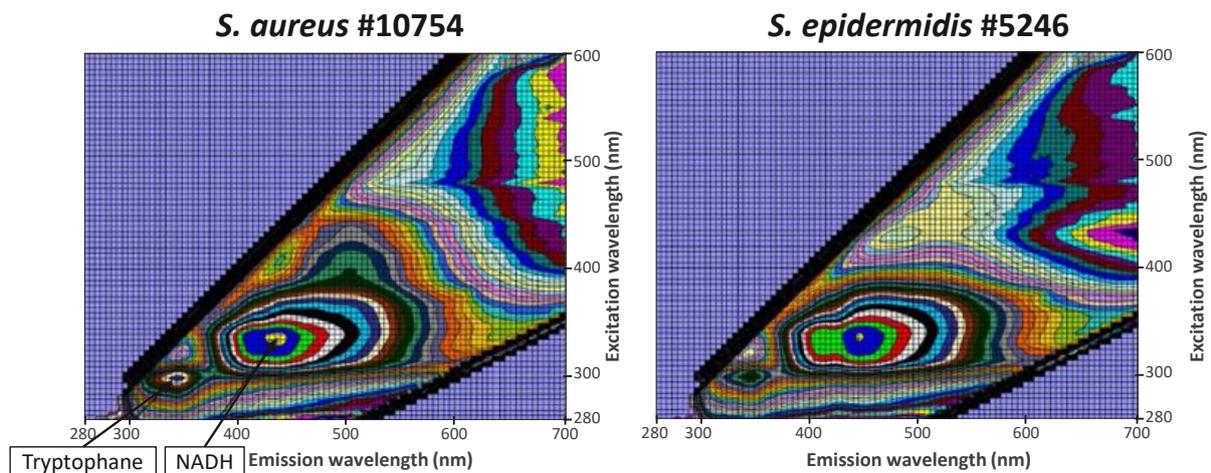


Figure 15. Exemples de cartographies de fluorescence obtenues par spectroscopie de fluorescence intrinsèque. En chaque point de la carte, la couleur indique l'intensité de fluorescence émise à une longueur d'onde donnée en fonction de la longueur d'onde d'excitation (attention, abscisses et ordonnées inversées). Les auteurs n'ont pas précisé d'échelle de couleur. Adapté de Walsch et al. 2013.

La spectrométrie de fluorescence intrinsèque avance aujourd'hui des arguments comme de bonnes performances de classification au genre ou à l'espèce, un résultat sans marquage en quinze minutes, un signal plus important qu'en Raman ($1/10^6$ photons réémis), ou encore une analyse possible sans contact sur de faibles quantités de cellules (Estes et al. 2003). La spécificité de la méthode pour des molécules comme le coenzyme NADH ouvre également des perspectives sur le suivi métabolique des cellules (Leblanc et Dufour 2004).

Si quelques travaux ont présenté une application possible pour l'identification de flacons d'hémoculture positifs (Walsh et al. 2013; Hyman et al. 2016), les études sur la spectroscopie de fluorescence intrinsèque restent pourtant marginales par rapport aux autres spectroscopies vibrationnelles. La principale limitation de cette méthode réside dans la faible diversité des molécules analysées, ce qui risque de limiter ses performances.

Nom	λ d'excitation	Avantages	Défauts
Infrarouge	3 – 8 μm	Fort signal, compatible avec l'imagerie	Absorbance de l'eau, sources de faible puissance
Raman	535 nm	Informations riches, possibilité de faire des analyses sur cellule unique	Signal faible, champ restreint, temps d'exposition longs, instrumentation coûteuse
Raman UV	230 – 240 nm	Signal plus important qu'en Raman, spécificité moléculaire	Destructif
Fluorescence intrinsèque	250 – 450 nm	Spécifique à certaines molécules, suivi métabolique	Données limitées à quelques fluorophores

Figure 16. Tableau récapitulatif des spectroscopies vibrationnelles.

I.3.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'infrarouge est défini comme la partie du spectre électromagnétique comprise entre 780 nm et 5 mm (Figure 17), généralement segmenté en infrarouge proche (780 nm – 3 μm), infrarouge moyen (3 – 50 μm) et infrarouge lointain (50 μm – 5 mm).

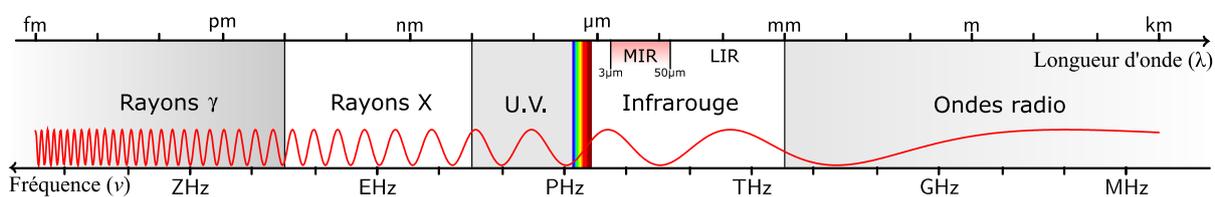


Figure 17. Domaines de longueurs d'onde du spectre électromagnétique. Le moyen infrarouge (MIR), qui sera principalement discuté ici, est mis en évidence en rouge. Modifié à partir de [Domaine du spectre électromagnétique, Benjamin Abel, Wikimedia Commons](#) (Attribution CC BY-SA 3.0).

Comme précédemment évoqué, la spectroscopie infrarouge s'intéresse à l'absorption du rayonnement infrarouge par un échantillon pour obtenir des informations sur sa composition chimique. La technique de spectroscopie d'absorbance la plus simple, appelée *spectroscopie dispersive*, consiste à illuminer l'échantillon à une longueur d'onde unique pour enregistrer l'absorbance. La longueur d'onde est ensuite changée pour scanner toute la gamme voulue, jusqu'à obtenir un spectre. Cette technique, largement employée dans les spectrophotomètres UV et visible, a historiquement été utilisée pour les premières analyses de microorganismes dans l'infrarouge (Stevenson et Bolduan 1952; Riddle et al. 1956), mais restait limitée par la lenteur et l'encombrement des instruments. C'est pourquoi, dès la fin des années 50, des alternatives basées sur une instrumentation plus simple ont été proposées, en utilisant le principe de la spectroscopie à transformée de Fourier (Williams 1958; Faix 1992).

Au lieu d'illuminer l'échantillon par un faisceau monochromatique, un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) illumine l'échantillon avec un continuum de longueurs d'ondes. Ce continuum est obtenu grâce à une source de type corps noir et un interféromètre de Michelson, dont l'un des miroirs est mobile, comme présenté en Figure 18.a. L'un des deux faisceaux lumineux passant dans l'interféromètre est plus ou moins retardé selon la position du miroir mobile, ce qui change la combinaison de longueurs d'ondes résultante. Il est alors possible de retrouver l'absorbance pour chaque longueur d'onde en analysant les données brutes par transformée de Fourier. L'utilisation d'un tel système a permis l'arrivée de spectromètres infrarouge de paillasse (Williams 1958), tout en améliorant le rapport signal à bruit par rapport à la méthode classique.

Depuis, les performances du FTIR comme outil d'identification à l'espèce, voire à la souche, ont été largement éprouvées (Maquelin et al. 2002; Wenning et al. 2014; Johler et al. 2016). D'autres travaux ont également démontré la possibilité de réaliser un test de susceptibilité aux antibiotiques (Hobro et Smith 2018), où d'accéder à des informations comme l'âge d'une colonie microbienne (Williams et al. 2019). Ces études ont mené à l'apparition de plusieurs appareils commerciaux dédiés à l'identification et au typage, comme le IR Biotyper de Bruker ou le i-dOne d'Alifax. En milieu hospitalier, le IR Biotyper fournit des résultats en 3 h après culture, et apparait tout aussi fiable que les méthodes de séquençage pour l'identification à la souche de certains pathogènes (Hu et al. 2021).

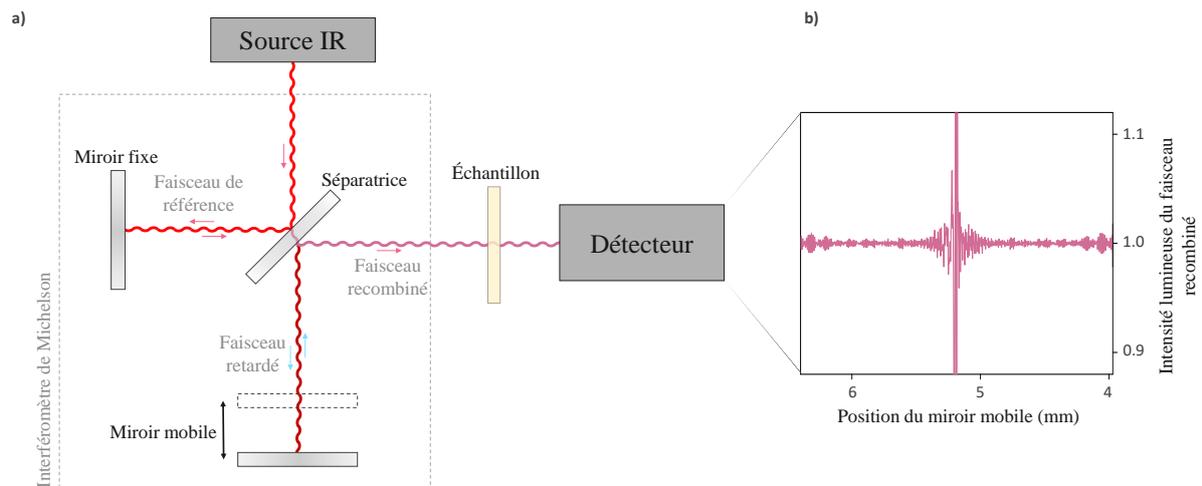


Figure 18. Principe du FTIR. a) schéma de l'interféromètre de Michelson. b) exemple d'interférogramme obtenu en sortie d'un interféromètre de Michelson.

La sensibilité de la méthode, ses performances pour le typage et l'arrivée sur le marché d'outils d'identification faciles d'utilisation font du FTIR un concurrent sérieux au MALDI-TOF (Wenning et al. 2014). Cependant, cette technologie ne reste pas exempte de défauts. Elle repose notamment sur une instrumentation complexe et relativement volumineuse (Figure 19), impliquant des miroirs de précision ainsi que des optiques infrarouges coûteuses. Ainsi, si les instruments spécifiquement dédiés à l'identification comme le IR Biotyper se présentent sous la forme d'outils plus compacts, ils conservent un prix élevé ($\approx 100\,000$ à $150\,000$ €) et pourraient demander un entretien conséquent.

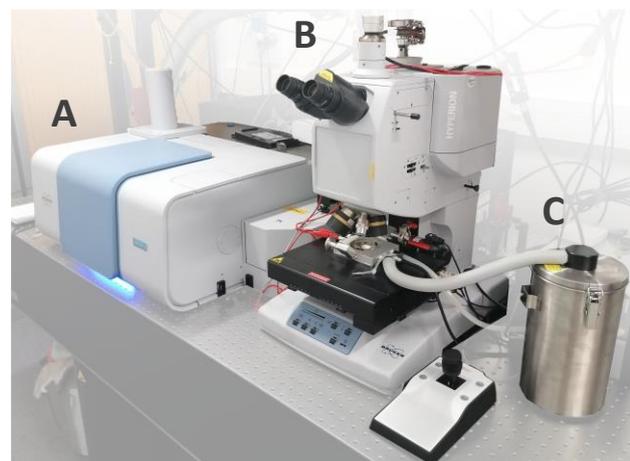


Figure 19. Photographie d'un micro-spectromètre FTIR, tel qu'utilisé au laboratoire (Hyperion, Bruker). A : le spectromètre en lui-même. B : microscope infrarouge associé. C : système de refroidissement à l'azote liquide.

De plus, la sensibilité du FTIR nécessite d'importants efforts de standardisation pour limiter la variabilité intra-espèce (Huayan et al. 2020). Cette standardisation peut parfois impliquer de repiquer une première génération de colonies pour préparer des sous-cultures indépendantes de

l'échantillon prélevé. Cette procédure assure que toutes les colonies soient bien analysées dans des conditions comparables, mais rallonge les délais d'analyse.

Enfin, comme précédemment évoqué, le principal défaut du FTIR découle de l'absorbance de l'eau dans l'infrarouge. Malgré le développement de sources laser de haute puissance (> 50 mW), il reste aujourd'hui impossible de traverser plus de 100 à 200 µm d'eau, ce qui interdit toute analyse en transmission d'une boîte de Petri ou d'un échantillon biologique non déshydraté. Les colonies doivent donc être prélevées avant analyse, et sont ensuite séchées à l'éthanol (Hu et al. 2021). La sélection et le prélèvement de colonies d'intérêt, également nécessaire pour le MALDI-TOF, peuvent être automatisés grâce à des appareils comme le COLIBRI de bioMérieux, mais implique malgré tout une perturbation de l'échantillon. En conséquence, une colonie analysée par FTIR ou MALDI-TOF ne peut être réutilisée pour une seconde analyse. Tout suivi dans le temps ou test de susceptibilité aux antibiotiques est donc impossible, ce qui pose des difficultés dans le cas d'échantillons donnant naissance à peu de colonies.

Ce repiquage impose une analyse colonie par colonie d'une boîte de Petri, ce qui ralentit l'analyse d'une boîte entière et implique généralement une pré-sélection des échantillons à analyser. De plus, le dépôt des colonies s'effectue sur un support transparent aux infrarouges, comme une lame en CaF₂ (environ 25 €) ou en silicium (20 € et plus selon les traitements antireflets). Compte tenu du prix des supports, ceux-ci sont difficilement envisageables comme des consommables, ce qui impose un lavage à la fois contraignant et source éventuelle de contamination des échantillons. Une autre méthode dite de *réflexion totale atténuée* (ATR) se passe de repiquage en venant sonder les colonies une à une à l'aide d'un prisme, mais la question du nettoyage de la sonde reste présente.

En conclusion, les spectroscopies vibrationnelles, qu'elles soient infrarouges, Raman ou de fluorescence, apparaissent donc comme des outils prometteurs pour l'identification phénotypique et sans marquage de microorganismes, et pourraient, à terme, fournir une alternative commerciale au MALDI-TOF. Elles reposent toutefois sur une instrumentation complexe et une analyse colonie par colonie, ce qui rallonge les acquisitions et altère les échantillons. Ce dernier point motive aujourd'hui des travaux visant à combiner la précision d'analyse des spectroscopies vibrationnelles avec l'aspect grand-champ des techniques d'imagerie.

I.4. L'identification microbiologique par des techniques d'imagerie spectrales

Les imageurs de plaque et l'imagerie sans lentille, respectivement évoquées en sections I.1.4 (p.16) et I.2.2 (p.19), ont été présentées comme des techniques d'analyse à grand champ optique, capables de scanner rapidement une boîte de Petri entière, mais manquant de précision pour les cas d'identification. Des milieux de culture sélectifs ou chromogéniques peuvent améliorer les capacités de discrimination (Baker et al. 2020), en contrepartie d'un surcoût parfois conséquent. Pour se passer de ce marquage biochimique, il a donc été proposé d'utiliser

des informations spectrales en complément des informations morphologiques déjà apportées par l'imagerie. On parle alors d'*imagerie spectrale*.

I.4.1. Imageries spectrales

L'appellation imagerie spectrale regroupe les techniques combinant une imagerie et une technique de spectrométrie. Une analyse en imagerie spectrale aboutit à la création d'une pile d'images tridimensionnelle, appelée *hypercube*, où chaque colonne de pixels correspond au spectre (ou partie du spectre) de l'échantillon en un point donné. Ces images sont générées par différentes méthodes dépendant du type de spectroscopie (visible, FITR, Raman...), d'acquisition spatiale (scan point-à-point, scan en ligne, imagerie à chaque longueur d'onde), mais aussi du type de données voulu. Nous en distinguerons ici deux types :

- **Les images hyperspectrales** présentent en chaque point un spectre continu sur une gamme de longueurs d'ondes donné (Figure 20. A). Ce type d'analyse fournit des données continues, plus détaillées, mais demande des temps d'acquisition et de traitement plus longs.
- **Les images multispectrales** ne représentent qu'une partie du spectre, par exemple à quelques longueurs d'ondes d'intérêt (Figure 20. B). L'imagerie en diffraction à plusieurs longueurs d'ondes, évoquée en section I.2.3 (p.20), fournit par exemple des images multispectrales. Si les images multispectrales apportent moins d'informations que leurs équivalents hyperspectraux, leur acquisition nécessite en revanche une instrumentation bien moins complexe (voir Figure 25, page 41). En effet, le multispectral ne demande que quelques sources lumineuses à des longueurs d'ondes discrètes (dites *monochromatiques*), au lieu d'un système de spectroscopie complet. En résultent des systèmes plus compacts, moins chers, et surtout plus rapides, en contrepartie d'informations spectrales plus succinctes.

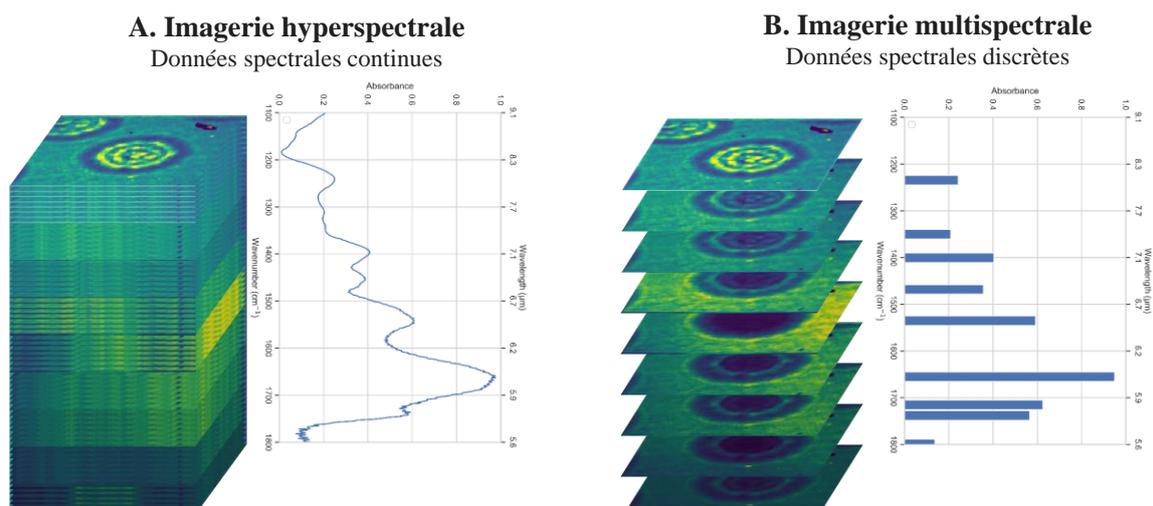


Figure 20. Principes et types de données obtenues pour les imageries hyperspectrale et multispectrale. Chaque pile d'images, surnommée ici hypercube, représente en 3D les données continues dans une image hyperspectrale (A) ou multispectrale (B). Les graphiques associés représentent les informations d'intensité contenues dans une colonne de pixels. Les images présentées ont été acquises sur une colonie de *E. coli* imagée dans le moyen infrarouge, entre 1235 et 1800 cm^{-1} .

Les imageries spectrales décrivent la forme des objets imagés, mais également la réponse à la lumière de chaque point de l'image (Williams et al. 2019; Kang et al. 2020). Cette réponse étant conditionnée par la composition chimique de la matière, on qualifie parfois ce type d'analyse d'imagerie chimique (Yeh et al. 2015). Les informations fournies permettent donc, entre autres, de discriminer des objets de composition chimique différente, mais indifférenciables en imagerie classique. L'imagerie hyperspectrale visible-proche infrarouge a par exemple été utilisée pour relever des traces de contamination fécale ou à *Pseudomonas* dans des produits alimentaires (Park et al. 2011; Spyrelli et al. 2020).

Appliqué à l'identification de colonies microbiennes, ce type d'analyse combine les avantages de la spectrométrie (composition chimique, signatures spectrales variables d'une espèce à l'autre), et des techniques d'imagerie (grand champ, description morphologique). D'importants travaux visent donc, encore à l'heure actuelle, à développer une technique d'identification fiable à partir d'une imagerie hyperspectrale. Citons entre autres :

- L'identification de pathogènes responsables d'infections urinaires dans le visible-proche infrarouge (Turra et al. 2015; Signoroni et al. 2018). Ces études sur cinq espèces communes, dont *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* et *C. albicans*, aboutissent à un taux d'identification correct à l'espèce supérieur à 95 %.
- La classification de pathogènes communs toujours dans le visible-NIR, mais cette fois-ci sur différents milieux de culture (Gu et al. 2020). Les taux d'identification sont une fois encore très encourageants (97 – 99 %).
- Des travaux menés uniquement dans le visible, visant à classifier 38 souches de 14 espèces différentes mais se limitant à une identification au type de Gram (Leroux et al. 2015; Midahuen et al. 2018).

Toutefois, l'étude la plus complète (Midahuen et al. 2018) montre que l'imagerie hyperspectrale dans le visible pourrait avoir une certaine difficulté à identifier jusqu'à l'espèce sur des cas d'usage réels. Les spectres en réflexion dans le visible présentent non seulement peu de pics par rapport à ceux obtenus en spectroscopies vibrationnelles, mais font également ressortir peu de différences entre microorganismes (*Figure 21*). L'imagerie hyperspectrale dans le visible-NIR pourrait donc ne pas suffire pour une identification précise, c'est pourquoi il a été proposé de transposer l'analyse dans l'infrarouge moyen, où les pics d'absorbance liés aux biomolécules sont beaucoup plus marqués (voir *Figure 12*, p.25).

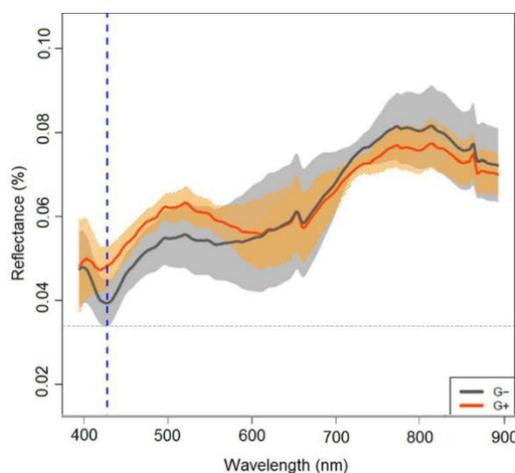


Figure 21. Spectres en réflexion de colonies bactériennes dans le visible-NIR, d'après Midahuen 2018. Les deux spectres moyens ont été calculés sur colonies de différentes espèces, groupées par leur type de Gram (G+ ou G-). Les enveloppes représentent la variabilité de chaque groupe autour de la moyenne (écart type de 1). Les spectres des deux groupes présentent peu de variations et ne se distinguent réellement qu'aux alentours de 430 nm (marquée par les pointillés verticaux). Si ces différences sont suffisantes pour distinguer les deux types de Gram, elles ne le sont pas pour une identification à l'espèce par spectroscopie visible.

I.4.2. Identification par imagerie hyperspectrale dans l'infrarouge moyen : une étude prometteuse

Comme évoqué précédemment, la spectroscopie FTIR offre des perspectives prometteuses pour l'identification et le typage de colonies microbiennes, et a récemment donné naissance à un premier appareil commercial (IR Biotyper, Bruker). Cependant, cette technique se cantonne à des analyses colonie par colonie, et reste donc plus lente qu'une analyse optique grand champ. Dans le domaine de l'imagerie spectrale, le FTIR a pourtant bénéficié d'innovations récentes avec les capteurs FPA – pour *focal plane array* – qui permettent l'enregistrement d'une image complète sans scan et accélèrent ainsi les acquisitions (Pilling et Gardner 2016).

En 2018, ce type de capteur a été mis à profit pour classifier des colonies appartenant à 8 espèces différentes à partir d'une imagerie hyperspectrale FTIR (Lasch et al. 2018). Les auteurs ont utilisé des spectres moyens, calculés au centre de colonies de référence, pour classifier les pixels d'autres colonies (Figure 22). Ils ne s'intéressent ici qu'aux spectres des pixels, et non à la morphologie des colonies. L'étude rapporte ainsi une bonne corrélation entre l'espèce réelle et les prédictions de l'algorithme, et suggère la faisabilité d'une identification jusqu'à la souche. Ce dernier point est cohérent avec les performances déjà discutées pour le FTIR (p.29). Transposer l'imagerie hyperspectrale dans l'infrarouge moyen offre donc de meilleures performances que dans le visible, tout en constituant une évolution grand champ des analyses FTIR classiques.

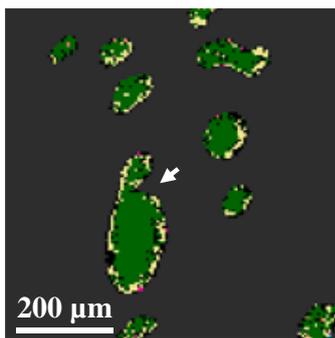


Figure 22. Identification de colonies de E. coli, d'après l'article de Lasch et al. (2018). Les pixels verts ont été identifiés correctement via leur spectre, tandis que les jaunes ou rose ont été classifiés comme une autre espèce (respectivement Citrobacter freundii et Staphylococcus aureus). Les pixels noirs n'ont pas pu être classifiés. La flèche blanche indique un creux anormal dans la colonie, probablement causé par la méthode de report sur CaF₂. Flèche et barre d'échelle ont été rajoutées sur la figure originale.

Toutefois, ce gain de précision taxonomique se fait au prix d'un certain nombre de contraintes liées à l'infrarouge. Comme évoqué en section I.3.3 (p.29), l'eau absorbe fortement le rayonnement infrarouge, ce qui impose un transfert des colonies. L'étude de Lasch et al. propose une méthode de « tampon » pour déplacer les colonies du milieu de culture à un support en CaF₂, transparent aux infrarouges. La morphologie est donc forcément altérée et, en conséquence, les analyses ultérieures considèreront les informations spectrales de chaque pixel de façon séparée. Ne pas considérer la colonie dans son ensemble limite l'intérêt d'une méthode d'imagerie.

De plus, l'étude utilise un système de microscopie FTIR avec un champ optique restreint (700 µm de côté), ce qui implique des délais importants pour scanner une grande surface. Les temps d'analyse ne sont pas précisés par l'étude et sont susceptibles de grandement varier d'un système à un autre. Afin d'avoir un ordre de grandeur, précisons tout de même qu'avec le FTIR disponible au laboratoire une imagerie multispectrale de 13 par 13 points – qui serait nécessaire pour couvrir la surface d'une boîte de Petri avec un champ optique de 700 µm de côté – demanderait environ 4 h d'analyse (gamme spectrale : 900 – 3000 cm⁻¹, 10 passes).

Malgré ces défauts, l'étude décrite prouve la faisabilité d'une identification de colonies par imagerie infrarouge, et offre quelques perspectives intéressantes. Après analyse en composante principale (méthode d'analyse de la variance des données, expliquée p.64), les auteurs précisent notamment que quelques gammes de longueurs d'ondes restreintes suffisent à expliquer la majeure partie des différences entre spectres de microorganismes (en particulier les régions 1370 – 1490 cm^{-1} et le pic ester-carbonyle à 1738 cm^{-1}). Cette redondance des informations au sein des spectres infrarouges est largement rapportée dans la littérature, c'est pourquoi des études suggèrent aujourd'hui d'abandonner le FTIR pour passer à des systèmes d'acquisition discrète, ciblant quelques longueurs d'ondes précises (Bhargava 2012; Nanosensors Group). Ces systèmes – surnommés DFIR pour *discrete frequency infrared spectroscopy* – ouvrent la voie à une imagerie multispectrale plus simple et plus rapide que l'hyperspectral (Figure 25.B), et sont aujourd'hui rendus possibles par des avancées dans le domaine des sources infrarouges.

I.4.3. Lasers à cascade quantique et nouvelles perspectives en imagerie infrarouge

À l'origine, la spectroscopie FTIR a été conçue pour remplacer les spectromètres infrarouges à dispersion, utilisant des réseaux ou des prismes (Faix 1992). Elle constituait une alternative plus facile à mettre en place, et a permis l'arrivée au laboratoire de spectromètres à un prix abordable. Toutefois, sa conception pose un certain nombre de contraintes, dont la nécessité d'enregistrer un spectre complet à chaque analyse. La spectroscopie DFIR ne souffre pas de ce défaut, mais nécessite soit plusieurs sources infrarouges monochromatiques, soit une source accordable, c'est-à-dire dont la longueur d'onde d'émission peut être sélectionnée.

Aujourd'hui, les principales sources monochromatiques dans le moyen infrarouge sont les lasers à CO ou CO₂, les diodes laser à sels de plomb, et enfin les lasers à cascade quantique (QCLs), comme présenté en Figure 23.

Les diodes laser à sels de plomb assurent une couverture complète de la gamme de longueurs d'ondes d'intérêt biologique (3-10 μm), mais nécessitent un refroidissement à 90 K (-183.15 °C) et une instrumentation volumineuse, ce qui impose immédiatement des contraintes matérielles (Marcadet et al. 2011). Une solution plus simple pourrait venir des lasers à cascade quantique, dont les longueurs d'ondes d'émission couvrent toute la gamme entre 5 et 10 μm où se concentre la majorité de la signature spectrale des microorganismes.

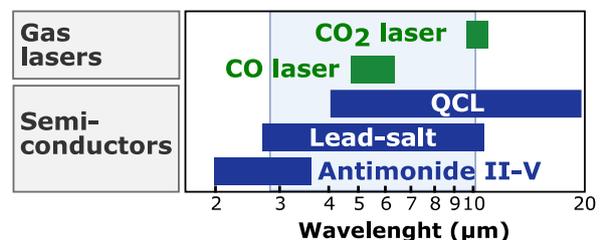


Figure 23. Sources lasers dans le moyen infrarouge. La zone bleue en arrière-plan représente la gamme de longueurs d'ondes d'intérêt pour l'identification microbiologique. Les Lasers à CO, CO₂ et antimoine couvrent des gammes de longueurs d'onde trop restreintes pour notre application. Reproduit et adapté d'après Tittel et al (Tittel, Richter, et Fried 2003).

Inventés dans les années 90, les QCLs sont des sources de lumière infrarouge monochromatique et de haute puissance (Faist et al. 1994). Ils fonctionnent grâce à un empilement de couches de matériaux semi-conducteurs, appelé *zone active*. Sans rentrer dans les détails du fonctionnement, les QCLs ont plusieurs avantages :

- Une grande flexibilité en termes de longueurs d'ondes, celle-ci étant définie par la conception de la zone active. Selon son design, un QCL peut couvrir une gamme spectrale de quelques centaines de cm^{-1} .
- Un fonctionnement à température ambiante, ne demandant donc pas de refroidissement à l'azote.
- Une puissance spectrale (puissance à chaque longueur d'onde) pouvant atteindre 10 W, et communément située autour de 100 mW. Ces puissances d'émission sont compatibles avec des applications biologiques (Bhargava 2012).
- Une résolution spectrale jusqu'à 0.01 cm^{-1} (communication personnelle interne au laboratoire).
- Une architecture compacte, facilement intégrable avec d'autres systèmes (Figure 24)
- La possibilité d'acquisitions multispectrales, s'intéressant uniquement à quelques longueurs d'ondes d'intérêt.



Figure 24. Photographie d'un packaging HHL (High heat load) pour QCL. La fenêtre laser apparaît en face avant, tandis que les broches d'alimentation sont visibles à l'arrière du boîtier. La chaleur produite par le QCL est généralement évacuée par un radiateur ou un refroidisseur Peltier couplé avec un ventilateur (non présenté ici). La vis placée à gauche de l'image pour référence mesure 1.7 cm de hauteur.

Couplés à un imageur non-refroidi, ces lasers ouvrent de nouvelles perspectives pour l'imagerie spectrale infrarouge. Ils ont déjà été mis à profit pour l'imagerie de tissus biologiques (Yeh et al. 2015; Bird et Rowlette 2017; Mathieu et al. 2021), mais également pour le suivi en temps réel d'un organisme vivant en milieu aqueux (Haase et al. 2016). Les systèmes de microscopie spectrale infrarouge à base de QCLs ont fait leur entrée sur le marché en 2015 avec le Spero[®] QT. Cet appareil, principalement commercialisé comme une solution d'analyse sans marquage de tissus biologique, affiche selon Daylight Solutions « des performances nettement supérieures à celles des microscopes FTIR en termes de résolution spatiale, de vitesse et de champ de vision, tout en éliminant le besoin de refroidissement cryogénique » (Daylight Solutions). Plusieurs études confirment ces performances, avec des temps d'analyse passant de plusieurs heures pour un scan FTIR à quelques minutes pour une imagerie spectrale à l'aide de QCLs (Bassan et al. 2014; Pilling et Gardner 2016; Kallenbach-Thieltges et al. 2020).

Dans les années à venir, des appareils comme le Spero[®] QT changeront probablement en profondeur le paysage de la spectroscopie infrarouge. Toutefois, si les microbiologistes reconnaissent l'intérêt de tels instruments (Hobro et Smith 2018), les études de microorganismes par imagerie à base de QCLs se font rares, et aucune n'a encore démontré la faisabilité d'une identification de colonies à l'aide de cette technologie. Les QCLs pourraient pourtant ouvrir de nouvelles perspectives en termes de précision d'identification, et surtout mener à des appareils d'imagerie multispectrale abordables et dédiés au diagnostic.

I.5. Conclusion de partie

L'identification microbiologique, traditionnellement réalisée *via* une galerie d'observations et de tests chimiques, a connu bon nombre de révolutions au cours des dernières décennies. L'arrivée sur le marché de solutions d'identification à base de PCR ou de spectrométrie de masse avec le MALDI-TOF permettent aujourd'hui une analyse fiable, rapide et de plus en plus automatisée. Ces solutions ne sont toutefois pas parfaites, que ce soit à cause d'un coût élevé ou encore d'une analyse échantillon par échantillon impliquant des prélèvements et des délais supplémentaires. En conséquence, et en parallèle de travaux d'amélioration des technologies existantes, une partie des efforts se tourne aujourd'hui vers la mise au point de techniques d'identification optiques sans marquage et non-destructives.

Actuellement, la seule technique d'identification optique sans marquage disponible sur le marché est la spectroscopie FTIR. Cette méthode pourrait offrir une résolution taxonomique inégalée, mais reste encore limitée en termes de débit d'analyse et pose d'importants problèmes de standardisation. C'est pourquoi il a été envisagé de passer d'une unique acquisition spectrale à un système d'imagerie spectroscopique, ce qui permettrait d'augmenter le nombre de colonies analysées en une seule acquisition tout en apportant de nouvelles informations liées à la morphologie.

Dans ce domaine, l'imagerie hyperspectrale FTIR, limitée par des délais d'acquisition de plusieurs heures, est peu à peu supplantée par l'imagerie DFIR, favorisée par le développement de sources laser de haute puissance dans le moyen infrarouge. Celles-ci, appelées QCLs pour *quantum cascade lasers*, offrent aujourd'hui une imagerie spectrale grand champ et à vitesse vidéo (60 images par seconde, contre une image en plusieurs minutes voire heures pour le FTIR), tout en simplifiant le système d'acquisition.

L'identification de microorganismes à l'aide d'une imagerie DFIR à quelques longueurs d'ondes n'a cependant pas encore été réalisée.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse s'intéressent à un procédé d'imagerie infrarouge à base de QCLs, pour l'identification sans marquage de colonies microbiennes cultivées sur milieu gélosé. Plus précisément, nous évaluerons ici les performances d'un système expérimental d'imagerie :

- **Multispectrale** : c'est-à-dire s'intéressant uniquement à quelques longueurs d'ondes d'intérêt. Cette restriction devrait accélérer les acquisitions, mais aussi mener à terme à une instrumentation plus simple et abordable qu'un système d'imagerie hyperspectrale comme le Spero[®] QT.
- **Sans lentille** entre l'objet et le capteur : l'absence d'optiques infrarouge participera à réduire le coût et la complexité du système, tout en assurant une imagerie grand champ.
- **Sans refroidissement cryogénique** : s'affranchir de tout système de refroidissement à l'azote simplifiera une fois encore les acquisitions et l'utilisation de l'appareil.

Le chapitre II sera consacré à la présentation du banc de mesure et du protocole d'acquisition. Nous y discuterons également des premières images multispectrales obtenues, ainsi que de leur prétraitement. Après une présentation des principes de la classification d'image, le chapitre III se concentrera sur l'analyse d'une base de données d'images multispectrales de colonies

microbiennes par des approches d'apprentissage machine. Y seront évaluées les performances de la technique pour l'identification de microorganismes, ainsi que les possibilités d'optimisation du nombre de longueurs d'ondes. Enfin, le chapitre IV discutera des perspectives de l'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge en regard de l'état de l'art. Il présentera les améliorations envisagées, ainsi que quelques axes de recherche pour la suite des travaux.



Chapitre 2

L'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge moyen

Introduction — L'imagerie multispectrale dans l'infrarouge est envisagée comme une technique d'identification microbienne combinant un apport d'informations phénotypiques, à la fois morphologiques et spectrales. Elle est en cela une alternative à l'imagerie hyperspectrale FTIR, à la différence qu'elle se concentre sur quelques longueurs d'ondes précises au lieu d'un continuum spectral. Cette discrétisation se fait au prix d'informations spectrales moins résolues, mais limite drastiquement les temps d'acquisition. En conséquence, l'imagerie multispectrale dans l'infrarouge pourrait devenir une technique d'analyse rapide et sans marquage de colonies bactériennes. Dans ce chapitre, nous détaillerons le principe de la méthode. Nous présenterons également le banc d'imagerie infrarouge et les différents éléments nécessaires aux acquisitions.

II.1. Imagerie multispectrale dans l'infrarouge moyen

II.1.1. Principe

Comme évoqué précédemment, l'imagerie hyperspectrale dans l'infrarouge moyen est envisagée comme une technique d'identification de colonies microbienne (Lasch et al. 2018). Elle a l'avantage d'être sans marquage et potentiellement non-destructive, mais souffre de temps d'acquisitions extrêmement longs et d'une instrumentation complexe (voir Figure 18 page 30, et Figure 25, page 41). De plus, les continuums d'images enregistrés représentent une grande quantité de données souvent redondantes. Malgré ses avantages théoriques, l'imagerie hyperspectrale reste encore trop lente pour envisager une application commerciale.

Ici, nous proposerons une simplification de l'imagerie hyperspectrale infrarouge. Cette nouvelle méthode est basée sur une combinaison de deux techniques d'imagerie : l'imagerie multispectrale et l'imagerie sans lentille.

L'imagerie multispectrale reprend le principe de l'imagerie hyperspectrale, mais se concentre sur l'acquisition de quelques longueurs d'ondes plutôt que d'un continuum spectral (voir Figure 20.B, page 32). Elle repose donc sur l'idée qu'un nombre restreint de longueurs d'ondes suffit à expliquer la majorité des variations entre deux spectres infrarouges. Dans le cas de l'identification microbiologique, ce constat a déjà été relevé par la littérature, ce qui fait de l'imagerie multispectrale un candidat crédible pour ce type d'analyses (Wenning et al. 2014). Comparée à l'imagerie FTIR, elle permettrait un gain de temps considérable sur les temps d'acquisition (de plusieurs heures à quelques secondes), mais aussi une simplification de l'instrumentation (Figure 25).

Au lieu d'une source polychromatique et d'un interféromètre (Figure 25.A), l'imagerie DFIR se baserait sur des QCLs monochromatiques ou accordables comme source d'illumination (Figure 25.B). Combinés à un imageur infrarouge, ces lasers infrarouges permettent une imagerie rapide à une longueur d'onde précise. Un simple imageur et une source accordable permettent ainsi d'enregistrer des informations spectrales sans spectromètre. Ce principe a déjà été utilisé pour l'analyse de tissus cancéreux (Bird et Rowlette 2017; Kallenbach-Thieltges et al. 2020; Kümmel et al. 2021), mais jamais pour l'identification de colonies de microorganismes. Notons toutefois ici que les longueurs d'ondes d'analyse dépendent de l'échantillon et de l'application ciblés. Un tel système doit donc être adapté selon les cas d'usage auxquels il se destine.

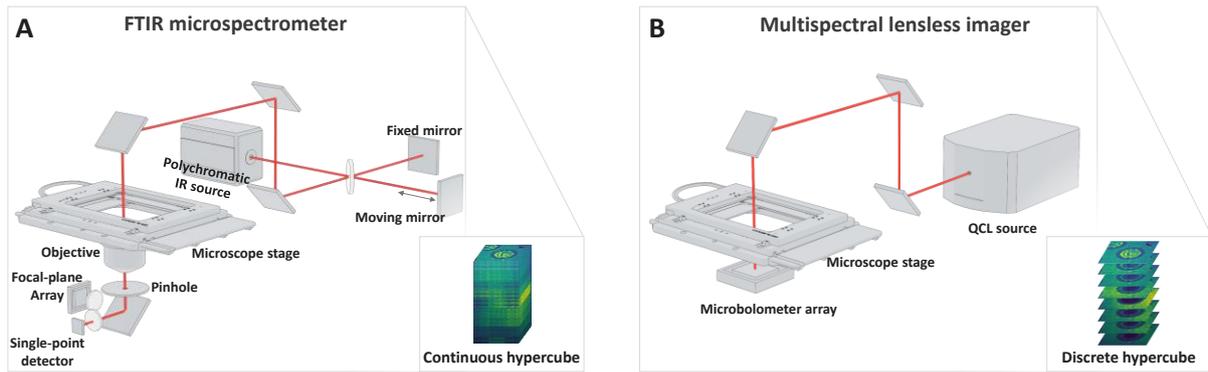


Figure 25. Instrumentations pour les imageries hyperspectrale et multispectrale dans l'infrarouge. A : schéma 3D d'un microspectromètre FTIR. Ce système nécessite entre autres un interféromètre (miroir fixe + miroir mobile), ainsi que des objectifs et lentilles pour l'imagerie qui en complexifient l'architecture. B : proposition de système d'imagerie multispectrale sans lentille. La source polychromatique et l'interféromètre du FTIR ont été remplacé par une source monochromatique accordable (QCLs), et les optiques d'imagerie sont retirées par la configuration sans lentille. Les hypercubes associés ont été acquis sur une colonie de E. coli imagée dans le moyen infrarouge, entre 1235 et 1800 cm^{-1} .

L'imagerie sans lentille, quant à elle, consiste à approcher l'échantillon au plus proche de l'imageur, et ce sans élément optique intermédiaire. Dans cette configuration, la distance objet-captur (ici, 2 mm) devient négligeable devant la distance source-objet (1 m, voir section II.2.1, page 47). Le grandissement du système s'approche alors de 1 (Perlemoine 2021) :

$$G = \frac{L + l}{L} \simeq \frac{L}{L} \simeq 1$$

Équation 3. Calcul du grandissement optique pour un système sans lentille. Avec G le grandissement, L la distance source-objet, et l la distance objet-captur. Ici, l est négligeable devant L .

En l'absence d'élément optique, et en supposant le grandissement proche de 1, le capteur collecte donc une image dont les dimensions sont équivalentes aux siennes. Plus le capteur sera large, plus le champ optique imagé sera important. Ce point est particulièrement intéressant puisqu'une amélioration du capteur a donc des répercussions directes sur certains aspects de la technique : ici, le nombre de colonies analysables en une seule image. De même, la résolution – c'est-à-dire la dimension du plus petit objet observable par le système – est ici directement liée à celle du capteur, définie quant à elle par le pas des pixels (dans le cas des capteurs infrarouges : 34 ou 12 μm , voir section II.2.3, p.50). Une remarque doit toutefois être apportée ici sur la limite de résolution.

En effet, la diffraction implique qu'un objet ponctuel éclairé par une source lumineuse et observé par un système optique ne donnera pas naissance à une image point, mais à une figure de diffraction appelée *tache d'Airy* (Figure 26). En deçà d'une certaine distance, deux taches d'Airy voisines se chevauchent et ne peuvent plus être distinguées l'une de l'autre. C'est la *limite de diffraction* : la dimension du plus petit détail observable par un système optique. Plusieurs critères existent pour définir cette limite de diffraction, mais on considère généralement en première approximation qu'elle est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde d'illumination (Giancoli 1993; Born et Wolf 2013). Pour la gamme de longueurs d'ondes qui nous intéresse ici (voir section suivante), la résolution maximale atteignable se

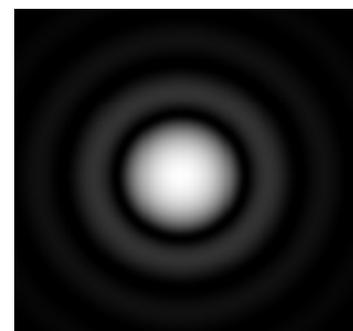


Figure 26. Exemple de tache d'Airy. Source : wikimédia, domaine public.

situe donc entre 5 et 10 μm . Comme nous le verrons en section II.2.3 (p.50), les capteurs utilisés au cours de ces travaux ont un pas de pixel de 34 μm . La taille des détails observables est donc limitée par le capteur, et non par la diffraction. À l'avenir, ce constat pourrait toutefois changer avec l'arrivée de capteurs plus résolus (Riedl 2001).

En résumé, l'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge moyen consiste à préparer un échantillon sans étape de marquage, puis amener cet échantillon au plus proche d'un capteur pour l'imager à quelques longueurs d'ondes discrètes (Figure 27). Après acquisition, les piles d'images obtenues, appelées hypercubes (Figure 27, Multispectral stack), peuvent être utilisées pour de la classification par apprentissage supervisé, et ainsi identifier un échantillon inconnu.

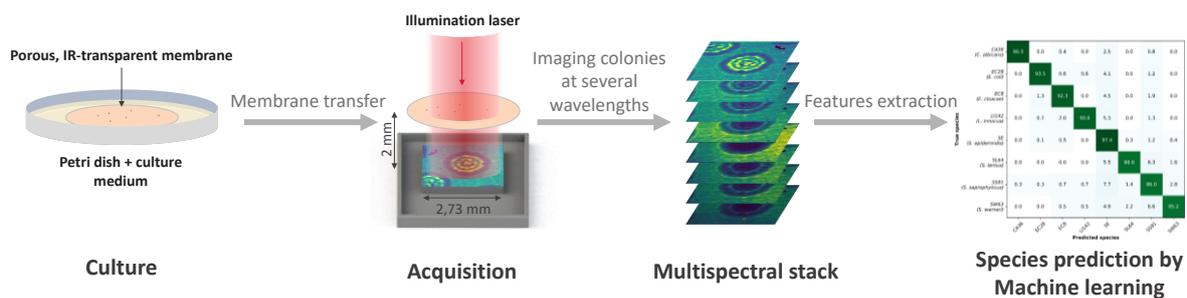


Figure 27. Principe de l'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge moyen.

Dans le cas du diagnostic, l'imagerie sans lentille et l'imagerie spectrale ont toutes deux été utilisées pour classer des colonies cultivées sur milieu gélosé (Maeda et al. 2017, 2018; Lasch et al. 2018). Leur combinaison laisse donc envisager des performances similaires, voire supérieures *via* l'apport d'informations à la fois spectrales et morphologiques (Kim et al. 2017). De plus, les développements récents dans les domaines des lasers et des capteurs infrarouges offrent aujourd'hui des acquisitions à vitesse vidéo (60 Hz), et permettent donc de scanner rapidement de larges surfaces comme une boîte de Petri. La question de l'absorbance de l'eau, particulièrement importante dans l'infrarouge, sera discutée en section II.3 (p.58).

Ici, la principale différence avec l'imagerie hyperspectrale réside dans la restriction du nombre de longueurs d'ondes. L'impact exact du nombre de longueurs d'ondes et de leur sélection sur la qualité des résultats fait partie des questions soulevées au cours ces travaux de thèse.

II.1.2. Longueurs d'ondes d'acquisition

En contrepartie d'une simplification du système et d'acquisitions plus rapides, le nombre restreint d'images enregistrées implique une sélection rigoureuse des longueurs d'ondes d'acquisition. Celle-ci s'est faite en plusieurs étapes.

Tout d'abord, les fréquences de résonance des liaisons chimiques impliquées dans les biomolécules sont abondamment documentées dans la littérature (Maquelin et al. 2002; Lasch et al. 2018; Bruker). Certaines d'entre elles, comme le pic amide I (1655 cm^{-1}) ou la bande phosphodiester ($1250 - 1220\text{ cm}^{-1}$), sont principalement associées à des biomolécules d'intérêt spécifiques comme les protéines ou les acides nucléiques, et sont ainsi susceptibles d'apporter des informations intéressantes. Cependant, le seul article de Maquelin (2002) recense une trentaine de signatures spectrales et certaines d'entre elles s'étalent sur des bandes de fréquence de plusieurs dizaines de cm^{-1} . D'autres études se basent entièrement sur les signatures spectrales des glucides en raison d'une importante variabilité d'une espèce à l'autre (Imperiali 2019;

Bruker), mais cette identification repose sur une analyse complète de la région 900-1400 cm^{-1} . La large gamme de longueurs d'ondes d'intérêt disponibles impose donc une seconde étape de sélection.

Remarque 6. Le nombre d'onde est défini comme l'inverse de la longueur d'onde. Son usage est privilégié dans certains domaines, y compris les spectroscopies infrarouges et Raman. En optique, on préférera cependant parler de longueur d'onde, c'est pourquoi nous parlerons souvent ici de « longueur d'onde d'acquisition » alors que les grandeurs évoquées correspondront à un nombre d'onde. Les deux unités sont reliées par la relation $\bar{\nu} = \frac{10000}{\lambda}$, avec $\bar{\nu}$ le nombre d'onde en cm^{-1} , et λ la longueur d'onde en μm . Ces unités sont celles rencontrées en spectroscopies moyen infrarouge.

L'analyse en composante principale, ou PCA (Principal Component Analysis) est un outil mathématique utilisé pour l'apprentissage non-supervisé et la réduction de dimensions. Elle permet, à partir d'un jeu de données à N variables corrélées entre elles, de calculer un nouveau jeu de données à n variables décorrelées, avec n inférieur ou égal à N (Jolliffe 2005; Loukas 2020). Ces nouvelles variables, appelées *composantes principales*, sont issues d'une combinaison linéaire des variables originales. Sur la Figure 28 ci-contre par exemple, les deux variables originales représentées selon les deux axes x et y , sont corrélées entre elles. La PCA aboutit à deux nouveaux axes représentés par les flèches, nommés PC1 et PC2, qui sont à la fois décorrelés et expliquent au mieux la variance du jeu de données. En trois dimensions, la PCA pourrait aboutir soit à une troisième composante principale, soit à deux composantes principales « résumant » la majeure partie de la variabilité des trois axes. Dans ce second cas, la PCA permettrait le passage d'un jeu de données en trois dimensions à deux dimensions : on parle alors de réduction de dimensionnalité.

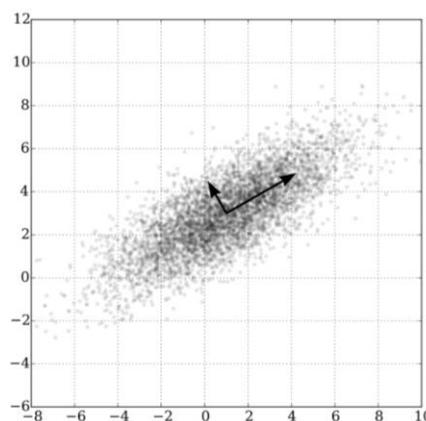


Figure 28. Exemple de PCA sur un nuage de point à deux variables. Les deux composantes principales PC1 et PC2 sont représentées par les flèches noires. Crédits image : Nicoguardo, wikimédia, CC 4.0. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:GaussianScatterPCA.svg>.

Appliquée à l'analyse de spectres, la PCA est utilisée pour transformer un jeu de données avec un grand nombre de variables (une par longueur d'onde analysée), en jeu de données à deux ou trois variables. Cette projection est fréquemment employée pour ramener un spectre sous la forme d'un point sur un graphique, à l'instar de ce qui sera présenté en Figure 99 (p.123). De plus, les composantes principales étant une combinaison linéaire des variables initiales, elle permet d'identifier les variables contribuant le plus à la variance des données ; les longueurs d'ondes expliquant le plus de variabilité entre échantillons (Kang et al. 2020).

Pour mettre en évidence des longueurs d'onde d'intérêt par PCA, des cultures sur milieu COS ont été préparées à partir de dix espèces différentes (*Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Candida Lusitaniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Listeria innocua*, *Bacillus thuringiensis*, et *Pseudomonas fluorescens*). Après incubation à 36.5°C pendant 24 h, une colonie de chaque culture a été reportée sur lame de CaF_2 et analysée au spectromètre FTIR (modèle Invenio®, Bruker). Une PCA à deux composantes a été calculée à partir des spectres ainsi acquis. Comme nous nous intéressons ici à la contribution de chaque

longueur d'onde à la variance globale, la Figure 29 ne présente pas la projection PCA en elle-même, mais la contribution de chaque longueur d'onde aux composantes PC1 et PC2. Les maximums de ces deux courbes font donc ressortir les longueurs d'ondes les plus discriminantes.

Celles-ci confirment l'intérêt des fréquences 1250 cm^{-1} et 1655 cm^{-1} , et en font apparaître de nouvelles comme 1400 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} et 1738 cm^{-1} , toutes situées sur des maximums locaux et associées à une liaison chimique connue. Ces données et les références issues de la littérature ont finalement menées au choix des longueurs d'ondes suivantes (désignées par le nombre d'onde équivalent) :

- 1235 cm^{-1}** ($8.1\ \mu\text{m}$) : correspondant à l'étirement asymétrique P=O de la liaison phosphodiester, majoritairement associée aux acides nucléiques (ADN et ARN). On cible ici le milieu de la gamme de résonance indiquée par Maquelin et al. 2002, entre 1250 et 1220 cm^{-1} .
- 1350 cm^{-1}** ($7.4\ \mu\text{m}$) : utilisée comme référence pour calculer la ligne de base dans certaines publications (Bird and Rowlette, 2017). Le signal bactérien n'est toutefois pas nul et peut varier d'une espèce à l'autre.
- 1400 cm^{-1}** ($7.1\ \mu\text{m}$) : étirement symétrique de la double liaison C=O au sein des groupements carboxyles ionisés (COO^-). Cette fonction chimique se retrouve principalement dans les acides aminés libres et les acides gras.
- 1468 cm^{-1}** ($6.8\ \mu\text{m}$) : déformation CH des groupements $-\text{CH}_2$ et CH_3 , abondant dans les chaînes carbonées non saturées comme les lipides et certaines protéines.
- 1535 cm^{-1}** ($6.7\ \mu\text{m}$) : pic « Amide II », résultant du cisaillement N-H et de l'étirement C-N des liaisons peptidiques des protéines (Bird et Rowlette 2017). Il s'agit, avec le pic amide I, du principal marqueur associé aux protéines dans la signature spectrale des microorganismes.
- 1655 cm^{-1}** ($6.1\ \mu\text{m}$) : pic « Amide I », correspondent principalement à l'étirement de la liaison C=O au sein d'une liaison peptidique (Coriolis Pharma). Elle est, dans une moindre mesure, liée au cisaillement N-H et à l'étirement C-N, toujours au sein des liaisons peptidiques. Sa fréquence de résonance varie en fonction de la structure secondaire des protéines, et apparaît à 1655 cm^{-1} dans le cas des repliements en hélice α (1637 cm^{-1} pour les feuillettes β). Ce pic correspond au maximum d'absorbance pour tous les microorganismes testés.
- 1715 cm^{-1}** ($5.8\ \mu\text{m}$) : étirement C=O des acides carboxyliques.
- 1738 cm^{-1}** ($5.7\ \mu\text{m}$) : étirement C=O des groupements esters, abondants dans les membranes bactériennes (Sohlenkamp and Geiger, 2016). Des molécules estérifiées comme le triacylglycérol sont également présentes dans certaines espèces d'actinomycètes et sont fréquentes en tant que réserve énergétique chez la plupart des eucaryotes (Alvarez and Steinbüchel, 2002). L'absorbance à cette longueur d'onde varie grandement d'une espèce à l'autre (Figure 29) ce qui en fait un bon candidat pour l'identification (Lasch et al. 2018).
- 1800 cm^{-1}** ($5.6\ \mu\text{m}$) : zone sans signal biologique particulier, utilisée comme référence dans la littérature (Bird et Rowlette 2017).

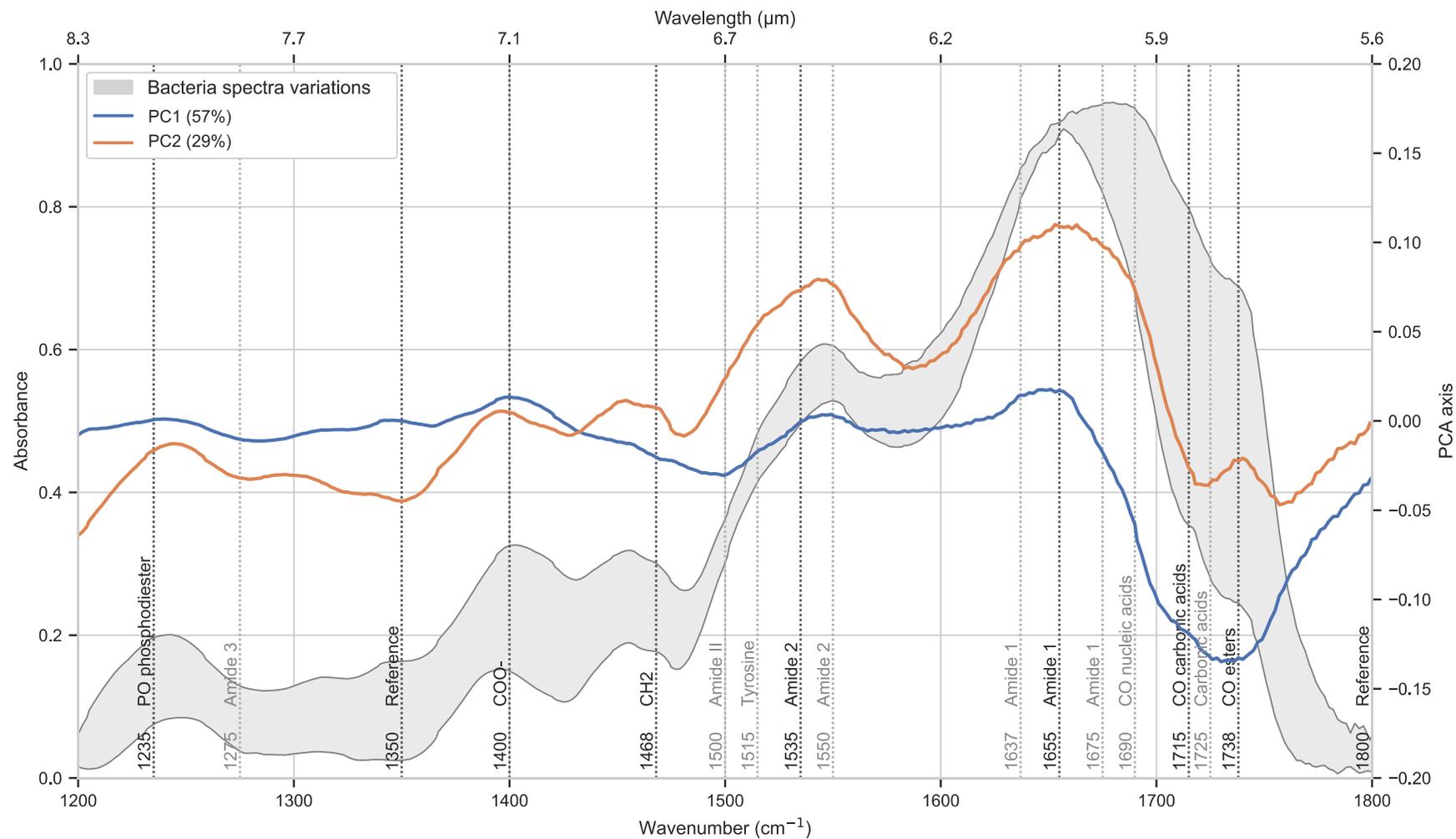


Figure 29. PCA. Toutes les courbes ont été lissées avec un filtre de Savitzky-Golay pour clarifier la figure (fenêtre : 5, polynôme : 3). Les pics de résonance des principales liaisons chimiques d'intérêt, extraites de Maquelin et al. 2002, sont représentés en lignes pointillées. Celles ayant été retenues pour l'imagerie multispectrale sont indiquées en noir.

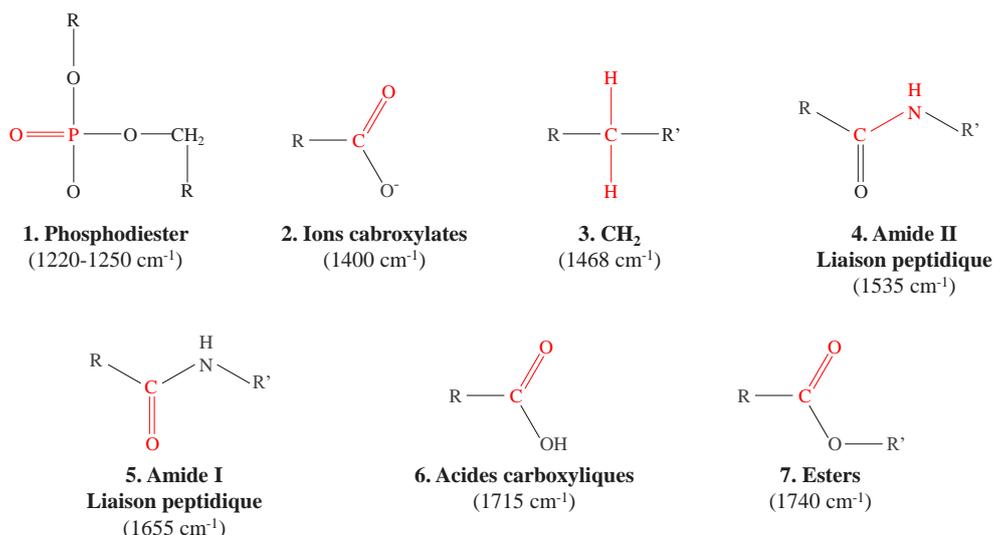


Figure 30. Formules des groupements chimiques ciblés par les longueurs d'ondes choisies. La, ou les, liaisons résonantes sont indiquées en rouge.

Notons ici que les fréquences indiquées ont pu être décalées de quelques cm^{-1} par rapport à leurs références bibliographiques. Ce décalage vise à éviter les pics d'absorbance de la vapeur atmosphérique ou à gagner en puissance laser, l'émission de notre source n'étant pas constante sur toute la gamme (voir section II.2.1, p.47). Précisons également que cette sélection s'est faite sur la base d'un jeu de spectres donné. Elle n'est donc pas nécessairement pertinente pour l'identification de toutes les espèces microbiennes. Toutefois, compte tenu de la diversité des espèces prises en compte pour la PCA, nous pouvons raisonnablement considérer que la sélection permettra l'identification d'un large panel de microorganismes.

Les neuf longueurs d'ondes décrites ci-dessus serviront donc de base à toutes les acquisitions en imagerie multispectrale infrarouge que nous décrirons à présent.

II.2. Banc de mesure

Pour tester les performances de l'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge sur un cas d'identification microbienne, le dispositif expérimental devait respecter certaines contraintes. En particulier :

- Avoir une source laser accordable entre 1235 et 1800 cm^{-1}
- Présenter le trajet optique à l'air libre le plus court possible pour limiter les perturbations atmosphériques
- Utiliser un capteur infrarouge abordable et non-refroidi.
- Être automatisable
- Permettre plusieurs modalités d'éclairage pour tester différents modes d'imagerie (transmission, réflexion, diffraction).

Cette section décrira le banc de mesure optique conçu d'après ce cahier des charges, de la source lumineuse au capteur, puis présentera les routines d'automatisation ayant été mises en place.

II.2.1. Source laser MirCat

La source infrarouge utilisée pour ces travaux de thèse est un laser MIRcat pulsé (Daylight solutions), composé de quatre unités accordables. Chaque unité intègre un QCL large bande, ainsi qu'une grille de diffraction et une cavité externe utilisées pour sélectionner une longueur d'onde d'émission précise. On parle de montage en *cavité externe*, ou EC-QCL (Wysocki et al. 2005; Daylight Solutions 2012), qui offre une largeur spectrale inférieure au cm^{-1} . Le MIRcat est donc composé de quatre EC-QCL, couvrant chacun une partie de la gamme de longueurs d'ondes d'émission de la source. Le MIRcat assure lui-même l'opération des quatre lasers et peut être considéré comme une source infrarouge unique, à quelques remarques près qui seront évoquées au fur et à mesure.

La source couvre une gamme de longueurs d'ondes d'émission allant de 900 à 1900 cm^{-1} (11.1 – 5.3 μm , Figure 31), avec un pas de 0.5 cm^{-1} . Les variations de puissance observées en Figure 31 découlent du montage à quatre QCL, chaque laser ayant son propre optimum de puissance. Notons également trois points de « coupure », correspondant à la longueur d'onde de changement de QCL, où la puissance d'émission est la plus faible. Le laser fonctionne en pulsé, à une fréquence de 100 kHz et avec une largeur de pulse de 940 ns.

Ce système coûtant plus de 150 000 €, il n'est pas envisagé comme une solution viable pour un système commercial. Il permet toutefois de tester différentes longueurs d'ondes pour orienter la conception d'un prototype intégré. À terme, un dispositif destiné aux utilisateurs remplacerait cette source accordable onéreuse par une série de QCLs monochromatiques à bas coût. Ce système ciblerait quelques longueurs d'ondes précises (entre 4 et 8) spécifiques à une application donnée.

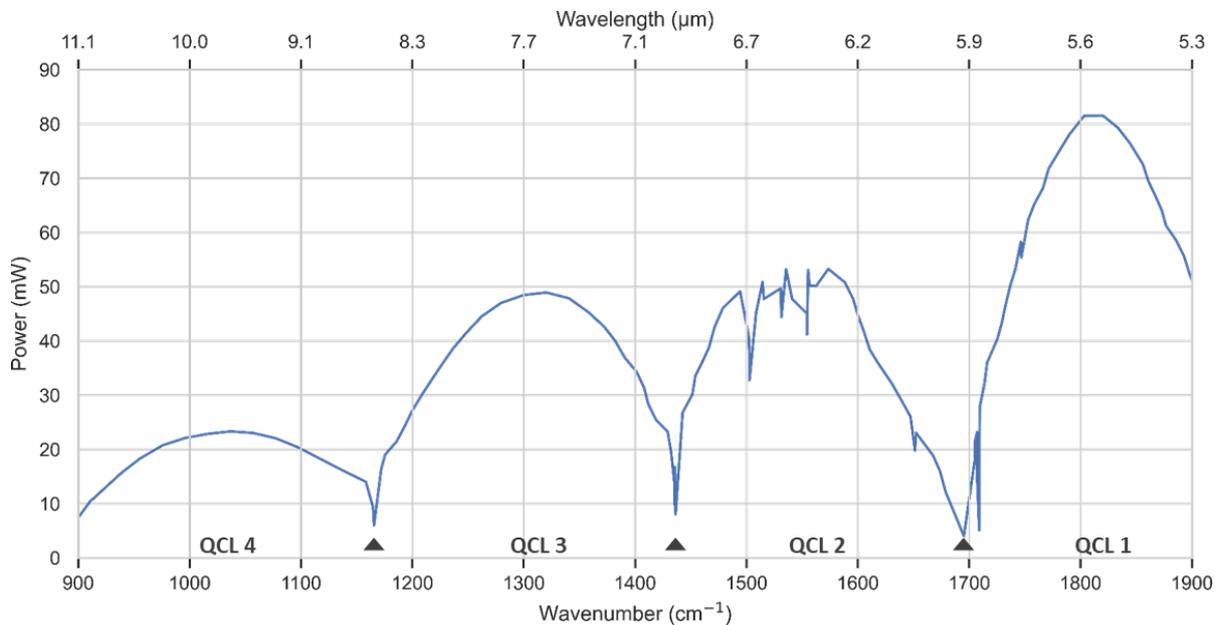


Figure 31. Puissance laser émise par le MIRcat en fonction de la longueur d'onde. Les changements de QCL sont indiqués par les flèches noires. Les pertes de puissances ponctuelles constatées en particulier sur le QCL 2 sont dues à l'absorbance de la vapeur d'eau présente dans l'atmosphère.

Notons toutefois que, contrairement aux sources FTIR, les QCLs sont des sources de lumière cohérente, c'est-à-dire que les ondes émises oscillent de façon synchronisée. Cette cohérence expose au risque d'interférences optiques, aussi appelées franges d'égale épaisseur. En effet,

lorsqu'un faisceau de lumière cohérente traverse un échantillon composé de deux faces parallèles avec un angle d'incidence i non nul, les multiples réflexions entre les deux faces de l'échantillon donnent naissance à autant de faisceau lumineux secondaires (Figure 32). Ces faisceaux sont alors susceptibles de se recombiner, de s'additionner ou de s'annuler, donnant naissance à des franges d'interférences observables en imagerie.

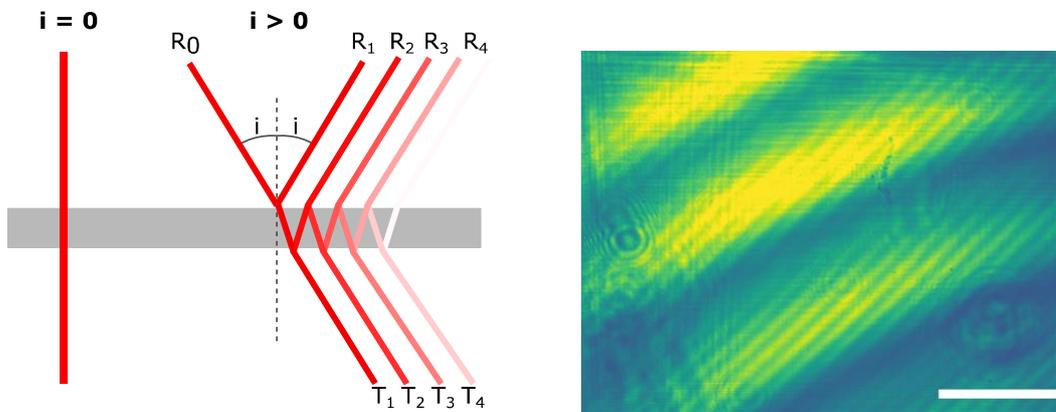


Figure 32. Interférences optiques. Droite : origine des franges d'épaisseur. Le schéma présente deux cas de figure. Lorsque le faisceau laser arrive avec un angle $i = 0$, aucune réflexion n'est observée. Lorsque l'angle i est non nul, les réflexions entre les faces parallèles du matériau donnent naissance à plusieurs faisceaux de lumière cohérente, menant à la formation de franges d'interférence. À gauche : franges d'interférences sur une lame de silicium sans échantillon. Les formes circulaires visibles en marge du centre sont liées à des poussières ou à des défauts de la lame. Barre d'échelle : 1 mm.

Ce phénomène a déjà été rapporté en imagerie QCL, et altère bien le résultat par rapport à ce qui peut être obtenu en imagerie FTIR (Yeh et al. 2015). Cependant, comme le rapportent Yeh et al., les interférences étant liées à la géométrie de l'échantillon, elles « encodent » sa structure dans l'image. Ainsi, elles pourraient dans certains cas être utilisées comme une source d'information supplémentaire. De plus, les altérations d'image n'empêchent généralement pas l'exploitation des données.

II.2.2. Trajet optique et présentation générale du banc de mesure

Comme évoqué en introduction de partie, plusieurs modalités d'imagerie ont été envisagées :

- **En transmission**, où le faisceau laser traverse l'échantillon avant d'être recueilli sur le capteur (Figure 33, A). Ici, aucun élément optique n'est placé sur le trajet objet – capteur.
- **En diffraction**, modalité similaire à l'imagerie en transmission, à l'exception près que le laser est focalisé sur l'échantillon (Figure 33, B). Le capteur infrarouge recueille alors un diffractogramme, à l'instar de ce que fait l'ELS dans le visible (voir I.2.3, page 20). L'imagerie en diffraction permettrait théoriquement d'identifier des objets plus petits comme des microcolonies (Marcoux et al. 2014), mais la focalisation du faisceau et l'échauffement qui en découle soulève la question de la destructivité de l'analyse.
- **En réflexion** (Figure 33, C), où la lumière réfléchiée par l'échantillon est collectée par un objectif ou une lentille, puis focalisée sur l'imageur placée au-dessus de l'objet. Ici, il n'est donc plus question d'imagerie sans lentille, mais la réflexion a l'avantage de placer tout le système au-dessus de l'échantillon. Elle permettrait donc théoriquement d'analyser des colonies à la surface d'une boîte de Petri sans nécessiter de support transparent aux infrarouges.

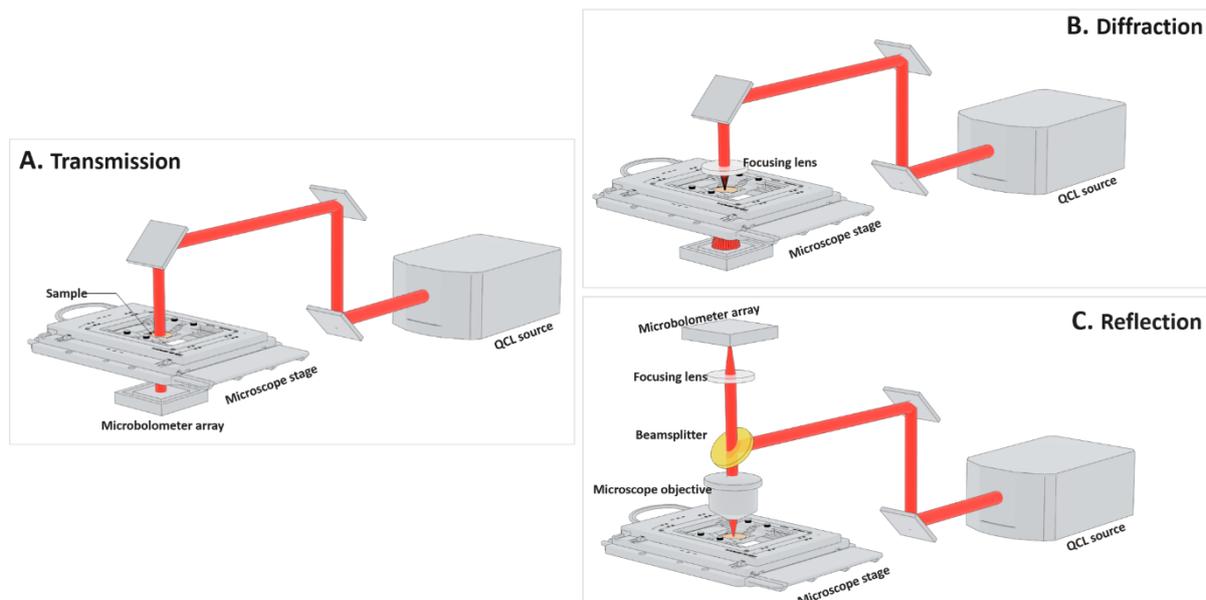


Figure 33. Modalités d'acquisition envisagées.

Pour des questions de praticité, un seul banc de mesure modulable a été conçu pour tester les trois modalités et passer rapidement de l'une à l'autre. Le système final, présenté en Figure 34, est basé sur un corps de microscope Leitz Sm-lux HL modifié pour notre application. Le laser y est redirigé depuis la source par trois miroirs en or (Thorlabs, PF10-03-M01), puis orienté vers l'échantillon au niveau d'un barillet à miroir. Celui-ci peut alterner entre un miroir diffusant (Thorlabs, DG10-1500-M01) ou une lame semi-réfléchissante en ZnSe (Thorlabs, BSW711) pour alterner entre différents modes d'imagerie.

Remarque 7. Les lentilles en silice utilisées en optique visible sont opaques dans l'infrarouge moyen (Crystan). Dans cette gamme de longueurs d'ondes, on préférera donc des matériaux comme le BaF₂, le CaF₂ (utilisé pour les lames de microspectroscopie FTIR), ou encore le ZnSe.

Le chemin total dans l'air a été limité à un mètre. Ce trajet, relativement court par rapport à d'autres bancs infrarouges montés au laboratoire, reste suffisamment important pour rendre les mesures sensibles à des variations atmosphériques comme le taux d'humidité (voir section IV.1.3, p.122).

Un expasseur de faisceau a également été placé sur le trajet optique pour augmenter la taille du faisceau laser sur l'imageur. Le diamètre de celui-ci est initialement de 2.5 mm, ce qui est insuffisant pour couvrir toute la surface du capteur de 2.73 mm de côté qui sera présenté en section suivante. Deux lentilles en ZnSe, respectivement de focales 50 et 75 mm (Thorlabs, LA7656-E3 et LA7660-E3), ramènent ce diamètre à 3.75 mm.

Enfin, une platine motorisée contrôlable manuellement ou par ordinateur (ThorLabs, MLS203-1) assure le déplacement de l'échantillon. Le capteur peut être installé en configuration sans lentille directement sous la platine (distance objet – capteur \approx 1 mm) ou au sommet du système, auquel cas deux autres lentilles assurent la focalisation de l'image.

Ce dispositif d'imagerie sera employé pour toutes les études en imagerie multispectrale infrarouge présentées par la suite. Il a également été utilisé dans le cadre d'un autre projet du laboratoire dédié à l'imagerie multispectrale sur tissus cancéreux (projet SPIRIT), pour lesquels

les imageries en transmission et en réflexion ont été testés. Dans le cadre de cette thèse, seule la configuration en transmission aura finalement été exploitée. L'imagerie en réflexion a brièvement été explorée en parallèle des travaux sur les tissus biologiques, mais demanderait un travail plus approfondi pour fournir des résultats concluants. Ici, le capteur sera donc toujours placé sous l'échantillon, en configuration sans lentille.

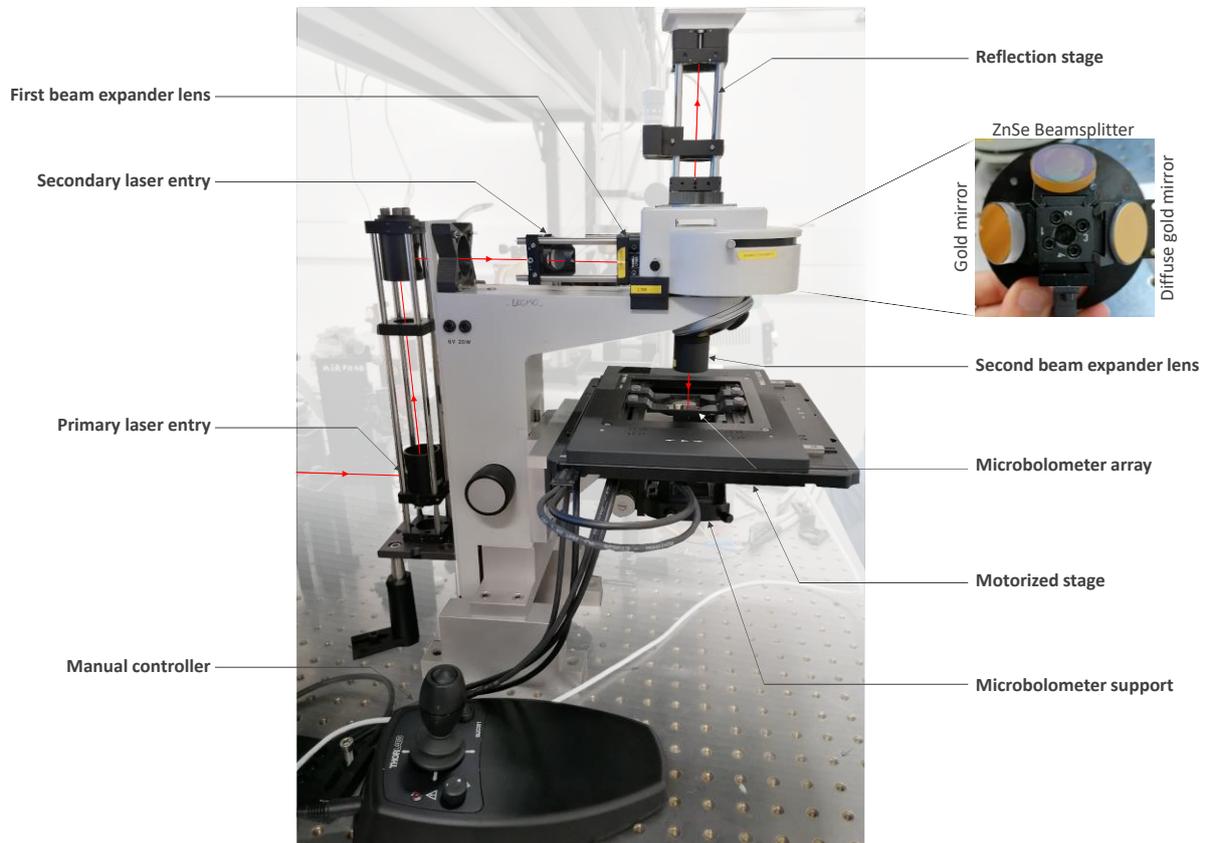


Figure 34. Vue générale du banc de mesure.

II.2.3. Matrice de microbolomètres

Les capteurs infrarouges se regroupent en deux familles selon la méthode de détection : quantique ou thermique (Ribet et al. 2021). Les détecteurs quantiques, historiquement utilisés pour les applications d'imagerie infrarouge, utilisent les électrons émis lors de l'absorption de photons par un matériau semi-conducteur pour détecter un rayonnement incident (Figure 35). Ils nécessitent cependant d'utiliser un matériau absorbant dans la gamme de longueurs d'onde que l'on désire imager. Le silicium classiquement utilisé pour l'imagerie dans le visible n'absorbant pas dans l'infrarouge, il est remplacé par des alliages comme le tellure de mercure-cadmium (MCT), ou encore l'antimoniure d'indium (InSb).

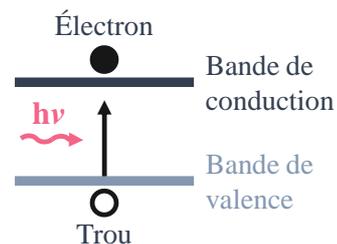


Figure 35. Transition électronique interbande induite par l'absorption d'un photon. Ce type de transition est impliquée dans l'effet photoélectrique de détecteurs dits à matériaux massifs, comme les capteurs MCT ou InSb. Reproduit d'après Ribet et al., 2021.

Les imageurs infrarouge comme les MCT ou InSb sont utilisés depuis les années 60 (Rogalski 2012), mais restent majoritairement limités à des applications de pointe comme la recherche, la caractérisation industrielle ou encore les domaines du militaire et du spatial. En effet, les faibles énergies impliquées dans les rayonnements infrarouges et les propriétés physiques des matériaux utilisés mènent à un rapport signal à bruit extrêmement faible à température ambiante (Tissot 2010). Ceci est dû à un courant électrique résiduel en absence d'éclairement lumineux, appelé le *courant d'obscurité*. Ce dernier constitue une source de bruit fondamentale des photodétecteurs qui augmente avec l'agitation thermique. Il masque ainsi d'autant plus le rayonnement incident avec l'augmentation de la température. Compte tenu des faibles énergies détectées, les capteurs quantiques infrarouges nécessitent un refroidissement cryogénique pour diminuer le courant d'obscurité, généralement à l'azote liquide, ce qui complexifie leur mise en œuvre et augmente les coûts d'utilisation.

Pour créer des capteurs infrarouges moins exigeants et utilisables par le grand public, les recherches se sont orientées depuis les années 80 vers les imageurs thermiques non-refroidis. Contrairement à leurs homologues quantiques, qui reposent sur un effet photoélectrique, les détecteurs thermiques mesurent une variation de température pour détecter le rayonnement infrarouge incident. Le circuit de détection du capteur est alors composé de trois composants :

1. Un matériau absorbeur, dont la température s'élève lorsqu'il absorbe un rayonnement thermique infrarouge
2. Un thermomètre, servant à lire cette élévation de température
3. Un puits thermique, considéré à température constante. L'importante capacité thermique de ce puits sert à ramener le matériau absorbant et le thermomètre à une température de consigne.

Différentes classes de capteurs existent en fonction du type de thermomètre utilisé pour la détection (optique, mécanique...). On parle de *bolomètre* lorsque celui-ci est une résistance thermique. Ces derniers ont fait l'objet d'importants travaux de miniaturisation (des capteurs avec un pas de pixel de 12 μm sont disponibles (Robert et al. 2020), et des recherches sont en cours pour atteindre 8 μm) et sont aujourd'hui suffisamment matures pour créer des imageurs infrarouges non-refroidis, fonctionnant à vitesse vidéo (généralement 60 Hz). Ceux-ci sont obtenus en intégrant une matrice de microbolomètres sur un circuit de lecture CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor, voir Figure 36 gauche), similaire à ceux utilisés pour les imageurs visibles. On parle alors de matrice de microbolomètres ou de capteur microbolométrique.

Ici, nous parlerons uniquement de capteurs microbolométriques à base de silicium amorphe (Yon et al. 2008).

La Figure 36 (droite) décrit l'architecture d'un pixel d'un tel capteur. Le bolomètre est ici constitué d'une membrane suspendue en silicium amorphe (thermomètre), recouverte d'une couche métallique de quelque nm d'épaisseur (élément absorbeur, également en silicium amorphe ou en titane, voir Tissot 2010). Le circuit de lecture en silicium fait office de puits thermique. Dans ce système, l'absorption d'un rayonnement incident par l'absorbeur cause une élévation de la température, et donc de la résistance électrique du silicium amorphe. Un courant de consigne, imposé par le circuit de lecture et circulant via les pieds de connexion, permet de

suivre la résistance de la membrane suspendue. L'augmentation de la résistance aux bornes du circuit témoigne ainsi de l'intensité d'un rayonnement infrarouge.

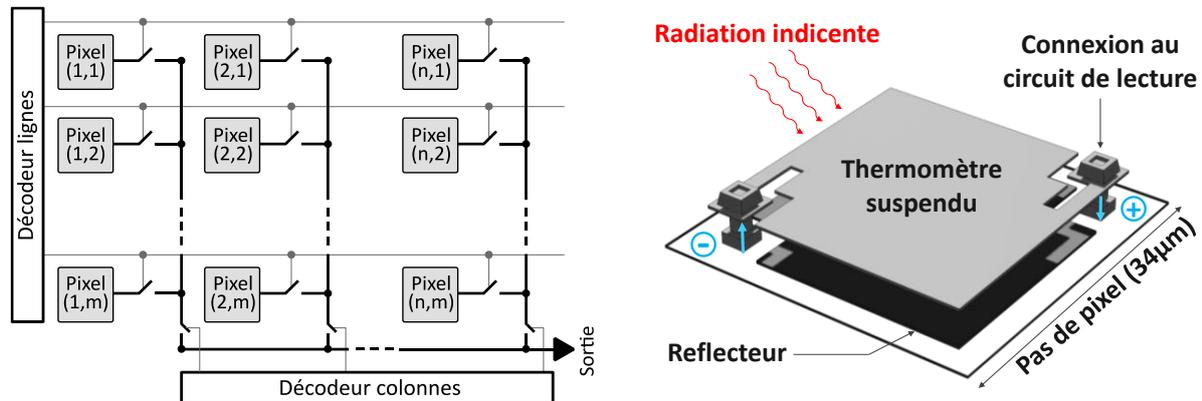


Figure 36. Principe d'une matrice de microbolomètres. Gauche : schéma simplifié d'un système de lecture CMOS classique. Dans ce circuit, un ensemble de transistors, contrôlés par les décodeurs lignes et colonnes, permettent de sélectionner les pixels un à un pour enregistrer le signal. Reproduit et simplifié d'après (Labonne 2007). Ici, chaque pixel est un microbolomètre comme représenté à droite. Il faut cependant noter que, dans le cas d'un capteur bolométrique, chaque colonne de pixel est complétée par un bolomètre « aveugle », isolé du rayonnement, et dont le signal sert à prendre en compte les variations de température ambiante (voir Figure 41) Droite : schéma de principe d'un microbolomètre. Une radiation incidente, absorbée par un thermomètre suspendu (absorbeur + résistance thermique), cause une variation de tension aux bornes du circuit. Cette variation peut être lue par le circuit de lecture présenté à gauche. D'autres représentations de ce type de capteur sont visibles en Figure 37.

Ces capteurs offrent plusieurs avantages non-négligeables. Tout d'abord, l'absence de refroidissement cryogénique et des coûts de fabrication plus faibles que pour les MCT les rendent accessibles pour de nouvelles applications. Ensuite, les bolomètres sont sensibles sur une large gamme de longueurs d'ondes dans l'infrarouge moyen, ce qui ouvre un vaste panel d'applications. Afin de limiter le bruit, cette largeur spectrale peut être restreinte au moment de la fabrication en fermant le capteur par un filtre, ici appelé *fenêtre*. Celle-ci est généralement optimisée pour l'imagerie thermique, entre 8 et 14 μm (Tissot 2010).

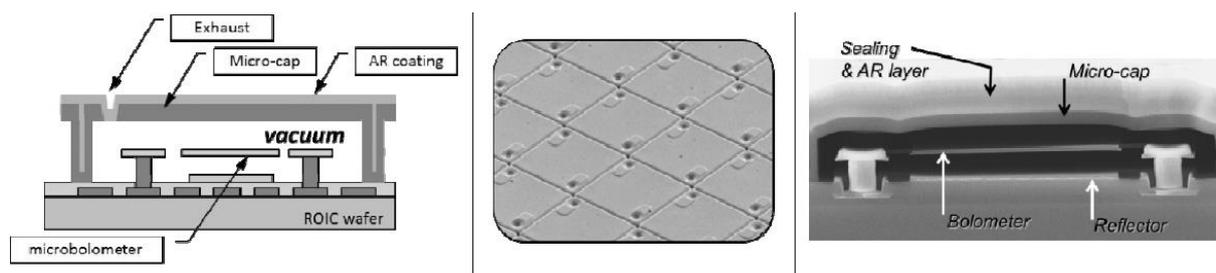


Figure 37. Imageur microbolométrique PLP. Gauche : schéma de principe d'un pixel (microbolomètre). Centre : image au microscope électronique à balayage (MEB) d'une matrice PLP. Chaque pixel est fermé par sa propre capsule de vide. Droite : vue en coupe au MEB d'un unique pixel, correspondant au schéma de gauche. Y sont visibles la capsule (micro-cap), ainsi que les revêtements déposés pour sceller la capsule (sealing & AR layer. AR : anti-reflet). Extrait de Yon et al., 2014.

En l'absence de refroidissement, les microbolomètres sont extrêmement sensibles aux variations de température. Pour isoler les pixels de l'environnement extérieur et de la convection thermique, les imageurs microbolométriques sont placés sous vide. La conception la plus simple consiste à faire ce vide en fin de fabrication, en scellant la matrice entière à l'aide de la fenêtre évoquée ci-dessus. On parle alors de design ALP, pour *array level packaging*. Il

existe également un second type d'architecture, appelé PLP pour *pixel level packaging*, qui nous intéresse ici (Dumont et al. 2012; Yon et al. 2014).

Sur un capteur PLP, le vide est fait non pas au niveau de la matrice, mais au niveau des pixels en eux-mêmes (Figure 37, gauche et droite). Chaque microbolomètre est ainsi placé dans une capsule individuelle, scellée par une couche de matériau antireflets. Dans le cas d'une imagerie sans lentille, ce design apporte plusieurs avantages par rapport à l'ALP, à commencer par l'absence de fenêtre filtrante. Il réduit ainsi la distance objet-échantillon, tout en gagnant en sensibilité et en largeur spectrale. Le capteur est alors utilisable sur tout l'infrarouge moyen, ce qui nous intéresse tout particulièrement puisque les longueurs d'ondes ici ciblées (entre 5 et 8 μm) sont hors de la gamme habituellement considérée par les fabricants (entre 8 et 14 μm), et donc filtrées par la fenêtre. Enfin, pour un imageur PLP, une rupture de vide n'impacte qu'un seul pixel au lieu de la matrice entière (Figure 37, centre), ce qui les rend résistants à certains dommages.

Pour ces travaux, nous avons utilisé une matrice de microbolomètres PLP développée par le laboratoire LI2T du CEA-LETI. Ils sont montés sur un socket de caméra ATOM 80 (Figure 38), système compact et facile d'utilisation commercialisé par Lynred, anciennement Ulis/Sofradir (Sofradir-EC 2014). Un prix réduit, combiné aux avantages précédemment cités, en font d'excellents outils de recherche, en particulier dans un contexte où la combinaison entre une lentille et un faisceau laser peut inopportunément brûler le capteur. Les caractéristiques de l'imageur sont résumées ci-dessous en Figure 39. Avec seulement 80*80 pixels, la définition est inférieure à celle atteinte par les capteurs MCT ou certaines matrices de bolomètres ALP, mais l'absence de refroidissement cryogénique et de fenêtre filtrante justifiaient cette concession.

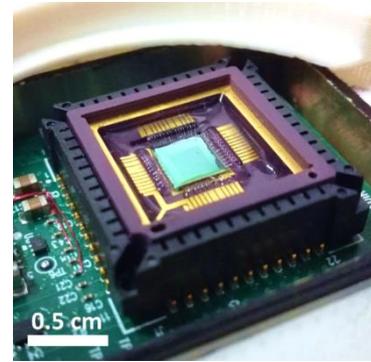


Figure 38. Photographie du capteur microbolométrique PLP utilisé au cours de ces travaux. Le capteur en lui-même (en vert au centre), mesure 2.73 mm de côté et est monté sur un socket ATOM80 (Lynred).

Définition	Taille des pixels	Pas de pixel	Surface	Vitesse d'actualisation
80x80 pixels	26 μm	34 μm	2.72 * 2.72 mm ²	60 Hz

Figure 39. Caractéristiques du capteur microbolométrique utilisé.

En résumé, les matrices de microbolomètres PLP sont donc des imageurs infrarouges abordables, non-refroidis et performants sur une large gamme de longueurs d'ondes, qui seront utilisés pour le reste de ces travaux de thèse.

Cependant, l'image fournie par un imageur microbolométrique n'est pas utilisable en l'état. En effet, l'image brute obtenue à l'issue d'une acquisition présente plusieurs défauts visibles en Figure 40. Certains d'entre eux sont liés à des défauts de fabrication, comme les pixels morts ou les non-uniformités d'une colonne de pixels à l'autre. De plus, en l'absence de refroidissement, l'auto-échauffement de la caméra n'est pas corrigé ce qui entraîne une dérive des mesures au cours du fonctionnement. Ces inhomogénéités sont corrigées par un procédé

appelé *non-uniformity correction* (NUC), qui réajuste le gain et l'offset de chaque pixel pour aboutir à une image lisse (Krupiński et al. 2014).

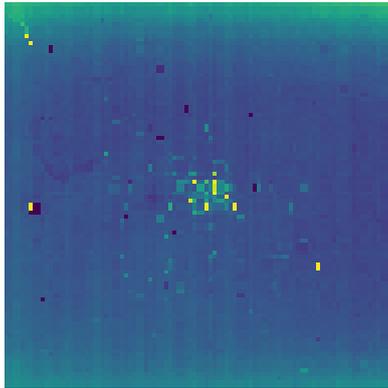


Figure 40. Exemple d'image non corrigée. On constate la présence de halos (zones claires sur les bords supérieurs et inférieurs de l'image), de différences de réponse d'une colonne de pixel à l'autre, ainsi que de pixels morts. Les pixels « chauds », principalement présents au centre de l'image, sont des pixels restants constamment surexposés. Ils découlent d'un dommage lié à l'exposition laser et à l'effet « lentille » de certaines colonies (discuté en section II.5.2, page 72).

En pratique, la correction d'image a été réalisée après les acquisitions par soustraction d'une image de fond moyenne. On parle alors de NUC 1 point, qui ne corrige que l'offset des pixels. Ce procédé sera présenté en section II.5.1 (p.70), et sera à nouveau évoquée en section IV.1.3 lors de la discussion sur les sources de variabilité expérimentales (p.122). Ici, seuls les réglages globaux du capteur sont donc paramétrés avant acquisition.

II.2.4. Réglages du capteur microbolométrique

Le circuit de lecture pour un bolomètre PLP est présenté en Figure 41.

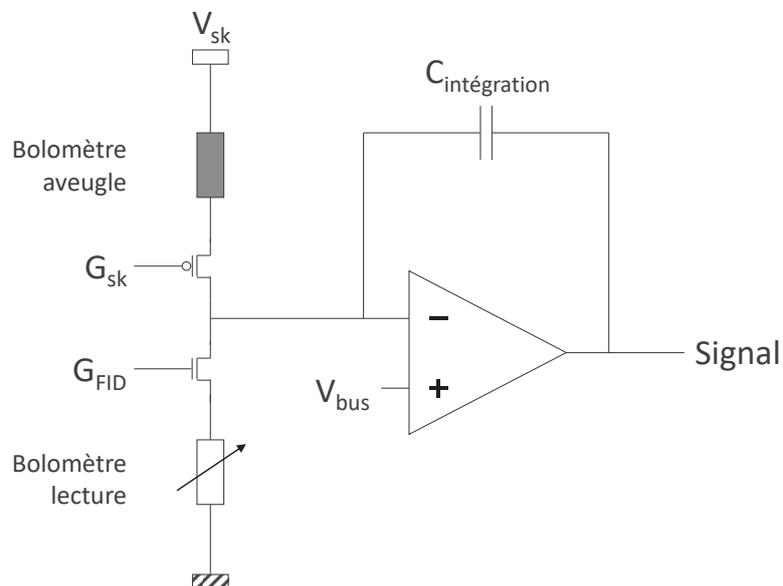


Figure 41. Schéma électronique du circuit de lecture de la matrice de microbolomètres.

Comme évoqué précédemment, un bolomètre peut être considéré comme une thermistance (composant dont la résistance varie avec la température). En appliquant une tension constante aux bornes de cette thermistance, le signal infrarouge reçu par le bolomètre se traduit par une variation d'intensité dans le circuit. À ce principe de base viennent toutefois s'ajouter plusieurs éléments.

Tout d'abord, le bolomètre de lecture est placé en série d'un autre bolomètre dit « aveugle », c'est-à-dire isolé du rayonnement infrarouge (ici, il y a un bolomètre aveugle par colonne de pixels). Les variations de réponse de ce bolomètre sont uniquement liées aux variations de température affectant le capteur. Il joue donc un rôle de référence pour s'affranchir en partie de l'influence de la température extérieure. Le signal en sortie du circuit est une mesure différentielle de l'intensité traversant le bolomètre aveugle et le bolomètre de lecture ; l'un est soustrait à l'autre. On parle d'*offset* ou encore d'*ébasage*. Deux transistors, G_{FID} et G_{sk} , contrôlent la contribution de chaque bolomètre au circuit global. Enfin, le couplage d'un amplificateur opérationnel et d'un condensateur (appelé montage intégrateur) permet l'amplification et l'intégration du signal sur une certaine durée.

L'utilisateur dispose de quatre paramètres pour contrôler ce circuit :

- Le temps d'intégration de l'acquisition (en ms), qui augmente l'intensité du signal.
- La tension de commande de G_{sk} (en V), qui influe sur la compensation du bolomètre de lecture par le bolomètre aveugle. On le surnomme parfois « ébasage », puisqu'il contrôle la soustraction du fond du signal, ou « ligne de base »
- La tension de commande de G_{FID} (en V), qui influe sur la contribution du bolomètre de lecture au signal. G_{FID} contrôle la *responsivité* du circuit, c'est-à-dire le rapport entre la puissance lumineuse reçue et l'intensité électrique en sortie de circuit.
- La capacité du condensateur (en pF), équivalente au gain du circuit. Une capacité plus faible entraîne un gain plus élevé, et donc une sensibilité et un niveau de bruit plus élevé.

En pratique, ces paramètres permettent d'ajuster la luminosité et le contraste des images. La luminosité, que nous surnommerons parfois *exposition* par abus de langage et analogie avec le domaine de la photographie, est définie ici comme la moyenne des niveaux de gris d'une image (voir Figure 42). Le contraste, quant à lui, rend compte de la différence de valeurs entre les pixels les plus lumineux et les pixels les plus sombres. Cette grandeur étant en partie liée à la perception de l'œil, plusieurs définitions formelles existent (Laurent 2014). Nous présenterons ici celle de Michelson, qui s'affranchit de toute notion de zone ou d'arrière-plan, et définit le contraste comme : $C = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}}$, avec I_{min} et I_{max} les intensités minimales et maximales de l'image.

Si l'on considère les images proposées en Figure 42, l'image *sous-exposée* présente à la fois une luminosité faible et un contraste faible (histogramme des niveaux de gris décentré vers les basses lumières et peu étalé). Ici, on considère une image *bien exposée* lorsque la luminosité et le contraste exploitent au maximum la dynamique du capteur : c'est-à-dire lorsque l'histogramme des niveaux de gris est distribué sur toute la gamme de valeurs disponible, sans que les valeurs extrêmes ne soient complètement noires (sous-exposées) ou complètement blanches (surexposées).

Dans le cas de notre capteur bolométrique, les quatre paramètres de réglage du capteur (INT , G_{sk} , G_{FID} , et Gain) impactent à la fois le contraste et la luminosité de l'image. Définir les réglages pour exploiter au mieux la dynamique du capteur s'avère donc délicat, d'autant plus que l'intensité lumineuse perçue varie en fonction de la longueur d'onde d'illumination.

En effet, les variabilités de réponse du bolomètre et de puissance d'émission du MIRcat, ainsi que la forte absorbance des échantillons à certaines longueurs d'ondes, entraînent d'importantes variations dans l'intensité et l'amplitude du signal (voir Figure 31 page 47, et Figure 45 page 59). Deux solutions ont été envisagées pour conserver une luminosité constante d'une longueur d'onde à l'autre :

- Soit ajuster l'intensité du laser pour garantir une puissance constante sur le capteur ;
- Soit laisser le laser à puissance maximale et jouer sur les paramètres du capteur pour ajuster la luminosité perçue à chaque longueur d'onde. Ces paramètres sont toutefois constants d'une acquisition à l'autre.

Si la première option est théoriquement plus rigoureuse, puisqu'elle permettrait de comparer l'absorbance des colonies d'une longueur d'onde à l'autre, elle est en pratique sous-optimale. En effet, les échantillons laissant passer très peu de signal à certaines longueurs d'ondes, ils demandent en conséquence des réglages avec un niveau de bruit supérieur (voir Figure 45 page 59). Diminuer l'intensité d'émission à toutes les longueurs d'ondes pour arriver à un niveau comparable impacterait négativement le ratio signal/bruit. Cette idée a donc été abandonnée au profit de la seconde option qui, même si elle interdit toute comparaison entre deux images acquises à des longueurs d'ondes différentes, garantit la meilleure qualité de signal possible.

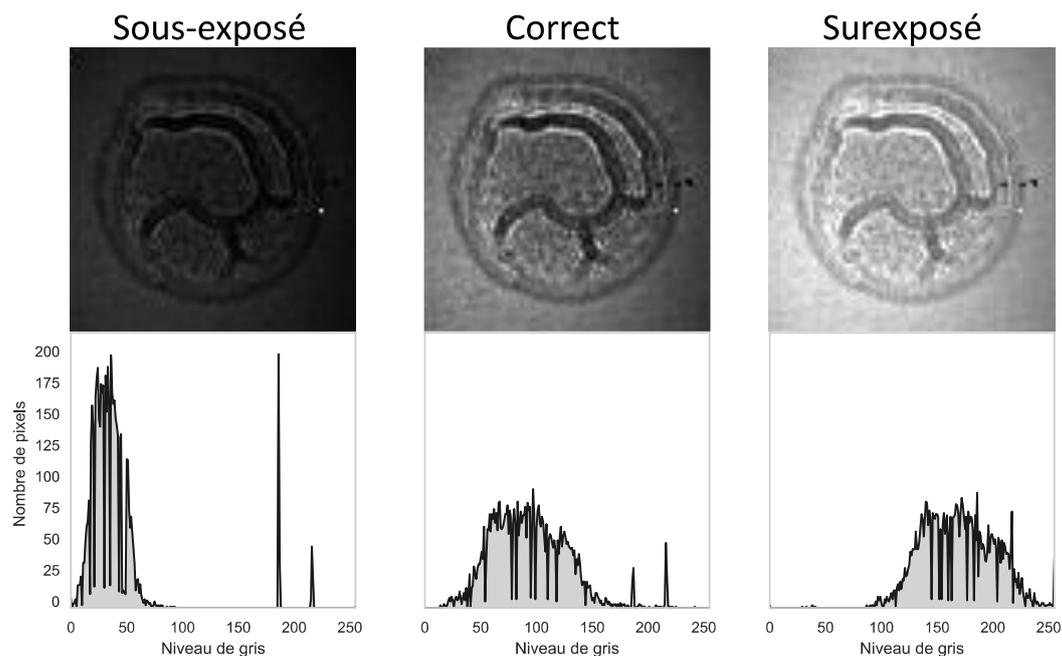


Figure 42. Histogramme et exposition d'image. La même colonie de *E. cloacae* (24 h d'incubation, milieu COS) a été imagée à 1800 cm^{-1} avec différents réglages de capteur. L'histogramme sous chaque image représente la distribution des pixels selon les différents niveaux de gris (de 0 à 255). Un décentrage de l'histogramme vers les faibles niveaux de gris (« basses lumières ») indique une image sous-exposée, et inversement. Notons ici que l'image associée à une exposition « correcte » est légèrement décentrée vers les basses lumières. Ce réglage volontaire évite la saturation du capteur en cas d'effet lentille de la colonie. Chaque image représente un champ optique de 2.73 mm de côté. Les images originales sont enregistrées en 14 bits (16384 niveaux de gris), mais sont ici présentées en 8 bits pour des raisons pratiques (255 niveaux de gris).

Les réglages des paramètres à chaque longueur d'onde ont été déterminé manuellement et sont résumés en Annexe B (p.145). Les valeurs sont définies pour garantir :

- Une intensité à 0 lorsque le laser est éteint ;
- Une utilisation maximale de la dynamique du capteur, c'est-à-dire s'assurer que l'histogramme d'intensité de l'image suive une distribution gaussienne couvrant au maximum la gamme de niveaux de gris disponible (Figure 42 : centre). Cette distribution n'a pas nécessairement à être centrée mais doit éviter de saturer le capteur.

Seuls G_{sk} et le temps d'intégration ont été réglés ici, les deux autres paramètres étant fixés pour garantir un meilleur ratio signal/bruit. Toutefois, régler manuellement ces paramètres à chaque longueur d'onde et pour chaque acquisition est à la fois long et fastidieux. Pour accélérer les acquisitions et éviter toute erreur de la part de l'utilisateur, les opérations du capteur ont été automatisées.

II.2.5. Routines de contrôle Python

En pratique, l'acquisition d'une pile d'image multispectrale implique une série d'opérations simples qui peut être décomposée de la sorte :

1. L'échantillon, placé au-dessus du capteur, est déplacé grâce à la platine deux axes pour centrer une zone d'intérêt dans le champ optique ;
2. Les deux paramètres non-fixes du bolomètre sont ajustés pour l'acquisition à une première longueur d'onde ;
3. La source laser est réglée à cette même longueur d'onde et à sa puissance de fonctionnement maximum ;
4. Le laser est allumé ;
5. Une pause de trois secondes laisse à la source lumineuse le temps de se stabiliser en puissance ;
6. Le capteur enregistre l'image (temps d'intégration : 20 ms) ;
7. Le laser est éteint ;
8. Les opérations 2 à 7 sont répétées pour chaque longueur d'onde d'intérêt. Au total, l'échantillon est donc irradié pendant 3 secondes à chaque longueur d'onde.

Pour simplifier les acquisitions, la coordination entre la platine, le capteur et le MIRcat est assurée par un programme écrit en Python 3.8. Celui-ci sert d'interface avec l'utilisateur et appelle des fonctions fournies par les fabricants pour communiquer avec les différents instruments. Ces fonctions, regroupées sous le nom de kit de développement logiciel (SDK, pour *software development kit*), sont spécifiques à chaque outil et généralement conçues pour être contrôlées via un code en C++. La librairie de fonctions Ctypes a donc été utilisée pour assurer la « traduction » entre le script Python et les différents SDK, tandis que la librairie Tkinter a servi à mettre en place une interface utilisateur (Figure 43).

Cette interface permet à l'utilisateur de lancer une acquisition, mais également d'entrer un certain nombre de métadonnées pour identifier l'expérience, de suivre les acquisitions en cours et de contrôler le laser.

L'interface présentée en Figure 43 a été utilisée tout au long de ces travaux, mais aussi dans le cadre du projet Carnot SPIRIT, où le système et les routines développées ont servi de base pour l'imagerie multispectrale de tissus cancéreux. La platine motorisée a également été automatisée pour ce second projet et intégrée aux routines de contrôle. Dans le cadre de cette thèse, nous

nous sommes toutefois cantonnés à un positionnement manuel. En effet, les colonies étudiées étant dispersées sur toute la membrane, le scan systématique de toute la surface de l'échantillon n'apportait pas plus d'information qu'une sélection manuelle des zones d'intérêt, mais nécessitait des temps d'acquisition beaucoup plus longs (plusieurs heures contre quelques minutes pour un échantillon complet).

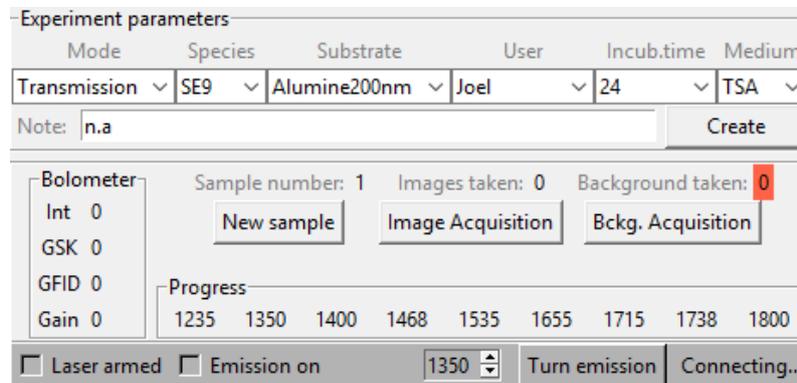


Figure 43. Interface graphique du programme d'acquisition, créée via le module Tkinter.

II.3. Membranes

II.3.1. Absorbance de l'eau dans l'infrarouge moyen et solutions envisagées

Le principal désavantage de la spectrométrie infrarouge pour la caractérisation d'objets biologiques est la forte absorbance de l'eau. Plus précisément, 100 μm d'eau suffisent pour atteindre une absorbance de 1, soit un facteur 10 entre l'intensité reçue et l'intensité transmise (Figure 45). Cette absorbance limite fortement les possibilités d'analyse d'échantillons biologiques, généralement riches en eau. Dans le cas de l'identification de colonies, une culture sur un milieu solide s'effectue classiquement avec une gélose de 5 mm d'épaisseur et composée à 80 % d'eau, à laquelle s'ajoute le plastique de la boîte de Petri, lui aussi fortement absorbant. Les acquisitions ne peuvent donc se faire directement sur boîte de Petri.

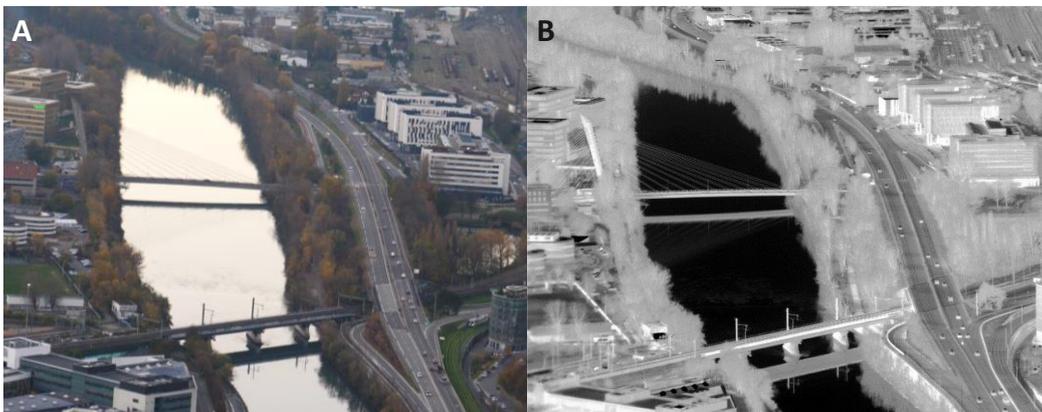


Figure 44. Mise en évidence de l'absorbance de l'eau dans l'infrarouge par une comparaison *in situ* (gamme de longueurs d'onde : 8-14 μm). A : photographie dans le visible du pont d'Oxford à Grenoble. B : imagerie dans l'infrarouge. La réflexion spéculaire est toujours importante (comme visible au niveau du reflet des ponts), mais la réflexion diffuse est quasiment inexistante. Crédits photos : Lynred.

Pour parer à ce problème, la solution la plus commune consiste en un report des colonies depuis le milieu de culture vers un support transparent dans l'infrarouge comme une lame de microscopie en CaF₂. Ce transfert peut s'effectuer via un outil de report spécial (Lasch et al. 2018), mais altère tout de même la morphologie et demande un repiquage colonie par colonie. Cette option n'est donc pas idéale dans l'optique d'une automatisation du laboratoire.

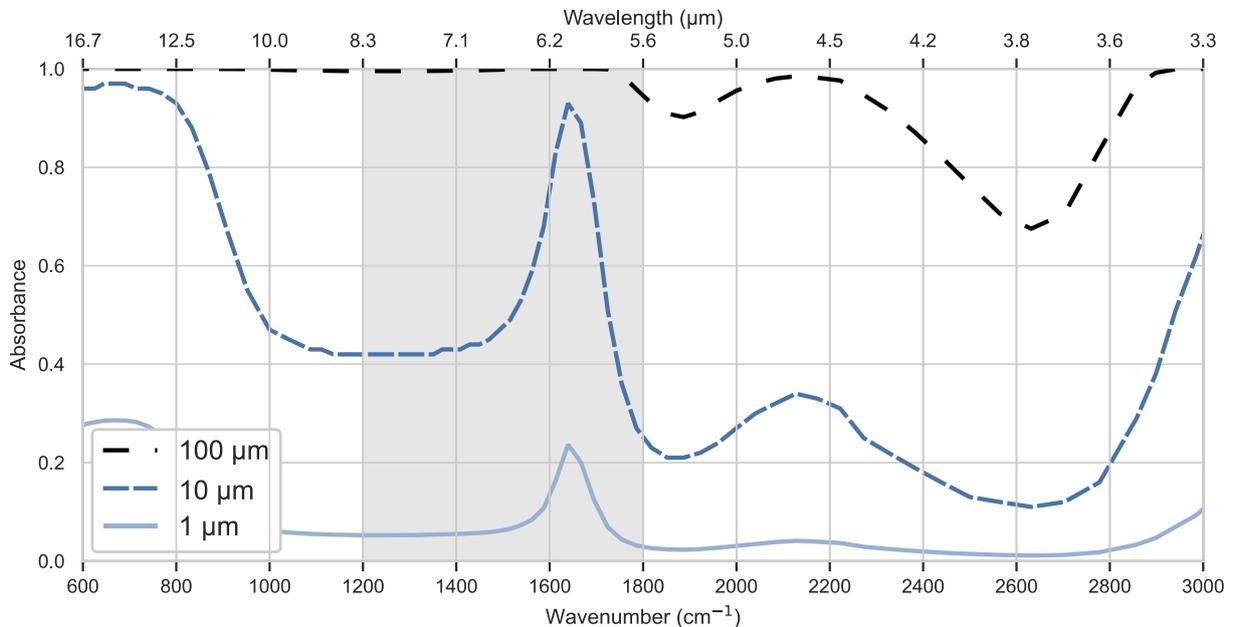


Figure 45. Spectre d'absorbance de l'eau dans l'infrarouge moyen en fonction de l'épaisseur. Données spectrales tirées de *refractiveindex.info*. Notre gamme d'intérêt dans le cadre de cette thèse est surlignée en gris.

Compte tenu de la puissance des sources QCLs, traverser 100 à 200 μm d'eau reste toutefois envisageable. Nous pourrions donc théoriquement travailler sur une fine couche de gélose déposée sur un matériau transparent dans l'infrarouge, mais des tests préliminaires sur lame de silicium ont fait ressortir plusieurs défauts. Tous les tests discutés ci-dessous ont été réalisés en coulant un volume de milieu TSA (Tryptose Soy Agar) de 22.5 μL dans une enceinte fermée de 225 mm² (gene frame), pour atteindre une épaisseur de gélose de 100 μm.

Tout d'abord, la finesse de la gélose expose à un risque de séchage pendant la durée d'incubation. Le montage présenté en Figure 46 : A a donc été proposé pour créer une enceinte humide, ce qui a effectivement empêché le séchage complet de la gélose au cours des 24 h traditionnelles d'incubation. La gélose a étéensemencée par dépôt de 20 μL d'une suspension *E. coli* (EC10, voir Figure 64 page 80), préparée à partir d'une préculture de 24 h et diluée jusqu'à une concentration de 10³ unités formant colonie par millilitres (CFU/mL⁻¹). La formation de colonies bactériennes est alors observée (Figure 46 : B).

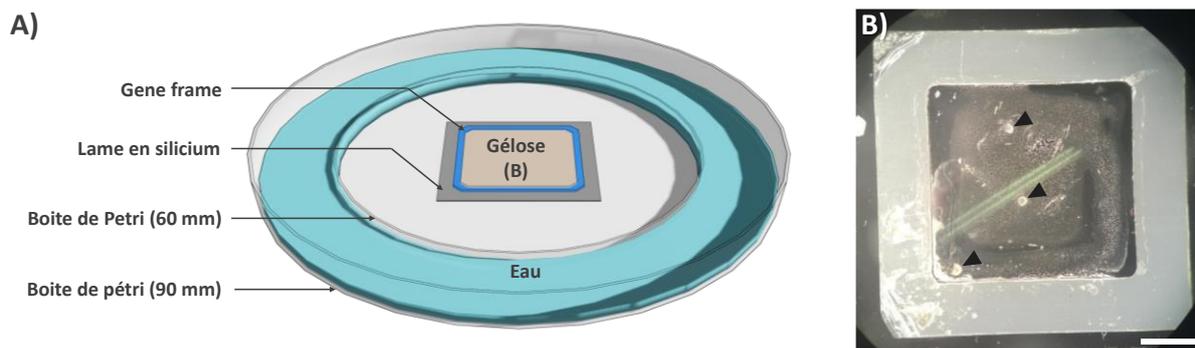


Figure 46. Culture microbienne sur silicium et gélose fine. A : Enceinte de culture anti-assèchement pour mini boîte de Pétri. B : photographie à la loupe binoculaire d'une mini boîte de Pétri sur silicium avec une gélose de 150 μm d'épaisseur, après 24 h d'incubation. Les deux bandes vertes sont des aberrations optiques liées à l'acquisition d'image, les flèches noires marquent les emplacements de colonies bactériennes, tandis que le « grain » de la gélose est constitué de bulles d'air (barre d'échelle : 15 mm).

Cependant, les volumes de gélose coulés sont si faibles que le gel polymérise immédiatement au contact du silicium, et ce avant même que la totalité du volume ait pu être coulé. La gélose obtenue est donc irrégulière, ne couvre pas tout la surface et est fortement altérée par la présence de bulles (Figure 46, milieu). Plusieurs solutions de préchauffage du silicium et de refroidissement lent de la gélose ont été testées, sans jamais aboutir à une qualité de gélose satisfaisante. Si l'imagerie infrarouge est effectivement possible à travers le milieu de culture ainsi coulé, les irrégularités de surface rendent les images infrarouges inexploitable, comme visible ci-dessous en Figure 47.

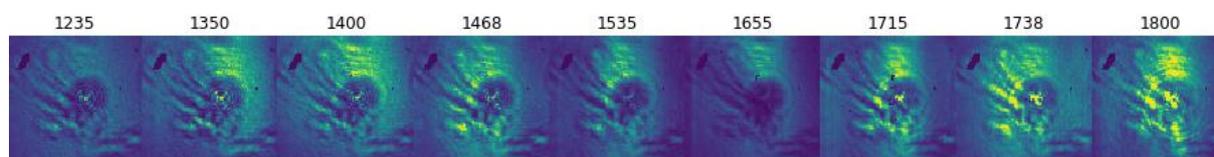


Figure 47. Séquences d'images dans l'infrarouge moyen d'une colonie de E. coli cultivée sur gélose fine. L'observation de la colonie (disque sombre au centre des images) est rendue impossible par l'inhomogénéité de la gélose (formes irrégulières distribuées sur toute la moitié inférieure droite des images). Les nombres d'ondes d'illumination sont indiqués en cm^{-1} pour chaque image. Celles-ci mesurent 2.7 mm de côté.

Il a été envisagé d'étaler la gélose par une rotation rapide du support en silicium grâce à un appareil dédié, appelé spin-coater, mais le protocole devenait complexe à mettre en place. En conséquence, l'idée d'une gélose fine a été abandonnée au profit d'une autre solution inspirée par des travaux préliminaires.

II.3.2. Culture sur membrane d'alumine

Plusieurs articles ainsi qu'un stage en partenariat entre le CEA et bioMérieux ont montré qu'il était possible de cultiver des microorganismes sur des membranes nanoporeuses en alumine (Ingham et al. 2007, 2008; Bisceglia 2010). Ces membranes, disponibles commercialement sous le nom d'AnodiscTM (Whatman), présentent de nombreux atouts en plus de leur très grande stabilité chimique. À la fois biocompatibles, transparentes aux infrarouges (voir Figure 49), hydrophiles et à la porosité traversante, elles laissent eau et nutriments diffuser d'une face à l'autre par capillarité. Déposées à la surface d'un milieu de culture, elles peuvent être ensemencées par des techniques d'étalement traditionnelles et servir de support de croissance. La culture de microorganismes sur membrane rallonge légèrement le temps de génération (20 %

plus long que sur gélose selon les articles d'Ingham, 5 % selon le stage d'Emilie Bisceglia) mais mène bien à la formation de colonies d'aspect normal (Figure 48).

Remarque 8. Même si une observation à l'œil ou à la loupe binoculaire ne permet pas de distinguer les colonies cultivées sur membrane de celles cultivées directement sur agar, il n'est pas exclu que ce support ait un impact sur leur morphologie. Toutefois, ces éventuelles altérations sont considérées comme reproductibles tant que le protocole de culture ne change pas. Nous ne comparerons donc entre elles que des colonies cultivées sur le même type de membrane, le même milieu, et préparées avec le même protocole (voir section II.4.1, page 64).

Les colonies cultivées ainsi croissent à la surface d'un support rigide, et non directement sur le milieu de culture. La membrane support peut alors être séparée de la gélose sans perturber les colonies (den Hertog et al. 2010), ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour l'imagerie infrarouge. L'absence de perturbation permettrait également, si l'analyse infrarouge n'est pas destructive, de transférer les colonies sur un autre milieu de culture pour tester leur résistance à un antibiotique donné, comme discuté dans l'article de den Hertog.

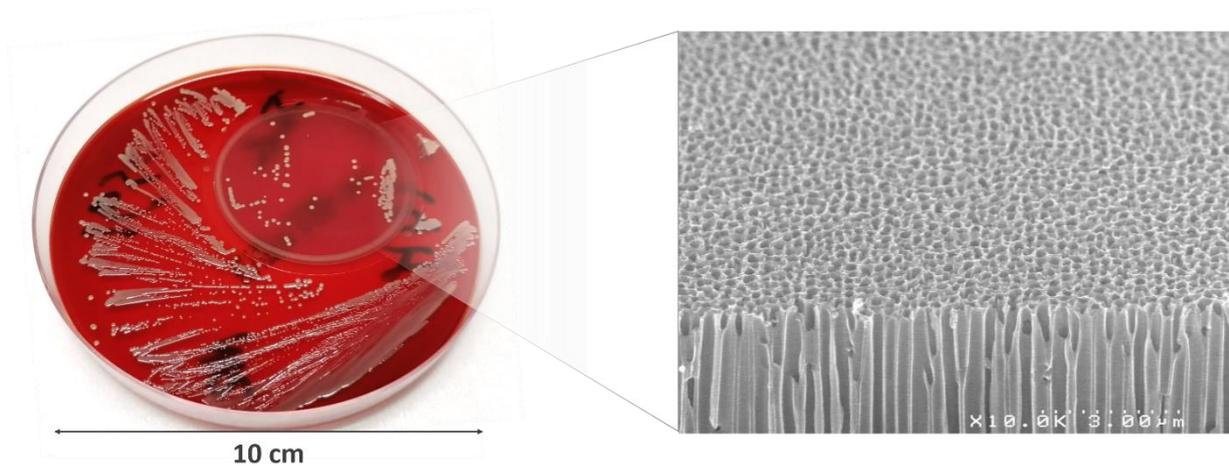


Figure 48. Culture microbiennes et membrane d'alumine. Gauche : culture de *E. coli* sur milieu COS, la membrane est visible sur la partie supérieure droite de la boîte. Droite : image MEB en coupe oblique de la surface d'une membrane d'alumine commerciale (ici avec un calibre de pore de 20 nm).

Les membranes utilisées dans le cadre de cette thèse sont constituées d'un disque d'oxyde d'aluminium (alumine) de 47 mm de diamètre et 60 μm d'épaisseur, rendu poreux par un traitement électrochimique (Anodisc®, Whatmann). Ce disque d'alumine est rigidifié grâce à une couronne de polypropylène en périphérie. Trois types de membranes ont été testées et sont ici désignées par le calibre de leurs pores : 20, 100 et 200 nm. Ces trois calibres permettent une croissance microbienne normale, mais, après analyse au FTIR, les membranes de 200 nm se sont avérées les plus transparentes aux infrarouges (Figure 49). Sauf mention contraire, elles seront donc utilisées dans toutes les expériences ultérieures.

Malgré leurs avantages, les membranes d'alumines font également naître de nouvelles contraintes. Tout d'abord, et comme présenté en Figure 49, les Anodiscs absorbent complètement le rayonnement infrarouge en-dessous de 1220 cm^{-1} (au-dessus de $8.1\ \mu\text{m}$), ce qui bloque l'accès à toutes les longueurs d'ondes d'intérêt entre 900 et 1200 cm^{-1} , dont plusieurs modes vibrationnels des liaisons impliquées dans les acides nucléiques. En pratique, les acquisitions sont possibles jusqu'à 1235 cm^{-1} mais nécessitent d'augmenter le temps d'intégration du capteur.

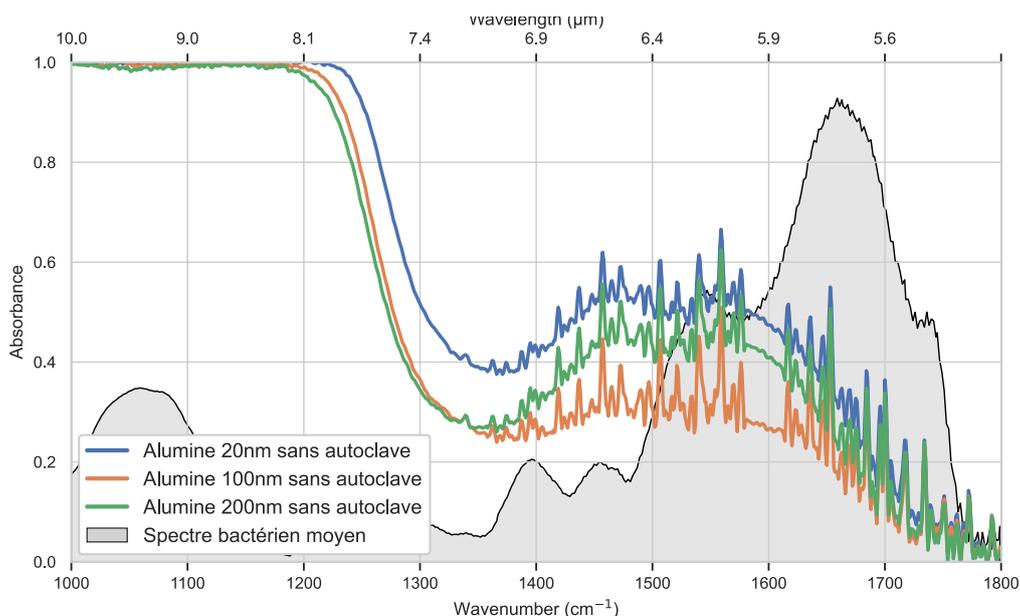


Figure 49. Spectres FTIR des membranes d'alumine à différents calibres de pores. Un spectre microbien moyen est présenté à des fins de référence. Celui-ci est calculé à partir des espèces présentées en section II.1.2 (p.42).

D'autres matériaux poreux, potentiellement plus transparents, ont donc été testés en remplacement de l'alumine. Citons parmi eux le polycarbonate (Remarque 9), mais également le silicium poreux sur lequel des développements technologiques sont encore en cours (voir Perspectives, section IV.2, page 125). Toutes ces alternatives se sont avérées moins intéressantes que l'alumine, que ce soit à cause de la fenêtre de transparence, des propriétés mécaniques ou encore d'un manque de maturité de la technologie.

Remarque 9. Des membranes en polycarbonate poreux ont été testées comme support de croissance (Whatmann, Cyclopore®, calibre 200 nm, 47 mm de diamètre). Toutefois, si ce matériau est plus transparent que l'alumine dans la gamme 1350 – 1800 cm^{-1} (Figure 50), il est opaque à 1235 cm^{-1} . Ceci couplé à une absence de rigidité rendant les acquisitions difficiles en font un moins bon candidat que l'alumine poreuse pour la croissance microbienne.

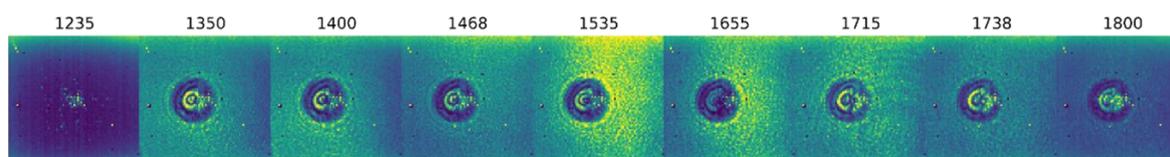


Figure 50. Hypercube acquis sur membrane de polycarbonate (*S. epidermidis*, milieu COS, 24h de culture). Nombres d'ondes en cm^{-1} . On observe sur l'image à 1715 cm^{-1} des franges d'interférences dues au gondolement de la membrane. Ces variations de surface ne sont pas reproductibles et gênent donc les acquisitions. Précisons également que, sur une vingtaine de colonies observées, celle-ci est la seule qui ne se soit pas déformée lors du décollement de la membrane.

Le fait de changer le protocole de culture en boîte de Petri est également une entrave à son acceptation commerciale, à laquelle s'ajoute un coût non négligeable de 5€ par membrane. Pour ces deux raisons, l'application de cette méthode d'identification serait à réserver aux protocoles nécessitant d'ores et déjà une membrane de filtration, ce qui sera discuté plus en détail en section IV.4.2 (p.133). Enfin, ce nouveau support utilisé à la fois pour la culture et l'imagerie, soulève de nouvelles questions d'ordre pratique.

II.3.3. Considérations pratiques pour les acquisitions sur membranes d'alumine

Lorsque la membrane est déposée sur le milieu de culture, les pores se gorgent immédiatement d'eau, ce qui augmente son absorbance dans l'infrarouge. Une fois décollée de la boîte de Petri, l'évaporation de l'eau présente dans les pores ramène progressivement l'absorbance à un niveau normal. Pour déterminer le temps nécessaire au séchage complet, une membrane de 200 nm a été déposée sur milieu COS et incubée pendant 24 h à 36.5°C. Après retrait, l'absorbance de la membrane a été suivie en spectroscopie FTIR pendant quinze minutes, à raison d'un spectre par minute (Figure 51). Il apparaît alors qu'un séchage de dix minutes à l'air libre suffit pour retrouver le spectre de l'alumine seule.

Cependant, si ce séchage est nécessaire pour les acquisitions, il pourrait aussi s'avérer délétère pour les colonies présentes à la surface de la membrane. Des problèmes d'altération de la morphologie comme des craquements ont été observés (Figure 52), mais il est aussi arrivé que des colonies se décollent de la membrane, voire éclatent sous l'effet du séchage. Ces phénomènes de dessiccation étaient en grande partie liés au protocole d'étalement sur la membrane et au degré d'hygrométrie de la pièce (voir détail en Annexe A, page 138). L'amélioration du protocole a mis fin aux altérations visibles, mais après analyse, il apparaît que les variations atmosphériques du laboratoire ont encore probablement un impact sur le séchage des colonies (voir Perspectives : IV.1.3, page 122).

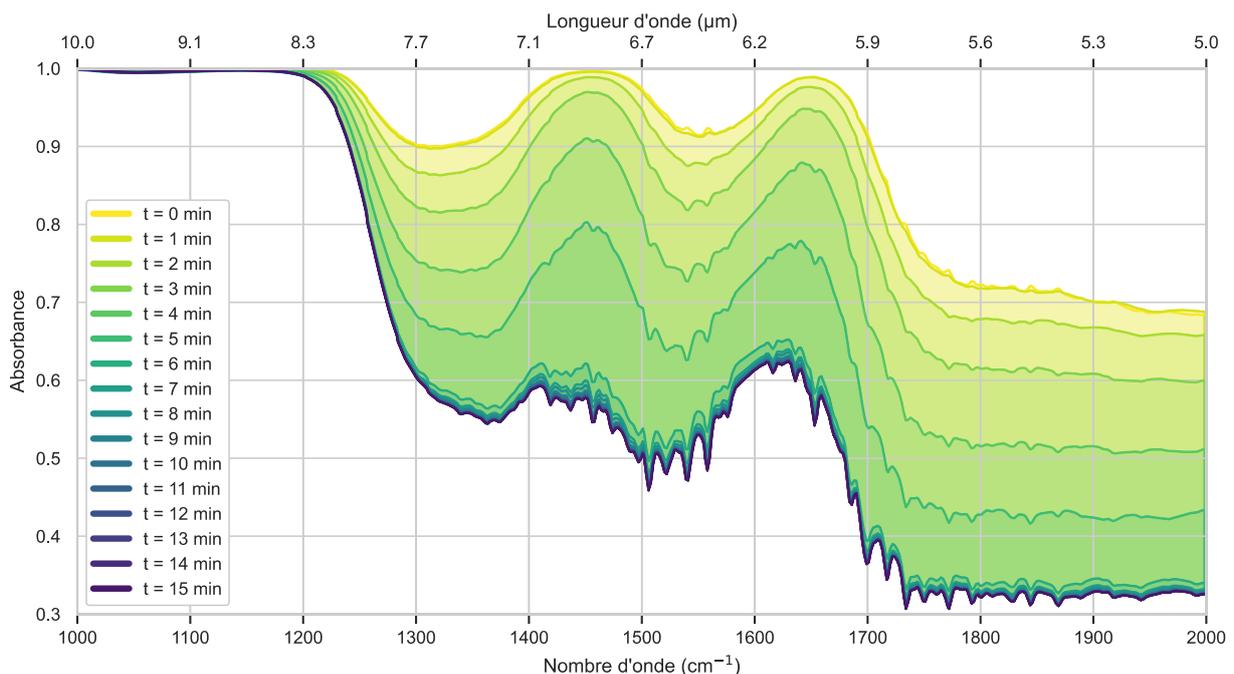


Figure 51. Évolution du spectre FTIR d'une membrane d'alumine 200 nm incubée 24 h sur gélose en fonction de la durée de séchage.

Une autre question soulevée par l'utilisation de la membrane réside dans l'orientation de celle-ci lors de l'imagerie : face ensemencée tournée soit vers le laser, soit vers l'imageur. Les deux méthodes ont été testées sur une même colonie de *E. cloacae* cultivée 24h sur membrane d'alumine, d'après le protocole général décrit en section suivante. Les résultats en imagerie multispectrale infrarouge, présentés en Figure 52, font ressortir plusieurs remarques intéressantes. Tout d'abord, les deux méthodes fournissent des images sur lesquelles l'objet est clairement identifiable, tout comme les détails de sa surface. L'une comme l'autre sont donc envisageables pour les acquisitions de routine.

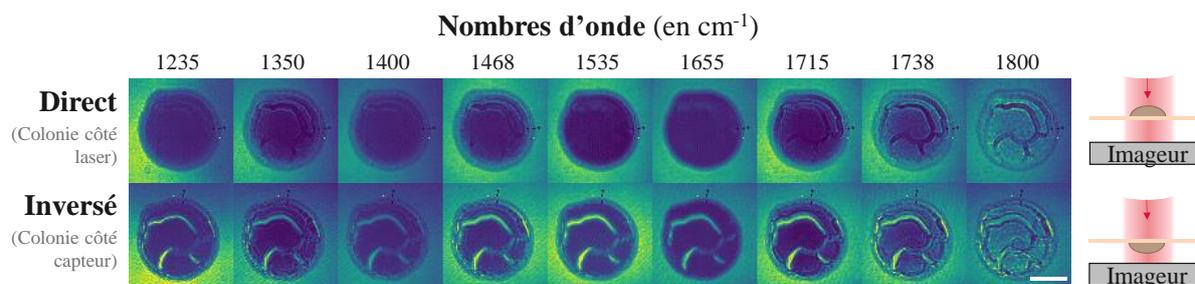


Figure 52. Imagerie multispectrale infrarouge sur une même colonie de *E. cloacae* selon le positionnement de la membrane face au capteur. Deux configurations sont possibles : soit les colonies sont placées face au laser, soit la membrane est retournée pour placer les objets face au capteur comme illustré par les schémas à droite. La colonie ici montrée a été exposée à un séchage rapide (séchage au laser), ce qui aboutit à l'apparition de formes de dessiccation, ici : des craquellements. Elle n'est toutefois pas représentative des objets imagés par la suite, et est simplement présentée à des fins d'illustration. Des colonies non-craquelées seront décrites en Figure 61 (p.74).

La principale différence entre les deux séries d'images provient des craquelures de la colonie : sombres sur l'image « directe », elles deviennent plus claires que le reste de la colonie lorsque cette dernière est placée au plus proche du capteur. Ce phénomène pourrait provenir d'un effet des interférences, de la différence d'éloignement colonie-capteur ou encore de diffraction liée à la géométrie des bords des craquelures, mais l'origine exacte n'a pas été investiguée.

Ainsi, il y a peut-être plus de détails à exploiter sur les images prises en configuration « inversée », lorsque la colonie est placée directement face au capteur. En pratique, placer le côté ensemencé de la membrane au plus près du capteur et en contact avec le support d'échantillon expose à des risques de contamination de la surface. Le banc de mesure étant utilisé pour d'autres expériences en parallèle de cette thèse, c'est donc la configuration « directe », colonie face au laser, qui a finalement été privilégiée.

II.4. Protocole et non-destructivité de la méthode

II.4.1. Protocole

Sauf indication contraire, toutes les acquisitions multispectrales présentées dans ce manuscrit sont réalisées à partir du même protocole. Certains paramètres comme le temps d'incubation, le milieu de culture ou le support de croissance pourront parfois être modifiés selon le but de l'expérience, mais les étapes du protocole restent celles que nous décrivons à présent.

Les cultures de microorganismes sont préparées par étalement à l'öse sur milieu COS (Columbia blood sheep agar, 5 %_{v/v}, VWR) à partir d'une culture préliminaire de 24h. Une membrane d'alumine Anodisc de 47 mm de diamètre et 60 μm d'épaisseur a préalablement été déposée à la surface du milieu (Figure 53, 1). Les premières stries de dépôt se font directement sur le milieu de culture (entre 1 et 4 selon l'espèce), tandis que les dernières sont étalées sur la membrane (entre 1 et 2 selon l'espèce), de façon à répartir les cellules sur la surface et obtenir des colonies isolées (Figure 53, 2). La boîte de Petri est ensuite incubée à 36.5°C pendant 24 h. Après incubation, la membrane est décollée de la boîte de Petri et déposée sur le support d'échantillon directement au-dessus du capteur et laissée à sécher pendant 10 minutes (Figure 53, 4 et 5). Une fois l'eau contenue dans les pores évaporée, l'échantillon est scanné pour

localiser les colonies d'intérêt. Celles-ci sont ensuite illuminées à une série de neuf longueurs d'ondes, et une image est enregistrée à chaque fois (Figure 53, 6). L'acquisition des neuf images prend actuellement une trentaine de secondes, le facteur limitant étant la source laser qui prend environ trois secondes à se stabiliser en puissance à chaque changement de longueur d'onde. Un système spécialement conçu pour cette application pourrait s'affranchir de ce problème en utilisant des sources monochromatiques. Chaque source étant dédiée à une longueur d'onde donnée, les périodes de stabilisation du laser ne seraient plus nécessaires, ce qui accélérerait les acquisitions.

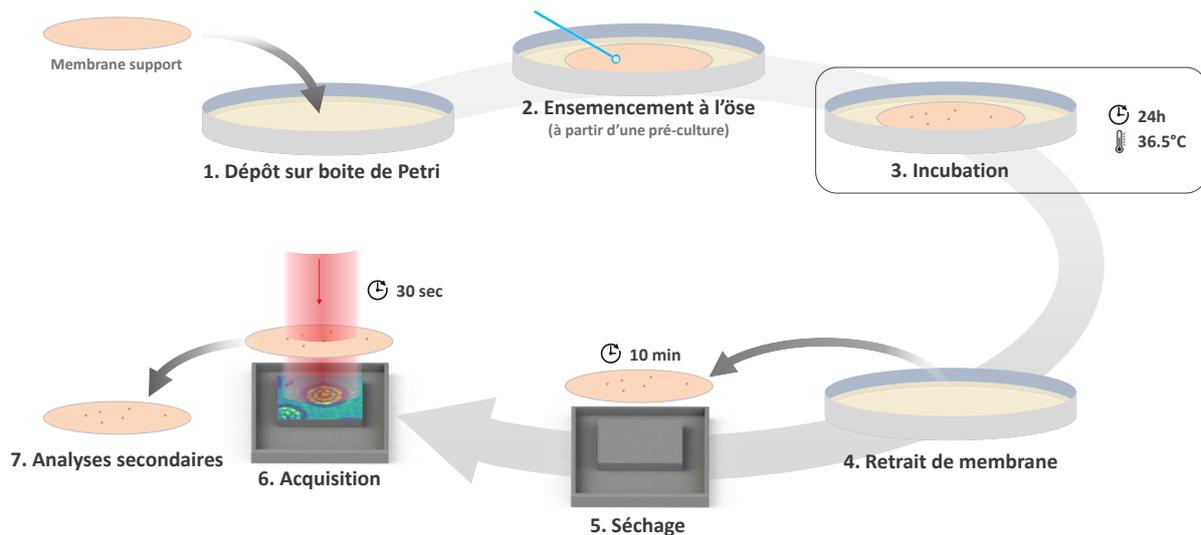


Figure 53. Récapitulatif du protocole de préparation d'échantillon

La préparation d'échantillon est ainsi sensiblement similaire à celle d'un étalement classique en boîte de Petri, exception faite de l'ajout d'une membrane poreuse. Cette membrane permet de déplacer un groupe de colonies vers le système d'analyse, et ce sans affecter leur morphotype. Toutefois, la non-destructivité de ce procédé et de l'analyse aux infrarouges qui s'en suit reste à démontrer.

II.4.2. Intérêt d'une acquisition non invasive et non destructive

L'un des arguments avancés en faveur des méthodes d'analyse optique sans marquage est leur non-destructivité. Dans le cas de l'identification, l'absence de perturbation de l'échantillon ouvre la voie à deux applications d'intérêt :

- Le suivi temporel d'une boîte de Petri, pour détecter et identifier des colonies dès les premières étapes de croissance.
- Permettre un test de susceptibilité aux antibiotiques sur une colonie préalablement analysée. Certaines boîtes de Petri ne permettent parfois la formation que de quelques colonies, que ce soit à cause d'une quantité limitée d'échantillon (biopsie), ou d'espèces microbiennes peu concentrées (cas des méningites). Dans ce contexte réaliser l'identification et l'AST sur un même échantillon peut s'avérer critique, en particulier en milieu hospitalier.

Les technologies d'identification actuellement disponibles sur le marché sont toutes destructives, que ce soit à cause de la méthode en elle-même (PCR, MALDI-TOF,

colorations...), ou de la nécessité de prélever une colonie sur le milieu de culture (FTIR). Une analyse ne perturbant pas la croissance bactérienne serait donc un argument majeur en faveur de l'imagerie dans le moyen infrarouge.

Deux étapes du protocole sont susceptibles de perturber les échantillons : le séchage de la membrane et l'exposition aux rayonnements infrarouges. Ces sources de stress hydrique, thermique et photoinduit peuvent ralentir la croissance bactérienne, détruire les cellules ou encore modifier leur réponse aux antibiotiques, ce dernier point étant particulièrement critique si l'on veut réaliser un antibiogramme sur des colonies identifiées. Les sections suivantes s'attacheront donc à discuter de l'impact des mesures sur la croissance des colonies, ainsi que sur les résultats d'un test de susceptibilité aux antibiotiques (AST).

II.4.3. Acquisitions précoces

L'un des enjeux majeurs de l'identification microbienne réside dans la réduction des délais d'obtention des résultats. Identifier une colonie dès les premières étapes de son développement permettrait de limiter la durée de croissance, et donc d'accélérer les analyses. De plus, le suivi de croissances de microorganismes est couramment utilisé pour faciliter leur identification (den Hertog et al. 2010; Maeda et al. 2017), ainsi, presque toutes les technologies d'imagerie ont été testées sur microcolonies (den Hertog et al. 2010; Bae et al. 2011; Espagnon et al. 2014; Marcoux et al. 2014). Dans ce domaine, l'imagerie multispectrale dans l'infrarouge présenterait deux avantages :

- Le grand champ rend possible un scan rapide de tout l'échantillon.
- Les informations spectrales pourraient permettre une identification, ou du moins une orientation avant même l'apparition de critères morphologiques analysables.

La possibilité de détecter des colonies plus précoces serait un argument de poids en faveur de notre méthode, à condition que la mesure ne perturbe pas la croissance microbienne pour permettre des analyses ultérieures. Pour vérifier ce dernier point, une culture de *E. cloacae* (EC8), préparée selon le protocole décrit en II.4.1, a été analysée en imagerie multispectrale infrarouge à deux temps d'incubation : 6 h et 24 h. Pour faciliter la relocalisation des champs optiques d'une analyse à l'autre, seuls deux traits d'ose ont été tracés sur la membrane. La concentration des colonies sur des zones restreintes rend leur localisation plus aisée, en sachant que des colonies isolées apparaissent toujours en marge des agrégats, comme observé en Figure 54.

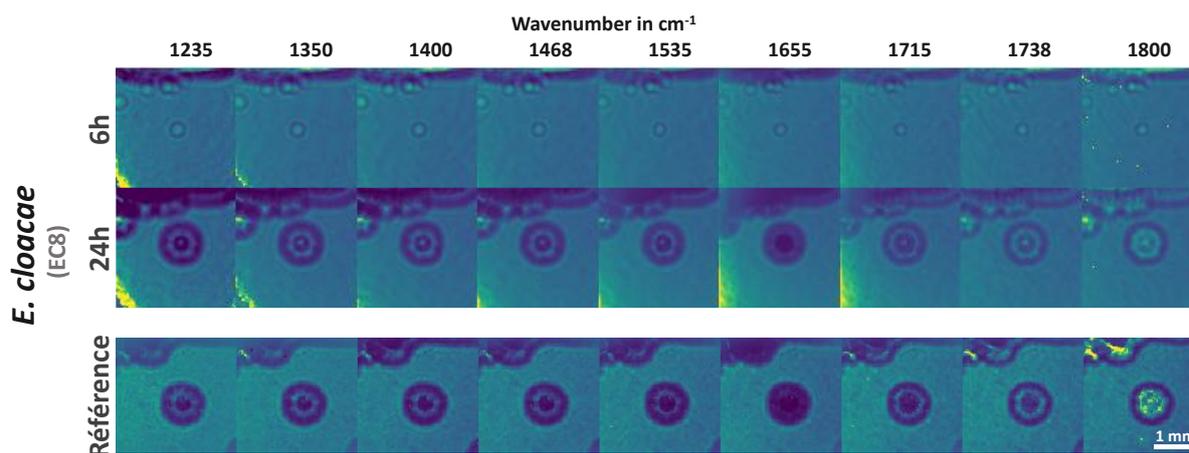


Figure 54. Images multispectrales d'une culture de *E. cloacae* observée à 6 h et 24 h d'incubation. Les deux lignes d'images supérieures présentent le même champ optique observé à deux reprises, séparées par 18 h d'incubation. Les images de référence ont été acquises sur une autre membrane non illuminée à 6 h d'incubation, et sont fournies à titre de comparaison.

Sur ce champ optique, la même colonie imagée à 24 h était déjà visible à 6 h. Même si les informations semblent trop limitées pour une identification, une détection précoce des colonies est donc possible, au moins sur certaines espèces. De plus, les images multispectrales obtenues sur cette colonie après 24 h de croissance sont sensiblement similaires à d'autres images de EC8, obtenues cette fois-ci sans cette première étape d'imagerie à 6 h. En moyenne, le rayon moyen mesuré sur 155 colonies de EC8 (voir partie III.1.2, page 79) est de 14.5 ± 2.8 pixels (soit 0.49 ± 0.09 mm), contre 15 pixels (0.51 mm) pour la colonie présentée en Figure 54.

Ce test ne constitue toutefois pas une quantification de la destructivité de la méthode. Déterminer l'impact exact de l'analyse sur les cellules passerait par la mesure du taux de décimation : mesurer combien de cellules sont tuées au bout de 5 ou 10 minutes d'exposition aux infrarouges. Cette expérience n'a toutefois pas été réalisé par manque de temps. De même, la faisabilité d'une identification à 6 h de croissance ou l'imagerie de microcolonies appartenant à d'autres espèces n'ont pas été testées. Des perspectives restent donc à explorer, mais cette première analyse indique qu'une imagerie précoce ne perturbe pas significativement la vitesse de croissance des colonies.

II.4.4. Impact d'une exposition aux infrarouges sur la concentration minimale inhibitrice

Comme évoqué en début de chapitre, la résistance d'un organisme aux antibiotiques est susceptible d'être altérée par un stress hydrique, thermique ou photoinduit. Si des conditions stressantes peuvent logiquement diminuer la résistance d'un organisme aux antimicrobiens, l'inverse est également possible. En effet, une étude de 2020 suggère qu'un mécanisme de défense contre le stress thermique promeut également la résistance à certains antibiotiques, en particulier la gentamicine et la ciprofloxacine (Ranganathan et al. 2020). Dans ces conditions, détecter un organisme résistant aux antibiotiques après analyse par imagerie infrarouge pourrait s'avérer difficile.

Pour vérifier l'impact de la mesure sur les mécanismes de résistance, nous nous intéresserons ici à la concentration minimale inhibitrice (CMI), définie comme la concentration minimale d'antibiotique inhibant la croissance chez un isolat bactérien donné. La méthode de référence

pour la mesure de la CMI est la méthode de dilution en milieu liquide. Des méthodes de mesure sur milieu gélosé existent également, soit à l'aide de disques chargés en antibiotiques, soit de bandelettes portant un gradient de concentration d'antibiotiques. C'est cette dernière approche qui sera présentée ici.

L'expérience suivante consistera donc à vérifier l'impact d'une analyse par imagerie multispectrale infrarouge sur les valeurs de CMI d'une souche de référence. Nous avons pour cela choisi la souche de *E. coli* ATCC 25922, ici nommée EC10. Les valeurs de CMI de cette souche sont consignées par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et sont disponibles dans le rapport de recommandations du comité, ce qui permet la comparaison avec nos résultats (Jehl et al. 2021).

Une culture de EC10 est donc tout d'abord préparée comme décrit en II.4.1. La membrane est incubée pendant 24h, puis retirée du milieu et séchée pendant 10 minutes. Seules trois colonies sont illuminées comme prévu dans le protocole d'analyse. Les autres ne sont pas exposées au laser. Sont ensuite prélevées, comme illustré ci-contre en Figure 55 :

1. Trois colonies étalées sur la gélose à côté de la membrane, ni séchées, ni exposées au laser comme témoin négatif.
2. Trois colonies présentes sur la membrane mais non exposées au laser, qui permettent de tester l'impact du séchage seul.
3. Les trois colonies illuminées, séchées et exposées au laser.



Figure 55. Photographie d'une boîte de Petri telle qu'utilisée pour l'évaluation de l'impact de l'analyse sur la CMI. Les numéros des trois groupes de colonies se rapportent à la description ci-contre.

Pour chaque échantillon, les trois colonies sont resuspendues ensemble en milieu de suspension (*Suspension medium*, bioMérieux REF. 20150), puis diluées jusqu'à 0.5 McFarland (échelle de mesure de la densité optique (McFarland 1907)). Des étalements en tapis bactériens sur gélose MHB (Müller-Hinton broth, bioMérieux) sont ensuite préparés selon le protocole d'AST du *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Matuschek et al. 2014). La CMI pour un antibiotique donné est déterminée grâce à une bandelette e-test. Cette bande contenant un gradient de concentration en antibiotique est déposée sur un tapis bactérien comme présenté en Figure 56. La lecture de la zone d'inhibition permet de déterminer la CMI.

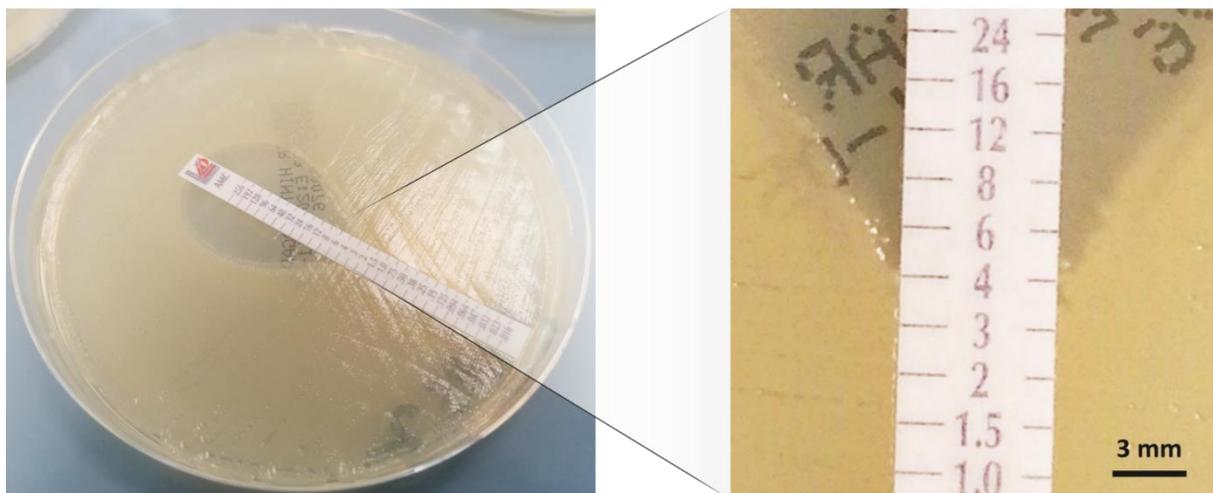


Figure 56. Présentation d'une bandelette e-test sur milieu MHB, après 24h de culture. L'image de gauche montre la bandelette en place sur la boîte de Petri. Le tapi bactérien est visible en jaune opaque, avec l'ampoule d'inhibition présente au sommet de la bande. L'agrandissement de droite présente la base de l'ampoule, permettant de déterminer la valeur de CMI.

Six antibiotiques sont testés contre chaque échantillon microbien : l'Ampicilline (Thermofischer scientifique, référence 92003), l'Amoxicilline-acide clavulanique (92180), l'Amoxicilline (92021), la Ciprofloxacine (92045), la Gentamicine (92009), et l'Imipénème (92054). Après 24 h de croissance, les CMI sont consignées en Figure 57. Si des variations existent entre colonies stressées et non stressées, aucune tendance globale ne se dégage des mesures. Deux explications sont alors possibles, soit la mesure n'a pas d'impact significatif sur les cellules, soit des stress sont effectivement induits, mais leur impact n'est pas le même sur les mécanismes de résistance aux différents antibiotiques. Compte tenu du petit nombre de mesures, il n'est pas possible d'apporter une réponse statistique en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses.

Toutefois, les valeurs de CMI relevées restent toutes dans les limites de tolérance préconisées par le CA-SFM. Si la mesure a un impact sur les mécanismes de résistance, elle n'a donc pas modifié significativement la CMI. De plus, la méthode d'étalement préconisée par le CA-SFM ne produit pas toujours des étalements parfaitement homogènes, ce qui induit une certaine variabilité expérimentale, à ajouter à la variabilité biologique.

En conclusion, s'il n'est donc pas possible d'exclure une altération des mécanismes de résistance via un stress hydrique ou radiatif, il apparaît toutefois que la mesure en imagerie infrarouge n'impacte pas significativement les résultats d'un test de susceptibilité aux antibiotiques. Le protocole d'imagerie infrarouge proposé semble donc bel et bien non-destructif, et devrait permettre de réutiliser et remettre en culture un même échantillon pour plusieurs volets d'analyse.

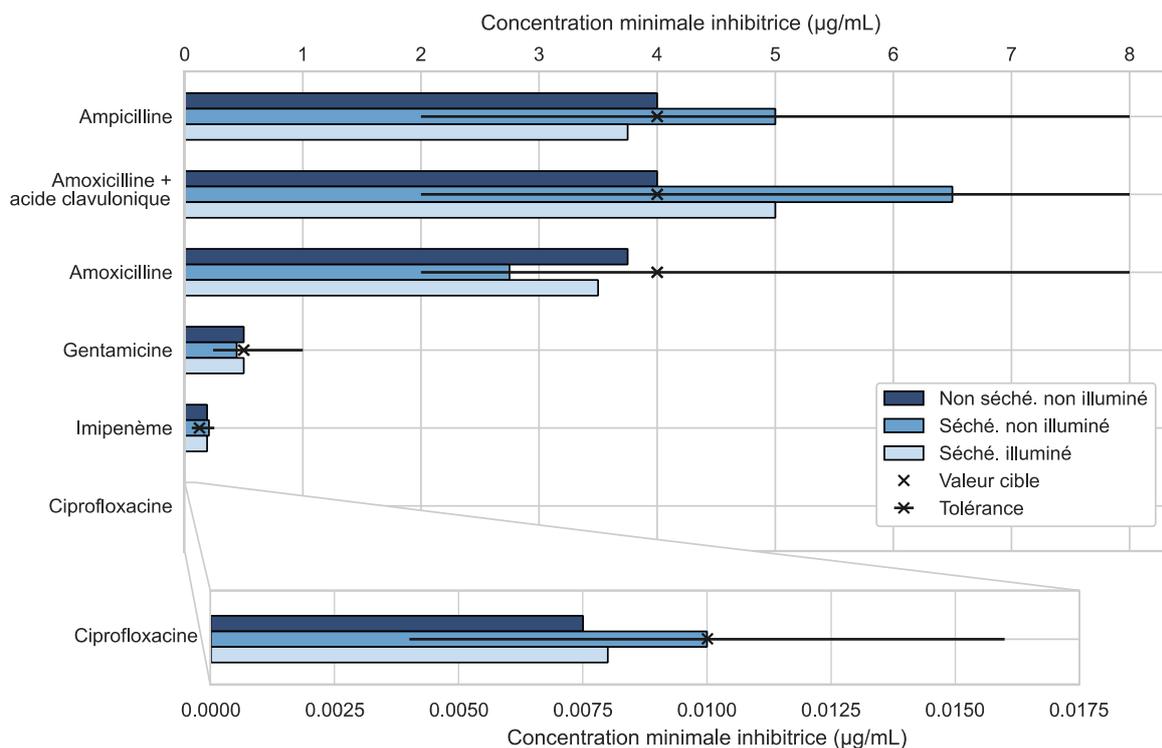


Figure 57. Mesures de la concentration minimale inhibitrice pour six antibiotiques sur EC10. Les valeurs cibles et tolérances sont indiquées d'après les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Jehl et al. 2021).

II.5. Prétraitement des images

Avant de passer au traitement d'image à proprement parler, il reste une dernière étape de préparation des données. En effet, comme évoqué en section II.2.3 (p.50), les images brutes obtenues en sortie de capteur souffrent d'un certain nombre de défauts qui empêchent leur exploitation. Les étapes du prétraitement visent donc à corriger les images, mais également à sélectionner la région d'intérêt à analyser : les colonies.

Tous les protocoles décrits ci-dessous ont été implémentés en Python 3.8, via la distribution Anaconda 3. Celle-ci inclut un grand nombre de bibliothèques de fonctions pour la gestion de données (Numpy et Pandas), la mise en forme graphique (Matplotlib), le traitement d'image (skimage) et l'apprentissage automatique (SciKit Learn). Les autres bibliothèques éventuellement utilisées seront précisées à chaque étape du processus.

II.5.1. Correction des images

Plusieurs facteurs gênent l'exploitation des images brutes :

- Des défauts du capteur tels que des pixels morts ou continuellement surexposés (chauds), ou encore des différences de réponse d'une ligne de pixel à l'autre (voir Figure 40, page 54).
- Des inhomogénéités d'éclairage dues à l'aspect du spot laser, plus intense au centre que sur les bords, et ce malgré l'expanseur de faisceau et le miroir diffusant.

- Le mauvais alignement des quatre lasers composant notre source lumineuse, pouvant causer un décalage du spot laser d'une longueur d'onde à l'autre.
- L'absorbance est susceptible de varier d'une membrane d'alumine à l'autre, mais également au sein d'une même membrane (données non présentées).

Pour les corriger, deux séries d'images sont enregistrées à toutes les longueurs d'ondes décrites en II.1.2 (p.42) en plus de la pile d'images brutes. La première, appelée *offset*, est enregistrée laser éteint avec l'échantillon en place. Elle rend compte des défauts du capteur comme les pixels morts ou les halos de bords. Or, la réponse de ceux-ci change selon les réglages du capteur, ce qui est particulièrement visible entre les images à 1235 et 1350 cm^{-1} de la ligne Offset en Figure 58. Les réglages étant différent pour chaque longueur d'onde (voir section II.2.4, page 54), une image d'offset est donc enregistrée pour chaque longueur d'onde d'acquisition.

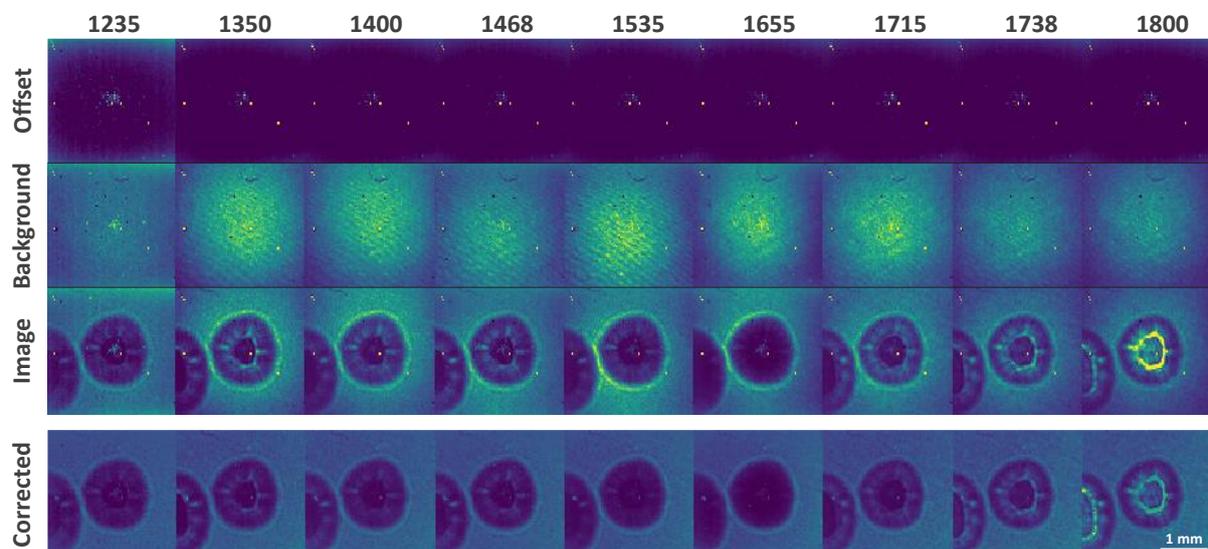


Figure 58. Exemples de piles d'images utilisées lors du prétraitement, ici présentées pour une colonie de *E. cloacae*. Les images corrigées résultent de l'opération présentée en Figure 59. Les nombres d'ondes sont indiqués en cm^{-1} .

En parallèle des images de colonies, des images de fond sont acquises sur des zones de la membrane sans microorganisme (Figure 58, background). Ce fond sert à corriger à la fois l'absorbance de la membrane et les inhomogénéités d'éclairage. Cependant, la rugosité de la membrane – liée aux pores – donne aux images un grain qui risque de perturber la correction. Des franges d'interférences peuvent également apparaître, comme entre 1350 et 1535 cm^{-1} sur la ligne Background ci-dessus, et fausser encore plus les résultats. Pour lisser ces défauts, six hypercubes sans colonies sont enregistrés et moyennés pour constituer la pile d'images de fond qui sera utilisée pour la suite des calculs.

Une fois ces données en main, la transmittance corrigée pour chaque pixel est calculée *via* la formule suivante :

$$T(i, j, \lambda) = \frac{I_{brute}(i, j, \lambda) - I_{offset}(i, j, \lambda)}{I_{background}(i, j, \lambda) - I_{offset}(i, j, \lambda)}$$

Équation 4. Calcul de la transmittance corrigée. Avec T : la transmittance, I : les différentes images, i et j : les indices x et y d'un pixel, λ : la longueur d'onde (équivalent ici à un indice en z du pixel dans la pile d'image).

Enfin, une dernière étape consiste à retirer les points aberrants (proches de zéro ou de l'infini) qui apparaissent parfois lors de l'étape de division, généralement à cause d'un pixel mort ou surexposé n'ayant pas été corrigé par l'offset. Pour cela, on calcule la différence entre la valeur de chaque pixel et la valeur médiane de son voisinage (un carré de 3 par 3 pixels). Si la différence est hors d'un écart de tolérance défini arbitrairement (entre 0.1 et 0.9), le pixel est remplacé par la valeur médiane. Ce filtre détecte et corrige les pixels aux valeurs anormalement écartées de leur voisinage.

Le procédé final, résumé en Figure 59, se déroule donc en trois étapes : soustraction par l'offset, division par le fond, puis correction des points aberrants.

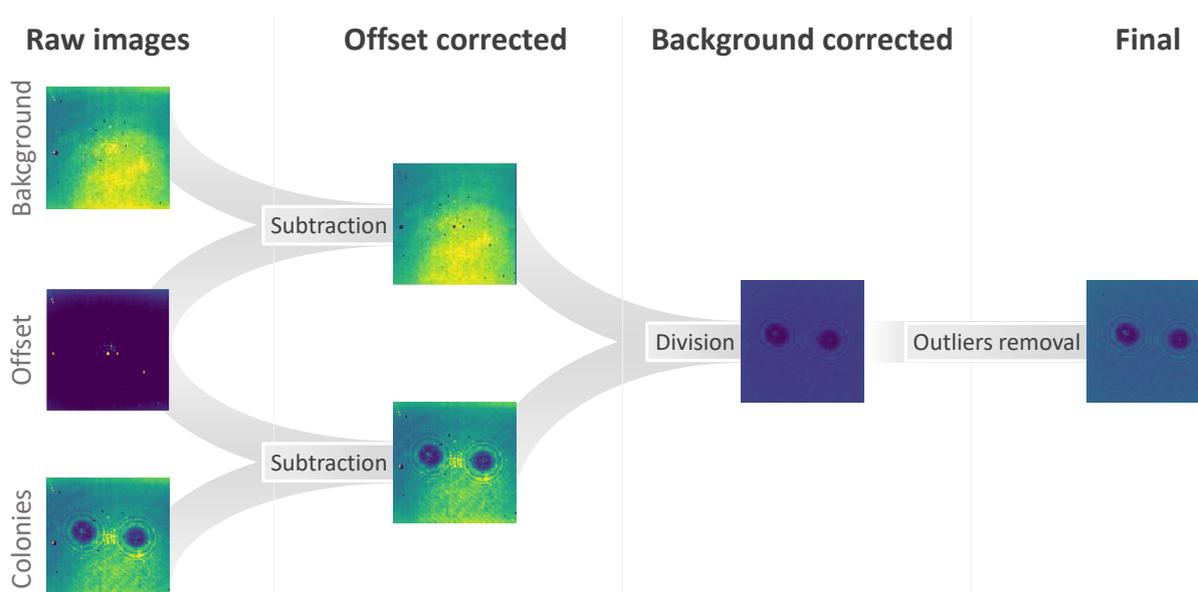


Figure 59. Présentation générale de la correction des défauts.

Ces corrections réduisent les défauts de l'image, mais n'en suppriment pas totalement l'impact. Il subsiste des points morts sur l'image (pixels valant 0 à chaque longueur d'onde), et les parties sous-exposées en bordure du champ optique sont artificiellement relevées au même niveau d'intensité que le centre de l'image par la correction de fond. En résultent des zones à la dynamique plus faible et donc difficilement comparables au reste de l'image. Nous ne considérerons donc que les objets proches du centre de l'image. Une étape de normalisation des images a également été envisagée (voir Annexe C, page 146), mais des essais non-concluants ont mené à son abandon. Enfin, une dernière étape de pré-traitement consiste en la localisation et l'extraction des régions d'intérêt.

II.5.2. Détection des colonies

Les images enregistrées sont susceptibles de présenter plusieurs types d'objets : le fond d'image (membrane), des objets non-biologiques (poussières, défauts de membrane...), des agrégats de

colonies, et enfin des colonies isolées. Seules nous intéressent ici les colonies isolées, dont la morphologie n'est pas altérée par le voisinage. Afin de s'affranchir du reste de l'image, une localisation automatique des régions d'intérêts (ROI) a été proposée. Deux approches principales sont envisagées : soit *via* un algorithme d'apprentissage supervisé, soit *via* une détection par filtres. Cette seconde approche a été favorisée pour des questions de rapidité et de facilité de mise en place. L'ensemble du procédé est présenté ci-dessous en Figure 60.

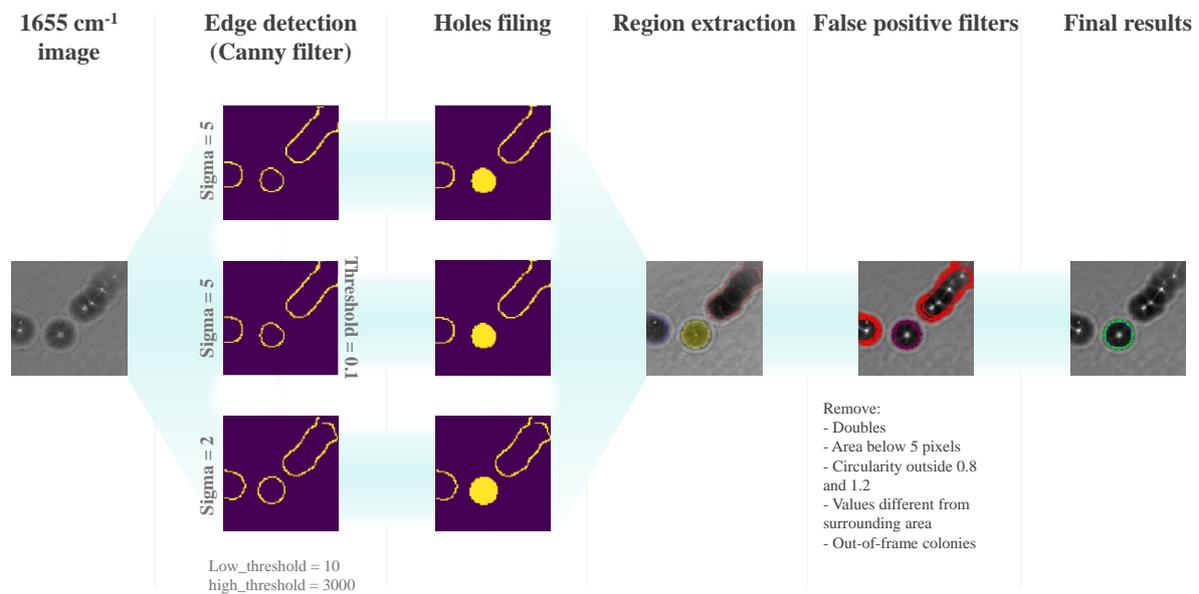


Figure 60. Présentation du procédé de détection des colonies.

Pour chaque hypercube, la détection de ROI utilise l'image à 1655 cm⁻¹. Cette image correspond en effet au maximum d'absorbance des colonies (voir Figure 12, page 25), et offre donc le meilleur contraste entre la membrane et les objets biologiques, ce qui facilite leur reconnaissance. Cette dernière se base sur un filtre de Canny (Scikit-image).

Le filtre de Canny est une méthode de détection de contour basée sur les gradients d'intensité dans l'image (*i.e.* la transition d'une zone sombre à une zone claire. Plus cette transition est nette, plus le gradient est fort et inversement). Deux paramètres contrôlent le filtre : *sigma*, qui règle le diamètre d'un flou gaussien utilisé pour lisser le bruit de l'image (en pixels), et le seuil, qui détermine la force des gradients d'intérêt. Ici, compte tenu de la diversité des objets recherchés (diamètre de colonie variable, bords plus ou moins marqués), aucun jeu de paramètre permettant la détection systématique de toutes les colonies n'a été trouvé. C'est pourquoi trois filtres de Canny sont appliqués en parallèle pour chaque image : le premier fonctionne dans la plupart des cas, le second permet de séparer des colonies proches, et le troisième détecte les colonies de faible diamètre (<7 pixels), qui sont fréquemment ignorées par les autres filtres.

Ces trois filtres sont ensuite complétés par une étape de remplissage (Figure 60, *holes filling*), qui transforme les contours détectés en régions. Ces dernières sont extraites *via* la fonction `measure.label()` de la bibliothèque `skimage`. Les régions détectées par les trois filtres de Canny sont alors recombinaées sur une même image. Enfin, une fonction filtre les régions pour ne conserver que celles correspondant à des colonies. Elle simplifie pour cela les éventuelles régions dupliquées (issues des trois filtres de Canny en parallèle) et supprime les colonies inexploitablees (touchant les bords de l'image ou avec une circularité hors de la gamme 0.8 –

1.2, ce qui indique que plusieurs colonies sont agrégées entre elles). Elle ignore également les faux positifs, par exemple les poussières détectées comme des colonies (rayon < 5 ou valeur d'absorbance à 1655 cm^{-1} proche de celle des pixels voisins).

À l'issue de ces étapes (correction + détection des colonies), le prétraitement aboutit à des images prêtes à être exploitées pour la classification en elle-même.

II.6. Conclusion de chapitre et exemples d'images

Dans ce chapitre, nous avons présenté un banc d'imagerie multispectral dans l'infrarouge, utilisant une source QCL et une matrice de microbolomètres comme imageur. Nous avons également discuté de la culture de microorganismes sur membranes en alumine poreuse, et de la façon dont ce support permet de transférer les colonies du milieu de culture au support d'imagerie sans en perturber la morphologie. À partir de ces éléments, un protocole de préparation et d'imagerie des cultures microbiennes a pu être proposé. Pour tester le système et mettre en évidence les caractéristiques utilisables pour l'identification microbiologique, quelques colonies préparées selon ce protocole ont été imagées aux infrarouges. Les résultats après pré-traitements sont présentés en Figure 61.

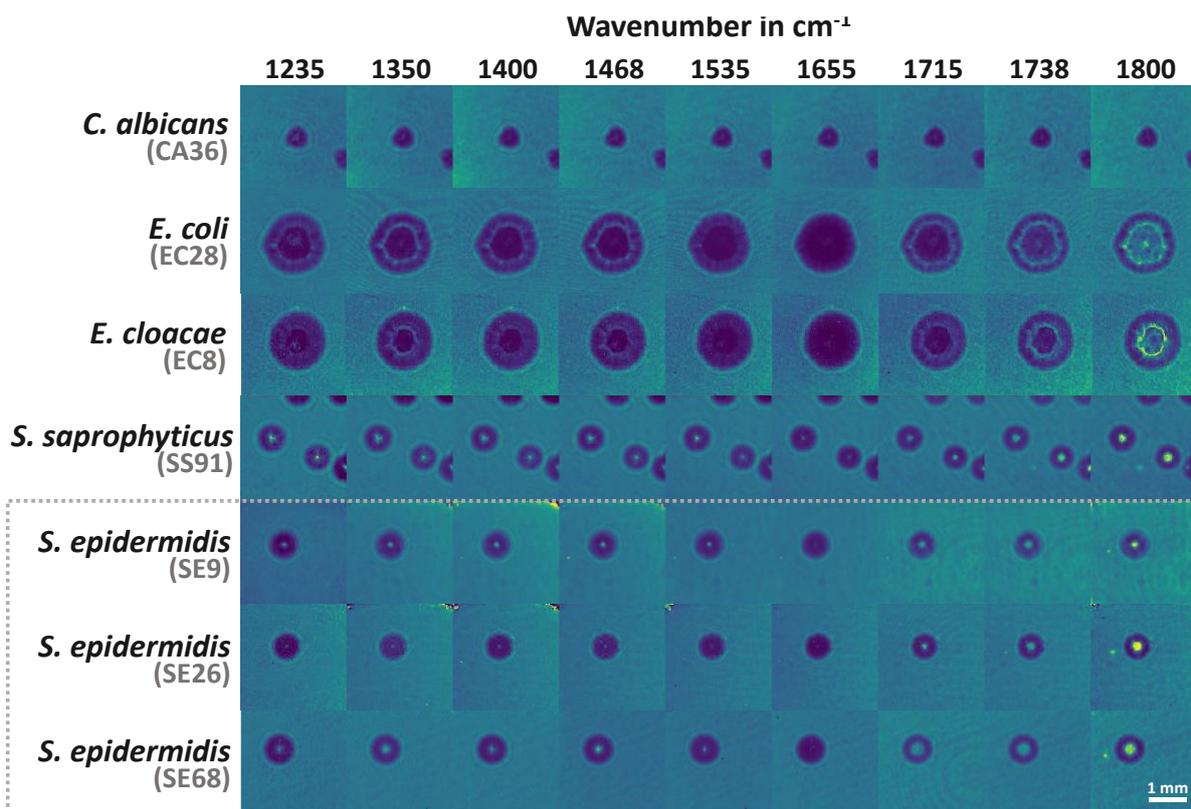


Figure 61. Exemples d'hypercubes en fausses couleurs de quelques colonies microbiennes. Chaque ligne montre une série d'images acquises à différentes longueurs d'ondes sur un même champ optique. Les trois hypercubes encadrés en pointillés correspondent à trois colonies de souches différentes mais appartenant à une même espèce.

Ces premières images sont particulièrement encourageantes pour l'identification. Quelques critères simples permettent déjà de distinguer certaines espèces : *C. albicans* et *E. coli*, par

exemple, sont aisément séparables par le rayon des colonies. D'autres facteurs morphologiques comme la présence de cercles de diffraction ou la distribution de la lumière à l'intérieur de la colonie diffèrent selon les espèces. Notons que ce dernier point est influencé par l'épaisseur de la colonie, sa forme (en dôme, en cloche, en cratère...), mais également par des effets de lentille particulièrement visibles à 1800 cm^{-1} (Remarque 10). Il semble en effet que certaines colonies aient, selon leur forme, un effet de focalisation de la lumière plus ou moins prononcé selon la longueur d'onde. Ce phénomène n'a pas été exploré plus en détail, mais est parfois suffisamment important pour que la concentration du faisceau laser sature le capteur – et donc tronque une partie de l'information (Figure 61 : SE26 à 1800 cm^{-1}). Ces effets étant liés à la forme de la colonie (épaisseur, géométrie, rugosité : voir Figure 3, page 11), ils pourraient également servir de facteur de discrimination. Enfin, des paramètres morphologiques plus fins comme la texture, c'est-à-dire l'arrangement spatial de l'intensité des pixels, pourront également être utilisés (Haralick et al. 1973).

Ensuite, les spécificités de la méthode ouvrent l'accès à des informations liées à la réponse spectrale des colonies. Compte tenu de la complexité des échantillons et des réglages effectués au niveau du bolomètre (voir page 54), il n'est pas possible de remonter à la composition chimique à proprement parler des colonies, mais les variations d'intensité lumineuse transmise d'une espèce à l'autre sont tout de même observables. Enfin, les paramètres morphologiques précédemment discutés varient également d'une longueur d'onde à l'autre, ce qui donne d'autres critères sur lesquels baser l'identification.

Remarque 10. Comme le montre la Figure 61, les images obtenues ne résultent pas uniquement de l'absorbance à chaque longueur d'onde, mais dépendent également de phénomènes optiques comme la diffraction, les effets de lentille ou encore les interférences liées au laser. En conséquence, les moyennes de niveaux de gris d'images de colonies à différentes longueurs d'ondes ne peuvent être directement reliées au spectre d'absorbance. L'imagerie multispectrale sans lentille ne peut donc pas être considérée comme une technique de spectroscopie à proprement parler. C'est une technique d'imagerie spectrale, qui sera ici uniquement employée afin de comparer des échantillons entre eux, et non pour une analyse chimique.

Notons également que le capteur de 2.73 mm de côté et l'aspect sans lentille de l'imagerie (grandissement ≈ 1) rendent possible l'acquisition de plus d'une colonie par champ optique. Les colonies à croissances rapide comme celles de *E. coli* sont généralement trop étendues pour tenir à plus de deux sur une image, mais pour des espèces plus lentes comme *S. epidermidis*, *C. albicans*, ou encore *S. saprophyticus*, ce nombre peut atteindre jusqu'à cinq colonies par champ optique. Du fait de l'absence de lentille entre l'imageur et l'échantillon, le nombre de colonie par image dépend uniquement des dimensions des colonies et de celles de l'imageur. Ainsi, un capteur plus large capturera plus de données en un seul champ et réduira d'autant le temps nécessaire à l'analyse complète d'une boîte de Petri.

Le système d'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge moyen permet donc l'acquisition rapide de piles d'images. Ces piles d'images, appelées hypercubes, peuvent représenter une ou plusieurs colonies imagées à neuf longueurs d'ondes différentes. Le chapitre suivant s'intéressera donc à la façon dont des processus de classification d'images peuvent exploiter ces hypercubes riches en information pour proposer une identification microbiologique.



Chapitre 3

Classification d'une base de données par des approches d'apprentissage supervisé

Introduction — La classification de données est le procédé algorithmique consistant à attribuer à un jeu de données une étiquette – une *classe*. Dans le cas de l'identification, la classe à attribuer est un nom d'espèce ; de souche dans le cas du typage. Ici, nous présenterons tout d'abord le principe de la classification des données au travers d'un exemple et de concepts propres au domaine. Cette introduction s'attardera en particulier sur deux éléments : les algorithmes de classification, aussi appelés *classifieurs*, et la base de données utilisée pour *entraîner* ces derniers à reconnaître des données inconnues. Nous discuterons ensuite des résultats de classification obtenus par différentes méthodes sur une base de données d'hypercubes de colonies, imagées dans l'infrarouge moyen.

III.1. Introduction à la classification d'images par apprentissage automatique

III.1.1. Un exemple de classification de données : la prédiction du diabète de type 2

La classification des données est fréquemment présentée à l'aide d'un cas d'usage, par exemple la prédiction de risques pour le diabète de type 2 (Sisodia et Sisodia 2018). Ici, la problématique est la suivante : comment peut-on, à l'aide de données simples comme l'âge, l'indice de masse corporelle (IMC) ou encore les antécédents familiaux, prédire le risque pour un patient de développer un diabète de type 2 ?

Pour résoudre ce problème, l'une des approches consiste à s'intéresser à des patients dont l'état de santé est déjà connu. Les médecins compilent alors toutes les données pertinentes (celles déjà évoquées, mais également le taux de cholestérol, la tension artérielle, la pratique ou non d'une activité sportive, etc.). Chaque patient se voit ainsi associer une série de données à laquelle est attribuée une étiquette selon son état de santé : sain ou malade. Prises ensemble, les données de tous les patients constituent la base d'apprentissage (voir Figure 62), ou encore la *partition* d'apprentissage (l'origine du terme *partition* sera présentée page 104).

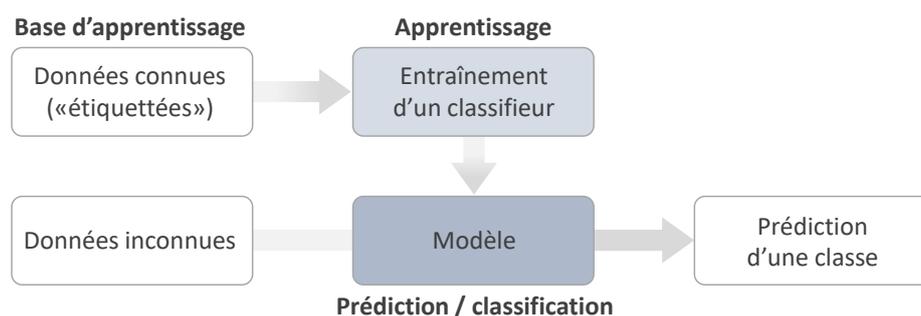


Figure 62. Présentation générale de la classification de données.

À partir de ces données, un algorithme appelé le *classifieur* est entraîné à différencier un patient sain d'un patient malade. C'est l'*apprentissage*, parfois aussi appelé *entraînement*. Ce dernier aboutit à un modèle : un ensemble de critères permettant de prédire une classe à partir de données inconnues (Figure 62, prédiction). Dans le cas du diabète, ce modèle est plutôt simple et équivalent à une régression logistique (Kazemnejad et al. 2010) : il associe une pondération à chaque critère – ou *paramètre* (âge, sexe, antécédents, etc.). Si nous prenons à présent un patient dont l'état de santé est inconnu, la somme des données du patient multipliées par leur

pondération aboutit à un score total représentant le facteur de risque. Si le risque est supérieur à un certain seuil, aussi déterminé par le modèle, le patient est classifié comme « à risque », sinon « sain ».

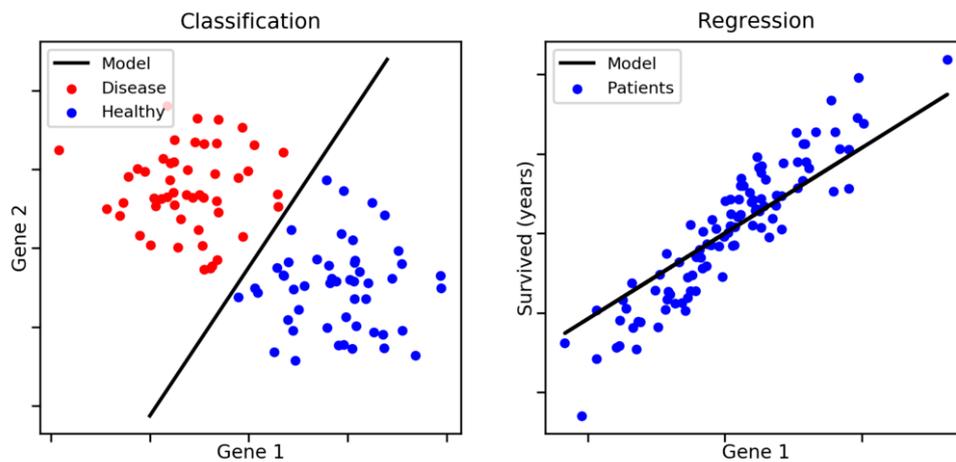


Figure 63. Illustration des procédés de classification et de régression. Dans le premier cas, la variable voulue en sortie est une catégorie ; une classe. Dans le cas de la régression, la variable est une valeur réelle (ici : le taux de survie en fonction de l'expression d'un gène). Le modèle obtenu à l'issue d'une régression est donc une fonction liant les données en entrée à la variable en sortie, tandis que pour la classification, le modèle fournit des critères pour séparer les différentes classes. Dans le cas du diabète, le modèle peut être ramené à une régression (comme ici à droite), sur lequel on appliquerait un seuil. Les deux classes, sain ou à risque, sont réparties de part et d'autre du seuil. Crédits image : Zakariyaa Ismaili, blog Analytics & Insights (Ismaili 2019).

La classification des données est donc un procédé algorithmique qui, à partir de données numériques et d'un algorithme à entraîner, aboutit à la prédiction d'une étiquette : une classe.

Notons que pour le diabète les données en entrée ne sont pas toutes comparables : un âge n'a pas la même échelle de valeur qu'un IMC, tandis qu'un antécédent familial sera représenté par une variable booléenne (0 ou 1). Les données doivent donc être ramenées à un niveau comparable. La question de leur pertinence doit également être posée. Par exemple, le fait d'aimer le cinéma n'impactera probablement pas le développement d'un diabète. Pourtant, si cette information était prise en compte dans les données d'apprentissage, et que celles-ci faisaient par hasard apparaître plus d'amateurs de cinéma chez les patients diabétiques que chez les patients sains, le classifieur pourrait donner de l'importance à ce paramètre. Il faut donc sélectionner les informations pertinentes avant la classification. Si dans le cas du diabète, l'expertise médicale guide les informations à considérer, certains cas d'usage peuvent faire appel à des données ou à des critères de sélection plus complexes. C'est par exemple le cas de la classification d'image, qui nous intéressera à présent.

En résumé, un processus de classification :

1. Part de données connues (la base de données),
2. En extrait les informations pertinentes (aussi appelées *descripteurs*),
3. Puis entraîne un classifieur à partir de ces informations.

Nous présenterons à présent chacune de ces étapes, résumées en voir Figure 66, p.81, en commençant par la première : la base de données.

III.1.2. Le fondement de la preuve de concept : la base de données

Qu'elle soit génétique, biochimique, optique ou encore électrique, l'identification de microorganismes revient toujours à rapprocher un échantillon d'une signature de référence. Dans le cas des techniques phénotypiques, cette signature ou « empreinte » ne peut être unique : elle doit prendre en compte la variabilité rencontrée au sein d'une même espèce. Pour créer une telle empreinte, il faut donc – avant toute identification – analyser un grand nombre d'échantillons pour obtenir un bon aperçu de la variabilité phénotypique de toutes les espèces qu'on souhaitera par la suite identifier. Cette variabilité est représentée par une base de données de référence. Plus la base compte d'échantillons et de conditions d'acquisition différentes, plus la classification qui suivra aura de signatures auxquelles se rapporter, et donc de chances d'être efficace.

C'est *via* de telles bases que la spectrométrie FTIR, Raman ou le MALDI-TOF identifient les microorganismes malgré les variations spectrales au sein d'une même espèce (Wenning et Scherer 2013; Espagnon et al. 2014), et c'est ce même principe qu'emprunte l'identification par imagerie multispectrale dans l'infrarouge.

Si la base de données commerciale doit être acquise dans les mêmes conditions que l'échantillon à analyser (en hôpital pour un échantillon clinique, avec le même protocole, etc.), la preuve de concept peut être réalisée en laboratoire. Cette approche est plus efficace d'un point de vue du coût et des contraintes d'accès aux échantillons. C'est donc une banque d'hypercubes sur souches de référence qui a été acquise au cours de cette thèse, et qui servira de base pour toutes les classifications présentées dans cette partie. Cette base de données doit répondre à deux contraintes :

1. Contenir un nombre suffisant d'échantillons pour chaque classe qu'elle représente (espèce ou souche). Ce nombre varie d'une méthode à l'autre, mais plus d'échantillons induit une meilleure couverture de la variabilité morphologique d'une classe, et donc généralement une meilleure identification. Dans notre cas, il a d'abord été fixé à 100 colonies par classe puis remonté à 150 après une première série d'acquisitions.
2. Prendre en compte la distance phylogénétique entre espèces. Différencier une bactérie d'un champignon n'est pas le même problème que distinguer deux bactéries appartenant à des espèces d'un même genre. Ces deux questions sont toutefois pertinentes pour l'évaluation d'une technique, et doivent donc ressortir au sein de la base de données.

En prenant en compte ces contraintes et les souches disponibles au laboratoire, la base décrite en Figure 64 a été proposée.

Comme représenté sur l'arbre phylogénétique simplifié de la Figure 65, cette base regroupe à la fois des espèces très éloignées (*C. albicans* et *E. coli*), des espèces proches (toutes les espèces du genre staphylocoque), et plusieurs souches d'une même espèce (*S. epidermidis*). Une grande gamme de variabilité phylogénétique peut ainsi être explorée.

Les acquisitions ont été réalisées selon le protocole décrit en II.4.1 et ont abouti à l'acquisition de 1833 hypercubes. Au total, 2253 colonies isolées ont pu y être identifiées grâce à l'algorithme de détection détaillé en II.5.2. Cet écart entre le nombre d'images et de colonies confirme l'intérêt de l'imagerie sans lentille grand champ : plusieurs colonies peuvent être présentes sur chaque acquisition (Figure 64 : Ratio), ce qui accélère d'autant l'analyse d'un

échantillon. À l'avenir, des capteurs couvrant plus de surface devraient améliorer la vitesse d'acquisition.

	Nom	Domaine	Gram et forme	Référence ATCC	Hypercubes	Colonies	Ratio
CA36	<i>Candida albicans</i>	Eukaryote	n.a	14053	173	243	1.4
EC28	<i>Escherichia coli</i>	Bacteria	Gram - bacillus	11775	169	170	1.0
EC8	<i>Enterobacter cloacae</i>	Bacteria	Gram - bacillus	13047	139	155	1.1
LI142	<i>Listeria innocua</i>	Bacteria	Gram + bacillus	33090	115	152	1.3
SE9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bacteria	Gram + coccus	14990	348	430	1.2
SE26	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bacteria	Gram + coccus	12228	220	283	1.3
SE68	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bacteria	Gram + coccus	700296	141	224	1.6
SL64	<i>Staphylococcus lentus</i>	Bacteria	Gram + coccus	700403	109	127	1.2
SS91	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Bacteria	Gram + coccus	15305	274	286	1.0
SW63	<i>Staphylococcus warneri</i>	Bacteria	Gram + coccus	49454	145	183	1.3
Total					1833	2253	1.2

Figure 64. Récapitulatif de la base de données. Pour chaque souche utilisée sont présentés un nom d'usage employé au laboratoire, le nom d'espèce d'après la nomenclature binomiale, ainsi que quelques informations sur l'espèce. ATCC est l'abréviation de American Type Culture Collection, un organisme collectant des souches de microorganismes de référence utilisées dans la plupart des laboratoires. Les trois dernières colonnes sont relatives à la base de données en elle-même. Y sont présentés le nombre d'hypercubes acquis pour chaque souche, le nombre de colonies présentes sur ces hypercubes (chaque hypercube pouvant représenter plusieurs colonies), et le ratio entre les deux. Ce dernier permet d'évaluer l'apport du grand champ optique de la technologie.

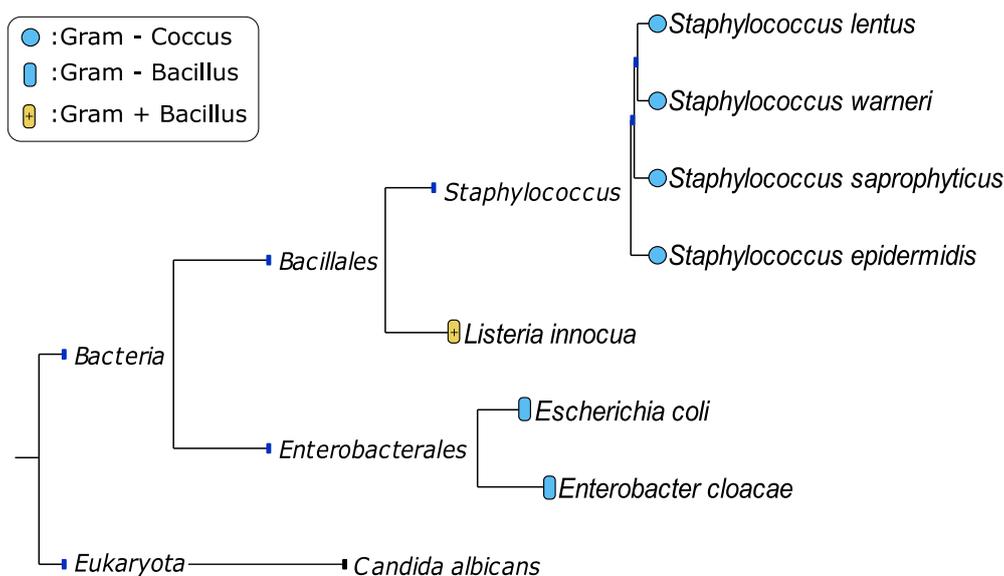


Figure 65. Arbre phylogénétique des espèces utilisées pour la base de données.

III.1.3. L'extraction des descripteurs

Comme évoqué en III.1.1, toutes les informations d'une base de données ne sont pas pertinentes pour la classification. L'étape suivante consiste donc à extraire des *descripteurs de*

caractéristiques, c'est à dire un ensemble de paramètres pertinents à transmettre au classifieur. Chaque descripteur représente une donnée simple, comme le poids ou l'âge dans le cas de la prédiction de diabète, ou un paramètre calculé à partir des données, comme par exemple le rayon d'un objet d'intérêt sur une image.

Dans le cas de la classification d'image, identifier des caractéristiques pertinentes pour la classification est quasi-obligatoire. En effet, les algorithmes de classification, dont le fonctionnement sera décrit en section suivante, travaillent uniquement sur des tableaux de données où chaque ligne représente un exemple de la base. Chaque image doit donc être résumée sous forme d'un vecteur.

L'option la plus simple consiste à linéariser l'image, c'est-à-dire transformer un tableau de niveaux de gris de dimension n par m en un vecteur de taille $n * m$. Si la classification est alors possible, le grand nombre de variables (*i.e* de pixels), ainsi que des facteurs aléatoires comme la position de l'objet d'intérêt, sa taille ou encore sa rotation, rendent l'apprentissage sur des images linéarisées hasardeux et peu efficace. Dans notre cas, chaque hypercube de notre base de données correspond à une matrice de 80 pixels par 80 pixels, sur 9 canaux de longueurs d'ondes. Une fois linéarisés, ces hypercubes deviennent donc un vecteur à 57 600 variables, ce qui rend le calcul particulièrement gourmand en ressources informatiques. De plus, la majorité de ces variables n'apporteront aucune information pertinente pour la classification. Le problème doit donc être simplifié.

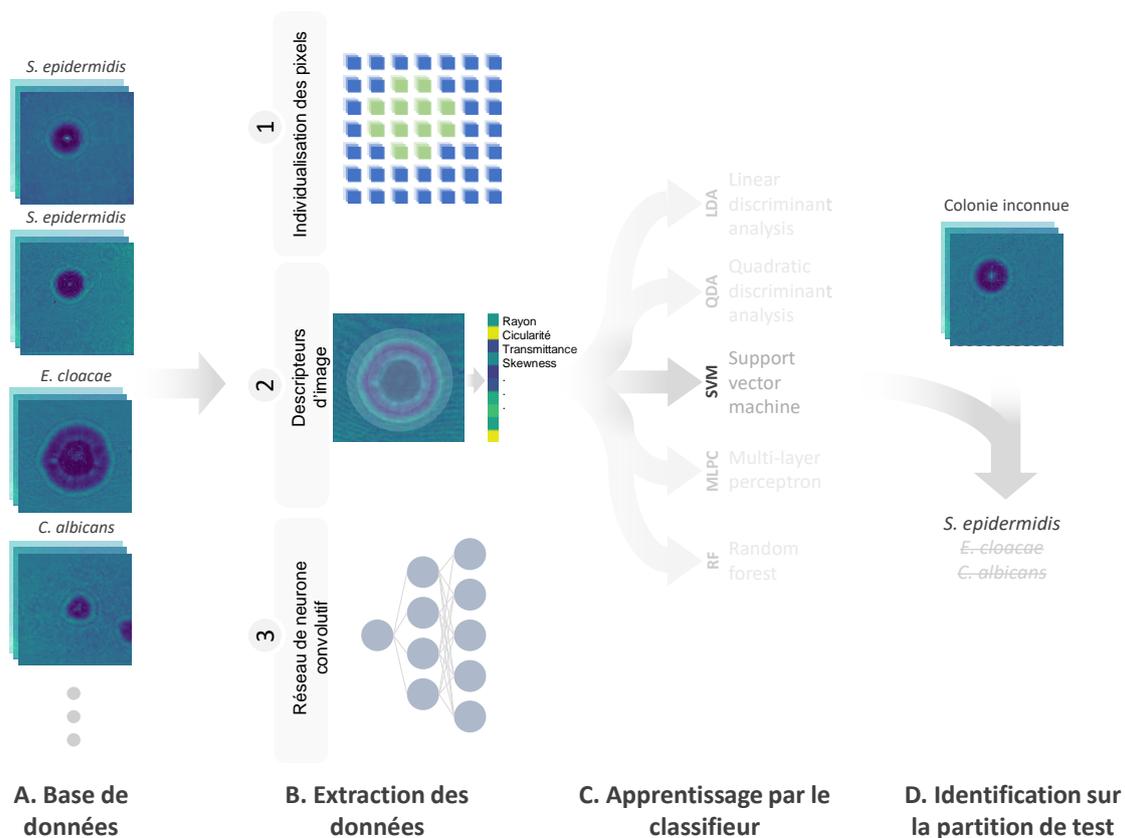


Figure 66. Présentation générale du processus de classification d'image par apprentissage supervisé.

Pour extraire des descripteurs d'image, plusieurs solutions sont communément utilisées en traitement d'image, et l'aspect multispectral de notre technologie en apporte une nouvelle :

La solution spectrale, la plus simple, consiste à faire l'apprentissage sur les pixels individuels plutôt que de considérer l'image dans son ensemble (Figure 66 B.1). Chaque point se voit alors résumé sous forme d'un vecteur donnant les valeurs d'intensité de ce pixel à chaque longueur d'onde, comme un spectre discrétisé. La classification pixel par pixel a été appliquée avec succès pour l'imagerie FTIR (Lasch et al. 2018), mais dans notre cas la faible quantité de données (9 valeurs) rend cette approche peu pertinente. De plus, elle ignore les informations de morphologie, ce que notre technique essaye justement de conserver. Elle ne sera donc pas détaillée dans ce manuscrit.

La deuxième approche consiste à définir manuellement des descripteurs pertinents, on parle ici de descripteurs *ad hoc*. Ceux-ci représentent des paramètres simples (rayon de la colonie, absorbance à chaque longueur d'onde etc.) et sont choisis en s'appuyant sur la littérature et sur l'expertise des utilisateurs. Pour chaque colonie (pour rappel, un hypercube peut montrer plusieurs colonies) est alors calculé un certain nombre de paramètres visant à décrire sa morphologie (Figure 66 B.2). Cette classification par descripteurs *ad hoc* a déjà fait ses preuves dans l'imagerie sans lentille visible (Maeda et al. 2017, 2018), et sera appliquée à l'imagerie multispectrale en **partie III.2, page 88**. Cette méthode a pour avantage d'offrir un contrôle sur les paramètres considérés et de créer des vecteurs de descripteurs de petite taille (moins de 100 dimensions). En contrepartie, toute caractéristique de l'image ignorée par l'utilisateur ne sera pas prise en compte par la classification. C'est pourquoi une autre approche a été considérée.

Les réseaux de neurones artificiels convolutifs, une classe particulière de réseaux de neurones, sont des algorithmes travaillant directement sur les images pour en extraire automatiquement les descripteurs, avant de réaliser la classification. Ils s'affranchissent donc de l'étape de définition manuelle des descripteurs pertinents. Ce fonctionnement leur permet ainsi de travailler sur des caractéristiques d'images difficilement identifiables par l'utilisateur, comme des irrégularités de formes ou des motifs récurrents d'une colonie à l'autre (Figure 66 B.3). Cette méthode sera explorée en détails dans la **partie III.3, page 100**.

Une autre méthode parfois utilisée en analyse d'image est celle dite des **Histogrammes de gradients orientés**. Celle-ci est détaillée en **Annexe D, page 148**, mais s'est avérée inappropriée pour la classification de nos données. Le principal défaut de cette technique est de fournir des descripteurs d'image de grande taille (2655 valeurs par colonies), tout en conservant assez peu de détails sur l'image. Les données fournies au classifieur sont donc peu pertinentes.

La méthode d'extraction des descripteurs conditionne les données qui seront transmises au classifieur, ce qui en fait une étape charnière du processus de classification d'images. En conséquence, les différents tests présentés par la suite seront regroupés en regard de leur méthode d'extraction (parties III.2 et III.3), et non en fonction des différents types d'algorithmes de classification que nous présenterons à présent.

III.1.4. Algorithmes de classification

Si la base de données est toujours nécessaire au bon fonctionnement de l'apprentissage automatique, deux familles d'algorithmes sont à distinguer : les algorithmes d'apprentissage supervisé, et non-supervisé.

L'apprentissage supervisé correspond au cas décrit sur l'exemple du diabète, en première section de ce chapitre (p.77). Ce type d'approche consiste à fournir à l'algorithme des données étiquetées pour l'entraîner à classer des données inconnues (Gulli et Pal 2017). L'analyse est donc orientée vers un type de résultat bien précis à partir de données connues, d'où le nom de *supervisée*. Ici, c'est principalement ce type d'approche qui nous intéressera.

L'apprentissage non-supervisé regroupe une ensemble d'approches d'exploration des données sans *a priori*, c'est-à-dire sans connaissance préalable des classes recensées dans la base de données (Jolliffe 2005). Les approches non-supervisées sont utilisées pour simplifier les données (réduction dimensionnelle), mais aussi pour regrouper des données proches. On parle alors de *clustering* (Ismaili 2019). Dans ce cas, la proximité d'un exemple inconnu avec les groupes préalablement constitués donne une tendance sur sa classe. Les approches d'apprentissage non-supervisé sont largement employées pour faire émerger des tendances au sein des données (par exemple, trouver les longueurs d'ondes les plus discriminantes sur des spectres FTIR de microorganismes, voir Figure 29, page 45). Toutefois, la classification à proprement parler est généralement faite *via* des approches d'apprentissage supervisé.

Dans cette section, nous nous concentrerons donc sur des algorithmes de classification supervisée. Plusieurs d'entre eux ont été testés au cours de ces travaux :

La machine à vecteurs support (SVM) est un classifieur classique de la littérature (Strola et al. 2014; Kim et al. 2017; Maeda et al. 2018). Elle consiste à trouver une frontière (appelée *hyperplan*) séparant les données appartenant à deux classes différentes (Hearst et al. 1998). La SVM fait appel à deux notions centrales. La première, la *distance maximale à la marge*, désigne la frontière qui sépare les données, tout en maximisant la distance entre les données et ladite frontière. L'hyperplan sélectionné par l'algorithme sera donc celui qui fournit la plus grande *marge* entre les données. En pratique, cette marge est contrôlée par un paramètre noté C, qui autorise plus ou moins d'erreurs de classification (la frontière est « floutée »).

Ensuite, la SVM ne trouve que des hyperplans linéaires (on parle d'algorithme de classification linéaire, au même titre que la LDA qui sera présentée ci-dessous). Dans le cas de classes non-linéairement séparables (comme en Figure 67 : SVM), la SVM fait donc appel à une seconde notion appelée *kernel* ou *noyau*. Celle-ci désigne une fonction permettant la transformation de données non-linéairement séparables en données linéairement séparables. La fonction la plus commune, et qui sera utilisée ici, est appelée *rbf* pour *Radial Basis Function* (Buhmann 2000; Chang et al. 2010). Notons également que la SVM est à l'origine conçue pour séparer uniquement deux classes. Lorsque plus de deux classes sont à séparer, la SVM peut soit être utilisée pour séparer un à un chaque couple de classe (fonctionnement *un-contre-un*), soit adaptée pour séparer toutes les classes d'un coup (*un-contre-tous*). Ici, nous utiliserons uniquement la SVM en un-contre-un.

Les réseaux de neurones artificiels (ANN) sont une classe à part d'algorithmes, inspirés du fonctionnement des neurones biologiques et capables d'approximer n'importe quel modèle mathématique (Cybenko 1989). Pour la classification, on utilisera volontiers une architecture de réseaux de neurones particulière appelée *perceptron multicouche*, ou encore MLPC (*Multi-Layer Perceptron Classifier*). Ces algorithmes de classification non-linéaires sont connus pour leur efficacité, mais leur aspect « boîte noire » et aléatoire peut gêner la compréhension des analyses. Pour faciliter l'accessibilité du discours, les réseaux de neurones seront ici considérés

d'un point de vue purement « utilisateur ». Leur fonctionnement sera toutefois détaillé lors de la discussion sur les réseaux de neurones convolutifs, section III.3.1, à partir de la page 100.

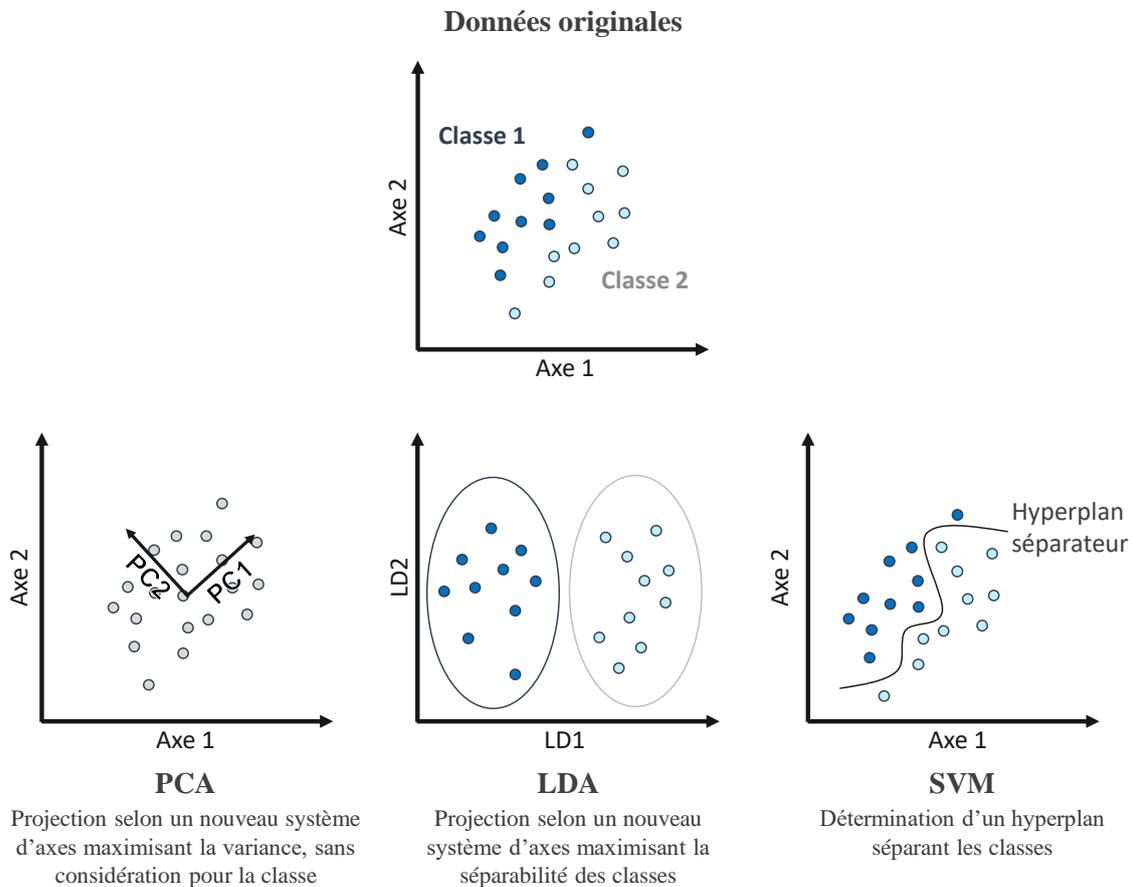


Figure 67. Schématisation des principes de quelques algorithmes d'apprentissage automatique. Notons que la PCA n'est pas un classifieur, mais un algorithme d'apprentissage non-supervisé, dont le principe sera décrit en section III.2.3, p.91

L'analyse discriminante linéaire (LDA) fonctionne selon un principe similaire à la PCA. Les données fournies en entrée sont transformées selon un nouveau système de variables construites de façon à maximiser la séparabilité des classes (Rao 1948; Raschka 2014). Ici encore, les nouvelles variables (appelées composantes linéaires : LC1, LC2, ...) sont des combinaisons linéaires des variables originales. Toutefois, contrairement à la PCA qui considérait uniquement la variance du jeu de données sans considération pour les classes, la LDA est donc conçue pour deux choses : maximiser la distance entre les moyennes des classes, et minimiser l'écart entre points au sein d'une classe (Rouvière 2021). Elle peut ainsi être utilisée directement comme classifieur ou comme méthode de réduction de dimensionnalité préalable à une classification. Ici, nous l'emploierons uniquement à des fins de classification.

L'analyse discriminante quadratique (QDA) est une méthode similaire à la LDA (Wu et al. 1996). Elle utilise cependant des hypothèses de départ différentes, et se base sur la distance quadratique pour séparer les classes, au lieu de la distance arithmétique utilisée par la LDA. En pratique, la QDA est utilisée sur des problèmes à grand nombre de dimensions que la LDA peine à résoudre (Tharwat 2016).

La forêt d'arbres décisionnels, ou forêt aléatoire (RF pour

Random Forest) est un algorithme de classification basé sur le principe des arbres décisionnels (Breiman 2001). Un arbre est constitué d'un ensemble de nœuds successifs (ou *feuilles*). Chaque nœud fonctionne comme un embranchement à partir d'une variable. Par exemple, dans le cas du diabète, le premier nœud peut imposer un critère sur l'âge pour séparer les patients ayant plus de 45 ans et moins de 45 ans, comme schématisé en Figure 68 ci-contre. Après cette première étape, de nouveaux critères sont proposés pour continuer à séparer les deux groupes formés. Idéalement, une fois arrivé au bout des branches de l'arbre, les exemples des différentes classes

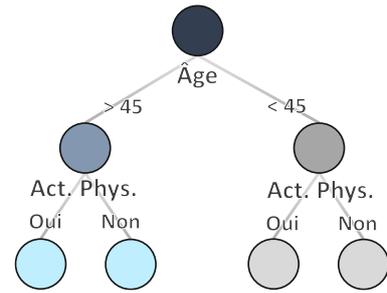


Figure 68. Exemple de début d'arbre décisionnel sur le cas du dépistage du diabète de type 2.

sont séparés les uns des autres. La forêt aléatoire génère ainsi une série d'arbres décisionnels aléatoires. Chaque arbre est entraîné indépendamment (c'est-à-dire ses critères de sélections améliorés pour permettre une meilleure séparation des classes), et ce sur un sous-ensemble de la base de données. À l'issue de l'apprentissage, chaque exemple est classifié par les différents arbres, et le résultat final est décidé par un vote à la majorité. Cette approche offre parfois d'excellentes performances de classification (Kim 2017, Maeda 2018, Mathieu 2021, pour ne citer que les articles déjà évoqués), mais demande des temps de calcul plus importants que les autres classifieurs présentés (2 à 3 fois plus long que la SVM dans notre cas). De plus, à l'instar des ANN, les aspects aléatoires et boîte noire du procédé gênent la compréhension des analyses.

Remarque 11. Le comportement de chaque algorithme est contrôlé par un ensemble de paramètres, appelés hyperparamètres, dont le réglage impacte les performances de classification. Pour chaque test effectué, il faudrait théoriquement optimiser les hyperparamètres pour obtenir les meilleures performances, ce qui est en pratique rendu difficile par la longueur des calculs. Les hyperparamètres ont donc été fixés une fois et conservés pour tous les tests décrits par la suite. Ils seront précisés lorsque nécessaire au cas par cas.

Avec la base de données, les méthodes d'extraction des descripteurs et les classifieurs, nous avons présenté les éléments essentiels nécessaires à la classification des données. À présent, nous discuterons de la façon dont sont évaluées les performances d'un classifieur.

III.1.5. La validation croisée

L'objectif d'un algorithme de classification est d'apprendre sur une base de données d'entraînement pour ensuite classer un exemple inconnu. En pratique, les données acquises sont séparées en deux entités distinctes : la base de données d'apprentissage et les données de validation (représentant classiquement 1/5^{ème} ou 1/10^{ème} du nombre total d'exemple). Les données de validation ne sont pas présentées à l'algorithme pendant l'apprentissage, mais sont utilisées à l'issue de ce dernier pour tester les performances du modèle sur des exemples inconnus (Figure 69).

Toutefois, l'apprentissage nécessite un grand nombre d'exemple, tout en gardant à l'esprit que plus le problème est complexe, plus la base de données devra être étendue afin de couvrir toute la diversité des cas. De même, les données sur lesquelles la classification sera testée doivent elles aussi être représentatives des cas que pourra rencontrer l'algorithme dans une application pratique. Il faut donc un nombre d'exemples conséquent, de l'ordre de plusieurs milliers sur

une application comme la nôtre. En pratique, on utilise donc un procédé appelé la *validation croisée*

Tout d'abord, la base de données initiale est séparée en n fractions. Nous verrons dans le chapitre Perspectives (page 118) qu'il existe plusieurs façons de fractionner la base de données, mais, pour le moment, considérons un fractionnement aléatoire. Les différents exemples sont donc répartis aléatoirement en n groupes, en conservant toutefois les proportions de chaque classe dans la base de données initiale. Si 100 colonies ont été enregistrées pour une classe, $\frac{100}{n}$ colonies seront réparties dans chaque groupe. On parle de *stratification des données*.

Une fois ces n groupes constitués, $n-1$ d'entre eux sont rassemblés pour constituer la partition d'apprentissage, tandis que le dernier est utilisé comme partition de test. Les phases d'apprentissage et de test sont répétées n fois pour que chaque groupe serve exactement une fois de groupe de test. Ainsi, chaque colonie acquise se retrouve associée à une espèce prédite par le modèle, ce qui permet de tester le procédé de classification sur chaque élément de la base de données.

Le procédé complet de validation croisée est résumé en Figure 69 : une base de données initiale est séparée en partition d'apprentissage (90 %) et en partition de test (10 %, aussi appelée partition de *validation*). La partition d'apprentissage est utilisée pour entraîner le classifieur, ce qui génère un modèle de prédiction de classe (Figure 69 : modèle). Le modèle est ensuite testé sur la partition de validation, ce qui permet de comparer les classes prédites aux classes réelles (Figure 69 : validation croisée).

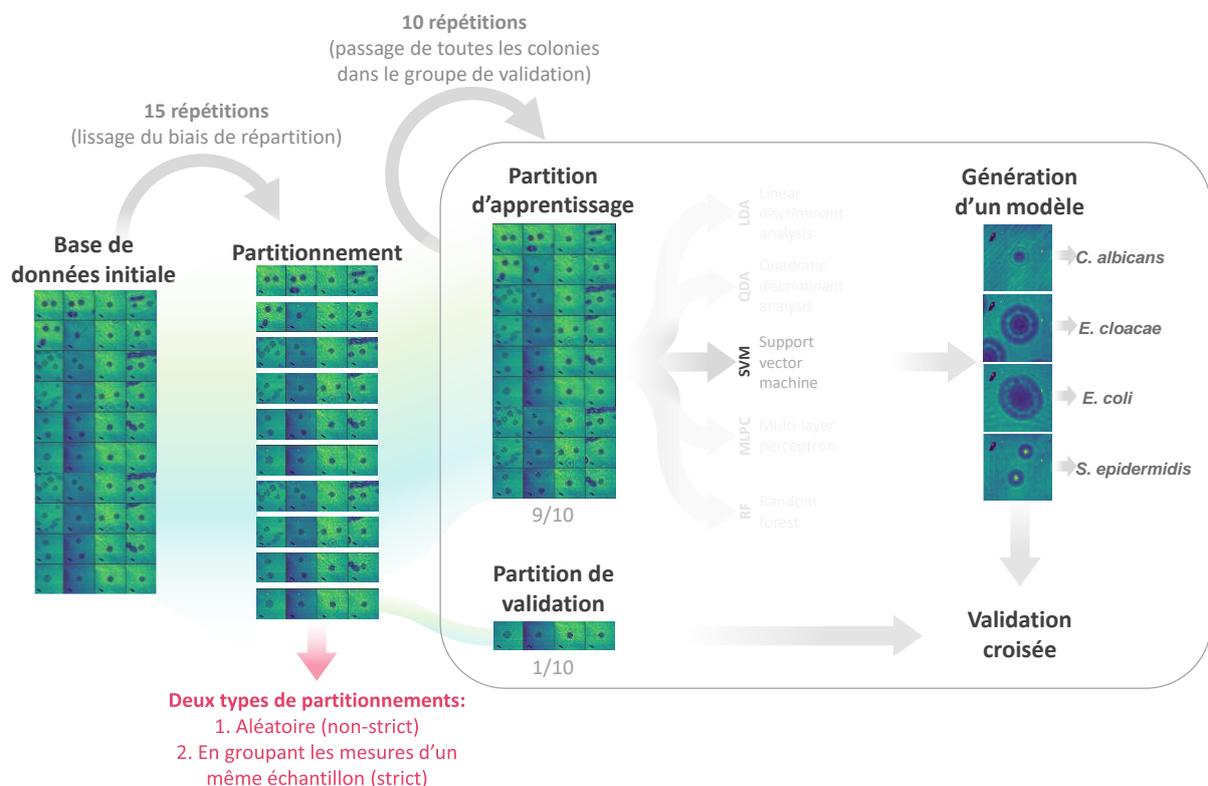


Figure 69. Principe de la validation croisée.

La validation croisée induit toutefois certains biais. En effet, lors du partitionnement des données, la répartition aléatoire des données donne lieu à une combinaison unique de n groupes (Figure 69 : Partitionnement). Deux validations croisées successives aboutiront donc à deux jeux de n groupes différents, et ainsi à des partitions d'apprentissage différentes. Or, le modèle généré par le classifieur dépend des données fournies pour son entraînement. Certains exemples peuvent être particulièrement représentatif de leur classe, et donc aider le modèle, tandis que d'autres entraîneront peut-être une certaine confusion. La répartition de ces exemples entre partitions d'apprentissage et de validation aura donc un impact sur le résultat. Deux validations croisées successives donneront ainsi naissance à des modèles légèrement différents. En pratique, ces différences d'une exécution à l'autre sont suffisamment importantes pour être prises en compte : jusqu'à 5 % des exemples peuvent être classifiés différemment (données non présentées).

Pour lisser ces variations, le processus de validation croisée est répété plusieurs fois – en général 15 –, à chaque fois avec un nouveau fractionnement aléatoire de la base de données. À chaque répétition, toutes les colonies de la base se voient attribuer une classe prédite par le modèle. La classe finale prédite pour chaque colonie est décidée à l'issue du processus par un vote à la majorité entre toutes les prédictions. C'est le résultat de ce vote qui est comparée à la classe réelle pour le calcul des performances de classification. Au total, un processus classique de validation croisée implique donc 15 fractionnements en 10 groupes. Ces groupes devant tous être utilisés une fois pour la validation, le cycle apprentissage / validation est donc répété 150 fois pour chaque test.

À l'issue d'une validation croisée complète (*i.e.* les 150 répétitions), les résultats de classification sont présentés sous forme d'une matrice de confusion, comme en Figure 70 ci-contre. Pour chaque classe présente dans la base (espèce ou souche), la matrice donne en ligne le ratio d'exemples ayant été attribué à chaque classe. Ainsi dans l'exemple ci-contre, la première ligne indique que 90 % des colonies de CA36 (*C. albicans*) ont été correctement classifiées et 10 % faussement interprétées comme étant du SE26 (*S. epidermidis*). Le bon fonctionnement d'une méthode de classification (extraction des données + classifieur adapté) peut donc se traduire par des ratios proches de 1 sur la diagonale. Dans la suite de ce document, nous nous intéresserons en particulier aux *taux d'identification correcte* (CIR). Ce taux, représentant le pourcentage d'exemples correctement classifiés, peut être calculé soit pour une classe donnée (nombres présents sur la diagonale), soit moyenné sur toutes les classes. Le CIR moyen sera ici utilisé pour évaluer les performances de classification d'un procédé. Notons toutefois que ce CIR moyen peut être faussé par des classes « extrêmes », avec des taux d'identification largement supérieurs ou inférieurs aux autres classes, ce qui trahirait un défaut du modèle. Seule la matrice de confusion permet donc d'évaluer correctement les performances de classification.

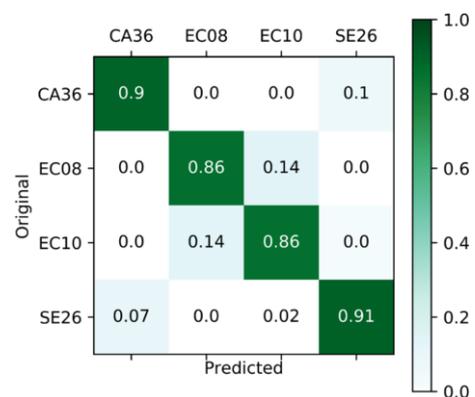


Figure 70. Exemple d'une matrice de confusion à quatre classes, obtenue à l'issue d'une classification par SVM, avec validation croisée au 1/10. La matrice se lit en lignes.

Les parties suivantes décriront à présent deux procédés d'analyse différents, séparés selon la méthode d'extraction des données : soit *via* des descripteurs d'image (partie III.2), soit à l'aide de réseaux de neurones convolutifs (III.3). Dans les deux cas, les procédés seront testés par validation croisée, et leurs performances évaluées en regard des CIRs obtenus.

Remarque 12 : Validation croisée stricte. Si la base de données est partitionnée de façon aléatoire, des colonies acquises sur la même membrane, et donc dans les mêmes conditions expérimentales, peuvent être séparées dans les partitions d'entraînement et de validation. Le classifieur est donc entraîné et testé sur des colonies ayant la même origine. Le partitionnement aléatoire induit ainsi une simplification du problème, puisqu'il ignore la variabilité expérimentale pouvant exister entre deux membranes différentes (absorbance de la membrane, conditions atmosphériques, mauvais alignement du laser d'un jour à l'autre, etc.) Une méthode plus rigoureuse de partitionnement non-aléatoire, appelée partition *stricte* (ou *strigent*), sera discutée dans les perspectives à partir de la page 118. Elle n'a toutefois pas été retenue pour les tests présentés dans ce chapitre, en raison du petit nombre de membrane analysé pour chaque classe (entre 5 et 9). Ici, nous en resterons donc à un partitionnement aléatoire.

III.2. Résultats de classification d'images à l'aide de descripteurs *ad hoc*

III.2.1. Descripteurs sélectionnés

Les algorithmes de classification travaillent uniquement sur des tableaux numériques. Dans ces tableaux, chaque ligne représente un exemple à classifier, tandis que chaque colonne correspond à une variable, un descripteur. Ici, nous considérerons des descripteurs dits *ad hoc*, c'est-à-dire définis selon la littérature et l'expérience utilisateur (Marcoux et al. 2014; Maeda et al. 2017).

Pour chaque colonie est donc calculée une série de paramètres tels que le rayon, la circularité ou la transmittance moyenne à une longueur d'onde donnée, afin d'obtenir un vecteur de descripteurs contenant quelques dizaines de valeurs. Cette approche ne conserve donc que les informations jugées pertinentes des images. De plus, elle fixe la taille des vecteurs indépendamment du diamètre de la colonie, réduit grandement le nombre de paramètres à analyser, apporte une forme de moyennage qui lisse le bruit et combine des informations sur la morphologie et sur la signature spectrale.

Les performances de la méthode dépendent toutefois de la pertinence des descripteurs. Ici, quatre classes de descripteurs ont été sélectionnés :

1. Des paramètres morphologiques, comme le rayon et la circularité de la colonie, invariables d'une longueur d'onde à l'autre et donc calculés uniquement sur l'image à 1655 cm^{-1} (correspondant à l'absorbance maximale des colonies et déjà utilisée pour la détection de contours, voir page 72).
2. Des paramètres purement liés à la valeur de niveau de gris des pixels : la transmittance moyenne de la colonie et l'asymétrie de distribution de l'histogramme associé (*skewness*). Ces deux descripteurs sont calculés pour chaque image de la pile et donnent un aperçu global de la colonie sans détailler chaque pixel individuel.
3. Des transmittances moyennes calculées sur des segments annulaires de la colonie (Figure 72 : Transmittance externe, bordure et moitié). Cette segmentation décrit

l'organisation radiale de la colonie ainsi que ses environs directs, influencés notamment par les éventuelles figures de diffraction.

4. Enfin : la similarité et la dissimilarité d'une matrice de cooccurrence des niveaux de gris. Ces deux paramètres décrivent la texture d'une colonie, c'est-à-dire son aspect lisse ou granuleux.

Au total, dix types de descripteurs ont été sélectionnés. Ceux-ci sont détaillés en Figure 71 et résumés sous forme graphique en Figure 72. D'autres descripteurs d'image sont possibles, comme un calcul des moments de Zernike (Marcoux et al., 2014) ou une analyse en coupe de la colonie (Maeda et al., 2018). Toutefois, ceux-ci sont sensibles au bruit ou au diamètre de la colonie, et donc moins adaptés à des images de faible définition comme les nôtres.

Paramètre	Longueur d'onde	Description	Information
Rayon	1655	Rayon de la colonie (en pixels)	Morphologique
Circularité	1655	$4\pi * \left(\frac{\text{aire}}{\text{périmètre}^2} \right)$	Morphologique
Skewness	Toutes	Assymétrie de l'histogramme associé à l'image de la colonie	Spectrale
Transmittance	Toutes	Transmittance moyenne sur toute la colonie	Spectrale
Half intensity	Toutes	Transmittance moyenne calculée sur un disque de $\frac{1}{2}$ du rayon de la colonie	Spectrale
Border intensity	Toutes	Transmittance moyenne de l'anneau compris entre $\frac{3}{4}$ et 1 rayon de colonie	Spectrale
External intensity	Toutes	Transmittance moyenne de l'anneau compris entre 1 et $1+\frac{1}{4}$ rayon de colonie	Spectrale
Donutness	Toutes	Transmittance / half intensity	Morphologique + spectrale
Texture difference	Toutes	Dissimilarité de la matrice de cooccurrence (gray-level cooccurrence matrix)	Texture
Texture similarity	Toutes	Similarité de la matrice de cooccurrence	Texture

Figure 71. Récapitulatif des descripteurs d'image. Ces descripteurs sont calculés pour chaque colonie de la base de données. Au total, une colonie est donc représentée par un vecteur à 74 variables (rayon, circularité, plus 8 descripteurs calculés à 9 longueurs d'ondes). La base de données complète est donc un tableau à 2253 lignes (une ligne par colonie) et 74 colonnes (une par variable).

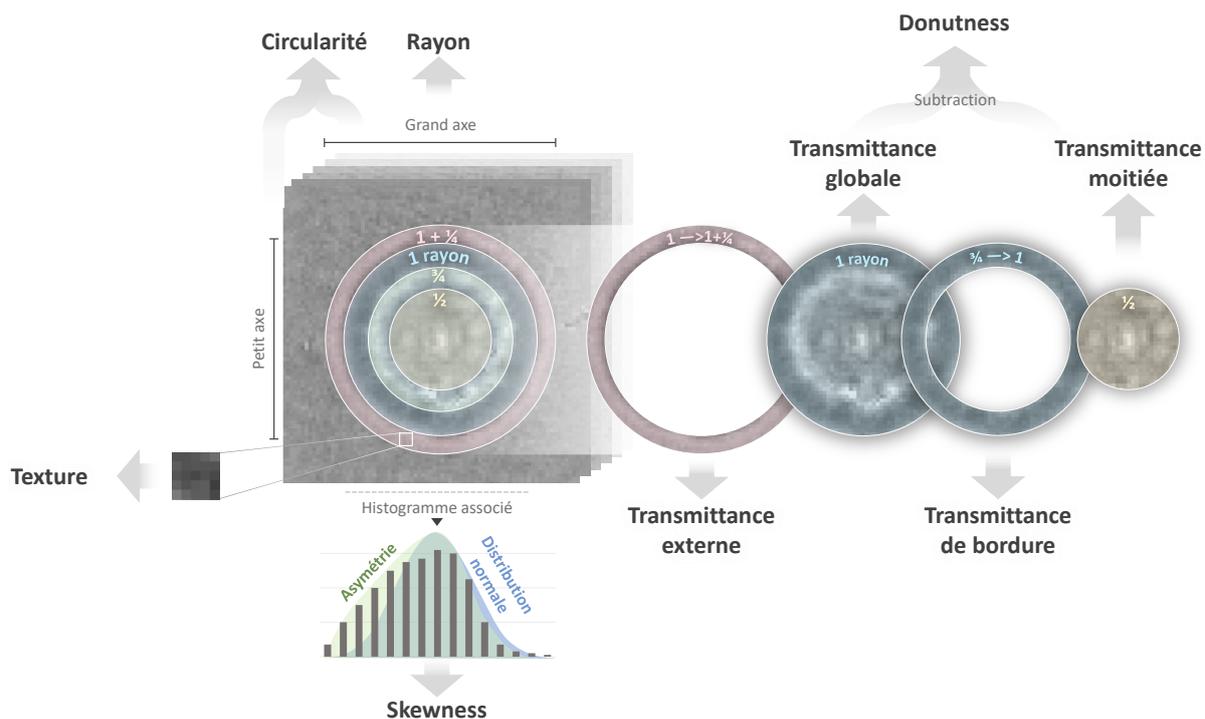


Figure 72. Résumé graphique des descripteurs utilisés. Seuls la circularité et le rayon sont calculés une seule fois, sur l'image à 1655 cm^{-1} , les autres paramètres sont calculés pour chaque image de la pile.

III.2.2. Préparation des données et premiers résultats de classification

À l'issue des calculs, l'ensemble de la base de données peut être représenté sous forme d'un tableau à 74 colonnes (8 paramètres extraits à 9 longueurs d'ondes, 2 paramètres fixes), et 2253 lignes représentant les différentes colonies. Comme évoqué lors de l'exemple sur le diabète, les différentes variables ne sont cependant pas sur des échelles comparables : le rayon d'une colonie varie entre 5 et 30 pixels, tandis que la transmittance moyenne, calculée sur des niveaux de gris encodés sur 14 bits, est susceptible de prendre n'importe quelle valeur entre 0 et 16384. Or, la plupart des classificateurs considèrent que les différentes variables (*i.e.* colonne du tableau) ressemblent à une distribution Gaussienne normale (moyenne=0, écart type=1), il faut donc ramener ces variables sur une échelle comparable (Pedregosa et al. 2011).

Différents procédés de mise à l'échelle existent, chacun étant préconisé pour certaines structures de données (scikit-learn developers 2021a). Ici, nous choisirons le procédé le plus général, appelé *standardisation*, qui ramène la moyenne de chaque colonne à 0 et son écart type à 1 *via* la formule suivante :

$$x_{i,j} \text{ standard} = \frac{x_{i,j} - m_j}{\sigma_j}$$

Avec $x_{i,j}$ la valeur d'une case, m_j la moyenne de la colonne associée et σ_j l'écart-type de la colonne. Ce procédé permet la comparaison entre colonnes et est généralement préféré à une simple remise à l'échelle entre 0 et 1 (scikit-learn developers 2021b).

Une fois la base de données préparée, les performances de classification des algorithmes décrits en III.1.4 sont testées *via* une validation croisée au 1/10. Les résultats sont présentés en Figure 73.

	Taux d'identification correcte (CIR)			Précision
	Moyen	Minimal	Maximal	Moyenne
SVM	0.912	0.860	0.956	0.938
MLPC	0.936	0.885	0.961	0.936
QDA	0.842	0.646	0.967	0.921
LDA	0.867	0.713	0.974	0.854
RF	0.510	0.329	0.700	0.562

Figure 73. Comparatif des résultats de validation croisée pour différents algorithmes classifieurs. La précision est définie comme le rapport entre le nombre d'éléments correctement classifiés pour une classe et le nombre l'éléments attribués à cette même classe, soit $p = \frac{\text{vrais positifs}}{\text{vrais positifs} + \text{faux positifs}}$. Elle donne ainsi une mesure du nombre de faux positifs. La SVM apparait ici comme la méthode la plus précise, devant même le MLPC. Plusieurs architectures de MLPC ont également été testées, mais seule la plus performante d'entre elles est présentée ici. Ce réseau est constitué de deux couches de neurones (respectivement 64 et 32 unités) et est implémenté via la fonction MLPClassifier du module scikit-learn.

La SVM et le MLPC ressortent comme les classifieurs les plus performants, avec des CIRs moyens respectifs de 91.2 % et 93.6 %. Malgré des performances légèrement inférieures à celles du réseau de neurones, la SVM demande des temps de calculs considérablement plus courts, ce qui la rend bien plus pratique d'utilisation. Elle sera donc utilisée comme classifieur principal dans la suite de cette partie. Les performances du MLPC sur des points critiques de l'analyse seront également discutées à des fins de comparaison.

Les premiers essais de classification aboutissent donc à des performances prometteuses. Toutefois, afin d'évaluer la pertinence de nos données et d'améliorer les CIRs obtenus, d'autres tests ont été réalisés. Les paragraphes suivants détailleront donc la pertinence des descripteurs d'image sélectionnés, avant de discuter de l'impact du nombre de longueurs d'ondes d'acquisition sur les résultats de classification. Enfin, les résultats de classification obtenus à l'issue d'une sélection plus soignée des paramètres seront présentés en section III.2.5 (p. 98).

III.2.3. Discussion sur les descripteurs

Les CIRs obtenus en section précédente confirment la pertinence d'au moins une partie des descripteurs sélectionnés. Toutefois, compte tenu du nombre élevé de variables (74 par colonie), il est possible que certains descripteurs soient redondants, voire non-pertinents. Ces données pourraient alors dégrader les résultats par un phénomène qualifié de surapprentissage, ou *overfitting* (Elite Data Science 2017).

Le surapprentissage survient lorsque le classifieur est confronté à des données non représentatives de la variabilité inter-classes. En résulte un modèle spécialisé qui reconnaît parfaitement des données similaires à celles de la base d'apprentissage, mais classe mal un nouvel exemple inconnu (Figure 74). On parle d'une incapacité à généraliser. Les méthodes d'imagerie spectrales sont particulièrement sensibles à ce risque. En effet, l'augmentation du nombre de longueurs d'ondes donne accès à plus de données, mais celles-ci peuvent être redondantes et donc fausser l'apprentissage.

Pour limiter les risques de surapprentissage, il ne faut transmettre au classifieur que les données pertinentes, tout en supprimant au maximum les redondances.

Cette restriction des paramètres à transmettre peut se faire à l'aide d'une Analyse en Composantes Principales, ou PCA (Loukas 2020). Comme évoqué dans la section sur la sélection de longueurs d'ondes (II.1.2, page 42), la PCA est un outil de transformation des données et de réduction dimensionnelle. Elle calcule un petit nombre de variables décorrélées (appelées *composantes principales* et notées PC1, PC2...) expliquant au mieux la dispersion des données sur un grand nombre de variables corrélées (Figure 67 : PCA). Cette dispersion est généralement mesurée par la variance. Contrairement aux algorithmes présentés en III.1.4, la PCA est un algorithme non-supervisé, c'est-à-dire qu'elle ne prend pas en compte la classe des données. Elle est employée pour deux usages principaux : la visualisation des données, puisque la réduction dimensionnelle permet de projeter des données en n dimensions sur une base plus simple, en 2 ou 3 dimensions (voir Figure 99, p.123), mais aussi pour sélectionner les données à transmettre au classifieur.

En effet, chaque composante principale résulte d'une combinaison linéaire des variables originales. Les poids donnés à chaque variable sont liés à la contribution de ladite variable à la variance globale. Ainsi, en sélectionnant les n variables ayant le plus de poids dans PC1 (en valeur absolue), il est possible de créer un vecteur de n descripteurs supposés pertinents à transmettre au classifieur.

Remarque : La sélection de descripteurs par PCA utilise la variance comme mesure des différences observées au sein de la base de données. Cette mesure n'est toutefois pas affectée par les différentes classes présentes dans la base. En conséquence, la variance rend à la fois compte des variations *inter* et *intra*-classes. Dans ce contexte, la pertinence des variables (ou descripteurs) sélectionnées pour répondre à un problème de classification dépendra de la dispersion des données. Les descripteurs indiqués par la PCA ne pourront ainsi être considérés comme pertinents que si les variations entre classes sont supérieures aux variations au sein de chaque classe.

Ici, cette approche a été mise à profit pour sélectionner des vecteurs de descripteurs de taille variables, afin d'évaluer l'impact d'une sélection de données plus restreintes sur les

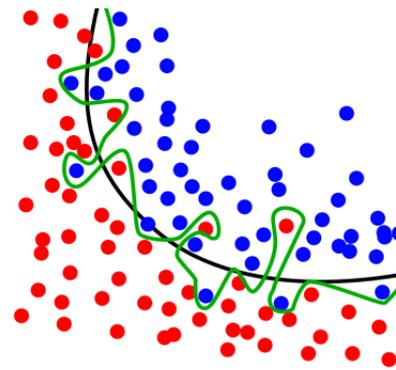


Figure 74. Exemple classique de surapprentissage. La ligne noire montre une séparation classique entre les deux groupes de points, tandis que la ligne verte montre un modèle biaisé. Les points sont parfaitement séparés, mais de nouvelles données seront probablement mal classifiées (source image : Wikipedia, CC BY-SA 4.0).

performances de classification en SVM. En sélectionnant les 42 descripteurs contribuant le plus à la variance, la sélection par PCA permet ainsi une amélioration de 1 point sur le CIR (Figure 75).

	Nombre de descripteurs sélectionnés par PCA								
	10	18	26	34	42	50	58	66	74
CIR	71.2	86.1	89.8	91.2	92.2	92.1	91.6	91.3	91.2

Figure 75. Taux d'identification moyen après réduction de dimension par PCA et classification par SVM. Les CIRs sont donnés en pourcents, avec la valeur maximale surlignée en vert. Le CIR original (74 variables) est mis en évidence en gras. Le nombre de dimensions correspond au nombre de variables sélectionnées ou de composantes principales extraites à l'issue du calcul. Les valeurs (10, 18, 26...) sont choisies pour correspondre au nombre de variables disponibles pour un nombre de longueurs d'ondes d'acquisition données (1, 2, 3...), ce qui sera utile en section III.2.4, p.95.

Ce gain de performance, bien que faible, offre des perspectives intéressantes sur la pertinence des différents descripteurs. En effet, le meilleur résultat (CIR de 92.2 %) a été obtenu en excluant les descripteurs d'image suivants : la skewness, la transmittance externe, un paramètre de texture (similarité de la comatrice), ainsi qu'une partie des données de la demi-transmittance. Ces variables seraient donc redondantes et/ou non pertinentes.

Toutefois, cette sélection a été déterminée d'après la contribution de chaque variable à PC1, qui n'explique ici que 55% de la variance totale. Cette analyse n'est donc pas suffisante pour conclure sur la pertinence de chaque paramètre, c'est pourquoi d'autres approches ont été considérées.

Afin d'identifier les redondances dans les données, nous nous sommes donc intéressés à la corrélation entre les variables. Celle-ci est déterminée par le calcul du coefficient de Pearson, via le module Pandas de python (`pandas.corr(method="Pearson")`). Cette méthode commune associe une valeur entre -1 et 1 pour représenter la corrélation entre deux séries de données, 0 étant une absence de corrélation, 1 une corrélation parfaite et -1 une anti-corrélation parfaite (Nettleton 2014). La matrice de corrélation obtenues pour nos variables est présentée en Figure 76.

Nous constatons tout d'abord une répartition en « blocs », qui traduit une bonne cohérence entre longueurs d'ondes pour un même descripteur d'image. Ce constat est rassurant : il y a généralement plus de corrélation entre deux longueurs d'ondes pour un même descripteur d'image, qu'entre deux descripteurs d'image différents. Quelques exceptions existent malgré tout. Notons principalement la corrélation entre la Transmittance et la *Border intensity* ; entre les deux paramètres de texture tirés de la comatrice ; ainsi qu'entre la différence de la comatrice et le rayon des colonies. Curieusement, il ne semble pas y avoir de corrélation marquée entre la *donutness* et les deux variables dont elle découle : la transmittance et la *half intensity*.

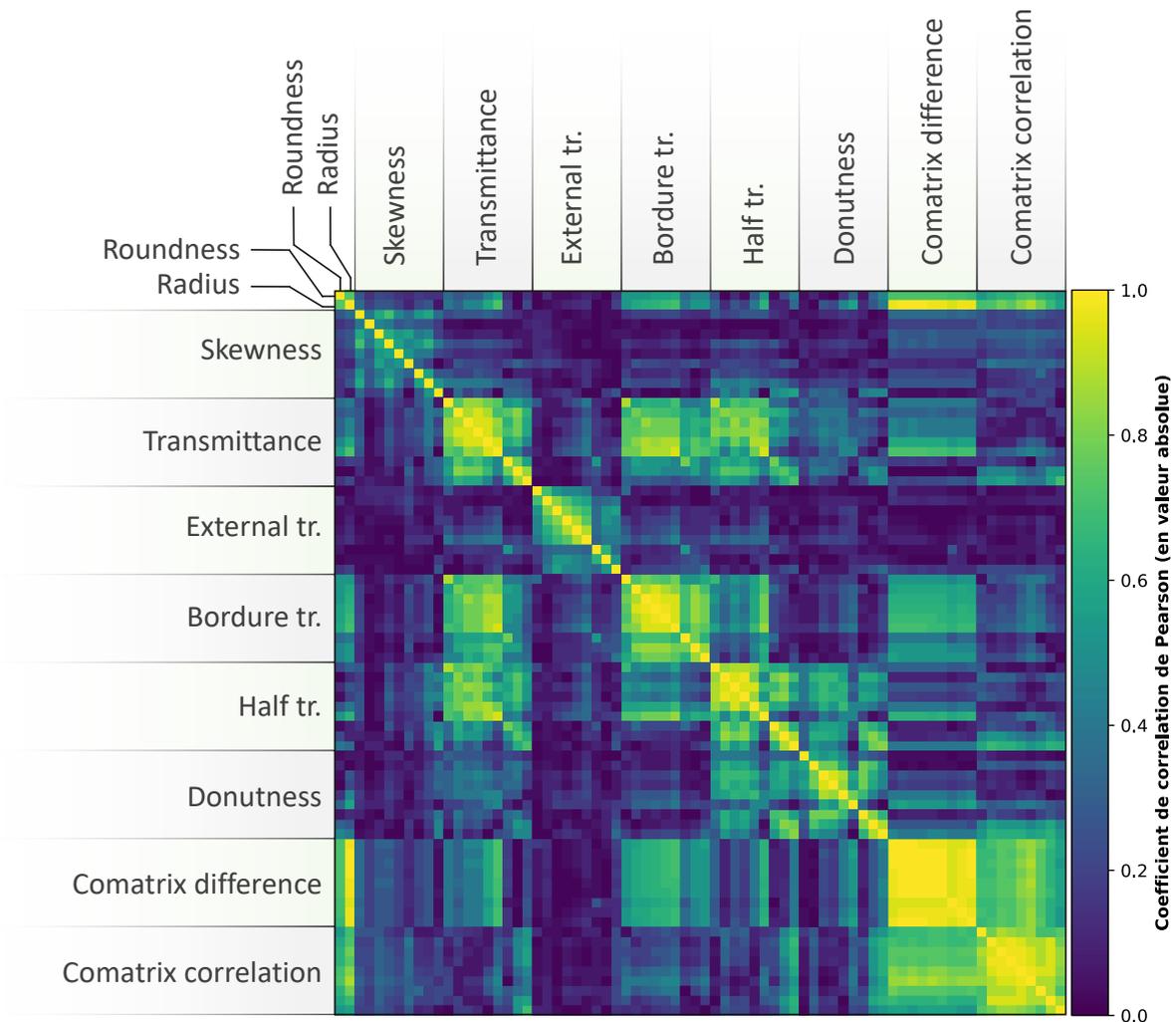


Figure 76. Matrice de corrélation présentant la valeur absolue du coefficient de Pearson pour chaque couple de variable. À l'exception du rayon et de la circularité, chaque variable est considérée pour tous les nombres d'ondes imagés (1235, 1350, 1400, 1468, 1535, 1655, 1715, 1738 et 1800 cm^{-1}).

En retirant la transmittance en bordure et la similarité de comatrice, la classification aboutit à un CIR de 92.3 % en SVM, et 93.3 % en MLPC. On observe donc un gain de performances de 1.2 point en SVM, comparable à celui obtenu via la PCA présentée en Figure 75 (1.1 point). Le constat est plus mitigé pour le MLPC, avec une légère dégradation du CIR (0.3 point). Cette observation paraît cependant cohérente avec le fonctionnement des réseaux de neurones, qui sera détaillé un peu plus loin (partie III.3.1, p.100). Ici, nous dirons simplement que ces algorithmes associent à chaque paramètre donné en entrée un poids. Cette pondération détermine l'importance de chaque paramètre, et permet aux réseaux de neurones de « laisser mourir » les paramètres les moins pertinents (régler leur pondération à zéro).

Une seconde approche, plus brute, consiste à tester l'impact de chaque descripteur sur les performances de classification. Pour ce faire, les calculs ont été répétés, en ignorant à chaque fois les variables liées à un descripteur donné. Les CIRs obtenus sont présentés en Figure 77.

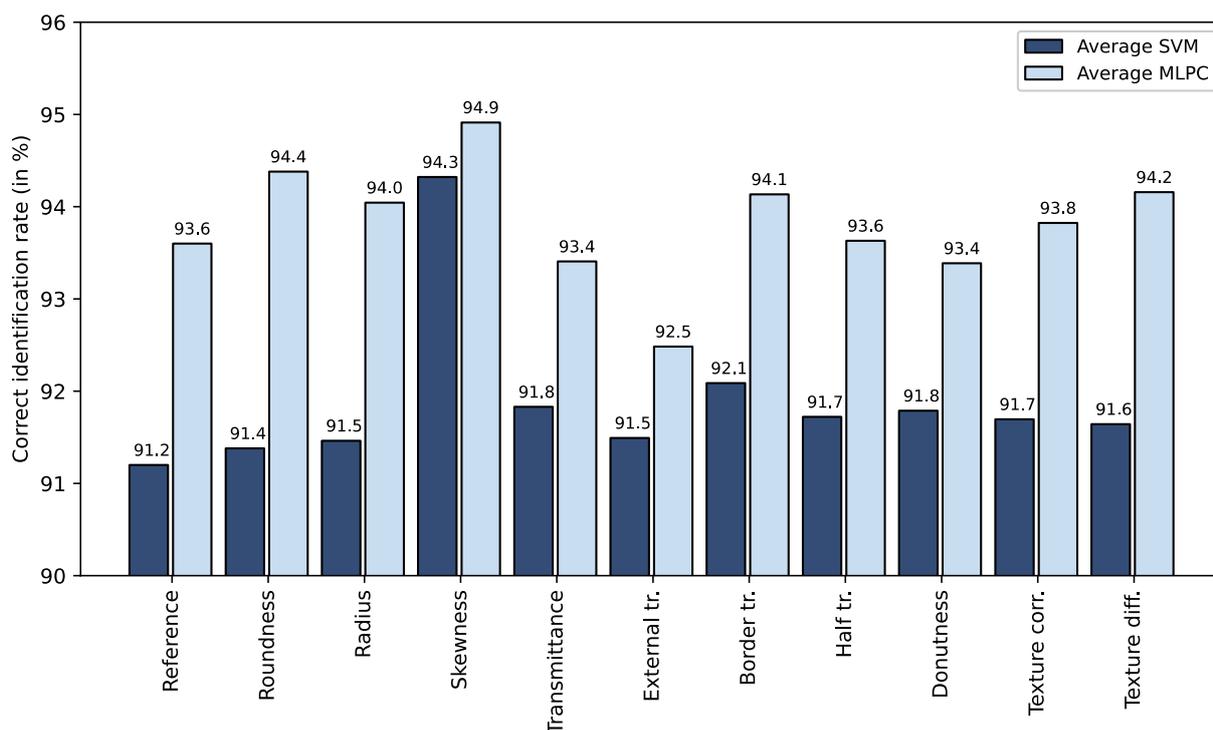


Figure 77. Évolution du CIR en fonction du descripteur d'image ignoré.

La *skewness* ressort comme le paramètre causant le plus de confusion, le CIR montant à 94.4 % en SVM lorsque celle-ci est ignorée, soit un gain de 3 points par rapport à la référence. D'autres candidats ont un effet intéressant, comme la transmittance de bordure (+1.2 point), la transmittance (+1 point) ou encore la *donutness* (+1 point). Ignorer ces trois paramètres simultanément a cependant un impact moins positif sur le CIR que retirer la *skewness* seule (93.3 % contre 94.4 %). Ces impacts sont donc non-cumulatifs, ou *a minima* chemin-dépendants. Les mêmes observations sont rapportées en MLPC.

Pour conclure, plusieurs tests ont été réalisés en ignorant un ou plusieurs des descripteurs pointés par les différentes analyses. Les meilleurs résultats pour la SVM ont été obtenus après retrait de la *skewness*, la transmittance de bordure et la corrélation de texture, aboutissant à un CIR moyen de 94.4 %. En MLPC, seule la *skewness* est retirée pour un CIR de 94.9 %. Nous précisons enfin que les analyses décrites ici ont également été réalisées sur un jeu de paramètres étendu via les polynômes de Zernike. Les résultats sont décrits en Annexe F (p.152), mais se sont avérés moins bons qu'avec les descripteurs d'image initialement choisis.

Une optimisation préalable des descripteurs d'hypercube fournis au classifieur permet une amélioration des performances de classification. Toutefois, cette première approche n'est pas la seule à envisager. En effet, les données d'imagerie multispectrale ont un coût pratique : chaque longueur d'onde imagée allonge la durée d'acquisition d'un échantillon et nécessitera à terme d'ajouter un laser au système d'imagerie. En plus de limiter les données en optimisant les descripteurs (procédé purement post-acquisition), nous pourrions également envisager de restreindre encore le nombre de longueurs d'ondes imagées.

III.2.4. Discussion sur les longueurs d'ondes et apport du multispectral

Les analyses multispectrales reposent sur le principe qu'un nombre restreint de longueurs d'ondes suffit à extraire l'information voulue. Réduire le nombre de longueurs d'ondes

simplifie les acquisitions et l'instrumentation, mais les données parcellaires obtenues peuvent ne pas suffire pour les analyses. Il faut donc un compromis entre sobriété et qualité du signal. Dans cette optique, nous discuterons ici de l'impact du choix des longueurs d'ondes sur les performances de classification.

Remarque 13. Nous reprenons dans cette partie le jeu de données complet tel que décrit Figure 71. La compilation des analyses sur les descripteurs et sur les longueurs d'ondes sera faite en partie III.2.5 (p.98).

Pour commencer, les classifications en SVM ont été répétées en supprimant à chaque fois les informations liées à une longueur d'onde précise. Ce calcul permet de vérifier l'impact d'une image précise sur l'efficacité globale de l'algorithme (Figure 78).

Il apparait qu'ignorer une image, à l'exception de celle à 1715 cm^{-1} , améliore le CIR moyen et ce jusqu'à un gain de 0.75 % pour les images à 1468 et 1655 cm^{-1} . Supprimer certaines images entraine une amélioration des performances similaire à celle observée en couplant PCA et SVM (Figure 75). Les données peuvent donc être simplifiées en trouvant un jeu de longueurs d'ondes optimum pour lequel le CIR moyen est maximisé.

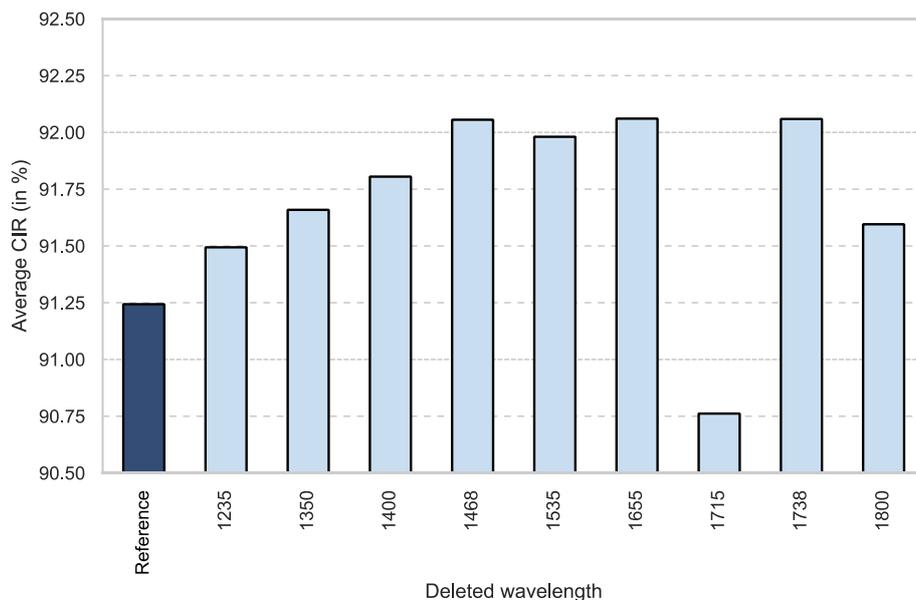


Figure 78. Taux d'identification moyen après retrait d'une image de l'hypercube (classifieur SVM). Le nombre d'ondes de l'image retirée figure en abscisse en cm^{-1} . À chaque classification, tous les descripteurs d'image relatifs à une longueur d'onde ont été ignorés. Le CIR moyen de référence (première barre en partant de la gauche) est obtenu avec toutes les longueurs d'ondes, soit avec 74 variables.

Pour trouver cet optimum, deux approches sont possibles : une recherche exhaustive – ou *force brute* – consistant à tester toutes les combinaisons de longueurs d'ondes, et une approche itérative consistant à ajouter petit à petit les longueurs d'ondes apportant le plus d'informations. C'est cette seconde approche, plus économe en temps et ressources informatiques, qui a été sélectionnée.

Le calcul procède comme suit : tout d'abord, on limite les données pour que la SVM n'ait accès qu'aux informations liées à une seule longueur d'onde. Chacune des neuf longueurs d'ondes est testée et seule celle donnant le meilleur CIR, moyenné sur toutes les classes, est conservée. On répète ensuite l'opération avec la longueur d'onde sélectionnée, qu'on combine une à une

avec toutes les longueurs d'ondes restante. La meilleure combinaison de deux longueurs d'ondes est alors conservée, et ainsi de suite jusqu'à un jeu de neuf longueurs d'ondes. La Figure 79 montre l'évolution du CIR moyen à mesure que les longueurs d'ondes sont ajoutées au jeu de données sélectionné.

En SVM, les CIRs les plus élevés apparaissent ainsi avec un jeu de 5 à 7 longueurs d'ondes. La dégradation des résultats induite par l'ajout des données à 1350 et 1468 cm^{-1} est cohérente avec les courbes PCA de la Figure 29 (page 45), où ces deux nombres d'ondes ne ressortent pas comme des points d'intérêt particuliers. Les images associées sont de plus sensiblement similaires à celles obtenues à 1400 cm^{-1} , (Figure 61, page 74). Le MLPC conserve malgré tout ces données, et gagne une fois encore à travailler sur des données informations plus complètes avec un CIR maximal atteint pour 6 à 9 longueurs d'ondes.

La dégradation des performances observées à la fois en SVM et MLPC par l'ajout des données à 1655 cm^{-1} pourrait quant à elle s'expliquer par la non-pertinence des descripteurs pour ces images. Les colonies étant en effet majoritairement opaques à cette longueur d'onde (voir Figure 61, page 74), les différentes transmittances apportent des informations redondantes. De plus, la faible intensité lumineuse des colonies et leur relative uniformité pourrait faire ressortir d'éventuelles variations liées au capteur. Si enregistrer l'image à 1655 cm^{-1} a donc un intérêt pratique (localisation des colonies, détermination du maximum d'absorbance), la classification en elle-même pourrait gagner à ne pas la prendre en compte.

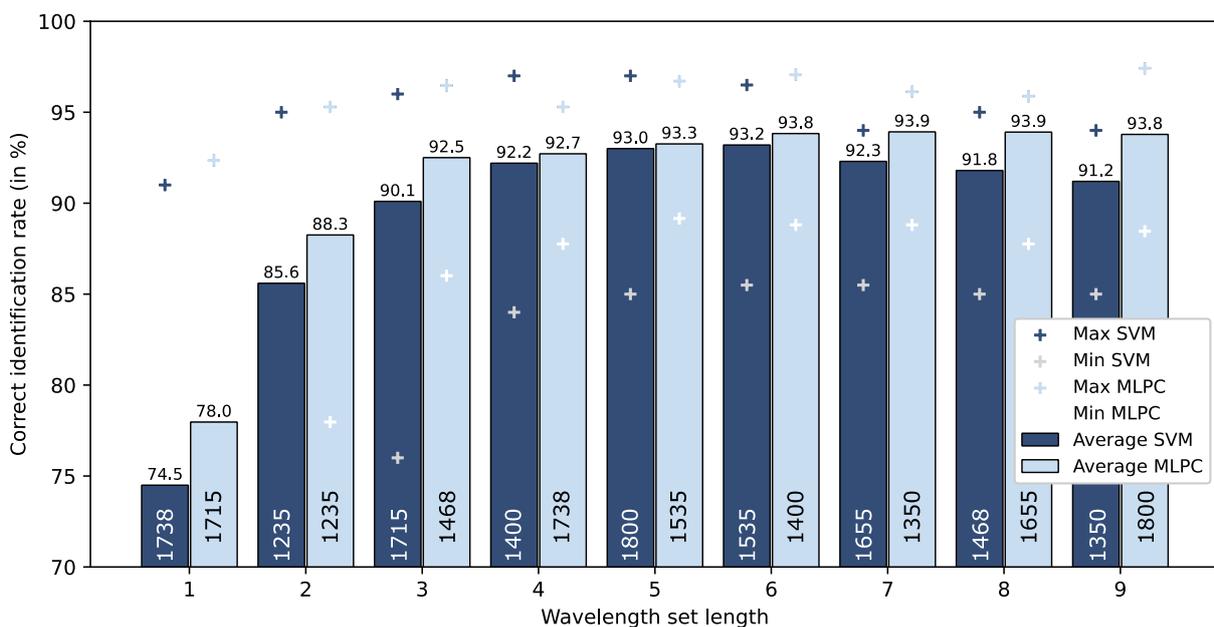


Figure 79. Taux d'identification correcte moyens obtenus par ajout itératif de longueurs d'ondes. Pour chaque jeu de longueur d'onde, un CIR a été obtenu pour chaque classe (souche ou espèce). Les barres grises montrent le CIR moyenné sur toutes les classes, les croix noires le CIR maximal obtenu sur une classe unique, et les croix blanches le CIR minimal. Le nombre d'onde sélectionné à l'issue de chaque étape est affiché au bas de la colonne correspondante (en cm^{-1}).

Il faut toutefois noter que la méthode utilisée en Figure 79 n'est pas absolue. Les résultats d'une étape varient en effet en fonction de l'étape précédente. Ainsi, si les données à 1738 cm^{-1} donnent les meilleurs résultats en SVM lorsqu'elles sont analysées seules, elles pourraient ne plus être les plus pertinentes une fois combinées avec les longueurs d'ondes suivantes. Le même calcul effectué dans l'autre sens (c'est-à-dire en supprimant à chaque étape la longueur d'onde

la moins pertinente) donne ainsi des CIRs sensiblement similaires pour un agencement de longueurs d'ondes différent. Ce type d'approche chemin-dépendant est usuellement corrigé à l'aide d'algorithmes d'optimisation comme le *recuit simulé* – ou *simulated annealing* (Mullen 2014). Cette optimisation n'aurait ici pas grand intérêt puisque les résultats obtenus se basent uniquement sur les quelques espèces acquises. Diminuer au maximum le nombre de longueurs d'ondes d'acquisition simplifiera le système, mais leur sélection exacte doit se faire au regard des espèces ciblées, et non d'une base de données purement théorique. L'optimisation des paramètres trouvera toutefois un intérêt une fois qu'une base de données pratique aura été acquise.

Cette analyse sur les longueurs d'ondes a surtout le mérite d'apporter quelques éclaircissements sur l'apport de l'imagerie multispectrale. Nous notons en effet une nette amélioration des performances dès le passage d'une à deux longueurs d'ondes (74.5 à 85.6% de CIR), et un passage au-dessus des 90% de CIR dès trois longueurs d'ondes d'acquisition. Augmenter le nombre d'acquisitions a donc bien un gain concret sur les performances, ce qui était déjà annoncé par d'autres études (Kim et al. 2017). Le gain est cependant moins important que celui obtenu en travaillant sur les descripteurs d'image. Ces deux approches peuvent toutefois être combinées.

III.2.5. Résultats de classification détaillés

Nous nous attacherons désormais à concilier les analyses présentées dans les deux sections précédentes. Ceci peut se faire de deux façons : soit en optimisant descripteurs d'image et longueurs d'ondes de sorte à obtenir le meilleur CIR possible, soit en privilégiant les aspects pratiques. Ici, c'est cette seconde approche qui a été choisie pour alimenter la discussion autour d'un futur prototype. La priorité est donc donnée aux longueurs d'ondes.

La Figure 79 montre que les deux classifieurs, SVM et MLPC, sont proches de leur maximum de performance pour un jeu de données comprenant six longueurs d'ondes¹. Ces deux jeux de longueurs d'ondes sont donc utilisés comme base. Concernant les descripteurs, répéter l'analyse présenté en Figure 77 indique alors une amélioration du CIR lorsque la *skewness* est retirée pour la SVM. Pour le MLPC, tous les paramètres sont conservés. Les CIRs moyens obtenus sont alors de 94.4 % en SVM et 93.8 % pour le MLPC.

La matrice de confusion obtenue à l'issue de la validation croisée par SVM est présentée en Figure 80.

La classification offre globalement une bonne séparation des classes, avec des CIR allant de 87.1 % à 96.4 %. La plupart des erreurs, toutes classes confondues, proviennent de confusions avec *S. epidermidis*, en particulier la souche SE9, et ce même avec des souches en apparence très différentes. La première explication envisagée pour ce phénomène tenait en la surreprésentation de SE9 dans la base de données (près de 350 exemples contre environ 200 pour les autres classes, voir Figure 64 page 80), qui pourrait biaiser l'entraînement du modèle. Plusieurs tests ont été effectués pour restreindre SE9, puis toutes les souches, à 127 exemples par classe (ce qui correspond au minimum d'exemples disponibles pour une classe donnée).

¹ 1235, 1400, 1468, 1535, 1715 et 1738 cm⁻¹ pour la SVM
1235, 1400, 1535, 1715, 1738, 1800 cm⁻¹ pour le MLPC

Les résultats obtenus sont sensiblement similaires. Il semblerait donc plutôt que le biais en faveur de SE9 soit lié à une représentation de morphotypes plus divers, conséquence indirecte du plus large panel d'exemples enregistrés.

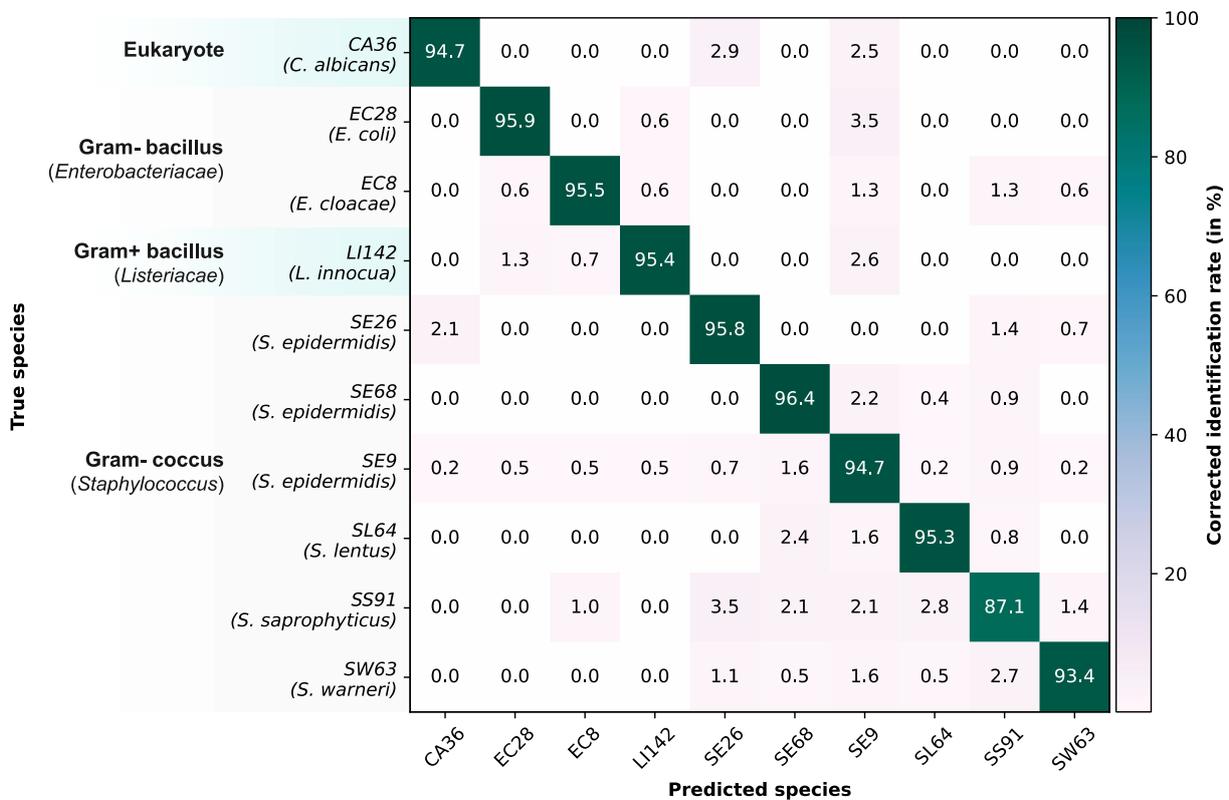


Figure 80. Matrice de confusion en pourcentage, obtenue à l'issue d'un test de classification en SVM et avec une validation croisée au 1/10. Le cycle de validation croisée a été répété 15 fois.

Les autres erreurs proviennent majoritairement de la confusion entre les différentes souches et espèces de staphylocoques, ce qui était attendu compte tenu de leur proximité biologique. Ceci confirme toutefois la cohérence des confusions observées avec les données phylogénétiques. Les confusions intra-espèce sur les trois souches de *S. epidermidis* (SE9, SE26 et SE68) sont toutefois étonnamment faibles (entre 0 et 2.2 %), au point que la distinction entre souches de *S. epidermidis* est bien souvent plus simple que celle entre espèces du groupe *Staphylocoque*. Une explication pourrait venir du fait que la classification phylogénétique se base sur le séquençage d'ARNr 16s. Cette méthode génétique ne rend pas forcément compte de la proximité phénotypique, ce qui a déjà été rapporté comme source d'erreur en spectrométrie FTIR, y compris sur staphylocoques (Wenning et Scherer 2013). Deux souches d'une même espèce peuvent donc avoir des morphotypes facilement différenciables, là où deux espèces génétiquement distantes peuvent avoir des signatures plus proches, et donc plus difficiles à distinguer.

Le MLPC aboutit à des résultats sensiblement similaires.

III.2.6. Conclusion

Cette première approche d'extraction des données via des descripteurs d'images a été testée en combinaison avec deux types de classifieur : le MLPC et la SVM. Après une première étape d'écrémage des paramètres à classifier, le réseau de neurones aboutit à un CIR de 94.9 %, qui

reste le meilleur résultat obtenu avec cette méthode. La SVM quant à elle atteint son efficacité maximale en limitant en plus l'analyse à seulement six longueurs d'ondes, pour un CIR de 94.4 %. Ce dernier point a permis d'alimenter les réflexions autour d'un futur prototype (voir section IV.1.5, page 125), mais nécessite toutefois une précision.

En effet, le jeu de nombres d'ondes ici identifié comme le plus efficace (1235, 1400, 1468, 1535, 1715 et 1738 cm^{-1}) ne peut pas être considéré comme un optimum absolu pour la méthode. D'autres longueurs d'ondes pourraient être plus pertinentes pour distinguer des espèces non représentées dans la base de données. À l'avenir, ces analyses devront donc être répétées si une base de données ciblant une application réelle était enregistrée.

Remarque 14. Concernant ce dernier point, l'analyse présentée en Figure 79 a été répétée sur des sous-ensembles de la base de données. Le nombre de longueurs d'ondes optimal a ainsi pu être déterminé pour une classification à l'espèce, au genre, uniquement sur staphylocoques, ou dans des cas de typage. Comme détaillé en Annexe E (p.150), la classification de chaque sous-ensemble fournit également les CIRs les plus élevés pour 5 à 7 longueurs d'ondes.

Quelques précisions concernant la classification par descripteurs d'images seront apportées en partie IV.1 : Essai de validation croisée dite « stricte » et sources de variabilité expérimentale (p.118). Pour l'heure, nous comparerons plutôt cette approche avec une autre méthode d'analyse d'image. En effet, si les CIRs obtenus ici sont déjà extrêmement encourageants, les descripteurs d'image présentés restent des paramètres simples et ne prennent pas en compte des caractéristiques fines, par exemple des motifs au sein des colonies. D'autres descripteurs pourraient donc améliorer les résultats. Pour trouver de tels descripteurs et comparer la classification actuelle à une autre méthode standard de l'analyse d'image, nous nous intéresserons à présent aux réseaux de neurones convolutifs.

III.3. Classification d'images par réseaux de neurones convolutifs

Dans cette partie, nous nous intéresserons à l'analyse d'image à l'aide d'une classe particulière d'algorithmes d'apprentissage automatique : les réseaux de neurones convolutifs. Ces algorithmes sont conçus pour apprendre à reconnaître des motifs complexes sur une image, sans *a priori* préalable sur son contenu. Nous commencerons ici par présenter le principe des réseaux de neurones artificiels, avant de voir comment une telle architecture peut s'affranchir de descripteurs d'images pour classifier des piles d'images de colonies.

III.3.1. Introduction aux réseaux de neurones artificiels

Les réseaux de neurones artificiels sont des architectures de calcul particulières conçues dans les années 40 (McCulloch et Pitts 1943). Leur fonctionnement s'inspire du système nerveux, et plus particulièrement de son unité de base : le neurone biologique.

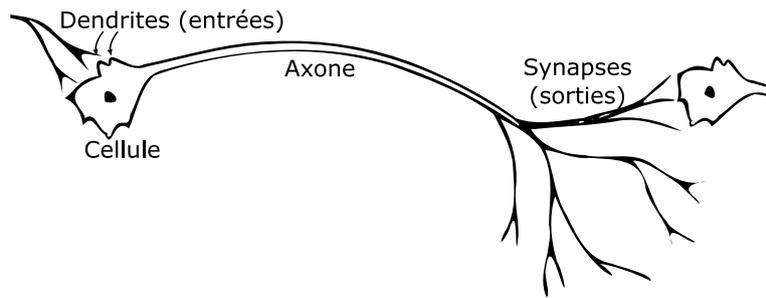


Figure 81. L'inspiration des neurones artificiels : un neurone biologique. Reproduit et adapté depuis *Principles of artificial neural networks* (Graupe 2007).

Au sens biologique du terme, un neurone est une cellule capable de donner naissance à un signal nerveux, appelé *potentiel d'action*. Ce dernier consiste en une variation rapide du potentiel électrique de la cellule, prenant naissance au niveau du corps cellulaire et se propageant le long d'une extension : l'*axone*. Deux conditions sont nécessaires pour qu'un potentiel d'action se propage. Tout d'abord, le neurone doit lui-même recevoir un signal en entrée, au travers de connexions appelées *dendrites*. Par ses dendrites, un neurone peut être connecté à plusieurs centaines d'autres neurones ou récepteurs (Graupe 2007). Toutefois, toutes les connexions ne sont pas équivalentes. Des pondérations, liées au fonctionnement chimique des connexions, donnent plus ou moins de priorité aux signaux entrants, signaux qui peuvent eux-mêmes être excitateurs ou inhibiteurs. Le neurone réalise ainsi une intégration des signaux reçus. Un potentiel d'action ne se déclenche que si la somme des signaux dépasse un certain *seuil*. Il se propage ensuite le long de l'axone, jusqu'à être transmis à d'autres neurones au travers de connexions de sorties appelées *synapses*. La fréquence de répétition des potentiels d'action donne également une information sur l'intensité du signal reçu.

Ainsi, un neurone est une unité biologique intégrée au sein d'un réseau. Elle prend en entrée plusieurs signaux, et donne en sortie un autre signal – ou réponse – dépendant des signaux d'entrée, de leur pondération, et d'un seuil imposé par le neurone.

Conçu par analogie avec son homologue biologique, le neurone artificiel est une unité de calcul numérique. Il est également connecté à d'autres neurones en entrée, et donnera une réponse en sortie. Pour comprendre comment est calculée cette réponse, prenons l'exemple en Figure 82.

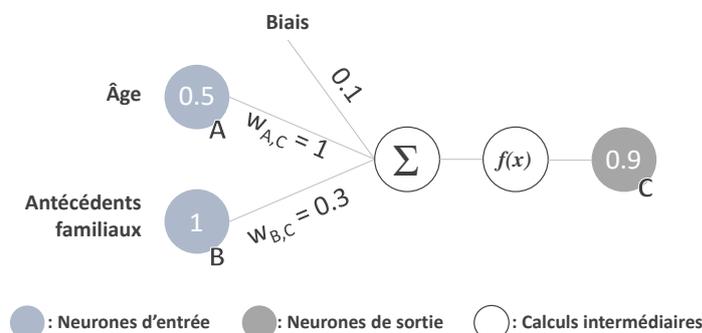


Figure 82. Exemple d'un réseau de neurones simple, comprenant deux neurones d'entrée et une seule sortie.

Le neurone qui nous intéresse ici est le neurone C, en gris à droite de la figure. Il est connecté à deux autres neurones, notés A et B, via des *connexions pondérées* (analogues aux dendrites et synapses). Chaque connexion possède un poids qui va moduler l'intensité du signal transmis

de A vers C, ou de B vers C. Le signal envoyé par un neurone est ici représenté par une valeur, appelée l'*activation*. Pour calculer le signal reçu par le neurone C, il faut donc multiplier l'activation d'un neurone par le poids de la connexion qui le relie à C, puis additionner les résultats de ces multiplications. Sur l'exemple Figure 82, cette somme vaut donc 0.8 ($= 0.5 * 1 + 1 * 0.3$). À celle-ci s'ajoute une valeur intrinsèque au neurone, appelée le *biais*. Par analogie avec le neurone biologique, plus le biais est élevé, plus le neurone déclenchera facilement une réponse, même avec des signaux d'entrée faible. On dit qu'il règle le seuil d'activation.

Enfin, dans le cas du neurone biologique, le neurone possède une dernière action après avoir intégré les signaux d'entrée : une fonction de seuil, qui déclenche ou non le potentiel d'action. Ici, ce seuil est remplacé par une fonction dite *fonction d'activation*, qui modifie le signal reçu par le neurone C. La fonction d'activation peut avoir différents effets (voir Figure 83), dans le but de rompre la linéarité des calculs.

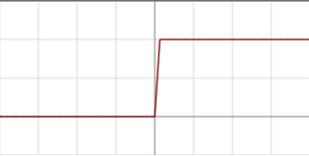
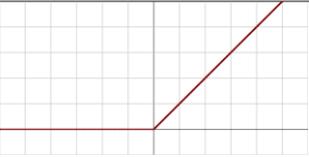
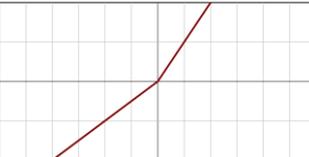
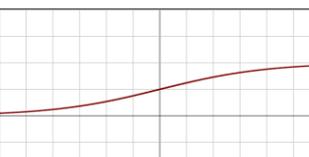
Nom	Fonction	Graph	Commentaire
Heaviside / fonction marche	$f(x) = \begin{cases} 0 & \text{si } x < 0 \\ 1 & \text{si } x \geq 0 \end{cases}$		Fonctionnement « tout ou rien », analogue au seuil d'un neurone biologique.
ReLU (Rectified linear unit)	$f(x) = \max(0, x)$		Insiste sur l'importance des valeurs positives. Couramment utilisée en convolution, son principal défaut est de ne donner aucune importance aux neurones d'activation inférieure ou égale à 0.
Leaky ReLU	$f(x) = \max(\alpha x, x)$		Corrige le problème de ReLU par l'ajout d'un facteur α (généralement 0.1 ou 0.01) qui diminue l'impact des résultats négatifs, sans complètement les éteindre
Sigmoïde	$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}}$		Ramène n'importe quelle entrée à une sortie entre 0 et 1. Particulièrement utile en classification.
SoftMax	$f(x)_j = \frac{e^{x_j}}{\sum_{k=1}^K e^{x_k}}$	<i>Non traçable.</i> La fonction prend en entrée un vecteur de K nombres, et le transforme en un nouveau vecteur de K nombres compris entre 0 et 1, et dont la somme vaut 1.	Particulièrement utilisée en classification, puisqu'elle donne une sortie finale pouvant être interprétée comme une probabilité

Figure 83. Fonctions d'activation utilisées dans ces travaux de thèse. Il convient de noter que si les fonctions notées ici sont parmi les plus usuelles en classification, il en existe de nombreuses autres. Si certaines fonctions sont privilégiées pour certains types de calcul, la fonction la plus adaptée à un problème donné est souvent déterminée de façon empirique. Source images : Wikimedia, attribution CC4.0 (Wikipedia, 2021).

Jusqu'ici, le réseau ne fonctionne que par une suite de sommes et de multiplications, soit une simple combinaison linéaire. L'application d'une fonction d'activation non-linéaire donne plus de poids à certaines informations qu'à d'autres, ce qui rompt la linéarité des calculs. Cette non-linéarité est modulable par un vaste choix de fonctions d'activation (voir Figure 83), et est l'un des intérêts majeurs des réseaux de neurones, qui peuvent ainsi résoudre des problèmes plus complexes qu'un algorithme linéaire (Cybenko 1989).

En généralisant les principes présentés sur la Figure 82, l'activation d'un neurone j est donc calculée comme suit :

$$a_j = f \left(w_{j,0} + \sum_{i=1}^n a_i w_{j,i} \right)$$

Avec a l'activation, $w_{j,i}$ le poids de la connexion entre les neurones j et i , $w_{j,0}$ le biais intrinsèque au neurone, f la fonction d'activation et n le nombre de neurones connectés en entrée du neurone j . L'activation ainsi calculée est la valeur que transmet le neurone j aux neurones qui lui sont connectés en sortie.

Un réseau de neurones artificiels est donc un ensemble d'unités de calcul, échangeant des valeurs (activations) *via* un système de poids et de biais, conditionné par une fonction non-linéaire.

Toutefois, contrairement à leurs homologues biologiques, l'organisation des neurones artificiels est contrainte par un système de couches successives. Les neurones d'une couche ne peuvent recevoir des activations que de la couche précédente, et ne transmettent la leur qu'à ceux de la couche suivante. La transmission de l'information est orientée. La Figure 84 représente par exemple un réseau à deux couches : une couche dite *d'entrée*, composée de quatre neurones (en bleu à gauche), et une couche de *sortie* à deux neurones (en gris à droite). La première couche sert à entrer dans le réseau une série de variables : par exemple les données médicales d'un patient non-atteint de diabète de type 2. Il y a donc autant de neurones dans cette couche que de variables à considérer. La couche de sortie, quant à elle, fournit les résultats du calcul. Ici, l'activation des deux neurones notés « Sain » et « À risque » représente la probabilité que le propriétaire des données d'entrée appartienne à l'une ou l'autre de ces classes.

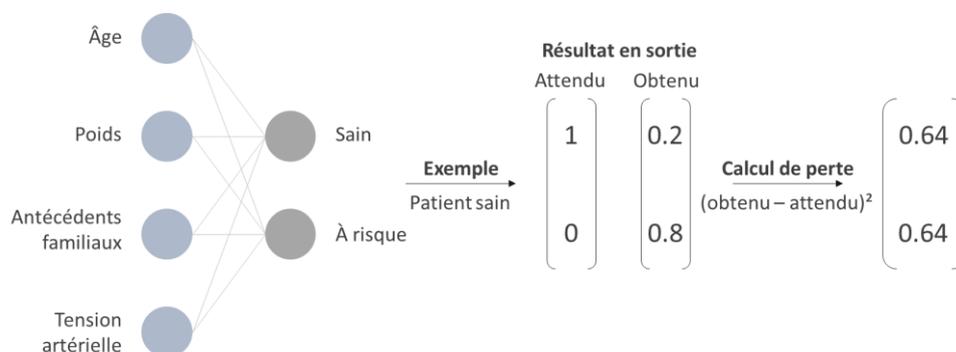


Figure 84. Exemple de réseau de neurone à deux couches et calcul de la perte du réseau, illustré sur le cas du diabète de type 2. Notons que ce réseau est prévu pour la classification, ce que trahit la présence de deux neurones sur la couche de sortie. Pour le cas du diabète, le réseau aurait pu être conçu avec un seul neurone de sortie, représentant un facteur de risque.

Un réseau de neurones artificiels est donc organisé en couches. La couche d'entrée permet de fournir les données au réseau : l'activation de ses neurones prend la valeur des variables fournies. Une ou plusieurs couches intermédiaires (absentes en Figure 84, un exemple de réseau à quatre couches est présenté en Figure 86) échangent et modifient ses activations sans intervention de l'utilisateur. On parle de couches *cachées*. Enfin, l'activation des neurones de la couche de sortie donne le résultat du calcul (une ou plusieurs valeurs numériques, selon le nombre de neurones de la couche).

Le résultat du calcul dépend donc uniquement du nombre de couches et de neurones, des poids des connexions, des biais et des fonctions d'activation appliquées.

Lors de la définition de l'architecture du réseau, l'utilisateur va définir pour chacune de ces couches le nombre de neurones qu'elle contient, la fonction d'activation des neurones de la couche, ainsi que le type d'opération à réaliser (voir section suivante, page 100). Les biais des neurones et les poids des connexions sont initialisés de façon aléatoire entre 0 et 1. Lorsque des données sont entrées dans ce réseau tout juste créé, les résultats obtenus en sortie sont donc entièrement aléatoires. Pour que le réseau soit capable de résoudre un quelconque problème, il faut encore modifier ces poids et biais jusqu'à obtenir les résultats attendus : il faut apprendre.

Remarque 15. L'utilisateur définit donc la structure du réseau en fonction de ses besoins. Le nombre de neurones en entrée et sortie est choisi selon le format des données souhaité, tandis que la configuration des couches cachées (nombre de couches, nombre de neurones par couche, fonction d'activation) définit la complexité des calculs. Toutefois, après l'initialisation, l'utilisateur n'a plus de contrôle sur les poids et biais. S'il connaît encore la valeur d'activation des neurones d'entrée et de sortie, les neurones des couches intermédiaires restent généralement inaccessibles, d'où le nom de couches *cachées*. Pour cette même raison, les réseaux de neurones artificiels sont parfois qualifiés de *boîtes noires*.

III.3.1. Apprentissage des réseaux de neurones par descente de gradient et rétropropagation

Le principe de l'apprentissage est le même pour les réseaux de neurones que pour les algorithmes d'apprentissage automatique discutés jusqu'ici. Il fait appel à une partition d'entraînement, une partition de test, mais également à une fonction de coût. Ici, nous approfondirons la façon dont l'apprentissage modifie les paramètres du réseau (poids et biais, aussi appelés *paramètres entraînaibles*) pour obtenir les résultats attendus.

Dans le cas des réseaux de neurones, l'apprentissage est un procédé itératif. On commence par fournir au réseau plusieurs exemples – données d'entrée – pour lesquels on connaît à l'avance le résultat attendu en sortie (par exemple, les données médicales de patients d'état de santé connu, voir Figure 86 : Forward, page 107). Pour chaque exemple, le réseau va donc fournir une prédiction. Cependant, lors de cette première passe, les poids et biais étant toujours dans leur état d'initialisation (aléatoire entre 0 et 1), les résultats obtenus sont généralement incohérents. Pour améliorer le réseau, la première étape est donc de savoir à quel point ces résultats sont éloignés de ce qui était attendu, et pourquoi.

Mesurer la concordance des résultats à la réalité se fait à l'aide d'une nouvelle fonction – appelée *fonction de perte* – qui compare, pour chaque neurone de la couche de sortie, le résultat prédit au résultat attendu (0 ou 1 dans le cas d'une classification, comme présenté en Figure

84). Il existe plusieurs fonctions de perte, l'une des plus simples étant la fonction $L2$ (Moon 2018), définie comme suit :

$$J(w) = \sum_{i=0}^n (y_i - h_w(x_i))^2$$

Avec J la fonction de coût, y_i le résultat attendu pour l'échantillon i et h_w la fonction représentant les opérations du réseau de neurones (*i.e.* le résultat des modifications par les poids, biais et fonctions d'activations des différents neurones). i désigne un exemple d'une base de données contenant n échantillons. w représente ici l'ensemble des poids et biais du réseau. $h_w(x_i)$ correspond donc à la valeur réellement obtenue pour l'échantillon i après calcul par le réseau. Le coût J est donc une fonction des paramètres entraînaibles w .

En résumé, la fonction de coût donnera une valeur faible si le résultat fourni par le réseau est proche de ce qui était attendu, élevé s'il s'en éloigne. Après passage de tous les exemples d'entraînement dans le réseau – ce qu'on appelle une « époque » – la somme des coûts définit ainsi la performance globale. Améliorer le réseau revient donc à minimiser ce coût global, parfois appelé *perte*, ayant été accumulé sur tous les échantillons de la base d'apprentissage.

La configuration des neurones, la fonction d'activation et les exemples d'entraînement étant fixés par l'utilisateur, le coût dépend uniquement des valeurs des poids et des biais. Or, selon la complexité du réseau, ces derniers peuvent être des centaines, voire des milliers. La fonction de coût dépend donc de centaines, voire de milliers de variables. Trouver le minimum global de cette fonction par calcul analytique est donc extrêmement difficile – sinon impossible. Cependant, il est possible de résoudre ce problème d'optimisation par petites étapes successives, grâce à un algorithme appelé la *descente de gradient* (ou SGD pour *Stochastic Gradient Descent*).

La descente de gradient est souvent présentée par analogie avec une balle lâchée le long d'une pente (Nielsen 2015). Celle-ci va descendre en suivant à chaque instant la direction de la pente maximale, et ce jusqu'à atteindre un minimum : le bas de la pente (Figure 85). De la même manière, si le minimum de la fonction de coût ne peut être trouvé immédiatement, on peut, à chaque époque, connaître la tendance globale de la pente : le *gradient*. À chaque époque, et après calcul du coût global, on va donc fixer l'intégralité des paramètres du réseau, à l'exception d'un poids ou d'un biais donné (noté w_i de façon généralisée). En modifiant légèrement la valeur de cet unique paramètre, on peut déterminer son impact sur la fonction de coût. Selon le résultat, la valeur du paramètre pourra être augmentée ou diminuée.

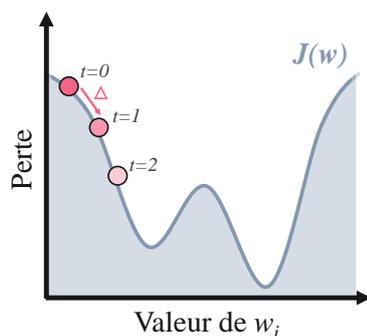


Figure 85. Illustration de la descente de gradient. Entre chaque époque (noté t), la descente de gradient calcule la direction de la pente pour un paramètre donné (w_i). La valeur de w_i est ajustée en fonction de ce gradient. D'époque en époque, w_j approche ainsi d'un minimum (qui peut être global ou uniquement local).

Mathématiquement parlant, la descente de gradient peut être formalisée comme suit (Qian 1999; Seth 2021) :

$$w_i^{t+1} = w_i^t - \alpha \frac{\partial}{\partial w_i} J(w)$$

Avec w_i^t la valeur du paramètre entraînable considéré, w_i^{t+1} la nouvelle valeur déterminée par la descente de gradient pour ce même paramètre, $\frac{\partial}{\partial w_i} J(w)$ la dérivée partielle de la fonction de coût par rapport au paramètre considéré, et enfin α un facteur appelé le *taux d'apprentissage* (Remarque 16).

Remarque 16. Le taux d'apprentissage règle l'amplitude de modification des paramètres à chaque époque, soit en quelque sorte la « vitesse » à laquelle la descente de gradient tend vers le minimum. Un taux d'apprentissage trop faible impliquera plus d'étapes de calcul et donc un procédé plus lent. À l'inverse, un taux d'apprentissage trop élevé peut mener à une amplitude de variation trop importante et donc empêcher la convergence du calcul (Seth 2021). Ce paramètre doit donc être correctement réglé.

À chaque époque, le réseau se rapproche ainsi de la configuration garantissant le coût le plus faible possible, et donc les résultats les plus proches de ce qui était attendu. Les époques de calcul sont répétées itérativement jusqu'à ce que le calcul converge vers un minimum. Notons ici que ce minimum n'est pas nécessairement le minimum global de la fonction, mais peut être un minimum local (voir Figure 85). Le minimum vers lequel tendra l'algorithme dépend de l'initialisation du réseau. Notons également que des variantes de SGD existent aujourd'hui, comme par exemple l'algorithme Adam (Kingma et Ba 2017).

Dans le cas de réseaux de neurones multicouches, les poids et biais à optimiser ne concernent pas seulement les neurones de la couche de sortie, mais également ceux des couches intermédiaires. En conséquence, la descente de gradient doit d'abord calculer les modifications à appliquer sur les paramètres de la couche de sortie, puis ceux de la précédente, et ainsi de suite jusqu'à revenir à la couche d'entrée (Figure 86 : backward). On parle alors de *retropropagation* des erreurs, ou *backpropagation* (Werbos 1982; Rumelhart et al. 1986).

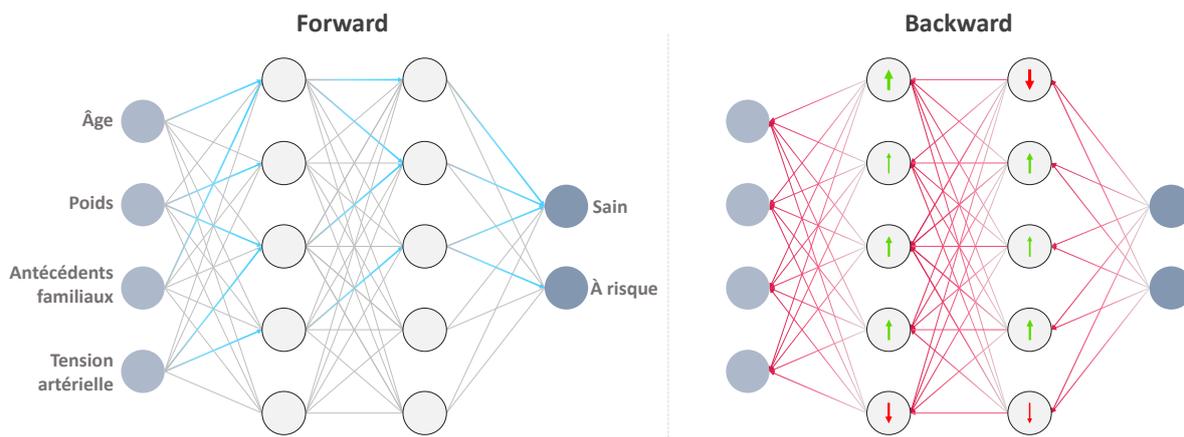


Figure 86. Illustration d'une époque d'apprentissage sur un perceptron à quatre couches. Passe Forward : tous les exemples d'entraînement passent dans le réseau. Les poids et biais des neurones calculent les activations pour les transmettre d'une couche à la suivante. Passe Backward : auto-ajustement du réseau. La rétropropagation des erreurs part de la couche de sortie, trouve quels paramètres influent le plus sur la fonction de coût par descente de gradient, et les ajuste en conséquence. Elle passe ensuite à l'avant dernière couche, puis l'avant avant dernière, etc. Ici, seuls les ajustements des biais ont été schématisés pour des questions de lisibilité.

En conclusion, un réseau de neurones est donc constitué de plusieurs couches d'unités de calcul. Ces unités échangent et modifient des activations via un ensemble de biais, de connections pondérées et d'une fonction d'activation. C'est l'optimisation pas-à-pas de ces poids et biais par la rétropropagation et la descente de gradient qui donne au réseau la capacité d'apprendre et de s'auto-améliorer au fil des itérations.

Si ce principe de calcul est à la fois gourmand en ressources informatiques et difficile à appréhender de par son aspect boîte noire (ce qui freine d'ailleurs son acceptation dans le domaine médical (Kazemnejad et al. 2010)), il a été démontré que les réseaux de neurones multicouches permettent d'approximer n'importe quelle fonction continue à n variables grâce à un empilement de fonctions non-linéaires (Cybenko 1989). De plus, la démocratisation de modules d'apprentissage automatique comme Scikit-learn ou Keras permettent aujourd'hui à n'importe quel utilisateur de concevoir un réseau de neurones, et ce sans connaissances étendues sur leur fonctionnement ou même sur le problème à résoudre (Graupe 2007). Depuis les années 80, ces architectures ont donc été mises à profit sur des problèmes allant de l'écriture automatisée de fanfictions de Harry Potter (Suwandi 2020), à la victoire médiatisée de l'ordinateur Alpha Go contre le champion du monde de jeu de Go (Silver et al. 2017), en passant par ce qui nous intéresse ici : la classification d'images.

Cette dernière application pose cependant un certain nombre de problèmes, le premier étant le volume de données à traiter. Si un réseau comme celui présenté en Figure 86 (surnommé *perceptron multicouche*) était adapté à la classification de données médicales, où chaque exemple est représenté par un vecteur d'une quinzaine de nombres, il l'est moins pour analyser des images. Chaque neurone ne pouvant ici travailler que sur une unique valeur, le réseau demande autant de neurones d'entrée que de pixels dans l'image (ce qui alourdit considérablement les calculs lorsqu'on travaille sur des piles d'images de $80 * 80 * 9$ pixels), et n'est pas adapté à l'extraction de caractéristiques précises comme des bordures ou des motifs récurrents. Il faut donc simplifier et traiter différemment le problème. Une première approche passe par l'utilisation de descripteurs *ad hoc*, comme décrit en section III.2, mais il est

également possible de réaliser l'extraction des descripteurs directement *via* le réseau, à l'aide de couches de neurones particulières : les couches de neurones convolutifs.

III.3.2. Les réseaux de neurones : des structures organisées en couches.

Comme évoqué précédemment, un réseau de neurones est composé d'un empilement de couches successives, échangeant entre elles des activations. Les réseaux traditionnels comme le *perceptron multicouche* étaient constitués de couches reposant toutes sur la même structure de neurone : une unité connectée à chaque neurone de la couche précédente et à chaque neurone de la couche suivante. Si ce type de couche, appelée couche *dense* ou *fully connected*, reste largement employé dans les réseaux de neurones modernes, il y est suppléée par des couches spécialisées travaillant parfois sur des données en 2, 3 dimensions ou plus (Gulli et Pal 2017; Keras). Citons parmi les principales :

Dense : comme évoqué précédemment, la couche dense est un empilement classique de neurones entièrement connectés. L'idée est ici de pondérer et de recombinaer des paramètres d'entrée à transmettre à la couche suivante, ce qui permet d'apprendre. Ce type de couche est également utilisé en sortie de réseau pour compiler les données des autres couches. Dans le cas particulier de la classification, on place en fin de réseau une couche dense avec autant de neurones que de classes possibles. Chaque neurone représente alors une classe. Une fonction d'activation sigmoïde ou SoftMax est appliquée sur chaque neurone de la couche pour conserver les activations entre 0 et 1 (voir Figure 83). Pour un exemple donné, on attend en sortie un vecteur contenant des valeurs proches de 0, à l'exception d'une seule valeur proche de 1, qui désigne alors la classe prédite par le modèle. Ce principe a déjà été appliqué en partie III.2 pour la classification de descripteurs *ad hoc* à l'aide du classifieur MLPC.

Dropout : désactive une fraction des neurones d'une couche pendant la phase d'apprentissage, puis les réactive pour la phase de test. Ces neurones n'auront donc pas appris pendant l'époque en cours, ce qui limite certains phénomènes de surapprentissage.

Convolution : couche spécialisée pour la reconnaissance de motifs au sein de données matricielles. L'application classique est l'analyse d'images, mais il existe également des couches de convolution 1D et 3D. Le principe de la convolution par réseaux de neurones est exposé en détail dans la prochaine section.

Maxpooling : fréquemment associée à une couche de convolution, une couche de MaxPooling 1, 2 ou 3D vise à réduire la taille des données reçues en entrée. Ce sous-échantillonnage limite les risques de surapprentissage, et réduit les besoins en termes de puissance de calcul.

Flatten : transforme des données multidimensionnelles (images, hypercubes, etc) transmises par la couche précédente en vecteur. On parle de *linéariser* les données. Une couche *flatten* sert généralement à passer d'une couche de convolution ou de Maxpooling à une couche dense.

III.3.3. Les réseaux de neurones convolutifs et l'analyse d'image

La convolution par réseau de neurones est un procédé visant à se passer de la définition manuelle de descripteurs. En pratique, le réseau va donc apprendre les caractéristiques à extraire *via* des opérations de filtrage, puis utiliser ces descripteurs pour la classification. La différence

avec le MLP présenté en section II.2 vient donc de l'ajout de plusieurs couches dédiées à l'apprentissage des descripteurs.

Ce procédé travaillant directement sur les images, il permet une analyse sans *a priori*, c'est-à-dire sans connaissance préalable sur le contenu de celles-ci. Ce genre de réseau est couramment utilisé pour reconnaître des formes difficiles à décrire, telles qu'un visage ou un animal. Dans une unité de convolution, le calcul n'est plus une simple combinaison linéaire modifiée par la fonction d'activation, mais une transformation par convolution, selon le principe décrit en Figure 87. Les autres aspects du réseau (fonction d'activation, connexions entre couches, descente de gradient, etc.) restent les mêmes.

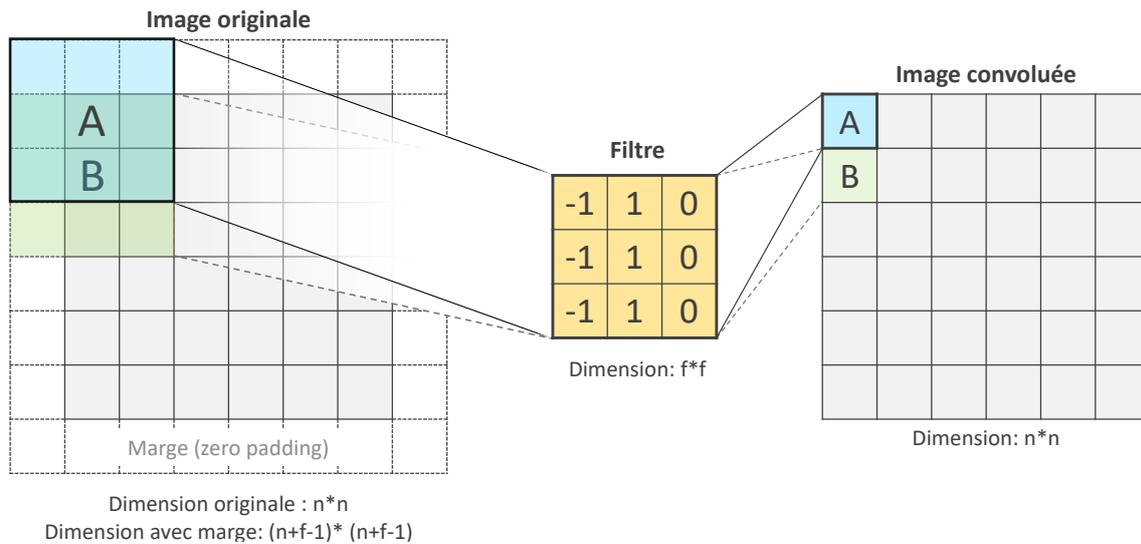


Figure 87. Principe de la convolution. Le procédé est ici illustré sur une image 2D, mais fonctionne sur le même principe en 1D et 3D. Chaque neurone de la couche possède un filtre de dimension $f * f$ (matrice jaune). Celui-ci constitue une matrice de poids, d'abord appliquée sur la zone A de l'image de gauche (un groupe de pixel de dimension $f * f$). Chaque pixel de cette zone est multiplié par la valeur correspondante du filtre, puis la somme de ces valeurs est assignée au pixel A de l'image de droite. Le filtre est ensuite décalé d'un pixel, et l'opération répétée. Nous noterons l'ajout d'une marge sur le pourtour de l'image de gauche, constituée de pixels valant tous 0 et servant à éviter le recadrage par l'opération de convolution. Ce procédé est appelé le zero-padding.

Les filtres de convolution font ressortir certaines caractéristiques d'une image comme une texture, des bordures ou encore la présence de certains motifs. Par exemple, le filtre – ou *noyau* – présenté en Figure 87 et appliqué en Figure 88, est conçu pour détecter les bordures verticales. L'image résultant du filtre (à droite sur les exemples ci-dessous) est appelée une carte de caractéristique.

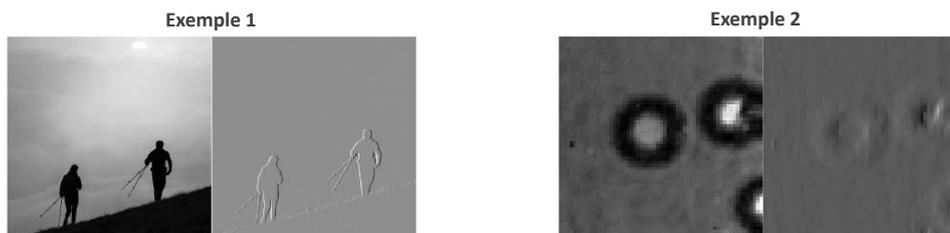


Figure 88. Exemples d'images et résultat de convolution par le filtre de la Figure 87. L'exemple 1 présente un cas simple de détection des contours verticaux sur une photographie en niveaux de gris. L'exemple 2 est tirée de notre base de données. Le résultat de convolution y est plus difficilement interprétable, mais montre le genre d'images sur lesquelles travaillent les réseaux de neurones convolutifs.

Dans le cas d'un réseau de neurones convolutif, chaque neurone (ou *plan de convolution*) d'une couche est associé à un noyau différent, initialisé de façon aléatoire. Une fois encore, c'est la rétropropagation des erreurs et la descente de gradient qui, au cours de l'apprentissage, ajuste les coefficients des noyaux pour faire ressortir une caractéristique de l'image (un bord, une texture particulière, ...). Ce type d'analyse d'image demande peu de prétraitements de la part de l'utilisateur.

En sortie d'une couche de convolution, on dispose donc d'autant de cartes de caractéristiques qu'il y a de neurones dans la couche. Ce procédé augmente sensiblement la quantité de données envoyée à la couche suivante. De $80 \times 80 \times 9$ pixels en entrée, on passe à $80 \times 80 \times 9 \times n$ pixels en sortie, avec n le nombre de neurones de la couche de convolution (en général, 32, 64 ou 128). C'est pourquoi une couche de convolution est généralement couplée à un sous-échantillonnage des images, qui vise à réduire la quantité de données (Signoroni et al. 2018). La couche de sous-échantillonnage la plus utilisée applique une fonction appelée MaxPooling, qui considère les pixels de l'image par groupes de taille $f \times f$, et ne conserve à chaque fois que le pixel de valeur la plus élevée (Figure 89). On complète ces opérations par une fonction d'activation appliquée sur les images (généralement ReLu), le plus souvent placée après la convolution et avant le MaxPooling.

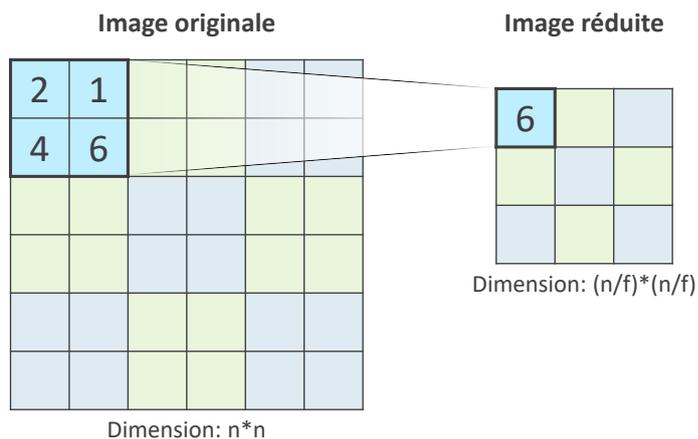


Figure 89. Principe du MaxPooling. La fonction définit un filtre (ici 2×2 pixels) qui parcourt l'image originale. Pour chaque groupe de pixels, on ne conserve que le pixel de valeur maximale. Une image est enfin recomposée à partir de ces valeurs. Ce procédé conserve certaines informations de l'image tout en réduisant fortement ses dimensions.

Un réseau de neurones convolutif est ainsi constitué d'un empilement de couches de convolution (1, 2 ou 3D) et de MaxPooling (également 1, 2 ou 3D). La multiplication des couches à nombre de filtres croissants permet de chercher des caractéristiques de plus en plus fines dans l'image. Une fois les caractéristiques extraites, la fin du réseau est un classifieur classique constitué : d'une couche de linéarisation (flatten), éventuellement d'un dropout pour limiter le surapprentissage, puis de plusieurs couches denses pour traiter et classifier les données (voir Figure 91).

Cependant, ce type d'approche est sensible à la position et la rotation des zones d'intérêt de l'image (Dieleman et al. 2015), ce qui nécessite de nouveaux prétraitements. Le centrage des colonies sur les images affranchit des problèmes de position. La rotation est en partie prise en compte par le sur-échantillonnage des hypercubes, comme décrit par Dieleman et al. Celui-ci consiste à dupliquer les images du groupe d'entraînement pour leur appliquer une rotation 90° , 180° et 270° . Cette étape multiplie donc par 4 le nombre d'images d'entraînement. Enfin, les

arrière-plans sont masqués (ramenés à 0), pour que seule une colonie apparaisse sur chaque image. Ce nouveau pré-traitement aboutit à des images comme présentées en Figure 90.

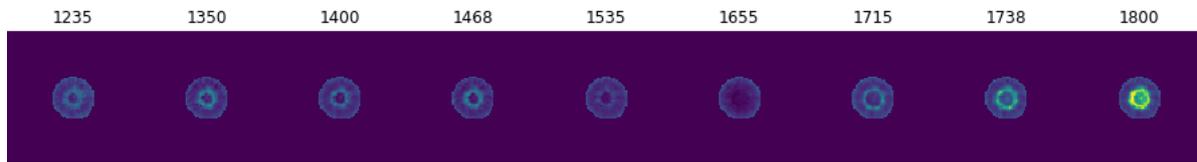


Figure 90. Exemple de pile d'images masquées et centrées telle que fournies aux réseaux de neurones. La colonie ici montrée est une EC8. Trois autres piles d'images (non présentées) sont obtenues par rotation de cette même colonie au cours du sur-échantillonnage. Les nombres d'ondes sont indiqués en cm^{-1} .

III.3.4. Résultats de classification par réseau de neurones convolutifs

À l'issue de la préparation des données, la base de données est composée de 2253 piles de 9 images, appartenant à 10 classes différents (minimum 150 piles par classe). Un cinquième de cette base constitue la partition de validation. La partition d'apprentissage (1800 piles d'images) est suréchantillonnée d'un facteur 4 comme décrit ci-dessus. Au total, l'apprentissage se fait donc sur 7200 piles d'images, chacune étant formatée en une matrice de taille $9 \times 80 \times 80$.

Compte tenu de la structure tridimensionnelle des données, deux méthodes de convolution sont possibles : soit en 2D sur chaque plan, soit en 3D. La convolution en deux dimensions travaille individuellement sur chaque image, sans faire de lien de l'une à l'autre. En trois dimensions, le calcul considère la pile d'images dans son ensemble et tient donc compte des différences de morphologie d'une longueur d'onde à l'autre.

Remarque 17. L'appellation « Convolution 2D » est ici un abus de langage. En réalité, les images considérées étant en trois dimensions, la convolution est forcément tridimensionnelle pour parcourir toutes les données. Une différence se fait cependant au niveau des dimensions du filtre. Avec un filtre de taille $1 \times 3 \times 3$, le calcul considérera uniquement des groupes de pixels contenus sur un même plan. On parlera alors de convolution 2D. En revanche, avec un filtre de taille $3 \times 3 \times 3$, la convolution considérera un groupe de pixel en trois dimensions, et sera donc bien appelée convolution 3D. La même remarque s'applique pour le MaxPooling.

Qu'elle soit 2D ou 3D, la convolution est implémentée en Python à l'aide de la fonction Conv3D, issue de la bibliothèque Keras (Gulli et Pal 2017), elle-même basée sur un outil d'apprentissage automatique appelé TensorFlow (Abadi et al. 2016; TensorFlow Developers 2021). Les autres fonctions classiques du package (Dense, Dropout, Flatten, MaxPooling et LeakyReLU, voir paragraphe III.3.1, p.100), sont utilisées pour créer une structure de réseau générique, présentée en Figure 91.

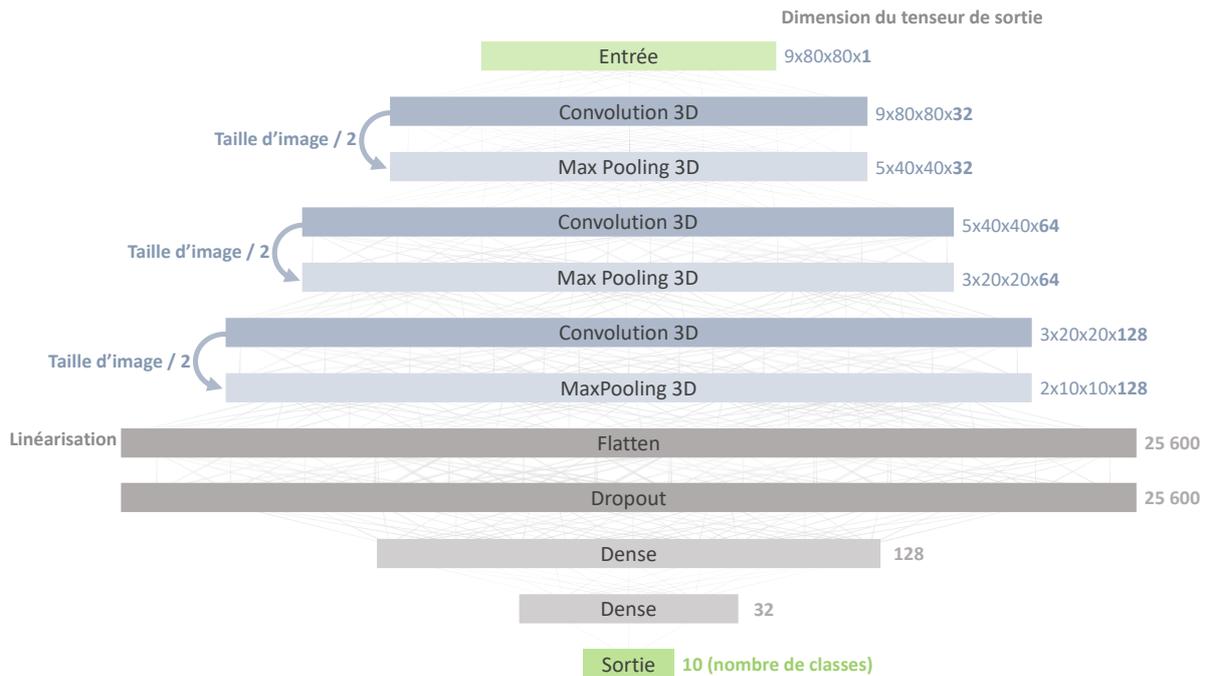


Figure 91. Empilement de couches du réseau de convolution utilisé dans cette partie. Les dimensions du tenseur, c'est-à-dire de la matrice de données échangée d'une couche de neurones à l'autre, sont précisées sur la droite pour un réseau de convolution travaillant en 3D avec un filtre de convolution de 3x3x3 et de maxpooling de 2x2x2.

Cette structure, basée sur trois empilements de couches de convolution + maxpooling, est un classique de la littérature (Dieleman et al. 2015; Signoroni et al. 2018), et a donné des résultats satisfaisants sur nos données lors des premiers essais de classification. Elle a donc servi de base à tous les tests suivants. Les couches de convolution y sont complétées par une couche de dropout puis plusieurs couches denses dont le fonctionnement est similaire à celui d'un MLPC. Toutes les couches utilisent une fonction d'activation *ReLU*, à l'exception de la dernière couche dense utilisant la fonction *SoftMax*. L'optimisation est assurée par l'algorithme Adam (Kingma et Ba 2017) et de la fonction de coût Categorical crossentropy, utilisée pour les problèmes de classification multi-classes (TensorFlow Developers). La taille de batch est fixée à 100. Plusieurs variantes de cette structure ont été testées en mélangeant couches de convolution 2D et 3D.

Avant de discuter des performances obtenues en classification, notons que cette approche souffre de temps de calculs largement supérieurs à ceux évoqués jusqu'ici. Avec un ordinateur de bureau classique (Intel Core i5 7^{ème} génération, 2.7 Ghz) il faut environ une heure de calcul pour chaque époque d'apprentissage, un modèle correct n'étant généralement atteint qu'après 20 à 30 époques. La classification en elle-même demande ensuite une minute pour traiter environ 400 images.

Compte tenu des temps de calcul, on s'affranchira ici de la validation croisée. Un seul groupe de validation est donc testé pour chaque classification présentée dans la suite de cette section. Pour augmenter le nombre d'exemples testés, la validation croisée n'est plus faite au dixième mais au cinquième. Malgré tout, il faut compter entre 20 et 30 h pour l'entraînement de n'importe quel réseau de neurones convolutif testé, ce qui représente le défaut majeur de cette méthode.

III.3.5. Résultats de classification

Les performances de classification obtenues après 30 époques d'entraînement sur différents réseaux de neurones sont résumées en Figure 92 ci-dessous :

Nom du réseau	Note	Couches de convolution	CIR moyen (%)	CIR min (%)	CIR max (%)
Conv2D		2D, 2D, 2D	89.9	77.6	100
Conv3D 2	2 couches	3D, 3D	90	80.2	97.1
Conv3D		3D, 3D, 3D	90.3	84.4	97.1
Conv3D	6 longueurs d'ondes	3D, 3D, 3D	90.6	78.4	100
Hybride		2D, 2D, 3D	92.5	77.6	100
Hybride 2	Pas de maxpooling sur la couche 1	2D*, 2D, 3D	91.5	/	/
SVM	Pour référence	n.a	94.4	87.1	96.4

Figure 92. Récapitulatif des tests de structures de convolution testées. La deuxième colonne résume l'empilement de couches de convolution utilisé. Comme indiqué en Remarque 17, le type de couche dépend des dimensions des filtres de convolution : 3x3x3 pour une convolution 3D, 1x3x3 pour une convolution 2d. Sauf cas particulier (indiqué par le symbole *), chaque couche 3D est suivie d'une couche de MaxPooling de 2x2x2, et 1x2x2 pour une couche 2D. Le CIR moyen indiqué pour le réseau Hybride 2 a été obtenu après 29 étapes d'apprentissage, le calcul ayant cessé de fonctionner avant la fin de la dernière époque. Les CIRs minimaux et maximaux ne sont donc pas connus. Les CIRs obtenus avec les descripteurs d'image et une classification par SVM sont indiqués à des fins de référence.

Globalement, les CIRs moyens sont en-deçà de ceux obtenus à l'aide des descripteurs d'image. Nous noterons également une plus grande amplitude entre les CIRs maximums et minimums, allant de 100 % à 77.6 %. Ces performances variables selon la classe sont décrites sur la matrice (a) en Figure 93, obtenue à l'aide du réseau Conv3D.

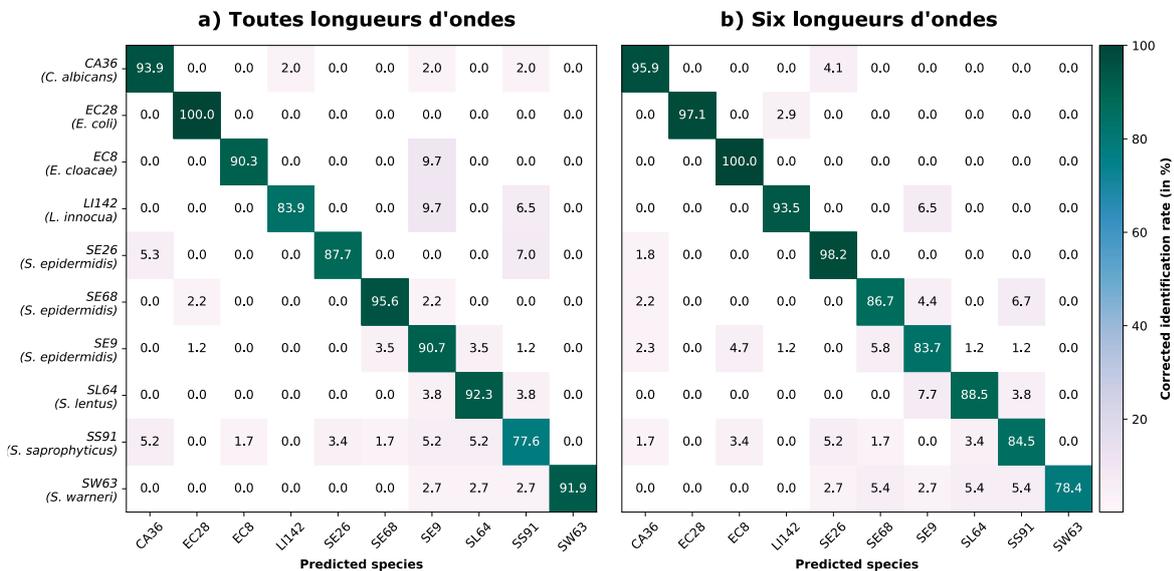


Figure 93. Matrices de confusions à l'issue d'une classification par le réseau Conv3D, avec validation croisée au 1/5. Les deux matrices ont été obtenues après entraînement sur des jeux de données différents. a) entraînement réalisé avec les images à toutes les longueurs d'ondes. b) entraînement uniquement sur les six longueurs d'ondes identifiées en partie précédente (voir p.99).

Plusieurs problèmes sont également observés au niveau de l'entraînement, dont l'historique est retracé en Figure 94. Tout d'abord, l'écart de performance obtenu sur la partition d'entraînement et de test trahit un problème de surapprentissage. Celui-ci peut être lié à la fois au paramétrage du réseau ou à la base de données, et demanderait donc une investigation plus

poussée. De plus, du fait de ce surapprentissage, le CIR moyen fourni par le réseau fluctue d'une époque d'entraînement à l'autre. Ces fluctuations sont d'autant plus importantes au niveau de la classe : pour EC8 par exemple, le CIR de 90.3 % montré en Figure 93 s'élevait à 96.8 % à l'époque d'entraînement précédente (donnée non représentée). Du fait de cette instabilité, une discussion détaillée des résultats ou une comparaison entre les différents modèles nous apparaît ici peu pertinente, les conclusions tirées sur un même modèle pouvant radicalement changer d'une époque à l'autre.

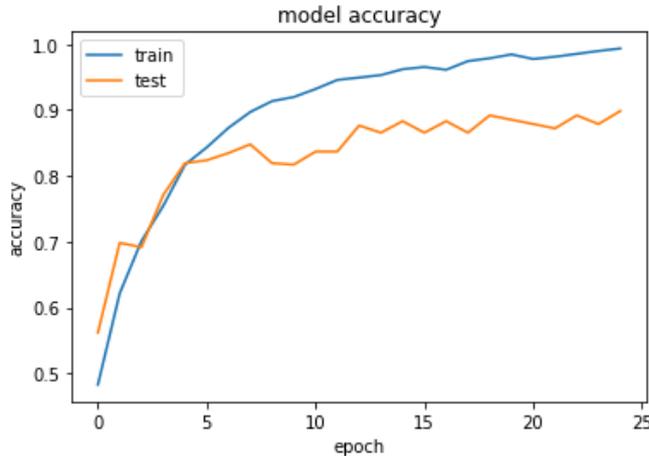


Figure 94. Historique d'entraînement du réseau de neurones de convolution 3D. Les deux courbes retracent l'évolution du CIR moyen obtenu à chaque époque pour les groupes d'entraînement et de validation. Le modèle obtenu à l'issue de l'entraînement est celui dont les performances sont détaillées en Figure 93.

Afin de comparer ces résultats à ceux obtenus en section III.2, des tests ont également été réalisés avec le réseau Conv3D appliqué à des données restreintes à 6 longueurs d'ondes (définies p.99). Cette restriction du nombre de longueurs d'onde a eu un impact négligeable sur le CIR : 90.3 % à 9 longueurs d'ondes contre 90.6 % à 6 longueurs d'ondes (Figure 93 a et b). Toutefois, ce dernier CIR apparaît plus stable au cours de l'entraînement (données non présentées). Les résultats sont également plus cohérents avec ceux obtenus sur descripteurs d'image, avec de bonnes performances sur espèces éloignées (CA36, EC8, EC28, LI142), qui se dégradent sur staphylocoques (Figure 93 b). La contribution exacte du surapprentissage et l'impact d'une sélection plus rigoureuse des données n'a toutefois pas pu être évaluée par manque de temps.

Les réseaux de neurones convolutifs se sont donc ici avérés moins performants qu'une classification *via* descripteurs *ad hoc* comme décrit en III.2. Ce défaut de performance pourrait provenir d'un paramétrage sous-optimal du réseau de neurones ou, plus probablement, de défauts au sein de la base de données. Quoi qu'il en soit, la lourdeur des calculs et l'aspect « boîte noire » de la technologie la rendent plus difficile à manier et à appréhender qu'une approche par descripteurs *ad hoc*. Cette approche s'avérera toutefois précieuse pour la suite des travaux, en particulier pour trouver des caractéristiques plus fines sur des images obtenues à l'aide d'un capteur de meilleure résolution, ou encore pour des applications autres que l'identification microbiologique. Nous pensons par exemple à la reconnaissance de cellules cancéreuses dans des tissus humains, autre application de l'imagerie multispectrale dans l'infrarouge, qui pourrait profiter des algorithmes de traitement mis en place au cours de cette thèse.

III.4. Conclusion de chapitre

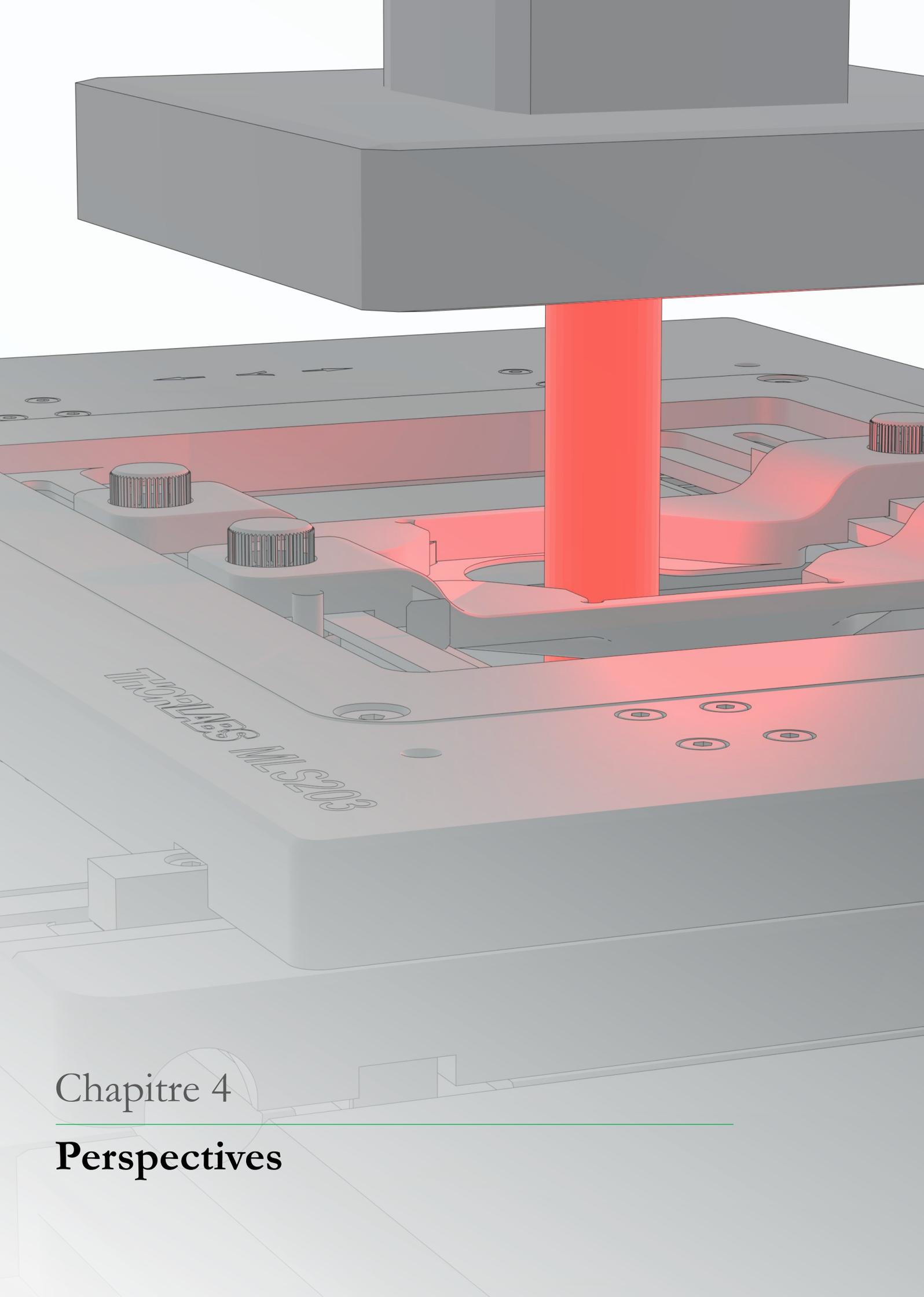
Dans ce chapitre, nous avons présenté une base de données d'images multispectrale dans l'infrarouge, rassemblant 2253 colonies appartenant à 10 classes différentes. Deux méthodes de classification ont pu être testées : soit *via* des descripteurs d'image couplés à une SVM, soit par des réseaux de neurones convolutifs. Si les deux approches offrent des CIRs moyens supérieurs à 90 %, l'approche par descripteurs d'image s'est avérée plus efficace et plus facilement améliorable. Des études pour déterminer les paramètres et les longueurs d'ondes les plus pertinentes ont permis d'atteindre un CIR moyen de 94.4 % avec un jeu de données restreint à six longueurs d'ondes (voir p.99).

Les réseaux de neurones convolutifs ont également été confrontés à cette base de données, avec des performances toutefois moindres (91.5 % de CIR contre 94.4 %). Ces résultats, bien que pouvant certainement être améliorés au cours de travaux ultérieurs, confirment la pertinence des descripteurs *ad hoc* choisis en partie III.2. Dans l'état actuel des travaux, la classification par descripteurs *ad hoc* + SVM reste donc la plus performante, tout en offrant des temps de traitement drastiquement plus courts.

Précisons enfin que ces résultats sont relatifs à la base de données considérée. Celle-ci ignore plusieurs familles de pathogènes communément recherchés (streptocoques, entérocoques, seulement deux souches d'entérobactéries) ce qui interdit toute conclusion sur les performances de la technologie sur un cas de diagnostic réel. De plus, les souches utilisées ici sont des souches de référence, cultivées en laboratoire dans des conditions contrôlées. Des souches issues de patients ou d'échantillons industriels auraient été exposées, préalablement à la culture, à des conditions de stress et des environnements métaboliques différents, entraînant une variabilité phénotypique que nous avons ici volontairement ignoré. En conséquence, une base de données sur souches cliniques ou industrielles aurait mené à des CIRs dégradés.

De même, la restriction de longueurs d'ondes s'est faite au regard de quelques espèces, et devra donc être affinée pour des cas d'usages concrets. Améliorer la technique et en évaluer les performances réelles passera donc forcément par l'acquisition d'une nouvelle base de données. Celle-ci pourrait à la fois être plus complète, avec par exemple une dizaine de souches pour chaque espèce considérée, ce qui permettrait de réaliser une validation croisée plus rigoureuse (voir Remarque 18 page 119), ou intégrer des souches issues d'échantillons cliniques ou industriels pour se tourner vers une application donnée.

Toutefois, le typage de trois souches de *S. epidermidis* réalisé ici offre un aperçu prometteur des performances de la technologie. L'évaluation de cette dernière sera à présent complétée par quelques travaux sur les limites et les perspectives de cette technique dans le domaine de la microbiologie.



Chapitre 4

Perspectives

Introduction – La méthode et les traitements de données présentés jusqu’ici ont démontré la faisabilité et l’intérêt d’une identification de colonies de microorganismes *via* une imagerie multispectrale dans l’infrarouge. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux limites de cette technologie, et à quelques pistes d’amélioration identifiées aux cours de ces travaux de thèse. Nous présenterons également d’autres axes de recherche encore en cours ou venant tout juste de commencer, qui pourraient ouvrir des perspectives intéressantes pour l’imagerie infrarouge. Enfin, nous discuterons du positionnement de la technologie développée en regard de l’état de l’art.

IV.1. Essai de validation croisée dite « stricte » et sources de variabilité expérimentale

IV.1.1. La validation croisée stricte : une question de partition des données

Comme évoqué en section III.3.1 (p.104), la validation croisée induit plusieurs biais liés à la séparation des données en groupes de test et d’entraînement. Nous avons déjà discuté de la confrontation aléatoire des données de test au modèle issu de la phase d’apprentissage, qui entraîne une certaine variabilité des résultats d’une classification à l’autre. Il existe toutefois un autre biais lié à la façon dont sont fractionnées les données. Deux méthodes sont possibles : en prenant en compte l’origine des différents exemples, ou non.

Jusqu’ici, toutes les validations croisées présentées ignoraient la façon dont ont été acquises les images. Toutes les colonies sont alors séparées de façon aléatoire en n groupes de tailles égales, puis recombinaison pour créer les fractions d’entraînement ($9/10^{\text{èmes}}$ ou $4/5^{\text{èmes}}$) et de test ($1/10^{\text{ème}}$ ou $1/5^{\text{ème}}$). Ce type de fractionnement a l’avantage de créer des groupes équilibrés et est possible même avec un nombre d’acquisitions restreint. En revanche, il n’est pas représentatif d’un cas d’usage réel.

En effet, les images ont été acquises sur un certain nombre de membranes différentes, à différents jours, et avec des conditions expérimentales pouvant varier légèrement. Un fractionnement aléatoire de la base de données groupe donc ensemble des images acquises séparément, et sépare des images acquises ensemble. Ce dernier point est particulièrement problématique, puisque des images acquises sur un même échantillon sont susceptibles d’être présentes à la fois dans le groupe d’entraînement et dans le groupe de test. Or dans un véritable cas d’usage, la classification se fait sans connaissance préalable d’images issues de l’échantillon testé.

Un fractionnement aléatoire de la base de données simplifie artificiellement la classification, et diminue l’impact d’éventuelles sources de variabilité expérimentale.

Il existe donc un second type de fractionnement – ici qualifié de *strict* ou *stringent* – qui conserve ensemble les données issues d’un même échantillon (ici : les colonies imagées sur une même membrane, voir Figure 95). Cette méthode est plus proche d’un cas réel, dans lequel l’échantillon analysé est entièrement inconnu, mais rend la classification plus difficile. Sans référence, celle-ci devient en effet particulièrement sensible à la variabilité intra-classe

découlant de la variabilité biologique et expérimentale (temps de culture, température de la pièce, hygrométrie, lot de membrane etc.).

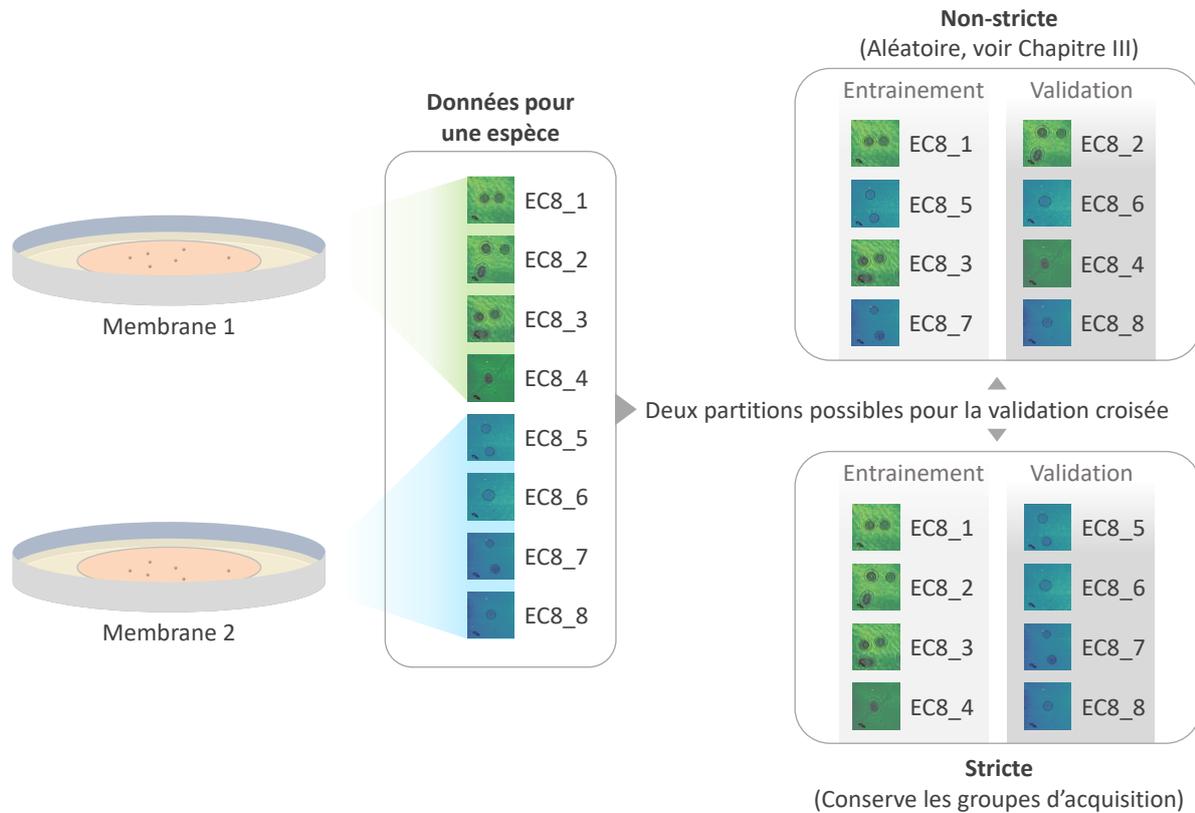


Figure 95. Principe de la classification stricte : exemple sur un cas à une espèce et deux séries d'acquisitions. Les images acquises pour une même espèce peuvent être fractionnées de deux façons : soit en considérant toutes les images comme un ensemble cohérent (validation croisée non-strict), soit en séparant les images acquises sur des échantillons différents (validation croisée stricte). Cette séparation pourrait également se faire sur d'autres paramètres, comme la date d'acquisition, le lot de membranes ou de milieu nutritif, et tout autre paramètre susceptible d'influer sur la signature collectée.

Dans la littérature, ce genre d'approche est rencontré sur des techniques déjà bien établies comme le FTIR (Lasch et al. 2018), ou encore le Raman (Espagnon et al. 2014). Il est en revanche ignoré sur des techniques plus expérimentales (Banada et al. 2006; Marcoux et al. 2014; Maeda et al. 2017, 2018; Signoroni et al. 2018). La classification stricte présuppose en effet une quantité d'échantillons suffisante pour couvrir toute la variabilité expérimentale. Ici, seulement cinq membranes ont été analysées pour chaque classe, avec à chaque fois entre 5 et 60 colonies par membrane. La classification stricte s'avérera donc plus difficile, mais apportera un éclairage intéressant sur les limites de la technologie.

Remarque 18. Un autre type de validation croisée stricte, appelée *leave-one-out* est également possible. Dans ce cas de figure, toute la base de données est utilisée pour l'apprentissage à l'exception d'un seul lot d'échantillons. Ce dernier peut par exemple rassembler toutes les données appartenant à une unique souche pour tester l'identification basée sur d'autres souches appartenant à la même espèce (*leave-one-strain-out*, voir Espagnon et al. 2014). Ce type de partition, plus proche de la réalité, a également été testé ici en excluant à chaque fois les données acquises sur une même membrane (*leave-one-membrane-out*). Les résultats obtenus sont similaires à ceux de validation croisée stricte, avec toutefois des temps de calcul plus longs (une classification par membrane, au lieu de 5 ou 10 pour toute la base). Le *leave-one-out* ne sera donc pas plus discuté ici.

IV.1.2. Résultats de classification en validation croisée stricte

Compte tenu de la durée des calculs et de résultats moins concluants en non-strict, la classification stricte par réseaux de neurones convolutifs n'a pas été expérimentée. Ici, nous reprenons donc le protocole de classification basé sur les descripteurs d'image détaillé en section III.2.1 (p.88). Nous utiliserons les longueurs d'ondes et les variables définies après réduction en section III.2.5 : 1235, 1400, 1468, 1535, 1715 et 1738 cm^{-1} , *skewness* retirée. La validation croisée est faite non plus au dixième mais au cinquième, étant donné que certaines classes n'ont été acquises que sur cinq membranes. Les partitions d'entraînement et de validation sont constituées en groupant, pour chaque classe, toutes les images acquises sur une membrane. En réalité, plusieurs membranes sont parfois groupées ensemble pour obtenir des groupes de tailles comparables.

Une classification par SVM sur les données partitionnées de la sorte aboutit à un CIR moyen de 68.8 %. La matrice de confusion ci-dessous (Figure 96) fait ressortir des difficultés importantes pour classifier les données de SS91 (37.6 % de CIR). Bien qu'il soit possible que cette espèce pose de réelles difficultés, nous notons que les premiers problèmes de dessiccation des colonies ont été observés sur SS91, qui semble donc particulièrement sensible au séchage. Une altération de la morphologie des colonies pourrait donc en partie expliquer ces difficultés.

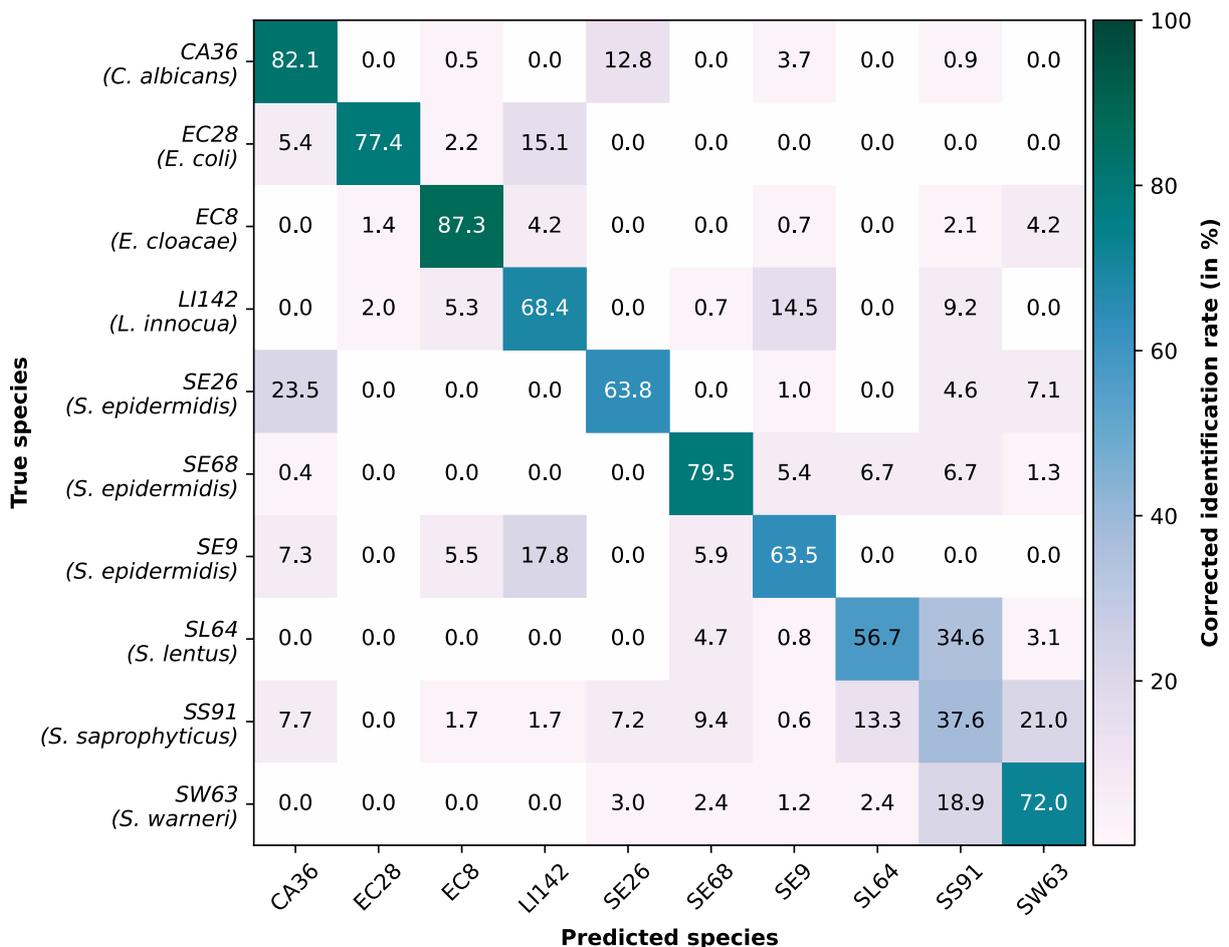


Figure 96. Matrice de confusion obtenue à l'issue d'une classification en SVM, après validation croisée stricte.

L'importante baisse de performances n'est toutefois pas à imputer à SS91 seule, mais répartie sur l'ensemble des classes. Des tests réalisés avec d'autres classifieurs ou jeux de longueurs

d'ondes confirment ces résultats, puisqu'une baisse de CIR de l'ordre de 20 à 30 % est systématiquement observée. Ces résultats décevants traduisent l'existence d'une forte variabilité d'une membrane à l'autre, jusqu'ici masquée par le fractionnement aléatoire.

Avant d'explorer les raisons à ce phénomène, nous avons tout d'abord vérifié l'intégrité de la base de données PCA. Les résultats, détaillés en Annexe G (p.155), ne font pas ressortir de points aberrants ou de répartition particulière des exemples mal classifiés. Les défauts de classification ne viennent donc pas d'un petit groupe d'exemples fautifs, mais d'un problème plus général.

Pour y voir plus clair, nous avons calculé la moyenne des différents descripteurs d'image pour chaque série d'acquisition (c.à.d. toutes les colonies cultivées sur une même membrane). Les résultats, présentés en Figure 97, font apparaître certaines cohérences au sein des classes. Par exemple, toutes les membranes de SE26 et SL64 se distinguent aisément des autres sur la corrélation de la comatrice (texture). D'autres paramètres, comme la transmittance, font en revanche ressortir d'importantes variations au sein même d'une classe, particulièrement visibles sur SW63 et SS91 (exemple extrême sur les séries de SS91 2020.10.7.0 et 2020.9.30.0). Ceci est d'autant plus gênant que la transmittance a été identifiée comme un bon facteur de discrimination en section III.2.3, p.91. Ici, il apparaît que la transmittance moyenne varie au moins autant au sein d'une classe (variabilité intra-classe), qu'entre deux classes (variabilité inter-classes). Ces constats se retrouvent sur les paramètres et les classes non affichés.

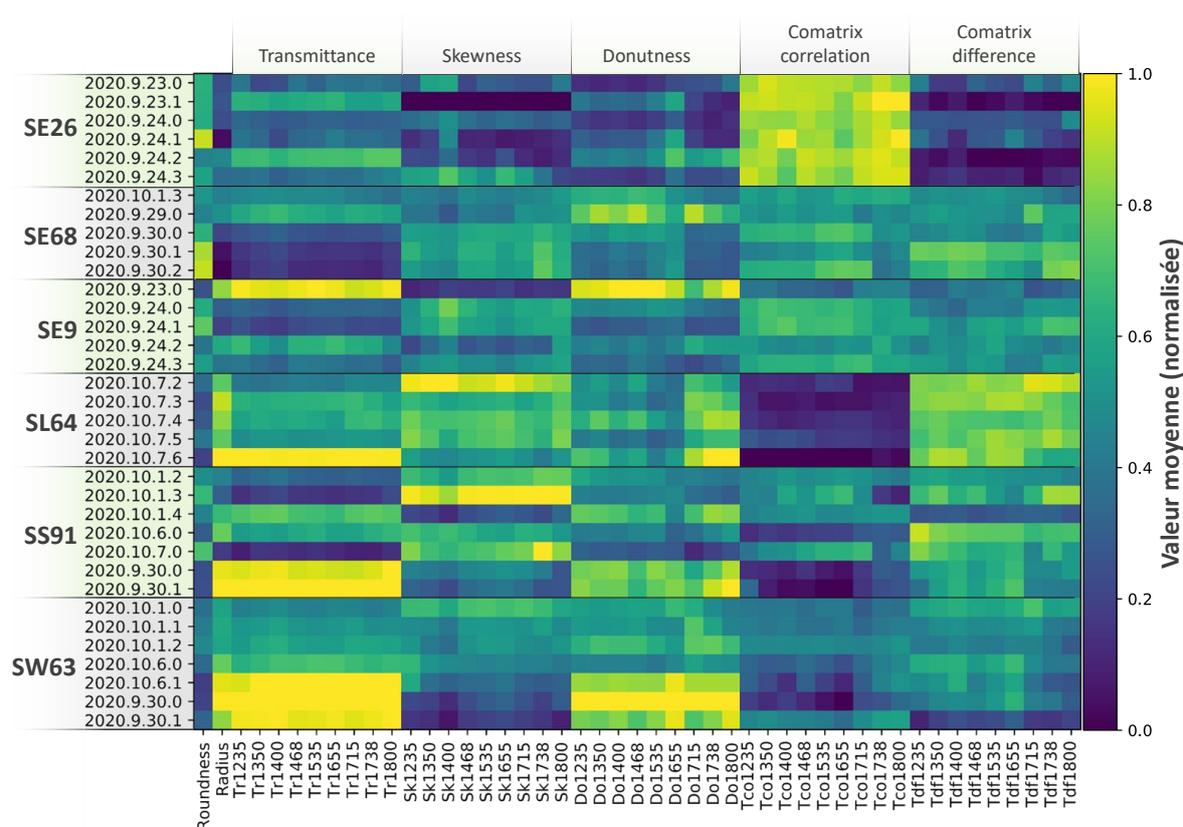


Figure 97. Valeurs moyennes de quelques descripteurs d'images, par série d'acquisitions. Chaque point de la matrice correspond à la valeur moyenne d'un descripteur d'image à une longueur d'onde donnée, pour toutes les colonies acquises sur une même membrane. Les identifiants des membranes sont donnés en ordonnées (espèce + date + numéro d'acquisition). Les descripteurs d'image ont au préalable été standardisés selon le principe décrit en III.2.2 (p.90). Seule une partie de la base de données est présentée.

Des différences significatives sont donc observées entre deux séries de mesures. Les conditions de culture des microorganismes (durée et température d'incubation) étant contrôlées, la variabilité biologique devrait rester relativement maîtrisée, ce qui n'est pas le cas ici. D'autres sources de variabilité expérimentales sont donc considérées.

IV.1.3. Sources de variabilité expérimentale

Les principaux facteurs ayant pu impacter les acquisitions sont listés ci-dessous :

Séchage de la membrane : Comme évoqué lors de la discussion sur le protocole (p.63) le séchage des membranes d'alumine altère l'aspect des colonies, en particulier les plus larges. S'il semble que cette déformation n'ait pas de conséquences sur la viabilité de la colonie, elle a toutefois un impact sur la morphologie au moment de l'imagerie. Cette déformation pourrait être en partie liée à l'espèce, et donc servir de facteur de discrimination, mais dépend également des conditions de séchage de la membrane. Or, des relevés de température et de degré d'humidité relative (% HR) au sein du laboratoire d'optique, présentés en Figure 98, montrent une variation du degré d'hygrométrie d'un facteur deux sur une semaine. L'humidité ambiante, non contrôlée au laboratoire, pourrait ainsi induire une forte variabilité expérimentale en agissant non seulement sur le séchage des membranes, mais aussi sur le laser circulant à l'air libre entre la source et le banc de mesure.

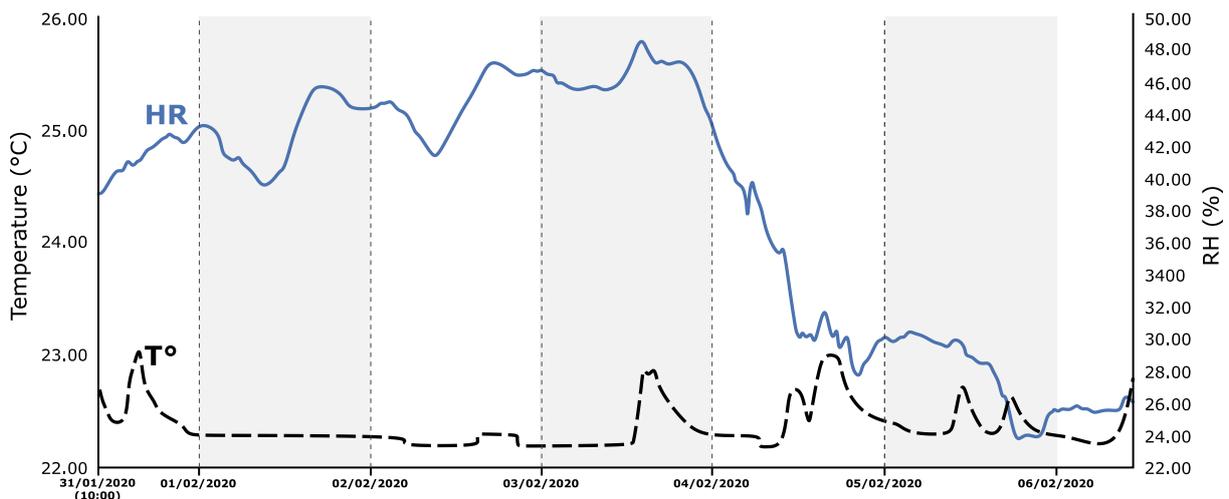


Figure 98. Suivi de l'hygrométrie et de la température du laboratoire d'optique sur plusieurs jours. % HR minimum : 23.7, % HR maximum : 49.5, Ecart type : 7.82. Vectorisé d'après le graphique fourni par l'instrument (Sonde thermo-hygrométrique : Kimo instruments).

Nombre de colonies par membrane : Le nombre de colonies par boîte de Petri impacte fortement la morphologie de celles-ci. Sur SE9 par exemple, certains morphotypes significativement plus petits apparaissent sur les membranes densément peuplées. Pour garantir une identification rigoureuse et reproductible, certains auteurs recommandent de se restreindre à une quinzaine de colonies par boîte de Petri, ce afin de limiter les interactions entre celles-ci (Sousa et al. 2013). Pour notre base de données, nous comptabilisons en moyenne 23 colonies par membranes, et ce sur un diamètre deux fois inférieur à celui d'une boîte de Petri standard (47 mm contre 90 mm). L'exclusion des membranes les plus peuplées ne suffira pas à contourner ce problème. En effet, certaines membranes n'ayant parfois donné que quelques colonies isolées, présentaient également des amas bactériens ayant pu influencer leur morphologie. S'il n'est donc pas possible d'évaluer l'impact de ce point précis, précisons tout

de même que sur 97 membranes analysées, seules 38 sont en-dessous des 15 colonies recommandées, et que ce nombre tombe à 8 si l'on rapporte les recommandations à la surface d'une membrane.

Intervalle de temps entre les acquisitions : un autre facteur à considérer est la période sur laquelle se sont étalées les acquisitions. Une première base de données, contenant EC8, SE9, EC10, CA36 et LI142 a été enregistrée fin 2019. Les problèmes de dessiccation des colonies et le premier confinement ont ensuite repoussé les acquisitions complémentaires sur staphylocoques entre août et septembre 2020. Outre les variations d'atmosphère déjà évoquées, ce report des expériences a décalé la deuxième campagne d'acquisition en même temps que des expériences sur tissus biologiques, menées sur le même banc de mesure. Les deux expériences utilisant des configurations différentes, le positionnement du barillet à miroir et la distance capteur-échantillon devaient être réglés avant chaque mesure. Or, compte tenu de la configuration sans lentille et des phénomènes d'interférences inhérents à l'utilisation de QCLs (Bhargava 2012), ce dernier paramètre impacte fortement les images. Malgré les efforts pour rendre ces réglages les plus reproductibles possibles, de légers décalages ont donc pu avoir un impact sur les acquisitions. La séparation par PCA des données de SE9, telle qu'observée en Figure 99, confirme l'existence d'une différence entre ces deux séries d'acquisitions.

De plus, une classification en SVM concentrée sur les données acquises en 2019 fournit un 82.5 % de CIR, contre 60 % pour les données de 2020 seules et 68.8 % toutes données confondues. Les données de 2020 se concentrent sur les staphylocoques, ce qui explique pour partie l'écart de performance observé, mais des différences expérimentales ne peuvent être exclues.

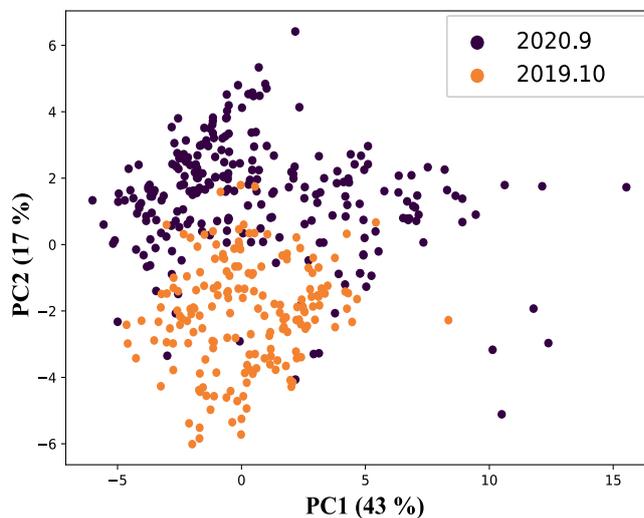


Figure 99. Projection en PCA sur deux axes des données de S. epidermidis (SE9), identifiées par le mois d'acquisition. La projection se base sur les descripteurs d'image et les longueurs d'ondes décrites en section III.2.5 pour la SVM. L'axe PC1 (43 % de la variance) sépare peu les données, contrairement à l'axe PC2 (17 %) où les deux périodes d'acquisition apparaissent comme deux groupes distincts.

Instabilité du bolomètre : comme discuté lors de la présentation du capteur (p.50), la matrice de microbolomètres est susceptible de s'auto-échauffer au cours du temps, ce qui induit une dérive de l'intensité lumineuse enregistrée. Ce type de variations temporelles est habituellement corrigé par la NUC (*non-uniformity correction*). Or, celle-ci n'est ici faite qu'une fois par série d'acquisition, lors du pré-traitement des images. Une éventuelle dérive de la réponse sur les images acquises sur une même membrane est donc envisageable. L'existence de cette dérive

n'a toutefois pas été vérifiée, puisqu'une correction plus régulière du capteur a d'ores et déjà été implémentée dans les nouvelles routines de contrôle du banc de mesure.

IV.1.4. Évolutions et améliorations envisagées

Comme discuté, la classification stricte pose donc un défi plus important que les analyses menées jusqu'ici. Une fois encore, ce type de validation croisée n'a pas été privilégié pour les analyses du chapitre III du fait de la quantité limitée de données acquises. Ici, seules 5 à 9 membranes ont été enregistrées pour chaque classe, là où la littérature présente une validation croisée stricte à partir de dix échantillons différents par classe (voir Espagnon 2014). Toutefois, cette approche met en évidence des défauts de reproductibilité des résultats. Plusieurs correctifs sont donc envisagés :

- Limiter le nombre de colonies par membrane ;
- Améliorer les procédés de correction de l'image et la maîtrise du capteur infrarouge ;
- Fixer définitivement les réglages du banc de mesure ;
- Contrôler l'humidité du laboratoire, ou placer le système dans une enceinte dédiée (éventuellement sous azote).

Ce dernier point pourrait s'avérer problématique sur le long terme, puisqu'il augmenterait sensiblement le coût et la difficulté de mise en place de la méthode. L'impact du séchage et de l'humidité ambiante sur la morphologie des colonies et les performances de classification est pour l'heure inconnu et nécessitera à l'avenir une attention particulière. Les autres correctifs sont en cours de mise en œuvre, notamment avec la conception d'un prototype (Figure 100).

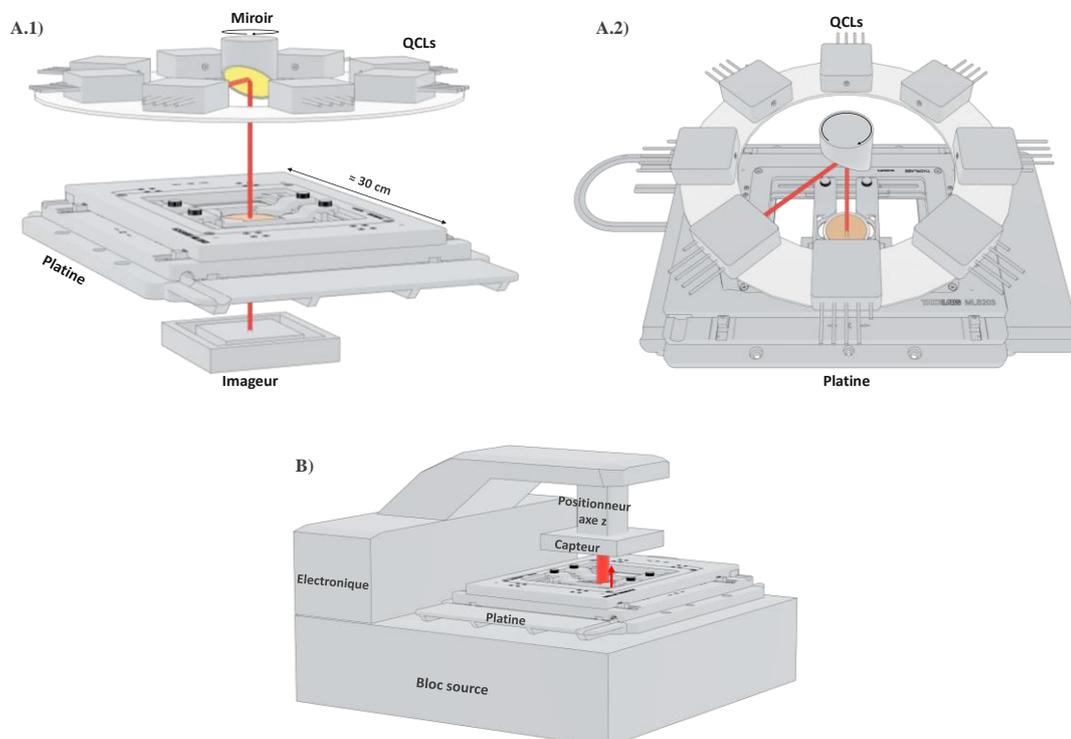


Figure 100. Propositions de designs pour un prototype dédié à l'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge moyen. A 1 et 2 : première proposition d'organisation des différents QCLs source (ici 8). Cette idée n'a pas été conservée à cause du miroir rotatif, source possible de problèmes mécaniques. B. Représentation de ce à quoi pourrait ressembler le prototype final. Le bloc source rassemble les 8 QCLs et le système de distribution de la lumière.

À terme, cet appareil rassemblera le capteur, le porte échantillon ainsi que les sources lasers à longueur d'onde discrète dans un design compact. Entièrement dédié à l'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge, il assurera la stabilité du système d'acquisition tout en limitant au maximum la distance source-capteur.

IV.1.5. Conclusion

La validation croisée stricte fait donc ressortir des problèmes liés aux protocoles d'acquisition, et jusqu'ici masqués par la partition aléatoire des données. Ces problèmes, liés entre autres à l'utilisation du banc de mesure pour d'autres expériences, à la méthode d'ensemencement et aux conditions de séchage de la membrane, impactent fortement la reproductibilité des mesures, et donc la cohérence de la base de données. Contrôler ces paramètres améliorerait donc les performances de classification et la robustesse de la méthode.

Pour autant, les analyses discutées dans le chapitre III ne sont pas nécessairement obsolètes. Étant donné que la validation croisée aléatoire simplifie la variabilité intra-classe, les performances de classification obtenues représentent ce vers quoi pourrait tendre la méthode en améliorant le protocole. Ceci ne pourra toutefois être confirmé qu'à l'aide d'une nouvelle base de données.

IV.2. Essais de culture microbiologiques sur membranes en silicium poreux

IV.2.1. Contexte

Malgré leurs avantages pratiques, les membranes d'alumine utilisées sont entièrement opaques en-dessous de 1220 cm^{-1} , alors que plusieurs longueurs d'ondes d'intérêt sont situées entre 800 et 1200 cm^{-1} (voir Figure 49, page 62). Pour accéder à ces informations, il a été suggéré de remplacer l'alumine par un matériau plus transparent dans l'infrarouge. Les propriétés du silicium dans ce domaine de longueur d'ondes et des travaux antérieurs de porosification réalisés au CEA de Grenoble ont orienté vers ce matériau en particulier.

L'utilisation de silicium poreux dans le cadre d'études microbiologiques n'est pas nouvelle. Citons notamment une application comme surface de capture via un couplage avec des anticorps (Massad-Ivanir et al. 2016), comme support pour l'étude des protéines membranaires (Tantawi et al. 2013), ou encore comme base pour un capteur de toxines (Reta et al. 2019). Toutefois, une culture de micro-organismes sur membranes en silicium n'a encore jamais été rapportée.

Ainsi, une part du projet a été dédiée au développement de membranes en silicium poreux comme remplacement à l'alumine poreuse. Ces travaux ont demandé d'importants développements sur la technologie du silicium, réalisés hors du cadre de cette thèse, et sont encore en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Remarque 19. Compte tenu d'éléments de propriété intellectuelle concernant la fabrication des membranes, nous nous concentrerons ici sur les tests de culture microbiologique réalisés dans le cadre de cette thèse. Les différentes conceptions de membrane seront présentées sans rentrer dans les détails à des seules fins de discussion.

Avant le début de ce projet, les travaux sur le silicium poreux s'étaient cantonnés à des traitements de surface, tandis que l'application actuelle nécessite une porosité traversante, avec des pores connectant la face avant à la face arrière. Une plaque de silicium classique utilisée en salle blanche – appelée *wafer* – fait 700 μm d'épaisseur, ce qui est impossible à traverser par les procédés de porosification actuels. De plus, cette épaisseur, largement supérieure aux 60 μm des membranes d'alumine actuelles, risque de ralentir, voire d'interdire le passage des nutriments. Les travaux ont donc exploré plusieurs solutions pour affiner le wafer et créer une membrane compatible avec notre application.

Celles-ci devaient répondre à un cahier des charges spécifiant notamment :

- **Les propriétés optiques**, devant être plus intéressantes que celles de l'alumine. On s'intéresse ici à la transparence sur notre gamme d'intérêt (800 - 1800 cm^{-1}), à la présence ou non d'interférences et au bruit lié à la rugosité et la porosité de la membrane. En pratique, plus la membrane sera fine et plus les propriétés de transparence devraient être intéressantes.
- **Les aspects pratiques**, comme la surface ensemencable, la rigidité de la membrane ou sa solidité. Le support doit en particulier résister aux différentes manipulations sans casser (dépôt sur la gélose, retrait, transport à la pince, etc.). La membrane ne peut donc pas être trop fine pour ne pas compromettre la tenue structurelle.
- **Le passage des nutriments**. Cet aspect dépend non-seulement du calibre des pores et de leur organisation, mais également de l'hydrophobicité des pores et de la surface, celle-ci étant conditionnée par des traitements chimiques.
- Et enfin, **la biocompatibilité de la surface**. En effet, certaines étapes du procédé de fabrication nécessitent des produits agressifs (éthanol, HF) ou créent des fonctions chimiques délétères pour les colonies comme les hydrures de silicium (Tsai et al. 1992; Stewart et Buriak 2000). Même si les autres conditions sont satisfaites, la faisabilité d'une culture microbienne n'est donc pas assurée.

En première estimation, le calibre des pores et l'épaisseur de la membrane ont été calqués sur ceux des Anodiscs utilisés jusqu'ici : 200 nm de diamètre sur 60 μm d'épaisseur. Ces paramètres sont déterminés par la durée et l'intensité d'un traitement électro-photo-chimique, en présence d'un mélange d'eau, d'acide fluorhydrique (HF) et d'isopropanol. À l'issue du traitement, la face avant du wafer est recouverte d'une couche de silicium poreux de l'épaisseur désirée. Plusieurs approches ont alors été envisagées pour affiner la face arrière, dont deux ayant mené à des tests de culture microbiologique.

IV.2.2. Première itération : gravure profonde par procédé Bosch

Au début de ces travaux, les propriétés mécaniques du silicium poreux étaient inconnues et la relative finesse de la membrane désirée (60 μm) faisait craindre pour sa solidité. Il a donc été proposé de ne graver la face arrière du silicium que sur certaines « fenêtres » de petites tailles,

allant de 3 μm à 3 mm (Figure 101 a, b et c). Le silicium intact entourant la membrane fait ici office de support, à l'instar du plastique support des membranes en alumine poreuse.

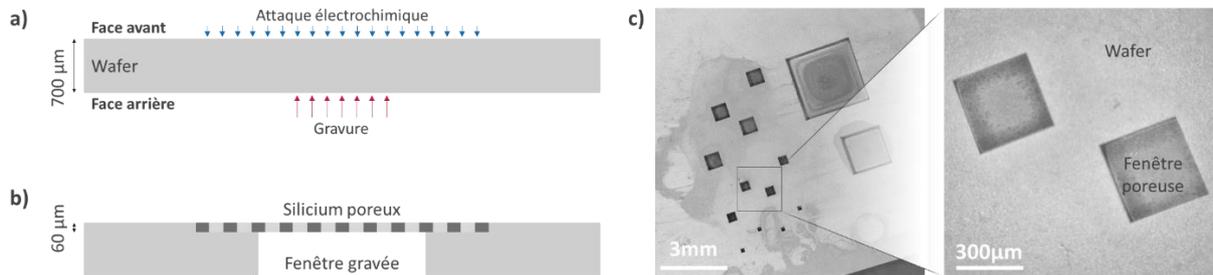


Figure 101. Présentation et test de culture microbienne sur une première génération de membranes en silicium. a : schéma du wafer de silicium avant traitement. b : schéma après traitement. c : Photographie de l'échantillon tel que déposé sur la gélose pour culture. Les fenêtres ouvertes vers le silicium poreux sont visibles en gris sombre.

Les membranes de 300 μm et 3 mm de côté ont été utilisées pour des tests de cultures microbiennes. Pour ce faire, la pièce de silicium a été déposée sur un milieu de culture COS (face avant contre le milieu). Une colonie de *E. coli* a été prélevée sur une culture à 24 h, puis resuspendue dans 1 mL de milieu de suspension. 100 μL de cette solution ont ensuite été déposés sur chaque membrane, avant incubation à 36.7°C pendant 24 h.

Le résultat après culture s'avère peu concluant. Non seulement aucune croissance bactérienne n'est à relever sur la membrane, mais de plus la gélose située directement sous l'échantillon ressort altérée, creusée (Figure 102.a). Ce phénomène réapparaît après lavage soigneux de la membrane à l'eau, éthanol, et passage à l'autoclave, ce qui suggère qu'il est lié à la surface du silicium plutôt qu'à un éventuel résidu de chimie. Il est supposé que ces altérations pourraient être liées à d'éventuelles liaisons SiOH apparues lors du traitement HF.

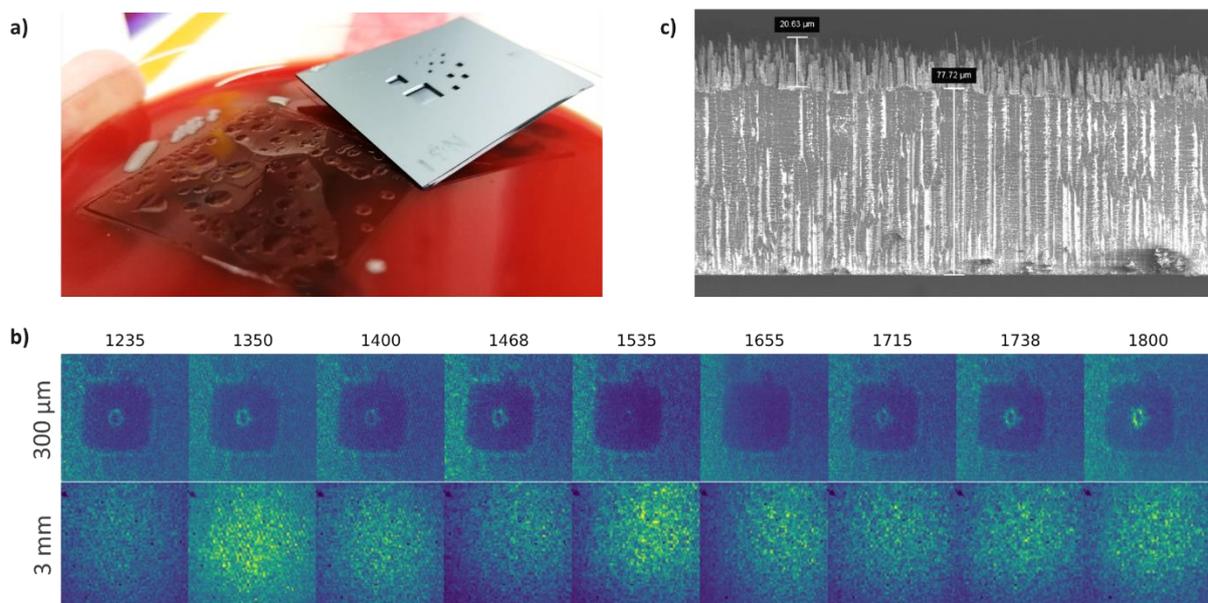


Figure 102. Résultats du premier test de culture sur membranes de silicium. a : vue générale de l'échantillon et du milieu gélosé sous-jacent après 24 h de culture. b : images multispectrales de deux fenêtres poreuses, de respectivement 300 μm et 3 mm de côté. c : Image en coupe au microscope électronique à balayage d'une membrane silicium. Les pics observés à la surface peuvent expliquer la rugosité visible en imagerie MIR.

Le second problème est une importante granulosité des images infrarouges obtenues en transmission (Figure 102.b). Ce grain (différent du bruit inhérent au capteur), apparaît lié à l'état de surface du silicium, et en particulier de sa face avant. En effet, la granulosité est observée à l'intérieur des fenêtres de 3 mm de côté, mais également à l'extérieur des fenêtres de 300 μm , où la face arrière est restée intacte. Une explication possible tient en la présence « d'herbes » apparaissant à la surface du silicium lors de la porosification (Figure 102.c et Figure 103).

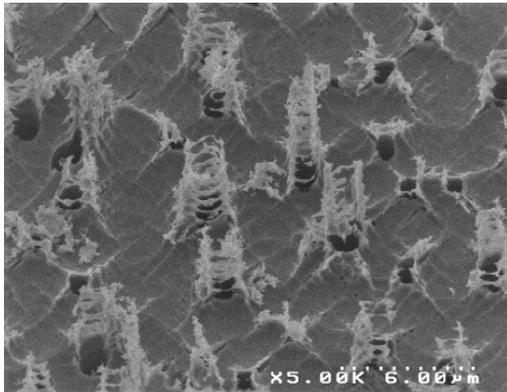


Figure 103. *Détail de la rugosité de surface d'un silicium poreux gravé en face arrière, ici observé au MEB avec un grossissement x5 000. Les pics observés semblent être des résidus de la paroi des pores. La réaction de porosification a probablement mené à une composition chimique différente de la paroi interne des pores, résultant à son tour en une réponse inhomogène de la gravure profonde. Les anneaux observés sont dus à la nature itérative du procédé de gravure (Bosch etching).*

Ce premier test s'avère donc non concluant, exception faite de la porosité traversante qui, elle, a bien été validée. Les membranes de 300 μm laissaient effectivement passer l'eau et l'éthanol par capillarité, ce qui valide les premières étapes de porosification. Il s'avère également que les membranes les plus larges conservent une bonne tenue mécanique puisqu'aucune casse n'a été à déplorer. En ces circonstances, un autre procédé de gravure a pu être testé.

IV.2.3. Seconde itération : Taiko process

Plutôt qu'une attaque chimique, le Taiko process utilise une forme de meulage pour affiner la face arrière du wafer jusqu'à atteindre la couche de silicium poreux en face avant. On parle ici de *grinding*, ou encore de *rodage*. Cette opération donne une membrane de grande surface (10 cm de diamètre, voir Figure 104) rapidement brisée en membranes de plus petites tailles ayant pu être utilisées pour un test de culture.

Comme pour le test précédent, les membranes ont été déposées sur un milieu COS commercial, puisensemencées à l'aide d'une colonie initiale de *E. coli* prélevée sur une pré-culture de 24 h. Compte tenu de la surface des membranes, dépassant parfois un centimètre de côté, l'ensemencement à cette fois-ci été réalisé à l'öse. Deux membranes ont également été déposées pour tester la croissance sur les deux faces du wafer : avant et arrière. La première a été exposée au procédé de porosification, tandis que la seconde a été fortement abrasée lors du



Figure 104. *Photographie du wafer de silicium à l'issue du rodage. Le wafer, déposé sur film plastique, est ici présenté sur l'appareil de Taiko process. La face arrière a été affinée de 700 μm à 60 μm d'épaisseur jusqu'à déboucher sur la couche de silicium poreux, visible sous forme d'un disque au centre de la plaque.*

rodage. Compte tenu des traitements et de la différence d'état de surface en résultant (la face arrière est bien plus « granuleuse », ce que confirment des images au MEB non présentées ici), les deux faces pourraient en effet ne pas avoir le même impact sur la croissance. En pratique, les deux ensemencements ont conduit au développement de colonies (Figure 105).



Figure 105. Culture de *E. coli* sur seconde génération de membrane en silicium poreux. L'ensemencement a été testé sur les deux faces (avant et arrière) pour évaluer l'impact des différents traitements.

Les colonies se développent normalement, peut-être plus lentement que directement sur la gélose, en particulier pour celles déposées sur la face arrière du wafer, mais confirment la faisabilité d'une culture microbienne sur membrane en silicium poreux. Notons également l'absence d'altération de la gélose sous la membrane, qui confirme l'origine chimique des dégradations précédemment observées (le procédé Taiko étant purement mécanique).

L'aspect optique des membranes est cependant plus mitigé, avec un contraste faible à certaines longueurs d'ondes, une granulosité importante et la présence de franges d'interférences (Figure 106). Le grain des images était attendu, le procédé de gravure abrasive laissant en effet une surface irrégulière en face arrière de la membrane. Cet état de surface peut être corrigé par polissage, ce qui aggrave en contrepartie les phénomènes d'interférences (données non présentées).

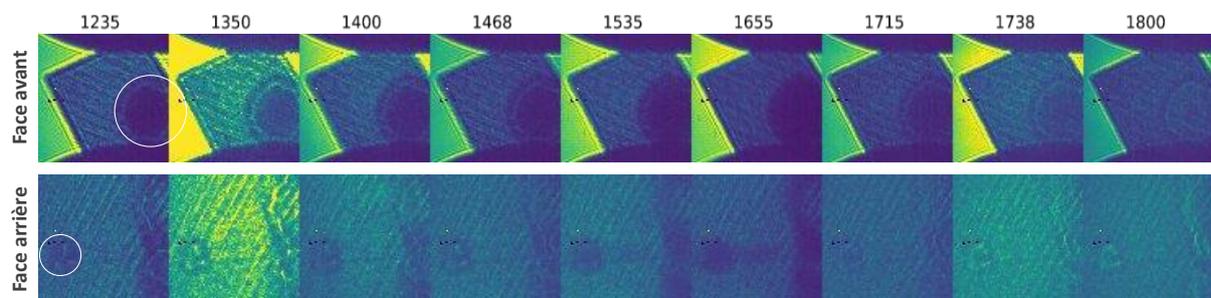


Figure 106. Images infrarouges des deux membranes présentées en Figure 105.

Comme pour les membranes d'alumine (voir Figure 32, p.48), ce type d'interférences découle de la réflexion partielle prenant place à l'interface entre le silicium et l'air. Chaque face agit alors comme un miroir, l'ensemble formant une cavité de Fabry-Perot. Toutefois, les

interférences ne sont visibles sur la membrane d'alumine que lorsqu'elle se gondole, alors qu'elles paraissent systématiques sur les membranes en silicium.

Résoudre les problèmes d'interférences sera donc l'un des principaux axes de recherche pour la suite des travaux, qui se consacrent à présent à améliorer les propriétés optiques et l'intégration de ces membranes.

IV.2.4. Perspectives

Ces travaux préliminaires ont montré la faisabilité d'une culture bactérienne sur membrane en silicium poreux. Si de nombreuses questions d'ordre pratique restent en suspens, ils pourraient ouvrir la voie à un nouveau support de culture en remplacement de l'alumine. Les membranes en silicium pourraient également être intégrées avec des circuits de lecture photoniques pour créer des « boîtes de Petri intelligentes », permettant le suivi des cultures en temps réel dans l'infrarouge. Notons enfin que d'autres applications pourraient profiter de ces développements, en particulier le domaine de la culture cellulaire et des organes-on-chip.

IV.3. Détection d'antibiorésistance par marquage au deutérium

La propagation des résistances aux antimicrobiens est considérée par l'OMS comme l'un des principaux défis que rencontrera la santé mondiale dans les décennies à venir (2014). Détecter rapidement une antibiorésistance est aujourd'hui le meilleur moyen de limiter l'impact d'une infection par un organisme résistant. C'est pourquoi de nombreux travaux visent à mettre au point des alternatives plus rapides et plus simples à mettre en place que le protocole standard actuel, évoqué page 67 (Jehl et al. 2021).

Dans ce contexte, l'idée d'un marquage métabolique est particulièrement prometteuse. Un microorganisme exposé à un antibiotique voit en effet son métabolisme altéré en réponse au stress, voire arrêté en cas de mort cellulaire. Suivre le métabolisme des cellules permettrait donc de repérer les organismes in affectés par les antimicrobiens, et donc résistants. Cette approche serait également sensible aux microorganismes *viables non-cultivables*, un état particulier dans lequel l'organisme altéré n'est plus détectable par les méthodes classiques mais toujours capable de déclencher une infection. Les marquages métaboliques les plus communs impliquent des réactifs colorés ou des isotopes radioactifs, mais les spectroscopies vibrationnelles ouvrent la voie à une nouvelle méthode : le marquage au deutérium (Tao et al. 2017).

Comme évoqué précédemment, les fréquences de vibration des liaisons moléculaires dépendent de la masse des atomes impliqués. Ainsi, deux isotopes d'un même élément donneront lieu à des modes vibrationnels différents, ce qui rend possible leur distinction par spectroscopies vibrationnelles. C'est par exemple le cas de l'oxyde de deutérium (D_2O), aussi appelé eau lourde, dont le spectre infrarouge est comparé à celui de l'eau en Figure 107.

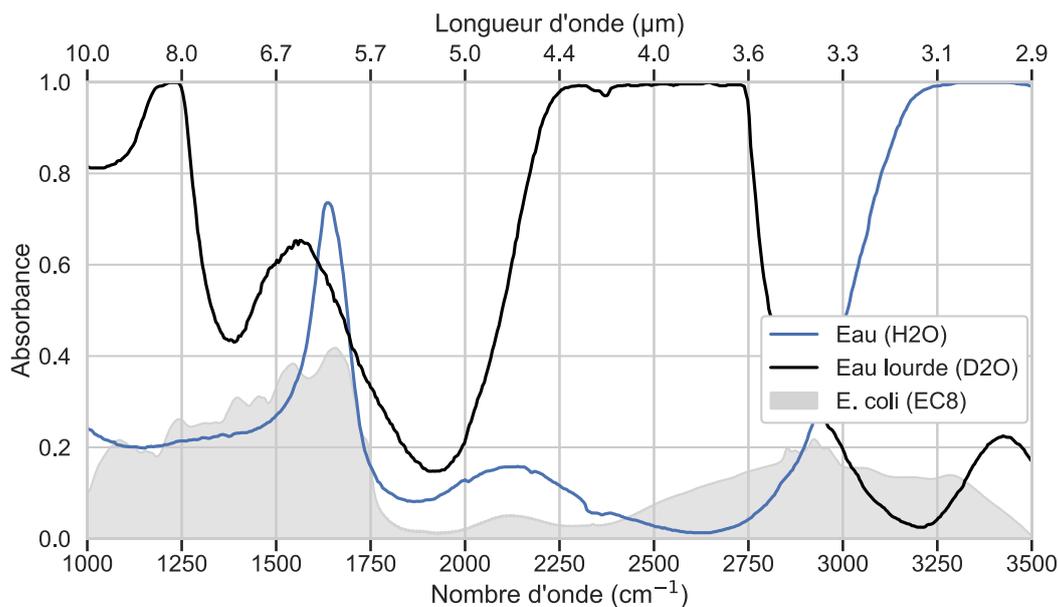


Figure 107. Comparaisons des spectres FTIR de l'eau et de l'eau lourde. Un spectre de colonie bactérienne est présenté en arrière-plan à des fins de comparaison.

Des microorganismes cultivés en présence d'eau lourde l'utilisent comme source d'hydrogène, et intègrent ainsi peu à peu le deutérium aux biomolécules. Dans le cas des protéines, l'intégration diminue l'absorbance à 1550 cm^{-1} et décale le pic Amide I de 1650 cm^{-1} à 1630 cm^{-1} (Blout et al. 1961). La culture sur eau lourde cause également l'apparition d'un pic Carbone-Deutérium (C-D) aux alentours de 2100 cm^{-1} (Chin et al. 2001). Suivre l'évolution dans le temps de ces pics permet un suivi de l'activité métabolique de microorganismes. Le pic C-D est particulièrement intéressant, puisque la signature spectrale biologique est quasiment éteinte entre 1800 cm^{-1} et 2500 cm^{-1} , ce qui faciliterait la lecture.

Le marquage au deutérium présente également des avantages pratiques, les principaux étant la stabilité de l'isotope, sa relative disponibilité, et surtout la biocompatibilité de l'eau lourde. Celle-ci est mise en évidence en Figure 108, qui présente des images infrarouges de cultures de *E. coli* ensemencées sur un milieu TSA préparé avec 100 % d'eau lourde. Le changement de solvant n'a pas empêché le développement normal de colonies.

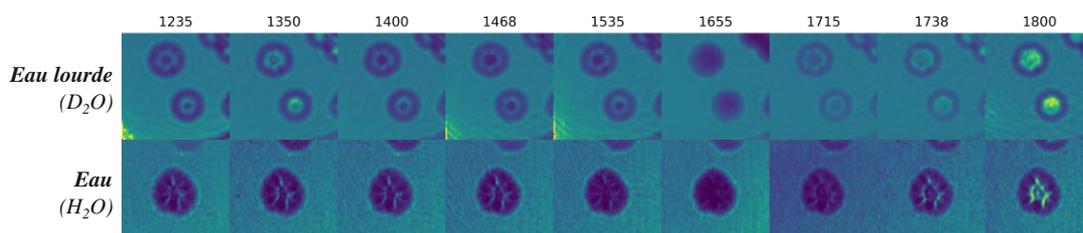


Figure 108. Images infrarouges de colonies de *E. coli* cultivées sur eau classique et sur eau lourde.

Pour suivre le métabolisme de colonies, nous pourrions donc envisager de commencer une culture sur milieu classique, puis déplacer les colonies ou microcolonies sur milieu à l'eau lourde. Ce procédé de transfert est facilité par la membrane d'alumine, qui permet de changer de milieu en cours de culture sans perturber la croissance (den Hertog et al. 2010). La culture sur milieu deutéré, combinée avec une mesure aux infrarouges avant et après incubation sur milieu à l'eau lourde, permettrait de mesurer la vitesse d'assimilation du deutérium, et donc de surveiller l'activité métabolique.

En plus de potentielles applications en recherche, ce marquage métabolique ouvrirait la voie à une nouvelle méthode de dépistage d'antibiorésistance. Le schéma en Figure 109 propose une ébauche de ce à quoi pourrait ressembler un protocole de test contre un antibiotique donné, *via* un transfert de la membrane sur milieu de culture à l'eau lourde. Tout le procédé de diagnostic microbiologique, de l'identification à l'AST pourrait alors se faire sur un même système d'analyse.

Les travaux sur le marquage métabolique au deutérium viennent tout juste de débiter et seront poursuivis dans le cadre de la thèse de Stéphan Pissot, débutée début novembre 2021.

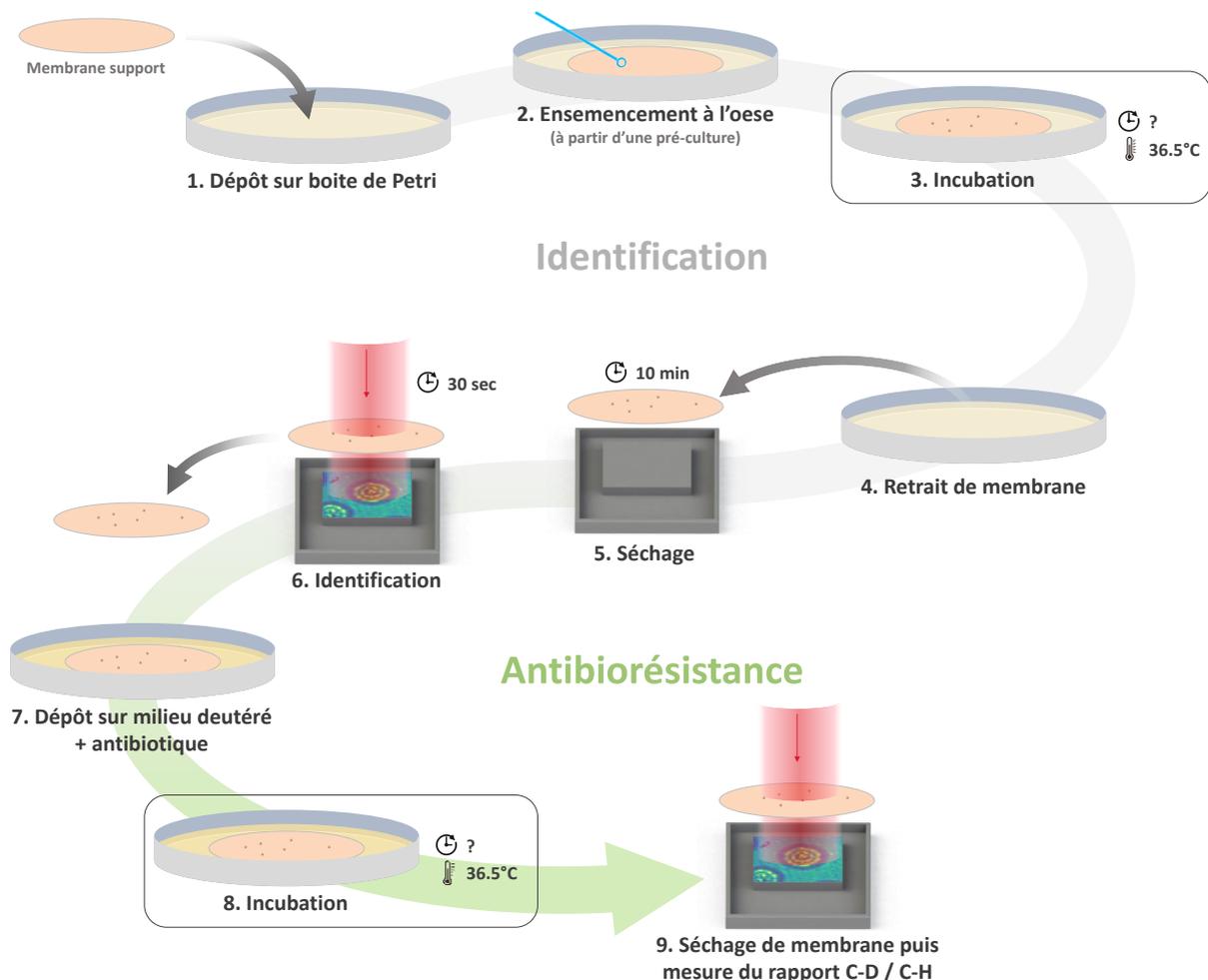


Figure 109. Proposition de protocole pour tester la résistance à un antibiotique par marquage isotopique au deutérium. Les étapes 1 à 6 sont les mêmes que pour le protocole utilisé au cours de ces travaux de thèse (voir section II.4.1, p.64). Le procédé proposé pour les étapes 7 à 9 permettrait théoriquement de tester la résistance d'un microorganisme contre un antibiotique donné, et ce sans repiquage. Il faut toutefois noter qu'un seul antibiotique serait ici testé, là où les protocoles standards en testent plusieurs. Des alternatives à ce protocole sont donc en cours de réflexion.

IV.4. Positionnement face à l'état de l'art et applications envisagées

IV.4.1. Comparaison à l'état de l'art

L'imagerie multispectrale dans l'infrarouge pourrait, à terme, devenir un nouvel outil d'identification de colonies microbiennes sans marquage. Dans ce contexte, et même si d'importants travaux sont encore nécessaires avant d'envisager une application commerciale, il nous paraît intéressant de discuter des capacités de cette technologie en regard de l'état de l'art.

Comme discuté dans le Chapitre I (p.16), le MALDI-TOF est actuellement la technologie de référence pour l'identification sans *a priori*. Avec un taux d'identification correct moyen de 85 % sur espèces cliniques (d'après Zhou et al. 2017, une méta-analyse sur 50 articles regroupant plus de 35 000 isolats), une bonne implantation dans les hôpitaux et d'importants développements de la part des industriels, la spectrométrie de masse est aujourd'hui difficilement concurrençable sur le marché clinique. C'est malgré tout le défi que tente de relever le FTIR, avec l'arrivée récente d'appareils comme le i-dOne d'Alifax, capable de reconnaître une cinquantaine d'espèces à partir d'une culture sur milieu gélosé (Alifax 2021). Le IR-biotyper de Bruker est quant à lui vendu comme un appareil de typage de souche, à la fois pour des applications clinique et agroalimentaire (Bruker 2021). Compte tenu de la taille actuelle des bases de données disponibles en MALDI-TOF, étoffées d'année en années, il faudra toutefois du temps pour juger des performances réelles du FTIR face à son concurrent. Pour l'heure, seules de rares études comparent les deux technologies, avec un avantage pour la spectrométrie de masse (Wenning et al. 2014).

Malgré des avantages liés à l'aspect grand-champ de la technologie, l'imagerie multispectrale dans l'infrarouge risque donc, pour l'heure, d'avoir des difficultés à concurrencer les performances et la rapidité de ces appareils. Cependant, d'autres avantages pratiques sont en sa faveur. Nous commencerons par une instrumentation simplifiée et donc moins coûteuse. Les estimations actuelles tablent sur 20 000 à 50 000 € par appareil, contre environ 250 000 € pour un MALDI-TOF auxquels s'ajoutent les frais de maintenance. De petits laboratoires cliniques ou industriels pourraient donc s'équiper d'un imageur multispectral infrarouge à frais bien moindre que pour un MALDI-TOF.

La question de la membrane en alumine reste cependant en suspens. Si des entretiens avec des cliniciens laissent envisager l'acceptation de ce consommable, il n'empêche que celui-ci apporterait un coût d'environ 5 € par boîte de Petri, y compris pour des cultures négatives. Se passer de la membrane impliquerait une imagerie en réflexion, ce qui, d'après des tests préliminaires, s'avèrera probablement difficile. En conséquence, cette technologie s'orienterait en priorité vers des applications nécessitant d'ores et déjà une membrane de filtration. C'est par exemple le cas pour les analyses de qualité de l'eau.

IV.4.2. Application possible pour la surveillance de la qualité de l'eau

La surveillance de la qualité des eaux de consommation et de baignade implique 92 000 stations microbiologiques en Europe, dont 6 700 uniquement en France (European Environment Agency 2018, 2021). Les analyses réalisées quotidiennement ciblent quelques contaminants connus, en particulier :

- *E. coli*, à distinguer parmi les autres coliformes et dont la présence indique une contamination fécale.
- *Enterococcus faecium* & *Enterococcus faecalis* à chercher parmi les entérocoques totaux, autre signe de contamination fécale.
- Les bactéries du genre *Salmonella*, sources fréquentes de maladies diarrhéiques et posant d'importants risques de résistances aux antibiotiques (WHO 2018).

Le protocole standard de contrôle qualité implique la filtration d'échantillons d'eau allant de 100 mL à 1 L. Les microorganismes sont ensuite mis en culture directement sur la membrane de filtration. Les colonies suspectes peuvent alors être séquencées pour identification. Une autre méthode consiste à incuber les cultures sur milieu chromogénique, contenant un substrat enzymatique chromogénique et précipitant. Cette méthode permet d'identifier une espèce précise en 24 à 48 h (IDEXX France). Il est également possible de quantifier le nombre de cellules d'une espèce par rapport au nombre total de cellules du même genre (ex : *E. coli* / coliformes totaux), mais cette méthode demande plusieurs consommables en plus de la membrane de filtration (système Quanti-Tray). De plus, chaque milieu ne détecte qu'une espèce d'intérêt. Il faut donc utiliser 3 à 4 boîtes chromogéniques pour tester toutes les espèces d'intérêt pour la qualité de l'eau, ce qui crée rapidement un coût conséquent par rapport à une membrane.

Une identification par imagerie multispectrale dans l'infrarouge prendrait ici tout son sens. Elle permettrait en effet d'identifier toutes les cibles sur une seule culture, mais tirerait aussi parti de la membrane déjà utilisée pour la filtration et la culture (Figure 110). L'aspect grand champ de la technologie et la rapidité d'analyse seront également de sérieux avantages compte tenu du nombre d'échantillon à analyser. Enfin, rappelons que la technologie a montré de bonnes capacités à distinguer *E. coli* et *E. cloacae* d'autres espèces, y compris en validation croisée stricte.

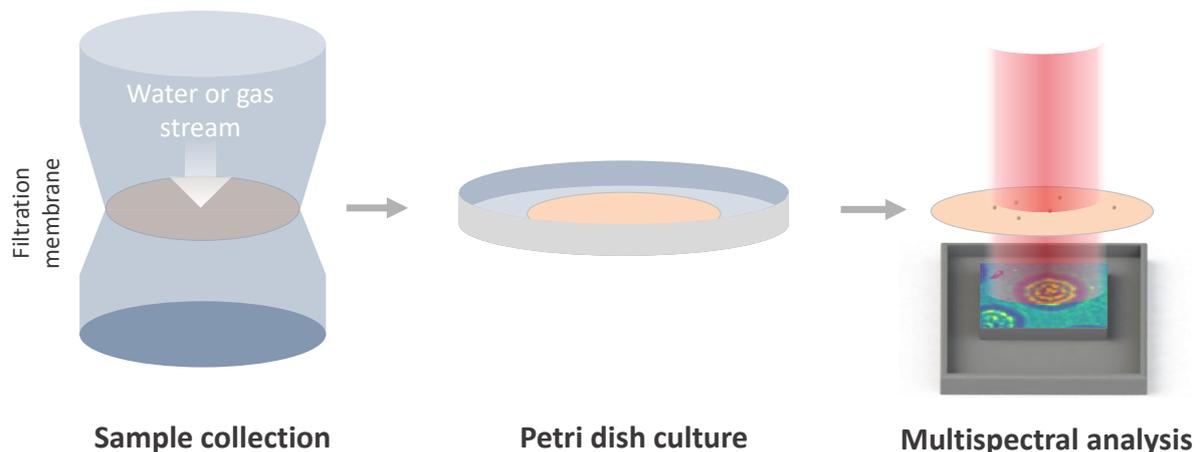


Figure 110. Ébauche de procédé de collection puis d'analyse d'échantillons pour le suivi de la qualité microbiologique de l'eau.

Compte tenu d'un marché important et d'aspects pratiques avantageux, la surveillance microbiologique de l'eau est donc envisagée comme l'une des applications de la technique. De nouvelles acquisitions sur différents coliformes et *Enterobacter* sont d'ores et déjà envisagées pour tester les performances de la méthode sur ces espèces, et les comparer à celles d'une autre technologie concurrente : l'imagerie sans lentille dans le visible (Maeda 2017, Ozcan 2016).

Conclusion générale

Résumé des travaux

Ces travaux de thèse se sont attachés à l'évaluation des performances d'une nouvelle technique d'imagerie pour l'identification sans marquage de colonies de microorganismes cultivées sur milieu gélosé. Cette méthode repose sur une combinaison entre l'imagerie sans lentille, qui consiste à approcher un échantillon au plus proche d'un capteur, sans élément optique intermédiaire, et l'imagerie multispectrale, qui vise à enregistrer plusieurs images à une série de longueurs d'ondes discrètes. L'imagerie multispectrale sans lentille donne ainsi naissance à une pile d'image, appelée hypercube, qui représente à la fois les aspects morphologiques de l'échantillon, mais également l'évolution de sa réponse selon les longueurs d'ondes. Dans l'infrarouge, cette évolution donne, selon le principe de la spectroscopie vibrationnelle, des informations sur la composition chimique de l'échantillon.

L'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge apporte donc des données riches, à la fois morphologiques et spectrales, tout en simplifiant l'instrumentation communément utilisée pour ces analyses. Cette simplification passe à la fois par l'absence de lentilles et d'objectifs, qui rend le système plus compact en se passant d'optiques infrarouges onéreuses, mais également par la discrétisation des sources lumineuses, rendue possible grâce au développement des QCLs. Un imageur infrarouge consistant en une matrice de microbolomètres permet également de simplifier plus encore le système, ce type de capteur ne nécessitant aucun refroidissement cryogénique habituellement nécessaire à l'imagerie dans l'infrarouge. Ces différents éléments ont été mis à profit pour concevoir un banc optique pouvant imager un échantillon à plusieurs longueurs d'ondes dans l'infrarouge, et ce sans spectrophotomètre.

Ce système a permis l'acquisition d'une base de données de 2253 hypercubes représentant chacun une colonie imagée à 9 longueurs d'ondes, entre 5 et 8 μm . Huit espèces et trois souches de *S. epidermidis* ont ainsi été analysées. Des approches de traitement d'image et d'apprentissage machine ont ensuite été appliqués pour classifier les échantillons. L'utilisation de descripteurs d'images simples, tels que le rayon, la transmittance à chaque longueur d'onde ou encore des paramètres de texture, couplée à une classification par SVM, a abouti à un taux d'identification correct de 94.4 % (souches et espèces séparées). Une approche par réseaux de neurones convolutifs a également été testée, pour des résultats légèrement moins convaincants (CIR moyen : 91.5 %).

Ces premiers travaux ont permis de démontrer l'intérêt de la méthode, mais également de mettre en évidence certaines limitations. Celles-ci apparaissent majoritairement liées à des défauts expérimentaux, comme l'influence des conditions atmosphériques sur le séchage de la membrane ou les difficultés de reproductibilité de certains réglages du banc optique (alignement du laser, distance objet-capteur). Plusieurs modifications de protocoles visent d'ores et déjà à corriger ces défauts ce qui, à l'avenir, permettra l'acquisition d'une nouvelle base de données.

Actuellement, les défauts de performance observés sur une validation croisée dite *stricte* (CIR : 68.8 %) semblent ainsi provenir de causes expérimentales plutôt que d'une réelle limitation des informations apportées par la technique.

Perspectives

Compte tenu des éléments présentés ici, les prochains travaux concerneront en priorité les améliorations du système d'acquisition, déjà en partie implémentées. À présent, nous présenterons quelques axes de recherches envisagés pour élargir les perspectives de l'imagerie multispectrale dans l'infrarouge.

Tout d'abord, des expériences d'imagerie en réflexion sont envisagées. L'eau absorbant fortement dans l'infrarouge moyen, une imagerie en transmission à travers une boîte de Petri et son milieu de culture n'est pas envisageable, ce qui force l'utilisation d'une membrane poreuse servant à la fois de support de croissance et d'imagerie. Toutefois, l'imagerie en réflexion permettrait peut-être de se passer de ce nouveau consommable en travaillant directement sur la boîte de Petri. Compte tenu de l'absorbance des milieux de culture, cette modalité d'imagerie soulèvera probablement des difficultés, mais des tests expérimentaux sont encore nécessaires pour trancher sur sa faisabilité.

Une autre piste d'amélioration concerne l'imageur microbolométrique. Même si la résolution reste contrainte par la limite de diffraction ($\approx 5 - 8 \mu\text{m}$), de nouvelles matrices de microbolomètres plus résolues (jusqu'à 12 voire $8.5 \mu\text{m}$ de pas de pixel), mais également plus définies (jusqu'à 320 par 260 pixels) devraient prochainement offrir des informations plus détaillées sur les colonies imagées. L'impact de ces détails sur les performances d'identification reste à évaluer, mais des matrices de plus grande taille seront, quoi qu'il arrive, bénéfiques. Un champ optique plus large permettra en effet d'imager plus de colonies en une seule acquisition, et donc d'accélérer les analyses. Si une meilleure résolution s'avérait bénéfique pour les performances, des techniques de super-résolution, brièvement testées en marge de ces travaux, pourraient également être implémentées pour améliorer la précision des images (Ozcan et McLeod 2016).

Comme évoqué dans les chapitres I et IV, les domaines d'application pour l'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge ne manquent pas. Si l'identification microbiologique pour le domaine du médical et le contrôle de la qualité de l'eau est actuellement envisagée comme application principale, d'autres domaines comme la cosmétologie, la pharmacologie, ou encore l'imagerie sur tissus biologiques pour le diagnostic en cancérologie pourraient également bénéficier de cette technologie. Un jeu de longueurs d'ondes optimal sera toutefois à définir pour chaque application.

Avec des performances prometteuses, des perspectives d'évolution à court et moyen terme ainsi que des applications dans des domaines variés, l'imagerie multispectrale sans lentille dans l'infrarouge apparaît donc comme un outil d'avenir pour l'identification sans marquage de colonies de microorganismes.

Annexe A. Origine des dessiccations de colonies

Lors de l'extension de la base de données pour inclure des images de staphylocoques, début janvier 2020, des phénomènes de dessiccation des colonies sont apparus lors de la phase de séchage à l'air de la membrane (Figure 111). Ce dessèchement rapide se traduisait par des craquelures, des décollements, voir des éclatements assez violents pour projeter des débris. Dans tous les cas, la forme des colonies se voyait suffisamment altérée pour ne plus être reconnaissable. Ce problème, non observé sur la première série d'acquisitions à l'automne 2019, survenait de façon apparemment aléatoire d'un jour à l'autre. La température étant maintenue constante dans l'enceinte du laboratoire, plusieurs origines ont été envisagées pour expliquer à la fois le craquèlement, l'aspect non-systématique et l'apparition subite du problème :

- Un comportement particulier lié aux staphylocoques
- Une altération de la membrane, par exemple liée à l'autoclave, à la face de dépôt ou à un lot en particulier
- Des variations atmosphériques, comme la température ou le degré d'humidité du laboratoire (hygrométrie)

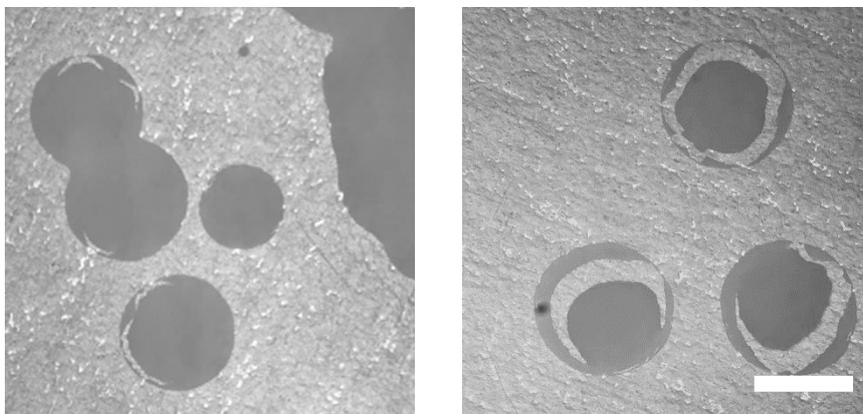


Figure 111. Images en réflexion de colonies sur membrane d'alumine, observées à la loupe binoculaire.
À gauche : colonies de SS91 en cours de séchage. À droite : colonies de SS91 séchées avec forme de dessiccation. Barre d'échelle : 1mm.

Toutes les expériences présentées ci-dessous découlent du protocole décrit en II.4.1. Le milieu de culture a cependant été changé pour du TSA, le milieu COS habituellement utilisé étant en rupture de stock au moment des premières expériences. Les formes de dessiccation ont été observées indistinctement sur colonies cultivées en milieu COS et TSA. Toutes les images présentées sont observées à la loupe binoculaire avec un éclairage en transmission et un grossissement x32.

Impact de l'espèce et du calibre des pores membranaires

Tout d'abord, des cultures de EC8 – espèce imagée sans difficulté notable à l'automne 2019 – ont été préparées en parallèle de cultures de SS91 – espèce sur laquelle les formes de dessiccation sont le plus souvent observées. Ces cultures ont été préparées sur trois types de membranes d'alumine avec des calibres de pores différents : 20 nm, 100 nm et 200 nm de diamètre, afin d'évaluer un éventuel effet de ce paramètre. Après retrait et séchage de la membrane, les colonies de EC8 et SS91 présentent un comportement similaire malgré des morphologies différentes (Figure 112).

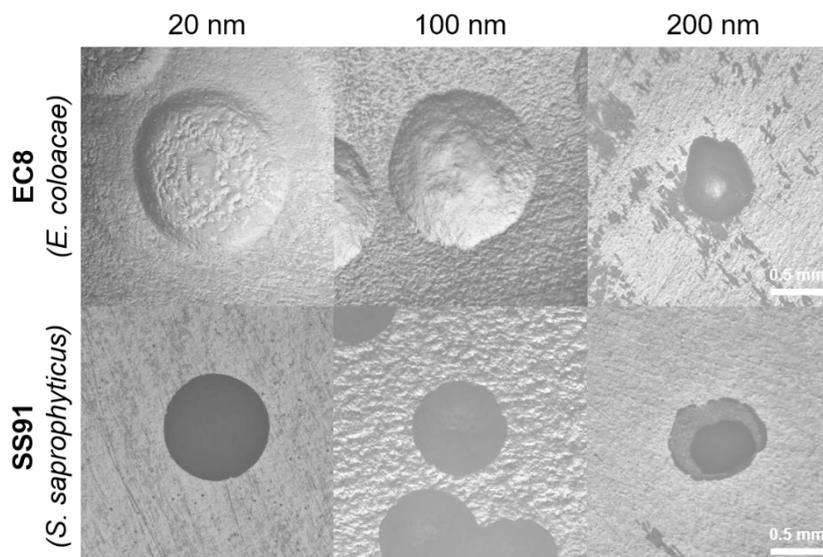


Figure 112. Impact de la porosité membranaire sur la morphologie des colonies de deux espèces (EC8 et SS91).

Sur membranes 20 nm, les colonies conservent la circularité observée sur boîte de Petri, et ce même après quinze minutes de séchage, ce qui correspond au comportement attendu. Avec membranes de 100 nm, les observations restent assez similaires, malgré de légères indentations en bordure pouvant sous-entendre une contraction de la colonie liée au dessèchement. Enfin, sur membranes 200 nm, les colonies présentent une taille plus réduite, décollées et irrégulières, comme précédemment constaté.

Ces observations attestent de l'indépendance du phénomène de dessiccation avec l'espèce utilisée, EC8 présentant en janvier 2020 un comportement non observé précédemment. L'autre donnée intéressante est la différence de morphologie observée selon le type de membrane. Deux explications peuvent être apportées pour expliquer ce phénomène : soit des pores de calibres plus faibles offrent plus de surface d'accroche, ce qui aiderait les colonies à rester attachées à la membrane malgré le séchage, soit l'évaporation est défavorisée par des pores plus étroits, ce qui piègerait l'eau sous les colonies et empêcherait leur séchage complet.

La membrane de culture semble donc avoir un impact important sur la dessiccation.

Impact des cycles autoclaves

Dans les premières versions du protocole, les membranes d'alumine étaient autoclavées par sécurité avant de servir de support de culture. Pour des raisons d'économie, les membranes inutilisées à la fin d'une journée de manipulations étaient réutilisées le lendemain et pouvaient

ainsi être autoclavées plusieurs fois. Il est possible que ces répétitions de cycles haute température-pression aient altéré les propriétés chimiques des membranes, en particulier leur affinité à l'eau. De telles modifications pourraient expliquer pourquoi certaines membranes verraient leurs colonies se décoller. Des membranes d'alumines 200 nm ont donc été analysées par spectrométrie FTIR après un nombre variable de cycles autoclaves (Figure 113). Si les spectres de membranes non autoclavées et autoclavées une seule fois sont similaires, des différences notables apparaissent dans la zone 1350 – 1700 cm^{-1} après plus de quatre cycles.

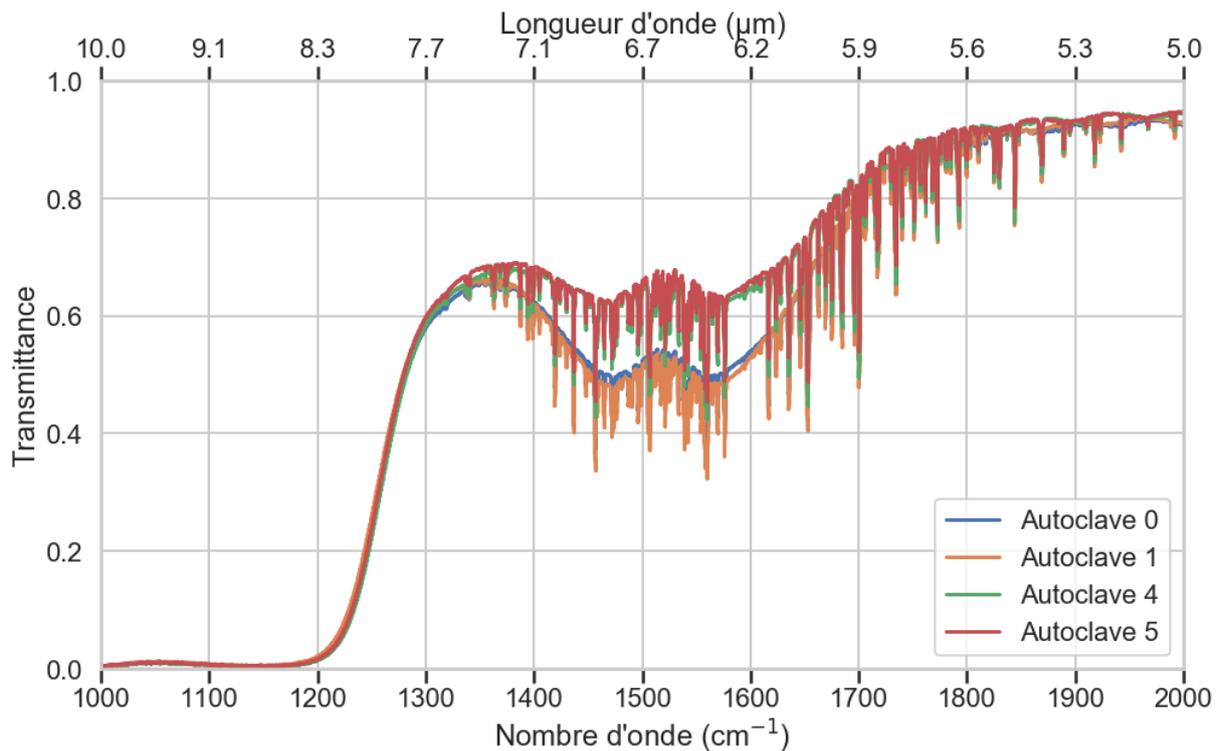


Figure 113. Spectres FTIR de membranes d'alumine avec un nombre variable de cycles autoclaves.

Ces différences pourraient toutefois provenir de variations normales d'absorbance d'un lot de membrane à l'autre. Ce dernier point n'a pas été vérifié, puisque les cultures de EC8 et SS91 préparées en parallèle sur membranes non-autoclavées et autoclavées cinq fois ont toutes été sujettes à la dessiccation. L'hypothèse de la modification chimique par l'autoclave a donc été abandonnée.

Toutefois, ces expériences ont mis en évidence une autre conséquence du passage à l'autoclave, cette fois-ci sur le plastique support. En effet, celui-ci se rétracte sous l'effet de la chaleur dès le premier cycle pression-température (d'après la notice, les Anodiscs sont prévus pour une utilisation en dessous de 40°C, tandis que l'autoclave atteint les 120°C). Ce repliement du plastique hors du plan de la membrane contraint la face d'étalement des microorganismes. Ce phénomène avait systématiquement été observé auparavant (Figure 114.C : relevé), mais un changement de lot de membranes au cours des manipulations a révélé que le repliement du plastique pouvait varier d'un lot à l'autre (Figure 114.C : tordu et replié). Cette variabilité du sens de repliement des membranes a conduit à réaliser l'étalement parfois sur la face supérieure, parfois sur la face inférieure. Or, les deux faces étant différentes (Figure 114.A), cette alternance crée des conditions de culture différentes.

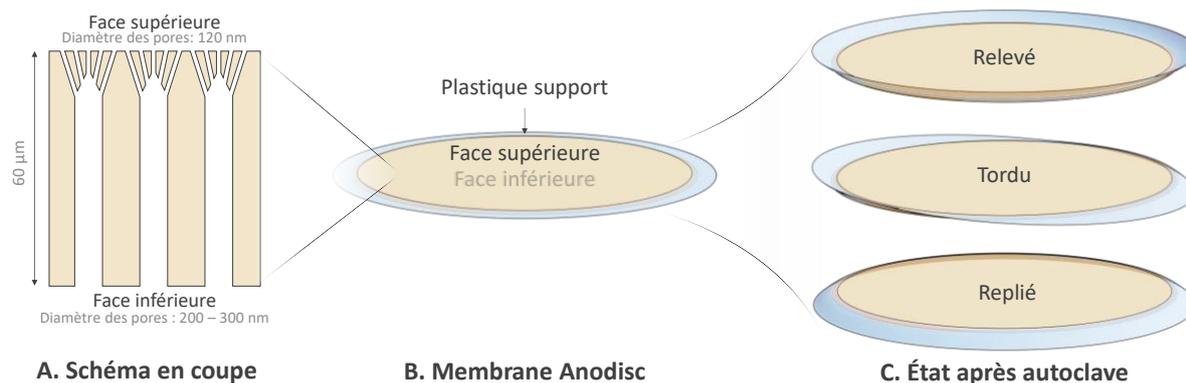


Figure 114. Asymétrie des membranes d'alumine. Les calibres de pores indiqués sur le schéma en coupe sont ceux mesurés lors des observations au MEB, présentées en Figure 48 (p.61).

Impact de l'hygrométrie

Enfin, compte tenu de la nature du phénomène, il était suspecté que l'atmosphère du laboratoire ait un impact sur le séchage de la membrane. Si la température est maintenue constante dans l'enceinte du bâtiment, l'hygrométrie n'est en revanche pas contrôlée. Un capteur d'humidité a donc été installé dans le laboratoire d'optique, et le degré d'hygrométrie mesuré avant chaque manipulation de membrane pendant plusieurs jours. Les variations mesurées sont conséquentes : au sein d'une même journée, le HR peut varier entre 25 et 50 % (voir Figure 98, p.122). Des cultures de SS91 sur membranes 200 nm autoclavées une fois (selon le protocole en vigueur à l'époque) ont directement été impactées par ces variations, comme présenté en Figure 115.

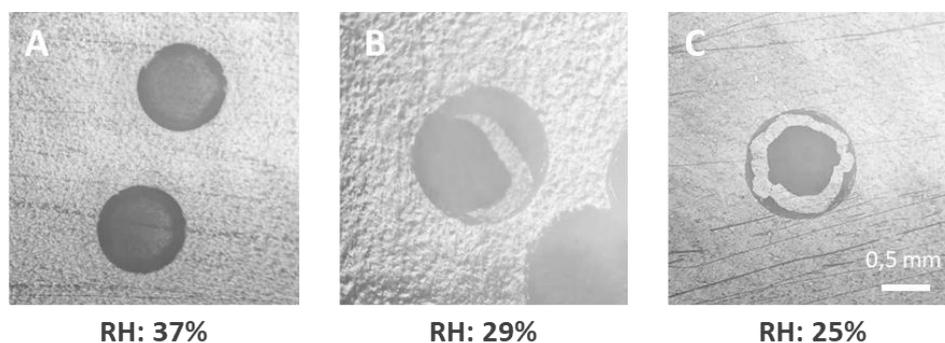


Figure 115. Formes de dessiccation sur colonies de *S. saprophyticus* en fonction du HR de la pièce, observées à la loupe binoculaire. A : colonie normale, B : colonie en cours de décollement. C : colonie entièrement craquelée, le centre de l'échantillon n'est en réalité plus rattaché à la membrane.

Sur une même espèce et dans des conditions expérimentales autrement inchangées, la dessiccation des colonies est donc directement liée à l'humidité atmosphérique. Les manipulations ont également été répétées dans un autre bâtiment du campus pour un résultat identique, ce qui exclut un éventuel paramètre atmosphérique spécifique au laboratoire.

Conclusion sur l'origine

Le phénomène de dessiccation des colonies est donc lié à l'humidité de l'atmosphère. Ce paramètre, non contrôlé dans nos laboratoires, varie librement en fonction des conditions extérieures ce qui explique la nature faussement aléatoire du phénomène. En revanche, l'hygrométrie seule ne suffit pas à expliquer pourquoi la dessiccation n'avait jamais été observé lors des premiers essais en aout et décembre 2019. Ce second problème semble plutôt découler

d'un changement de lot de membranes entre décembre 2019 et janvier 2020 (un lot = 50 membranes). Ce nouveau lot apporte un changement majeur qui, au cours des expériences, est lui aussi apparu comme corrélé au problème : la face d'étalement.

Avec le premier lot, toutes les membranes voyaient leur plastique support se replier du même côté, ce qui contraignait toujours l'étalement des microorganismes sur la même face (face supérieure, ou surface de filtration). Les membranes du second lot quant à elles, se repliaient selon trois modes différents décrits en Figure 114. La face contrainte n'était donc pas toujours la même, ce qui, couplé aux variations hygrométriques, explique le phénomène observé. Cette explication suppose que cultiver les colonies uniquement sur la face supérieure pourrait résoudre le problème, ce qui a ensuite été testé.

Solutions explorées

Plusieurs solutions ont été considérées pour répondre au problème de dessiccation :

- Contrôler l'atmosphère lors du séchage et des acquisitions
- Contrôler la face d'étalement des microorganismes
- Limiter l'impact de la dessiccation en contrôlant la température de séchage

Compte tenu de l'organisation de notre laboratoire, un système de conditionnement de l'atmosphère serait difficile à mettre en place, c'est pourquoi les autres solutions ont été explorées en priorité.

Remarque : Le milieu habituellement utilisé pour nos expériences étant de nouveau disponible au laboratoire à cette période, il a été décidé de repasser sur milieu COS, dans un souci de cohérence avec les données déjà acquises. À l'exception de ce changement, le protocole des expériences présentées ci-dessous reste le même que précédemment.

Température de séchage

Au cours des manipulations, il est apparu que les colonies placées sous le faisceau de la loupe binoculaire avant séchage complet conservaient leur forme sans impact du HR, et ce même lorsque les autres colonies de la membrane se décollaient. De façon empirique, il a été proposé que ce phénomène puisse découler de l'échauffement induit par la concentration du faisceau lumineux sur la colonie. Pour tester l'impact de la température sur l'aspect des colonies après séchage, plusieurs cultures de SS91 ont été mises à sécher pendant 15 minutes dans une étuve réglée à 25, 37, puis 70°C. Toutes les membranes ont été séchées et observées sur une seule matinée, avec un HR mesuré stable à 25 %. Pour chaque mesure, un témoin était laissé à sécher dans la même pièce mais hors de l'étuve. Les résultats observés sur les témoins sont toujours identiques à ceux d'un séchage à température ambiante 25°C (Figure 116 : 25°C).

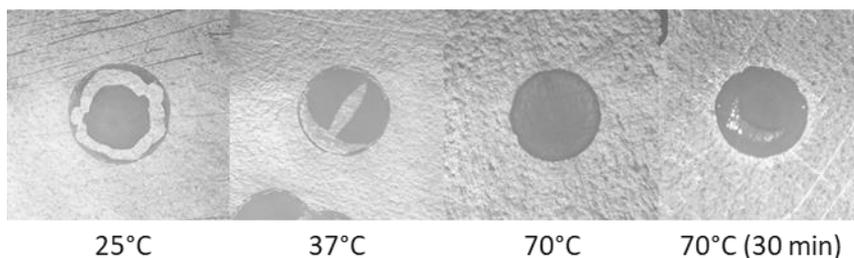


Figure 116. Impact de la température de séchage sur la morphologie des colonies.

Ainsi, les colonies séchées à 37°C (température d'incubation) apparaissent moins altérées que celles laissées à température ambiante, mais restent difficilement exploitables. En revanche, les colonies séchées à température élevée (70°C) conservent leur morphologie malgré un HR maintenu à 25 % (Figure 116). Un séchage à haute température permettrait donc de s'affranchir du problème de dessiccation.

Cependant, l'un des principaux arguments en faveur des technologies optiques, et en particulier de l'imagerie sans lentille dans l'infrarouge, est leur aspect non-destructif. Chauffer des colonies de microorganismes à 70°C pendant 15 minutes, largement au-dessus de leur température de croissance, altérerait largement les échantillons et interdirait toute analyse ultérieure. De plus, les colonies présentes sur une membrane laissée pendant 30 minutes à l'étuve montrent toutes des altérations de morphologies probablement liées à la température. Si ces altérations ne sont pas clairement visibles dès 15 minutes de séchage, il est probable que les phénomènes dont elles découlent aient déjà commencé. Un séchage à haute température apparaît dès lors comme une demi-solution, et n'a donc pas été exploré plus en profondeur.

Solutions via la membrane

Comme observé sur la Figure 112, utiliser des membranes avec des pores de 20 nm de diamètre au lieu des 200 nm actuellement utilisés limiterait fortement (sinon totalement) le phénomène de dessiccation. Toutefois, l'opacité de ces membranes à des longueurs d'ondes au-delà de 8 μm interdit l'imagerie à certaines longueurs d'ondes d'intérêt, en particulier 1250 cm^{-1} , associée à la liaison phosphodiester, ce qui limite l'intérêt de ces membranes (voir Figure 49, p.62). Les membranes 100 nm ont un temps été envisagées comme un bon compromis mais des expériences ultérieures ont montré qu'elles n'empêchaient pas totalement la dessiccation, même si elles limitaient son impact (données non présentées).

Les recherches ont donc été orientées vers la face d'étalement. Les membranes étant asymétriques (Figure 114.A), la face sur laquelle sont étalés les échantillons biologiques a un impact sur la formation des colonies, ce qui a déjà été observé lors de tests préliminaires au laboratoire (Bisceglia 2010). Cette face de dépôt étant conditionnée par le gondolement du plastique après passage à l'autoclave, les tests suivants ont été réalisés sur membranes non-autoclavées. Deux cultures de SS91 ont donc été préparées en parallèle, l'une sur la face supérieure d'une membrane (face de filtration, voir Figure 114.A), l'autre sur la face dite « inférieure » d'une seconde membrane. Les deux cultures sont incubées, puis séchées simultanément. Le % HR a également été mesuré au moment des observations, présentées en Figure 117.

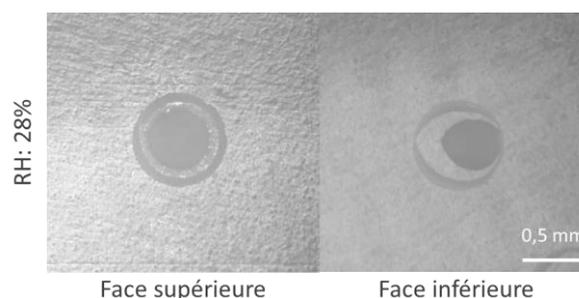


Figure 117. Impact de l'orientation de la membrane sur la dessiccation de colonies de SS91.

Si les colonies sont impactées par le % RH sur les deux types de cultures, celles étalées sur la face supérieure conservent leur aspect circulaire et ne présentent pas les craquèlements visibles sur les cultures en face inférieure. La face de dépôt a bien un impact sur la morphologie des colonies après séchage. Ce phénomène a été vérifié sur d'autres cultures. Si la forme semble systématiquement altérée par un degré d'humidité faible, l'absence de forme de dessiccation (craquèlements, décollements) rend les images exploitables. Ces altérations pourraient toutefois induire une forte variabilité d'un jour de mesure à l'autre, ce qui explique en partie les résultats observés en validation stricte (comme discuté en section IV.1, p.118).

Compte tenu de l'impact de la face d'étalement sur la morphologie des colonies, il a été décidé de ne plus cultiver les microorganismes que sur la face supérieure, celle-ci étant reconnaissable grâce à la position du plastique support (Figure 114). Ce changement de protocole implique cependant de ne plus autoclaver les membranes. Aucune contamination des échantillons n'a été observée au cours des différentes campagnes d'acquisitions, mais cette absence de stérilisation secondaire (après le conditionnement par le vendeur) devra être gardée à l'esprit à l'avenir.

Conclusion

La dessiccation des colonies découle donc de deux facteurs : le degré d'humidité relative, véritable origine du problème, et la face d'étalement des colonies, qui le masquait jusqu'ici. Afin de changer le moins possible le protocole en place (et d'une façon plus générale, le protocole utilisé dans les laboratoires de microbiologie), il a été décidé de ne plus autoclaver les membranes d'alumine pour mieux maîtriser la face d'étalement. Ceci, en plus de répondre au problème de dessiccation, est essentiel pour la répétabilité des expériences, les deux faces des membranes n'étant pas équivalentes. Malgré l'absence de stérilisation, aucune contamination n'a été observée au cours de expériences ultérieures, ce qui confirme la stérilité du conditionnement des Anodiscs®.

Ce changement de protocole a mis fin aux altérations de morphologie les plus importantes (craquèlement, décollement, éclatement). Cependant, le dessèchement des colonies a certainement toujours un impact sur les mesures, et semble vraisemblablement à l'origine de variations jour-à-jour. Une réelle solution à ce phénomène reste donc à mettre en place, soit *via* l'utilisation de membranes moins susceptibles au séchage (par exemple des Anodiscs à pores calibrés à 20 ou 100 nm), ou en plaçant le système d'acquisition sous enceinte à humidité constante.

Annexe B. Réglages instrumentaux pour la base de données

Les réglages des différents paramètres du bolomètre et du MIRcat sont précisés dans le tableau ci-dessous. Ceux-ci ont été conservés tout au long des acquisitions pour la base de données. Pour chaque paramètre lié au capteur (INT, GSK, GFID et Gain), sont précisés le count brut, c'est-à-dire la valeur transmise au logiciel de contrôle du capteur, et la valeur de tension ou de capacité réellement réglée sur le circuit de lecture (voir Figure 41, page 55).

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Fonction chimique associée	INT		GSK		GFID		Gain		Puissance	
		Count	Value	Count	Value (mV)	Count	Value (mV)	Count	Value (pF)	Alimentation (mA)	Puissance sur échantillon (mW)
1235	PO	55	233,75	437	2,0942	135	2,167	1	6	1050	9.1
1350	Ref	5	21,25	255	1,621	135	2,167	1	6	1050	15.5
1400	COO-	13	55,25	380	1,946	135	2,167	1	6	1050	9.7
1468	CH2	22	93,5	417	2,0422	135	2,167	1	6	880	12.6
1535	Amide 2	15	63,75	400	1,998	135	2,167	1	6	880	12.6
1655	Amide 1	15	63,75	400	1,998	135	2,167	1	6	880	4.9
1715	CO carbonic	8	34	348	1,8628	135	2,167	1	6	950	7.1
1738	CO ester	8	34	348	1,8628	135	2,167	1	6	950	14.7
1800	ref	13	55,25	400	1,998	135	2,167	1	6	950	12.4

Figure 118. Réglages de l'imageur microbolométrique à chaque longueur d'onde tels qu'utilisés pour l'acquisition d'une base de données.

Annexe C. Discussion sur la normalisation des images

À l'issue de la correction d'image présentée en section II.5.1 (page 70), des variations d'intensité de fond sont parfois observées. Ces dernières apparaissent parfois entre deux séries d'images de colonies différentes, mais également au sein d'un même hypercube, comme illustré en Figure 119.

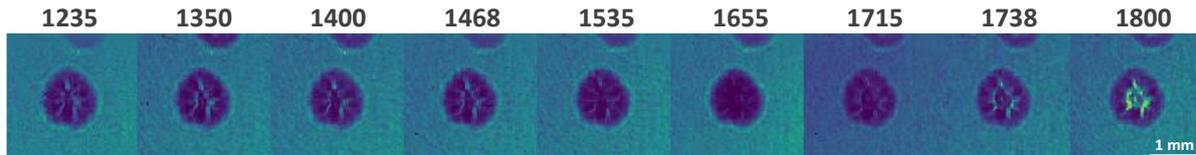


Figure 119. Différence d'intensité de fond entre 1655 et 1715 cm^{-1} , sur une colonie de *E. cloacae*. Les images ont été prétraitées comme décrit en section précédente. L'origine précise du saut de luminosité entre 1655 cm^{-1} et 1715 cm^{-1} n'est pas identifiée.

Ces défauts ne sont pas apparus lors des premiers tests, et n'ont donc été remarqués qu'après acquisition d'un grand nombre d'images. Ils pourraient être liés à une différence de séchage entre deux séries d'acquisition, à un désalignement du laser, ou encore à des interférences atmosphériques (vapeur d'eau, etc.). Ces points ont été évoqués en section IV.1.3 lors de la discussion sur les sources de variabilité expérimentales (p.122). Les acquisitions étant toujours en cours lorsque ce problème est apparu, il a été décidé de ne pas changer le protocole pour assurer la comparabilité des données. Après acquisitions, nous avons cependant souhaité lisser ces différences par une normalisation d'image. Plusieurs méthodes ont été testées :

Diviser chaque image par sa moyenne. Cette méthode devrait ramener les images à un niveau comparable mais n'est en réalité pas applicable compte tenu des objets considérés. En effet, la taille des colonies – généralement plus sombres que le fond – influe largement sur la moyenne, tout comme la présence d'agrégats de colonies. Par cette méthode, une image densément peuplée obtient donc un fond plus intense qu'une image présentant une seule colonie de petite taille.

Normaliser par le fond : c'est-à-dire diviser l'image par une moyenne calculée non plus sur l'image entière, mais uniquement sur les pixels représentant la membrane (*i.e.* le « fond » de l'image). Cette approche ignore l'impact de la taille des colonies, mais soulève d'autres problèmes liés à la reconnaissance du fond par l'algorithme. En effet, si la segmentation d'image est relativement simple, définir un critère algorithmique absolu pour reconnaître les différents objets de l'image s'avère difficile à cause des agrégats. Ceux-ci peuvent occuper une large part de l'image (Figure 120) et gêner la distinction entre le fond, les colonies, et les amas cellulaires à ignorer. La normalisation par le fond est donc une piste intéressante, mais n'a pas été explorée plus en détail par manque de temps.

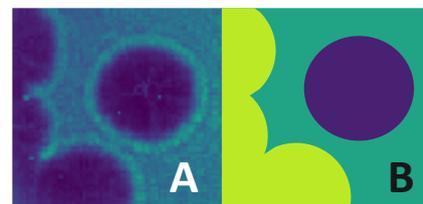


Figure 120. Segmentation d'image et sélection du fond. A : Image de *E. cloacae* à 1655 cm^{-1} . B : résultat de segmentation d'image par détection de contours (voir Figure 60, p.73).

Normaliser par une longueur d'onde de référence. Ici, l'objectif est de diviser toutes les images de l'hypercube par l'image à 1655 cm^{-1} , qui correspond à l'absorbance maximale des colonies. L'utilisation de cette image de référence devrait ainsi ramener les différents hypercubes à un niveau comparable. De plus, l'image à 1655 cm^{-1} a été rapportée comme n'apportant pas d'information significativement discriminante pour la classification (voir discussion sur les longueurs d'ondes, section III.2.4, p.95). Cette solution apparaissait donc comme idéale, mais les premiers tests se sont avérés décevants.

En effet, si l'intensité du fond est effectivement rendue comparable d'un hypercube à l'autre (données non présentées), les différences entre images d'un même hypercube restent présentes (Figure 121). Les colonies ainsi corrigées présentent de plus un aspect différent des colonies non corrigées. En conséquence, les descripteurs d'image présentés en partie III.2 (p.88) ne sont plus pertinents. Des essais de classification en SVM ont abouti à un CIR moyen de 75 %, bien en-deçà des 94.4 % obtenus sans normalisation. D'autres descripteurs plus adaptés à la nouvelle forme des colonies auraient pu améliorer les résultats, mais compte tenu des modifications à implémenter en priorité au niveau du système d'acquisition (section IV.1.3, page 122), ces travaux n'ont pas été poursuivis.

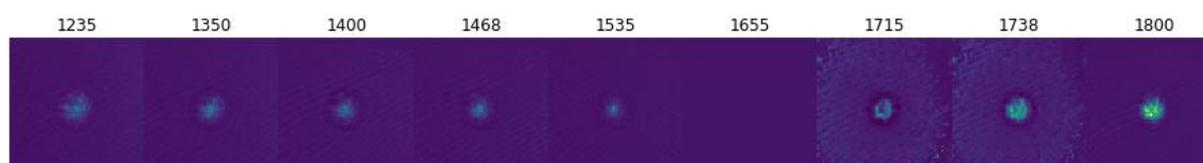


Figure 121. *Hypercube d'une colonie de S. epidermidis, normalisé par l'image à 1655 cm^{-1} . Les nombres d'ondes sont indiqués au-dessus de chaque image en cm^{-1} . Malgré la correction, un saut d'intensité est visible entre l'image à 1535 cm^{-1} et celle à 1715 cm^{-1} . L'image à 1655 cm^{-1} a été divisée par elle-même, ce qui explique son aspect.*

En conclusion, la normalisation d'image n'apparaît pas comme une solution idéale. Chaque méthode apporte de nouveaux biais et difficultés techniques, c'est pourquoi elle a été abandonnée dans le cadre de cette preuve de concept. Tous les tests de classification présentés dans ce document ont donc été réalisés sans normalisation, afin d'obtenir une première évaluation des performances de la technique et d'identifier les défauts expérimentaux à corriger en priorité. À l'avenir, des travaux sur la normalisation par une image de référence (1655 cm^{-1}) pourraient toutefois apporter des résultats intéressants.

Annexe D. Classification par histogrammes de gradients orientés

Les *histogrammes de gradients orientés* (HOG) sont une méthode de réduction des données utilisée en vision par ordinateur (Dalal et Triggs 2005). L'objectif est de ramener une image à une série de vecteurs dont l'orientation et la force retranscrivent les principaux contours et formes de l'image. Dans l'exemple en Figure 122, une image en couleur de $288 \times 512 \times 3$ pixels, soit 442 368 valeurs, a été ramenée à un vecteur à 20 736 valeurs, représentant seulement 4.68 % du nombre de points original mais conservant les grandes lignes de la scène.

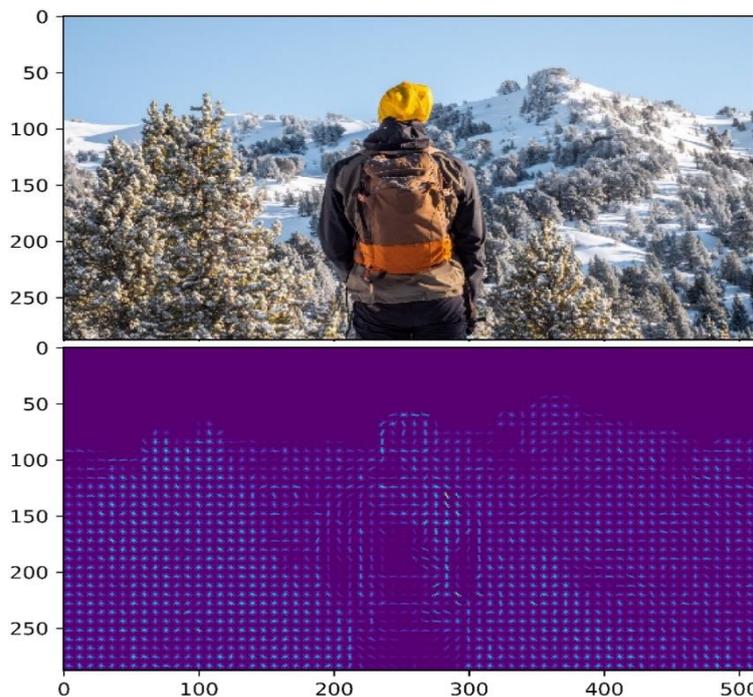


Figure 122. Exemple d'image et le HOG résultant (8*8 pixels par bloc). Image source : <https://flic.kr/p/2jAZuR2>.

Le calcul du HOG se déroule en plusieurs étapes (Mallick 2016) :

1. Tout d'abord, pour chaque pixel sont calculés deux valeurs, selon le principe décrit en Figure 123. Le calcul s'intéresse d'abord à l'intensité en x et en y des gradients des valeurs de gris autour du pixel considéré. À partir de ces valeurs sont calculés deux données qui nous intéressent ici : l'intensité globale du gradient (g) et son angle (θ).
2. L'image est ensuite divisée en cellules dont la taille dépend du cas et de la compression souhaitée (généralement 8 par 8 pixels, ou 16 par 16).
3. Pour chaque cellule, est ensuite créé un vecteur à neuf valeurs. Chaque valeur représente l'intensité du gradient de la cellule complète pour un angle donné ($0^\circ, 20^\circ, 40^\circ \dots 160^\circ$). Elles constituent en quelque sorte des cases, auxquelles seront ajoutées les valeurs des gradients de chaque pixel, proportionnellement à leur angle θ . Par exemple, un pixel avec un gradient de 3 pour un angle 0° ajoutera 3 dans la case 0° , là où un pixel avec une valeur de 8 pour un angle de 30° ajoutera 4 dans la case 20° et 4 dans la case 40° .
4. Le calcul est enfin répété à toute l'image, jusqu'à ce que toutes les cellules soient transformées en un vecteur à neuf valeurs, résumant l'intensité des gradients de la cellule pour ces neuf directions.

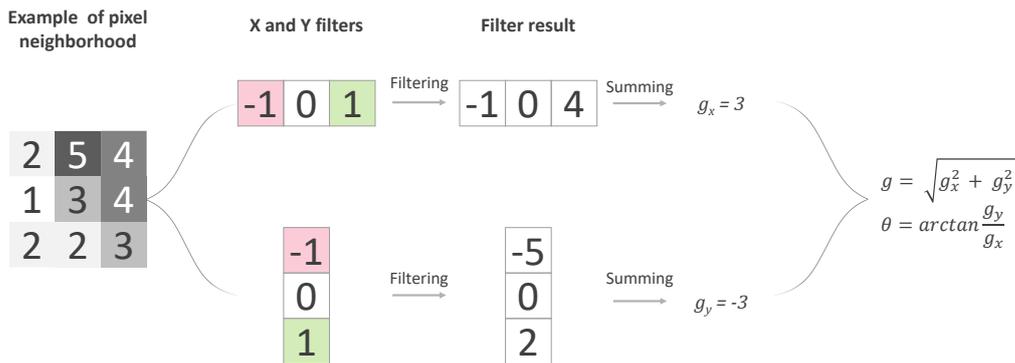


Figure 123. Principe de calcul des gradients et de leur angle.

Ici, les HOGs ont été envisagés pour remplacer les descripteurs d'image décrits en III.2. Ils seraient une nouvelle façon d'extraire les données, ensuite classifiées par MLPC ou SVM. Chaque colonie est avant tout centrée et le fond masqué (ramené à 0). Se pose ensuite la question de la taille de cellule pour le calcul du HOG. Une grande cellule (16 par 16 pixels) augmente la compression, mais une petite cellule (8 par 8) conserve plus de détails. Les deux méthodes ont été testées. Dans le cas d'une cellule de 8 par 8, les images ont également été recadrées à une taille de 40 par 40 pixels (au lieu de 80 par 80 originaux). Cette opération exclut de l'information sur les plus grosses colonies, mais ramène la quantité de données extraites au même niveau que pour la cellule de 16 par 16 pixels.

Pour chaque image d'un hypercube, le résultat est donc une matrice de 5 par 5 par 9 (nombre de directions), qu'il faut encore multiplier par 9, le nombre de longueurs d'ondes d'acquisition. Après linéarisation, un hypercube est donc représenté par un vecteur à 2655 valeurs, représentant l'orientation des gradients sur toutes les images de la pile (Figure 124). Deux défauts majeurs de la technique apparaissent dès à présent : une quantité importante de données (2655 valeurs contre 74 avec les descripteurs d'image, voir p.88), et une mauvaise représentation de l'organisation circulaire des colonies.

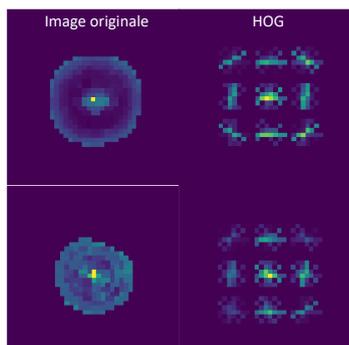


Figure 124. Transformation HOG sur des images de SE68. Seule l'image à 1535 cm^{-1} est présentée pour des questions de clarté. Des différences sont visibles même sur deux images d'une même souche, toutefois des informations comme le rayon sont perdues. Taille des cellules HOG : 8 par 8 pixels. Les images ont été recadrées à 40 pixels de côté.

Les performances de classification sur ces données ont été testées par SVM avec une validation croisée au 1/10. Le CIR moyen plafonne à 62.3% avec des cellules de 8 par 8 (Figure 124), et seulement 54.2% avec des cellules de 16 par 16 pixels. Les résultats s'avèrent donc décevants, ce qui s'explique par les défauts précédemment évoqués. Cette méthode d'analyse d'image, pas assez spécifique pour notre application, a donc été abandonnée au profit de celles décrites en III.2 et 0.

Annexe E. Optimisation du nombre de longueurs d'ondes sur des sous-ensembles de la base de données

Le calcul visant à déterminer un optimum de longueurs d'ondes pour la classification, décrit en Figure 79 (p.97), a été répété sur plusieurs sous-ensembles de la base de données. Ces sous-ensembles sont construits en conservant uniquement les informations de certaines classes, par exemples toutes les espèces de staphylocoques, uniquement les souches de *S. epidermidis*, etc. Chaque sous-ensemble représente ainsi grossièrement ce qui pourrait être un cas d'usage, par exemple une classification à l'espèce, au genre, un cas de typage, etc.

L'objectif est de vérifier que les résultats obtenus lors de la discussion sur les performances de classification en fonction du nombre de longueurs d'ondes (p.95) se retrouvent aussi bien au niveau de la base de données complète que sur les différents sous-ensembles. Pour rappel, l'analyse de la Figure 79, menée en SVM et MLPC sur les 74 descripteurs d'images présentés en section III.2, aboutissait à la conclusion qu'un jeu de cinq à six longueurs d'ondes offrait les meilleures performances d'identification, tout en simplifiant le système d'acquisition.

Ici, les résultats présentés en Figure 125 tendent vers la même conclusion. Sur chaque sous-ensemble, les CIR en SVM dépassent 92% à partir de quatre longueurs d'ondes et atteignent un maximum pour cinq à six longueurs. Au-delà les résultats se dégradent, et ce généralement à cause des mêmes longueurs d'ondes que pour la base de données complète (1350, 1468 et 1655 cm^{-1}).

Nous notons également quelques résultats intéressants, comme la séparation des différentes souches de *S. epidermidis*, efficace à 97.4% dès quatre longueurs d'ondes, ou encore un CIR moyen atteignant les 98.3% lorsque les staphylocoques sont exclus de la classification. Pour certaines applications précises, l'imagerie multispectrale dans l'infrarouge s'avèrerait donc aussi, voire plus efficace de que l'imagerie FTIR, avec un système plus simple et considérablement plus rapide.

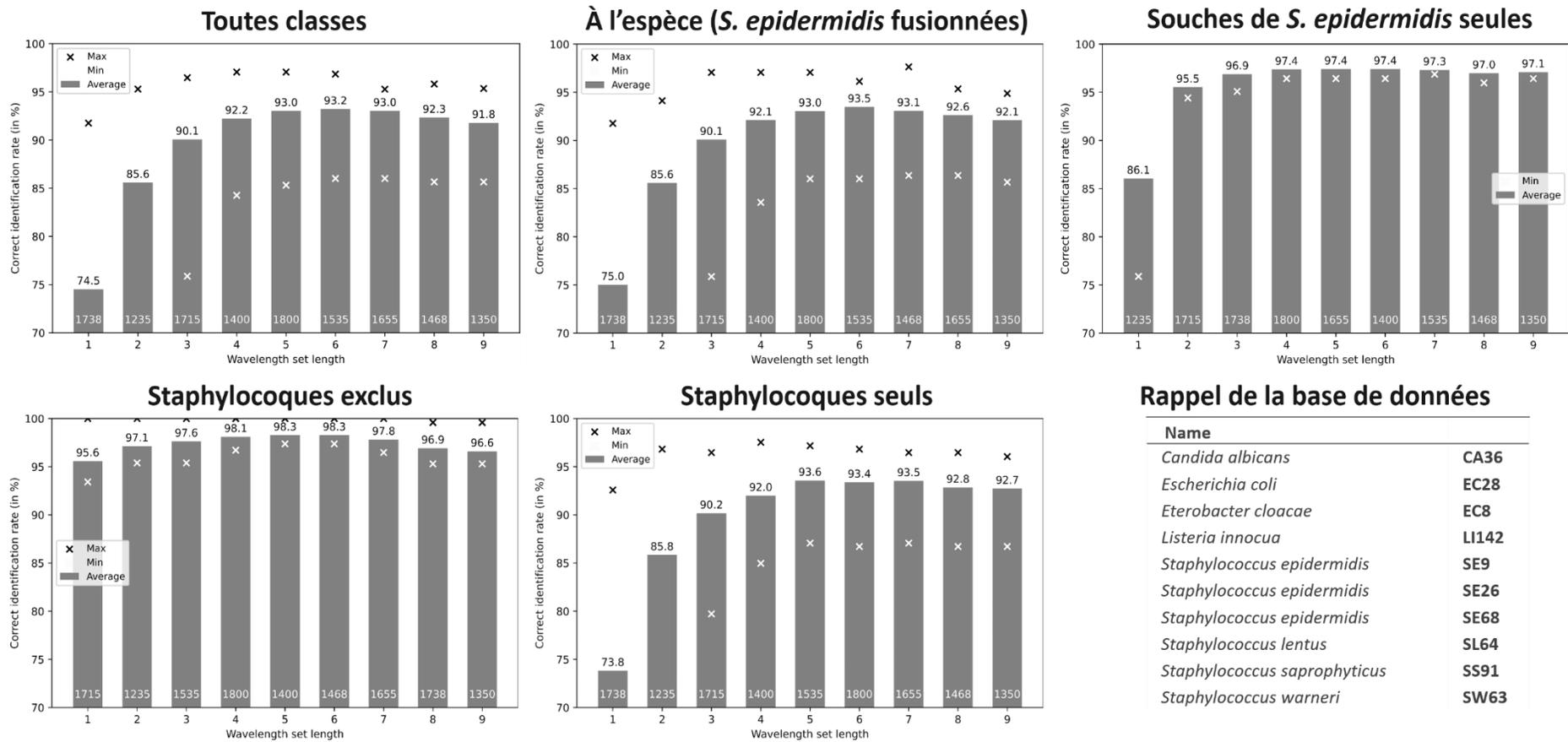


Figure 125. Impact du nombre de longueurs d'ondes sur le CIR moyen de divers sous-ensembles de la base de données. Le principe du calcul est décrit en section III.2.4 (p.95). Les classifications sont faites en SVM avec une validation croisée au dixième.

Annexe F. Classification par invariants de Zernike

Les polynômes de Zernike sont une série de polynômes mathématiques orthogonaux de complexité croissante, et définis sur le disque unité (Figure 126). Ils sont utilisés pour la correction d'aberrations optiques (Mahajan 1994), mais aussi pour la reconnaissance d'image et la description d'objets présentant une organisation radiale (Khotanzad et Hong 1990; Bayraktar et al. 2006; Marcoux et al. 2014; Kim et al. 2017).

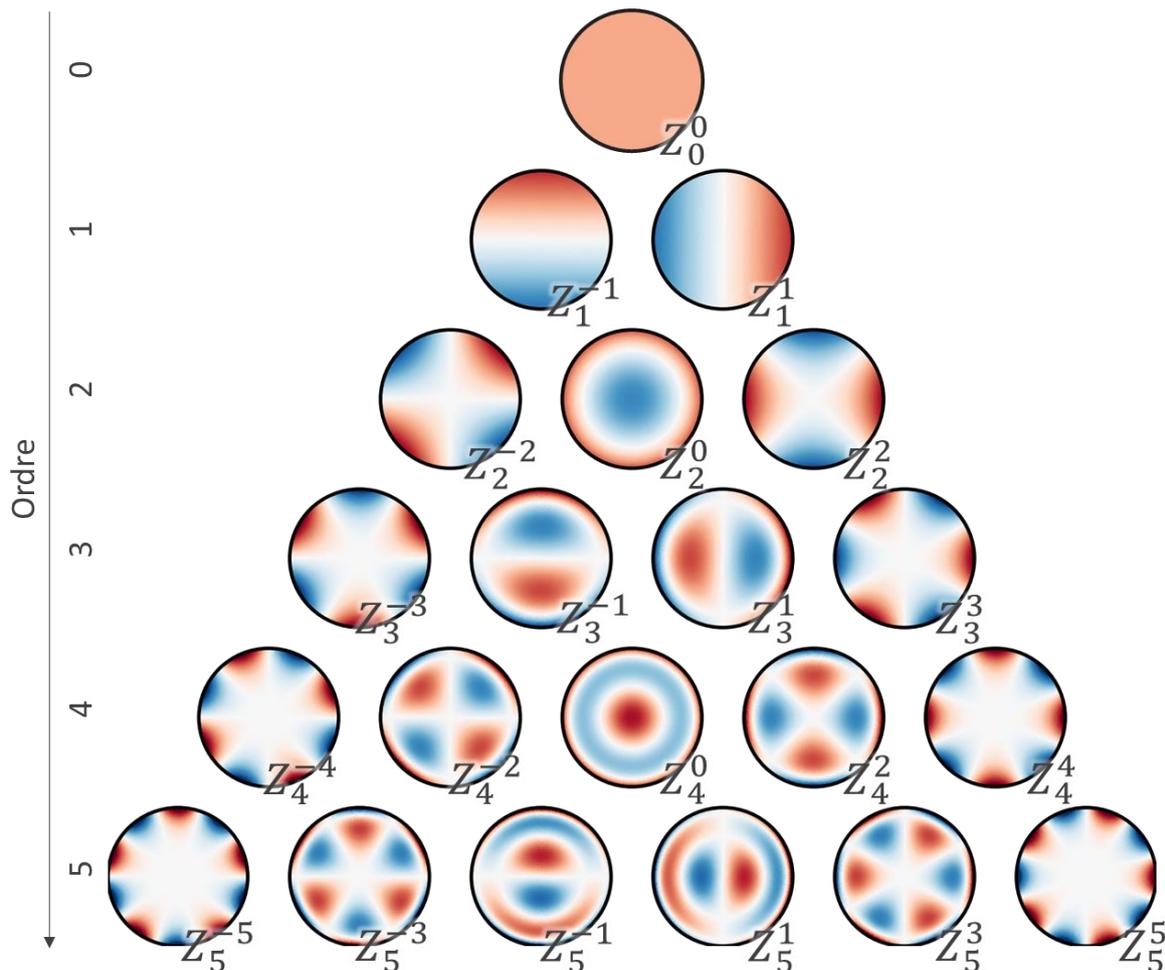


Figure 126. Projection sur le disque unité des cinq premiers ordres de polynômes de Zernike. Crédits image : Wikipédia, creative commons 4.0.

Les polynômes de Zernike permettent de décrire n'importe quelle image présentant une organisation radiale. Chaque polynôme est alors associé à un coefficient, définissant sa participation à l'image. On parle ici de « projection » sur les polynômes de Zernike (Figure 127). Cette projection associe chaque image à un vecteur, et peut donc être utilisée comme méthode d'extraction des données. Pour s'affranchir de l'effet d'une rotation, on utilise uniquement la partie réelle des polynômes, alors surnommés *invariants de Zernike*.

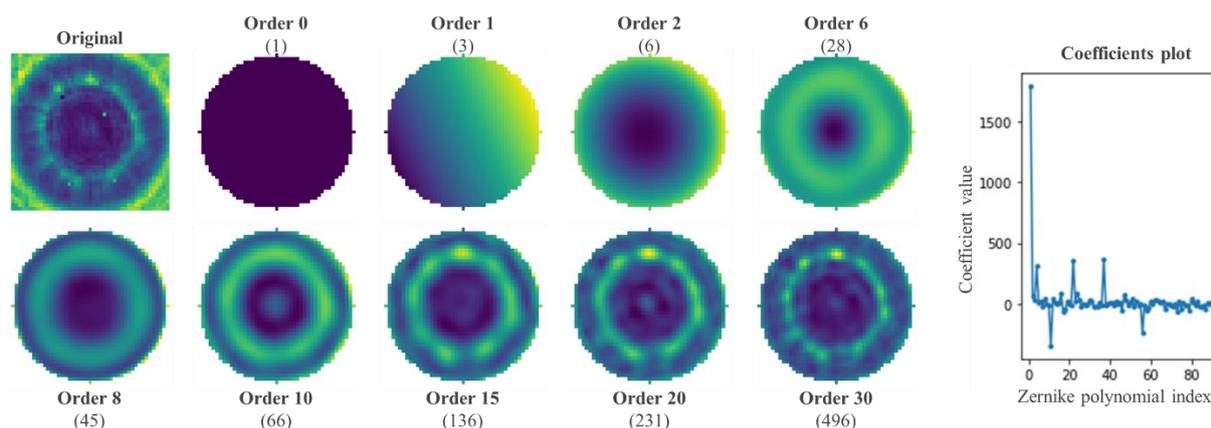


Figure 127. Reconstruction d'une image de colonie à partir de polynômes de Zernike à différents ordres. Le nombre de polynômes constituant chaque image est indiqué entre parenthèses. À droite, le graphique présente les coefficients des polynômes utilisés pour la reconstruction jusqu'à l'ordre 12.

Pour évaluer le potentiel de cette méthode, les quinze premiers invariants de Zernike ont été extraits pour chaque colonie de la base de données présentée en partie III.1.2 (p.79). En résulte un tableau de données à 649 colonnes. Le risque de surapprentissage, déjà présent avec les 74 descripteurs d'images originaux (Figure 71, p.89), est donc d'autant plus présent ici. Cette prédiction est confirmée par les résultats de classification. Comme présenté en Figure 128, les classifications ont été testées en MLPC, SVM et PCA+SVM confrontés à différents types de données. Les invariants de Zernike ont été utilisés seuls ou combinés aux descripteurs d'image décrits en Figure 71 (p.89). Plusieurs combinaisons de longueurs d'ondes ont également été testées : soit toutes les longueurs d'ondes, soit les 6 déterminées en partie III.2.4 (p.95), soit uniquement 1738 cm^{-1} . Cette dernière a précédemment été déterminée comme ayant le plus grand impact sur les classifications. Ces différentes combinaisons ont pour but de réduire l'impact du surapprentissage, sans grand succès.

	Zernike (toutes longueurs d'ondes)		Zernike (6 longueurs d'ondes)		Zernike (1738 cm^{-1})	
	Seuls	+ desc.	Seuls	+ desc.	Seuls	+ desc.
Nombre de dimensions	649	723	433	483	73	83
MLPC	82.1	89.7	79.4	88.3	64.7	92.0
SVM	75.9	69.1	76.5	76.9	62.8	76.6
PCA+SVM	69.7	75.7	71.9	77.5	61.7	75.6

Figure 128. CIRs obtenus pour différents tests de classification utilisant les invariants de Zernike comme descripteurs d'image.

Utilisés seuls, les invariants de Zernike ne permettent pas d'atteindre les CIRs obtenus en partie III.2 (au mieux 82.1 % en MLPC, contre 93.6 %). Combiner les descripteurs d'image « classiques » avec les invariants de Zernike améliore les performances (CIR : 89.7 %), mais reste significativement moins bon qu'en se basant sur les descripteurs seuls. Restreindre le nombre de longueurs d'ondes ou de dimensions des données s'est également avéré inefficace. D'autres tests non présentés en Figure 128 ont également été réalisés (descripteurs à toutes les longueurs d'ondes + Zernike à une longueur d'onde, Zernike limité à l'ordre 6, utilisation d'autre classifieurs), toujours pour des résultats similaires.

Les invariants de Zernike n'apparaissent donc pas comme une méthode d'extraction de données fiable pour notre cas d'étude. Les raisons à cela n'ont pas été explorées en profondeur, mais plusieurs pistes d'explication sont envisagées. Tout d'abord, il faut noter que certains des descripteurs d'image utilisés en partie III.2 sont très proches de polynômes de Zernike : Z_0^0 pour la transmittance moyenne, Z_2^0 pour la transmittance de bordure, et Z_4^0 pour la donutness. Ces données connues sont cependant noyées parmi d'autres informations peut-être non pertinentes.

De plus, les études utilisant les invariants de Zernike pour la classification se basent sur des images de définition largement supérieures aux nôtres (de l'ordre de plusieurs centaines de pixels de côté, Kim et al., 2017 ; Marcoux et al. 2014). Compte tenu de la finesse des formes obtenues via les polynômes, on peut supposer que la pixellisation de nos images entraîne une grande variabilité dans les résultats de projection, et donc de classification. Ce type d'analyse pourrait cependant s'avérer intéressante à l'avenir, si les acquisitions se font avec des capteurs de plus haute définition et moins sensibles au bruit.

Annexe G. Vérification de la base de données par analyse en composante principale

Avant d'explorer les origines possibles de la variabilité intra-classe sur les données extraites à partir de descripteurs d'images, nous avons souhaité nous assurer de la cohérence de la base de données et repérer l'existence d'éventuels points aberrants. Cette vérification passe par le calcul d'une PCA sur deux axes, dont la projection est présentée en Figure 129.

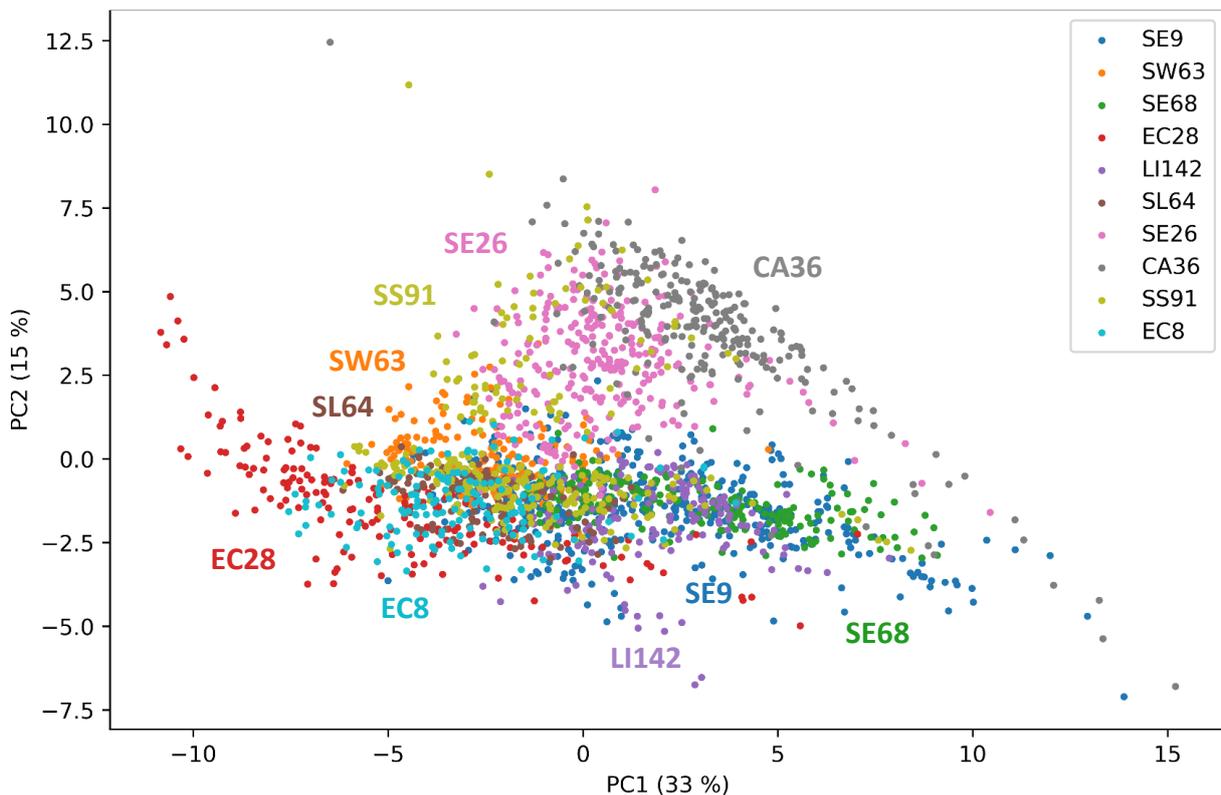


Figure 129. Projection de la base de données de descripteurs d'image en PCA sur deux axes. Chaque point représente les données d'une des colonies de la base de données, projetées dans le nouveau système d'axe déterminé par la PCA. À des fins de lisibilité, les noms des différentes classes ont été ajoutés à proximité de la majorité des points associés.

Plusieurs remarques peuvent être apportées ici. Tout d'abord, la distribution des données en PCA est cohérente avec la matrice de confusion obtenue à l'issue d'une classification en SVM (Figure 96, page 120). Les points de CA36 sont par exemple bien séparés du reste de la base, mais proches de SE26, classe avec laquelle sont observées la majorité des confusions. Pour le reste, la séparation des classes est très imparfaite, en particulier selon PC1. En effet, toutes les classes sont largement étalées sur l'axe 1, justifiant à lui seul 33 % de la variance totale. Cet étalement confirme l'existence d'une importante variabilité intra-classe.

Des points aberrants – très éloignés du corps des données – apparaissent également. Les retirer des calculs ne change toutefois pas les résultats de classification. Les points mal classifiés sont quant à eux éparpillés sur toute la projection (données non présentées sur le graphique). Cette dispersion confirme que les erreurs ne proviennent pas d'un seul groupe d'exemples aberrants, par exemple liés à un défaut sur une série d'acquisition, mais d'un problème plus général dont l'origine est discutée en section IV.1.3, page 122.

Bibliographie

- Abadi M, Barham P, Chen J, Chen Z, Davis A, Dean J, et al. TensorFlow: A System for Large-Scale Machine Learning. In: Symposium on Operating Systems Design and Implementation [Internet]. 2016 [cité 28 oct 2021]. p. 265-83. Disponible sur: <https://www.usenix.org/conference/osdi16/technical-sessions/presentation/abadi>
- Alharbi B, Sikulu-Lord M, Lord A, Zowawi HM, Trembizki E. Near-Infrared Spectroscopy Evaluations for the Differentiation of Carbapenem-Resistant from Susceptible Enterobacteriaceae Strains. *Diagnostics*. oct 2020;10(10):736.
- Alifax. I-dOne : next generation microorganism identification [Internet]. Alifax.com. 2021 [cité 24 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.alifax.com/products/bacteriology-line/show/I-done>
- Ammor MS. Recent Advances in the Use of Intrinsic Fluorescence for Bacterial Identification and Characterization. *J Fluoresc*. 17 août 2007;17(5):455-9.
- Ancin-Murguzur FJ, Barbero-López A, Kontunen-Soppela S, Haapala A. Automated image analysis tool to measure microbial growth on solid cultures. *Comput Electron Agric*. 1 août 2018;151:426-30.
- Ashton L, Lau K, Winder CL, Goodacre R. Raman spectroscopy: lighting up the future of microbial identification. *Future Microbiol*. sept 2011;6(9):991-7.
- Bae E, Aroonnu A, Bhunia AK, Robinson JP, Hirleman ED. System automation for a bacterial colony detection and identification instrument via forward scattering. *Meas Sci Technol*. 1 janv 2009;20(1):015802.
- Bae E, Bai N, Aroonnu A, Bhunia AK, Hirleman ED. Label-Free Identification of Bacterial Microcolonies Via Elastic Scattering. *Biotechnol Bioeng*. mars 2011;108(3):637-44.
- Bae E, Bhunia AK, Hirleman ED, Huisung KIM, Bartłomiej P. Rajwa, Joseph Paul ROBINSON, et al. Organism identification. 2016.
- Bae EW. Analysis and characterization of multi-scale scattering: application to bacteria colonies. PhD Thesis. déc 2006;
- Baker J, Timm K, Faron M, Ledebner N, Culbreath K. Digital Image Analysis for the Detection of Group B streptococcus from ChromID Strepto B Medium Using PhenoMatrix Algorithms. Munson E, éditeur. *J Clin Microbiol* [Internet]. 17 déc 2020 [cité 6 sept 2021];59(1). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01902-19>
- Banada PP, Guo S, Bulent Bayraktar, Bae EW, Bartek Rajwa, J. Paul Robinson, et al. Optical forward-scattering for detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. *Biosens Bioelectron*. 3 avr 2006;22:1664-71.

- Bassan P, Weida MJ, Rowlette J, Gardner P. Large scale infrared imaging of tissue micro arrays (TMAs) using a tunable Quantum Cascade Laser (QCL) based microscope. *Analyst*. 14 juill 2014;139(16):3856-9.
- Bayraktar B, Banada PP, Hirleman ED, Bhunia AK, Robinson JP, Rajwa B. Feature extraction from light-scatter patterns of *Listeria* colonies for identification and classification. *J Biomed Opt*. juin 2006;11(3).
- van Belkum A, Durand G, Peyret M, Chatellier S, Zambardi G, Schrenzel J, et al. Rapid clinical bacteriology and its future impact. *Ann Lab Med*. janv 2013;33(1):14-27.
- Bhargava R. Infrared Spectroscopic Imaging: The Next Generation. *Appl Spectrosc*. 1 oct 2012;66(10):1091-120.
- Biofire. The FilmArray® System [Internet]. BioFire Diagnostics. [cité 1 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.biofiredx.com/products/filmarray/>
- Biofire defense. BioFire Defense – BioFire Defense is committed to making the world a healthier and safer place. [Internet]. 2019 [cité 23 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.biofiredefense.com/>
- Biomérieux. WASPLab® [Internet]. bioMérieux Clinical Diagnostics. 2016 [cité 3 août 2021]. Disponible sur: Integrated lab optimization and automation
- Biomérieux VMP. VITEK® MS PRIME [Internet]. bioMérieux Clinical Diagnostics. 2021 [cité 28 sept 2021]. Disponible sur: New-generation mass spectrometry microbial identification system
- Bird B, Rowlette J. High definition infrared chemical imaging of colorectal tissue using a Spero QCL microscope. *Analyst*. 10 avr 2017;142(8):1381-6.
- Bisceglia É. Membranes d'alumine nanoporeuses pour l'identification de bactéries par spectroscopie Raman. École centrale de Lyon; 2010 sept.
- Blout ER, De Loze C, Asadourian A. The deuterium exchange of water-soluble polypeptides and proteins as measured by infrared spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 1961;83(8):1895-900.
- Bona M, Borghetti M, Bellitti P, Serpelloni M, Sardini E. A concept sensor-based system to be integrated in an existing automated platform monitoring bacterial growth. In: 2017 International Conference on Engineering, Technology and Innovation (ICE/ITMC). 2017. p. 474-81.
- Born M, Wolf E. Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light. Elsevier; 2013.
- Branda JA, Rychert J, Burnham CAD, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, et al. Multicenter validation of the VITEK MS v2.0 MALDI-TOF mass spectrometry system for the identification of fastidious gram-negative bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1 févr 2014;78(2):129-31.
- Breiman L. Random Forests. *Mach Learn*. 1 oct 2001;45(1):5-32.

- Bruker. Microbial Strain Typing [Internet]. Bruker.com. 2021 [cité 10 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-strain-typing.html>
- Bruker. IR Biotyper® for Food Microbiology [Internet]. Bruker.com. [cité 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.bruker.com/en/applications/microbiology-and-diagnostics/food-beverage-microbiology/ir-biotyper-for-food-microbiology.html>
- Buhmann MD. Radial basis functions. *Acta Numer.* janv 2000;9:1-38.
- Buzalewicz I, Karwańska M, Wieliczko A, Podbielska H. On the application of multi-parametric optical phenotyping of bacterial colonies for multipurpose microbiological diagnostics. *Biosens Bioelectron.* janv 2021;172:112761.
- Camoez M, Sierra JM, Dominguez MA, Ferrer-Navarro M, Vila J, Roca I. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 1 févr 2016;22(2):161.e1-161.e7.
- Chang YW, Hsieh CJ, Chang KW, Ringgaard M, Lin CJ. Training and Testing Low-degree Polynomial Data Mappings via Linear SVM. *J Mach Learn Res.* 2010;11(48):1471-90.
- Chen XG, Lemmon DH, Bormett RW, Asher SA. Convenient Microsampling System for UV Resonance Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 1 févr 1993;47(2):248-9.
- Chin JK, Jimenez R, Romesberg FE. Direct Observation of Protein Vibrations by Selective Incorporation of Spectroscopically Observable Carbon–Deuterium Bonds in Cytochrome c. *J Am Chem Soc.* 1 mars 2001;123(10):2426-7.
- Copan. WASPLab®: automatic lab processing [Internet]. Copan. [cité 3 août 2021]. Disponible sur: <https://www.copangroup.com/product-ranges/wasplab/>
- Coriolis Pharma. Coriolis Pharma [Internet]. Coriolis Pharma. [cité 8 févr 2019]. Disponible sur: [https://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/fourier-transform-infrared-\(ftir\)-spectroscopy/](https://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/fourier-transform-infrared-(ftir)-spectroscopy/)
- Crystran. Silica Glass (SiO₂) Optical Material [Internet]. [cité 21 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.crystran.co.uk/optical-materials/silica-glass-sio2>
- Cunningham-Oakes E, Weiser R, Pointon T, Mahenthiralingam E. Understanding the challenges of non-food industrial product contamination. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1 déc 2019 [cité 9 nov 2021];366(23). Disponible sur: <https://academic.oup.com/femsle/article/366/23/fnaa010/5707401>
- Cybenko G. Approximation by superpositions of a sigmoidal function. *Math Control Signals Syst.* 1 déc 1989;2(4):303-14.
- Dalal N, Triggs B. Histograms of oriented gradients for human detection. In: 2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05). 2005. p. 886-93 vol. 1.

- Daylight Solutions. Daylight Solutions Launches New MIRcat™ Laser Source with Industry-leading Mid-Infrared Tuning Range [Internet]. Daylight Solutions. 2012 [cité 21 déc 2021]. Disponible sur: <https://daylightsolutions.com/news/daylight-solutions-launches-new-mircat-laser-source-with-industry-leading-mid-infrared-tuning-range/>
- Daylight Solutions. Spero® Chemical Imaging Microscope: Mid-IR Spectroscopy | Real-time, High-Throughput Spectral Imaging [Internet]. Daylight Solutions. [cité 17 nov 2021]. Disponible sur: <https://daylightsolutions.com/product/spero/>
- De Meutter J, Goormaghtigh E. Searching for a Better Match between Protein Secondary Structure Definitions and Protein FTIR Spectra. *Anal Chem.* 26 janv 2021;93(3):1561-8.
- Dieleman S, Willett KW, Dambre J. Rotation-invariant convolutional neural networks for galaxy morphology prediction. *Mon Not R Astron Soc.* 21 juin 2015;450(2):1441-59.
- Douet A, Josso Q, Marchant A, Dutertre B, Filiputti D, Novelli-Rousseau A, et al. Fast Raman single bacteria identification: toward a routine in-vitro diagnostic. *Proc SPIE 9887 Biophotonics Photonic Solut Better Health Care V.* 2016;98871:98871W-98871W - 11.
- Dumont G, Rabaud W, Yon JJ, Carle L, Goudon V, Vialle C, et al. Current progress on pixel level packaging for uncooled IRFPA. In *SPIE*; 2012.
- Elite Data Science. Overfitting in Machine Learning: What It Is and How to Prevent It [Internet]. EliteDataScience. 2017 [cité 19 oct 2021]. Disponible sur: <https://elitedatascience.com/overfitting-in-machine-learning>
- Espagnon I, Ostrovskii D, Mathey R, Dupoy MG, Joly P, Novelli-Rousseau A, et al. Direct identification of clinically relevant bacterial and yeast microcolonies and macrocolonies on solid culture media by Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.* févr 2014;19(2):027004.
- Estes C, Duncan A, Wade B, Lloyd C, Ellis W, Powers L. Reagentless detection of microorganisms by intrinsic fluorescence. *Biosens Bioelectron.* mai 2003;18(5-6):511-9.
- European Environment Agency. European waters -- Assessment of status and pressures 2018 [Internet]. eea.europa.eu. 2018 [cité 9 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.eea.europa.eu/publications/state-of-water>
- European Environment Agency. State of bathing waters — European Environment Agency [Internet]. 2021 [cité 9 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.eea.europa.eu/themes/water/interactive/bathing/state-of-bathing-waters>
- Faist J, Capasso F, Sivco DL, Sirtori C, Hutchinson AL, Cho AY. Quantum Cascade Laser. *Science.* 22 avr 1994;264(5158):553-6.
- Faix O. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: Lin SY, Dence CW, éditeurs. *Methods in Lignin Chemistry* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1992 [cité 16 nov 2021]. p. 83-109. (Springer Series in Wood Science). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_7

- Faron ML, Buchan BW, Coon C, Liebrechts T, van Bree A, Jansz AR, et al. Automatic Digital Analysis of Chromogenic Media for Vancomycin-Resistant-Enterococcus Screens Using Copan WASPLab. Burnham CAD, éditeur. *J Clin Microbiol.* oct 2016a;54(10):2464-9.
- Faron ML, Buchan BW, Vismara C, Lacchini C, Bielli A, Gesu G, et al. Automated Scoring of Chromogenic Media for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by Use of WASPLab Image Analysis Software. Richter SS, éditeur. *J Clin Microbiol.* mars 2016b;54(3):620-4.
- Foucher F. Detection of Biosignatures Using Raman Spectroscopy. In: Cavalazzi B, Westall F, éditeurs. *Biosignatures for Astrobiology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cité 4 janv 2022]. p. 267-82. (Advances in Astrobiology and Biogeophysics). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-319-96175-0_13
- Gelfand DH. Taq DNA Polymerase. In: Erlich HA, éditeur. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* [Internet]. London: Palgrave Macmillan UK; 1989 [cité 9 déc 2021]. p. 17-22. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-349-20235-5_2
- Genuer V, Gal O, Méteau J, Marcoux P, Schultz E, Lacot É, et al. Optical elastic scattering for early label-free identification of clinical pathogens. In: *Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic and Surgical Guidance Systems XIV* [Internet]. International Society for Optics and Photonics; 2016 [cité 31 mars 2020]. p. 96980A. Disponible sur: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/9698/96980A/Optical-elastic-scattering-for-early-label-free-identification-of-clinical/10.1117/12.2211021.short>
- Genuer V, Marcoux P, Schultz E. System for observing objects [Internet]. 2019 [cité 10 août 2021]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US10247668B2/en>
- Geraldine Durand. Phenotypic identification of bacteria based on digital imaging [Internet]. ECCMID 2015; 2015 [cité 9 déc 2021]. Disponible sur: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/?tx_solr%5Bfilter%5D%5B0%5D=entry_type%253ASymposium%2Blecture&tx_solr%5Bfilter%5D%5B1%5D=main_category%253ADiagnostic%2BBacteriology%2B%2526%2BGeneral%2BMicrobiology&tx_solr%5Bpage%5D=3
- Giancoli DC. *Physique générale: Ondes, optique et physique moderne*. De Boeck Supérieur; 1993.
- Gowen AA, Feng Y, Gaston E, Valdramidis V. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta.* 15 mai 2015;137:43-54.
- Graupe D. *Principles of artificial neural networks*. 2nd ed. Singapore ; Hackensack, N.J: World Scientific; 2007. (Advanced series on circuits and systems).
- Griffiths PR. Introduction to the Theory and Instrumentation for Vibrational Spectroscopy. In: *Handbook of Vibrational Spectroscopy* [Internet]. American Cancer Society; 2010 [cité 5 août 2021]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0470027320.s8935>

- Gross JH. *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer Science & Business Media; 2006.
- Gu P, Feng YZ, Zhu L, Kong LQ, Zhang X ling, Zhang S, et al. Unified Classification of Bacterial Colonies on Different Agar Media Based on Hyperspectral Imaging and Machine Learning. *Molecules*. 14 avr 2020;25(8):1797.
- Gulli A, Pal S. *Deep Learning with Keras*. Packt Publishing Ltd; 2017.
- Guo L, Ye L, Zhao Q, Ma Y, Yang J, Luo Y. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J Thorac Dis*. mai 2014;6(5):534-8.
- Haase K, Kröger-Lui N, Pucci A, Schönhals A, Petrich W. Real-time mid-infrared imaging of living microorganisms. *J Biophotonics*. janv 2016;9(1-2):61-6.
- Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural Features for Image Classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern*. nov 1973;SMC-3(6):610-21.
- Hearst MA, Dumais ST, Osuna E, Platt J, Scholkopf B. Support vector machines. *IEEE Intell Syst Their Appl*. juill 1998;13(4):18-28.
- den Hertog AL, Visser DW, Ingham CJ, Fey FHAG, Klatser PR, Anthony RM. Simplified Automated Image Analysis for Detection and Phenotyping of Mycobacterium tuberculosis on Porous Supports by Monitoring Growing Microcolonies. *PLoS ONE*. 2010;5(6):e11008.
- Hitchens AP, Leikind MC. The introduction of agar-agar into bacteriology. *J Bacteriol*. 1939;37(5):485-93.
- Hobro AJ, Smith NI. Vibrational spectroscopic imaging of pathogens, microorganisms, and their interactions with host systems. *Opt Commun*. 1 sept 2018;422:75-84.
- Hu Y, Zhou H, Lu J, Sun Q, Liu C, Zeng Y, et al. Evaluation of the IR Biotyper for Klebsiella pneumoniae typing and its potentials in hospital hygiene management. *Microb Biotechnol*. 2021;14(4):1343-52.
- Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of Rapid Organism Identification via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Combined With Antimicrobial Stewardship Team Intervention in Adult Patients With Bacteremia and Candidemia. *Clin Infect Dis*. 1 nov 2013;57(9):1237-45.
- Huayan Y, Fangling W, Fuxin X, Kegi T, Chuanfan D, Haimei S, et al. Bacterial Typing and Identification Based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy (preprint). 14 févr 2020 [cité 20 avr 2021]; Disponible sur: <https://protocolexchange.researchsquare.com/article/pex-829/v2>
- Humble MW, King A, Phillips I. API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J Clin Pathol*. 1 mars 1977;30(3):275-7.
- Humphreys H, Becker K, Dohmen PM, Petrosillo N, Spencer M, van Rijen M, et al. Staphylococcus aureus and surgical site infections: benefits of screening and decolonization before surgery. *J Hosp Infect*. nov 2016;94(3):295-304.

- Hunt DF, Yates JR, Shabanowitz J, Winston S, Hauer CR. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci.* 1 sept 1986;83(17):6233-7.
- Hyman JM, Walsh JD, Ronsick C, Wilson M, Hazen KC, Borzhemskaya L, et al. Evaluation of a Fully Automated Research Prototype for the Immediate Identification of Microorganisms from Positive Blood Cultures under Clinical Conditions. *mBio* [Internet]. 4 mai 2016 [cité 1 avr 2020];7(2). Disponible sur: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00491-16>
- IDEXX France. Produits et services : eau [Internet]. *idexx.fr.* [cité 9 nov 2021]. Disponible sur: https://www.idexx.fr/fr/water/products/?cy=all&cx=x_category_259&ts=all
- Imperiali B. Bacterial carbohydrate diversity — a Brave New World. *Curr Opin Chem Biol.* 1 déc 2019;53:1-8.
- Ingham C, Bomer J, Sprenkels A, van den Berg A, de Vos W, van Hylckama Vlieg J. High-resolution microcontact printing and transfer of massive arrays of microorganisms on planar and compartmentalized nanoporous aluminium oxide. *Lab Chip.* 2010;10(11):1410.
- Ingham CJ, Ayad AB, Nolsen K, Mulder B. Rapid drug susceptibility testing of mycobacteria by culture on a highly porous ceramic support. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12(6):645-50.
- Ingham CJ, Sprenkels A, Bomer J, Molenaar D, van den Berg A, van Hylckama Vlieg JE, et al. The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(46):18217-22.
- Ismaili Z. Apprentissage Supervisé Vs. Non Supervisé [Internet]. *Analytics & Insights.* 2019 [cité 27 déc 2021]. Disponible sur: <https://analyticsinsights.io/apprentissage-supervise-vs-non-supervise/>
- James G. Universal Bacterial Identification by PCR and DNA Sequencing of 16S rRNA Gene. In: Schuller M, Sloots TP, James GS, Halliday CL, Carter IWJ, éditeurs. *PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010 [cité 9 déc 2021]. p. 209-14. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-90-481-9039-3_28
- Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol* [Internet]. sept 2007 [cité 9 déc 2021]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JCM.01228-07>
- Jarvis RM, Goodacre R. Ultra-violet resonance Raman spectroscopy for the rapid discrimination of urinary tract infection bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* mars 2004;232(2):127-32.
- Jehl F, Cattoen C, Aubin G, Cattoir V, Goutelle S, Lepeule R, et al. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, recommandations 2021. *Recomm 2021 V1 0 Avril.* avr 2021;117.

- Jehlička J, Vandenabeele P. Evaluation of portable Raman instruments with 532 and 785-nm excitation for identification of zeolites and beryllium containing silicates. *J Raman Spectrosc.* 1 oct 2015;46(10):927-32.
- Johler S, Stephan R, Althaus D, Ehling-Schulz M, Grunert T. High-resolution subtyping of *Staphylococcus aureus* strains by means of Fourier-transform infrared spectroscopy. *Syst Appl Microbiol.* mai 2016;39(3):189-94.
- Jolliffe I. Principal Component Analysis. In: *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2005 [cité 20 déc 2021]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0470013192.bsa501>
- Kallenbach-Thieltges A, Großerueschkamp F, Jütte H, Kuepper C, Reinacher-Schick A, Tannapfel A, et al. Label-free, automated classification of microsatellite status in colorectal cancer by infrared imaging. *Sci Rep* [Internet]. déc 2020 [cité 17 nov 2021];10(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-67052-z>
- Kang R, Park B, Chen K. Identifying non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) using deep learning methods with hyperspectral microscope images. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 5 janv 2020;224:117386.
- Kazemnejad A, Batvandi Z, Faradmal J. Comparison of artificial neural network and binary logistic regression for determination of impaired glucose tolerance/diabetes. *EMHJ - East Mediterr Health J* 16 6 615-620 2010 [Internet]. 2010 [cité 16 juin 2021]; Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/117927>
- Keras K. Keras documentation: Keras layers API [Internet]. [cité 19 juin 2021]. Disponible sur: <https://keras.io/api/layers/>
- Khotanzad A, Hong YH. Invariant image recognition by Zernike moments. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell.* mai 1990;12(5):489-97.
- Kim H, Doh IJ, Bhunia AK, King GB, Bae E. Scalar diffraction modeling of multispectral forward scatter patterns from bacterial colonies. *Opt Express.* 6 avr 2015;23(7):8545-54.
- Kim H, Doh IJ, Sturgis J, Bhunia AK, Robinson JP, Bae E. Reflected scatterometry for noninvasive interrogation of bacterial colonies. *J Biomed Opt.* 2016;21(10):107004-107004.
- Kim H, Rajwa B, Bhunia AK, Robinson JP, Bae E. Development of a multispectral light-scatter sensor for bacterial colonies. *J Biophotonics.* 1 mai 2017;10(5):634-44.
- Kingma DP, Ba J. Adam: A Method for Stochastic Optimization. *ArXiv14126980 Cs* [Internet]. 29 janv 2017 [cité 30 déc 2021]; Disponible sur: <http://arxiv.org/abs/1412.6980>
- Kirn TJ. Automatic Digital Plate Reading for Surveillance Cultures. *J Clin Microbiol.* 1 oct 2016;54(10):2424-6.
- Krupiński M, Bieszczad G, Sosnowski T, Madura H, Gogler S. Non-uniformity correction in microbolometer array with temperature influence compensation. *Metrol Meas Syst*

- [Internet]. 2014 [cité 18 nov 2021]; Vol. 21(nr 4). Disponible sur: <http://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-aea3b0c3-1843-4d75-bd88-e63e244f15cc>
- Kümmel T, van Marwick B, Rittel M, Ramallo Guevara C, Wühler F, Teumer T, et al. Rapid brain structure and tumour margin detection on whole frozen tissue sections by fast multiphotometric mid-infrared scanning. *Sci Rep* [Internet]. déc 2021 [cité 1 juin 2021];11(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-021-90777-4>
- Labonne E. Contribution à la conception de capteurs de vision CMOS à grande dynamique [PhD Thesis]. Institut National Polytechnique de Grenoble-INPG; 2007.
- Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev.* janv 2015;28(1):208-36.
- Lakowicz JR. Protein Fluorescence. In: Lakowicz JR, éditeur. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1999 [cité 4 déc 2021]. p. 445-86. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6_16
- Lasch P, Stämmeler M, Zhang M, Baranska M, Bosch A, Majzner K. FT-IR Hyperspectral Imaging and Artificial Neural Network Analysis for Identification of Pathogenic Bacteria. *Anal Chem.* 7 août 2018;90(15):8896-904.
- Laurent G. *Ecrans plats et vidéoprojecteurs - 2e éd: Principes, fonctionnement et maintenance.* Dunod; 2014.
- Leblanc L, Dufour E. Monitoring bacteria growth using their intrinsic fluorescence. *Sci Aliments.* 2004;24(3):207-20.
- Leroux DF, Midahuen R, Perrin G, Pescatore J, Imbaud P. Hyperspectral imaging applied to microbial categorization in an automated microbiology workflow. In: Brown JQ, Deckert V, éditeurs. *Proceedings of SPIE Volume 9537, Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging IV* [Internet]. Munich, Germany; 2015 [cité 1 avr 2020]. p. 953726. Disponible sur: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2184140>
- Lombardo D, Cordovana M, Deidda F, Pane M, Ambretti S. Application of Fourier transform infrared spectroscopy for real-time typing of *Acinetobacter baumannii* outbreak in intensive care unit. *Future Microbiol.* 22 oct 2021;16(16):1239-50.
- Loukas S. PCA clearly explained — How, when, why to use it and feature importance: A guide in Python [Internet]. *Towards data science.* 2020 [cité 20 déc 2021]. Disponible sur: <https://towardsdatascience.com/pca-clearly-explained-how-when-why-to-use-it-and-feature-importance-a-guide-in-python-7c274582c37e>
- Maeda Y, Dobashi H, Sugiyama Y, Saeki T, Lim T kyu, Harada M, et al. Colony fingerprint for discrimination of microbial species based on lensless imaging of microcolonies. Lee BL, éditeur. *PLOS ONE.* 3 avr 2017;12(4):e0174723.

- Maeda Y, Sugiyama Y, Kogiso A, Lim TK, Harada M, Yoshino T, et al. Colony Fingerprint-Based Discrimination of Staphylococcus species with Machine Learning Approaches. *Sensors*. 2018;18(9).
- Maeda Y, Sugiyama Y, Lim TK, Harada M, Yoshino T, Matsunaga T, et al. Rapid discrimination of fungal species by the colony fingerprinting. *Biosens Bioelectron*. 15 déc 2019;146:111747.
- Mahajan VN. Zernike Circle Polynomials and Optical Aberrations of Systems with Circular Pupils. *Appl Opt*. 1 déc 1994;33(34):8121-4.
- Mallick S. Histogram of Oriented Gradients explained using OpenCV [Internet]. *Learn OpênCV*. 2016 [cité 2 mars 2021]. Disponible sur: <https://learnopencv.com/histogram-of-oriented-gradients/>
- Mansberg HP. Automatic Particle and Bacterial Colony Counter. *Science*. 1957;126(3278):823-7.
- Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, van den Braak N, Endtz HP, Naumann D, et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Methods*. 1 nov 2002;51(3):255-71.
- Marcadet X, Carras M, Maisons G, De Naurois GM, Simozrag B. Les lasers à cascade quantique : l'accès au moyen infrarouge. *Photoniques*. juill 2011;(54):54-7.
- Marcoux P, Dupoy M, Cuer A, Kodja JL, Lefebvre A, Licari F, et al. Optical forward-scattering for identification of bacteria within microcolonies. *Appl Microbiol Biotechnol*. mars 2014;98(5):2243-54.
- Massad-Ivanir N, Shtenberg G, Raz N, Gazenbeek C, Budding D, Bos MP, et al. Porous Silicon-Based Biosensors: Towards Real-Time Optical Detection of Target Bacteria in the Food Industry. *Sci Rep*. 30 nov 2016;6(1):1-12.
- Mathieu G, Dupoy M, Bonnet S, Rebuffel V, Coll JL, Henry M. MID infrared multispectral imaging for tumor tissue detection. In: *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XIX* [Internet]. International Society for Optics and Photonics; 2021 [cité 7 juill 2021]. p. 116471A. Disponible sur: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/11647/116471A/MID-infrared-multispectral-imaging-for-tumor-tissue-detection/10.1117/12.2577221.short>
- Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. avr 2014;20(4):O255-66.
- McCulloch WS, Pitts W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull Math Biophys*. 1 déc 1943;5(4):115-33.
- McFarland J. The nephelometer : an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA J Am Med Assoc*. 5 oct 1907;XLIX(14):1176.

- Midahuen R, Barlas P, Fulchiron C, Laloum E, Mahé P, Leroux D. Direct and label-free gram classification of bacterial colonies on agar using hyperspectral imaging. In SPIE; 2018. (SPIE Photonics Europe; vol. 10685).
- Moon C. L1 and L2 as Cost Function [Internet]. Things to Know about Machine Learning. 2018 [cité 30 déc 2021]. Disponible sur: <http://csmoon-ml.com/index.php/2018/12/17/11-and-l2-as-cost-function/>
- Morot-Bizot SC, Talon R, Leroy S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *J Appl Microbiol.* 1 nov 2004;97(5):1087-94.
- Mullen KM. Continuous Global Optimization in R. *J Stat Softw* [Internet]. 2014 [cité 28 déc 2021];60(6). Disponible sur: <http://www.jstatsoft.org/v60/i06/>
- Nanosensors Group. Discrete frequency infrared spectroscopy [Internet]. [cité 16 nov 2021]. Disponible sur: <https://nano.ece.illinois.edu/research-smartphone-biosensors/discrete-frequency-infrared-spectroscopy/>
- Nettleton D. Chapter 6 - Selection of Variables and Factor Derivation. In: Nettleton D, éditeur. *Commercial Data Mining* [Internet]. Boston: Morgan Kaufmann; 2014 [cité 28 déc 2021]. p. 79-104. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124166028000066>
- Neugebauer, Schmid, Baumann K, Ziebuhr W, Kozitskaya S, Holzgrabe U, et al. The influence of fluoroquinolone drugs on the bacterial growth of *S. epidermidis* utilizing the unique potential of vibrational spectroscopy. *J Phys Chem A.* 27 mars 2007a;111(15):2898-906.
- Neugebauer U, Schmid U, Baumann K, Ziebuhr W, Kozitskaya S, Deckert V, et al. Towards a Detailed Understanding of Bacterial Metabolism—Spectroscopic Characterization of *Staphylococcus Epidermidis*. *ChemPhysChem.* 8 janv 2007b;8(1):124-37.
- Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, et al. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl Env Microbiol.* 2010;76(8):2445-50.
- Nielsen MA. *Neural Networks and Deep Learning* [Internet]. 2015 [cité 15 juin 2021]. Disponible sur: <http://neuralnetworksanddeeplearning.com>
- Novais Â, Freitas AR, Rodrigues C, Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* mars 2019;38(3):427-48.
- Novelli-Rousseau A, Espagnon I, Filiputti D, Gal O, Douet A, Mallard F, et al. Culture-free Antibiotic-susceptibility Determination From Single-bacterium Raman Spectra. *Sci Rep* [Internet]. déc 2018 [cité 1 avr 2020];8(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-22392-9>
- Oberle M, Wohlwend N, Jonas D, Maurer FP, Jost G, Tschudin-Sutter S, et al. The Technical and Biological Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time

- of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing: Employment of Bioinformatics in a Multicenter Study. PLOS ONE. 31 oct 2016;11(10):e0164260.
- O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations [Internet]. Government of the United Kingdom; 2016 mai. Disponible sur: <https://apo.org.au/node/63983>
- Orenga S, James AL, Manafi M, Perry JD, Pincus DH. Enzymatic substrates in microbiology. J Microbiol Methods. 1 nov 2009;79(2):139-55.
- Ozcan A, McLeod E. Lensless Imaging and Sensing. Annu Rev Biomed Eng. 11 juill 2016;18(1):77-102.
- Pahlow S, Meisel S, Cialla-May D, Weber K, Rösch P, Popp J. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. Adv Drug Deliv Rev. 2015;89:105-20.
- Panetier C. Étude des mécanismes de migration du césium dans le dioxyde d'uranium stoechiométrique et sur-stoechiométrique : influence du molybdène [Internet] [Theses]. Université de Lyon; 2019 [cité 5 août 2021]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02454477>
- Park B, Yoon SC, Windham WR, Lawrence KC, Kim MS, Chao K. Line-scan hyperspectral imaging for real-time in-line poultry fecal detection. Sens Instrum Food Qual Saf. mars 2011;5(1):25-32.
- Park JY, Kricka LJ. One hundred years of clinical laboratory automation: 1967-2067. Clin Biochem [Internet]. 1 mars 2017 [cité 20 sept 2019]; Disponible sur: <https://utsouthwestern.pure.elsevier.com/en/publications/one-hundred-years-of-clinical-laboratory-automation-1967-2067>
- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clin Chem. janv 2015;61(1):100-11.
- Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, et al. Scikit-learn: Machine Learning in Python. J Mach Learn Res. 2011;12(85):2825-30.
- Perlemoine P. Etude de l'imagerie sans lentille grand champ pour le test de susceptibilité en phagothérapie [Internet] [thesis]. Université Grenoble Alpes; 2021 [cité 14 déc 2021]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2021GRALT012>
- Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. J Appl Microbiol. 2007;103(6):2046-55.
- Petri JR. Eine kleine Modification des Koch'schen Plattenverfahrens. In: Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde [Internet]. Jena : G. Fischer.; 1887. Disponible sur: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/210666>
- Pilling M, Gardner P. Fundamental developments in infrared spectroscopic imaging for biomedical applications. Chem Soc Rev. 29 mars 2016;45(7):1935-57.
- Pincus DH. Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. Encycl Rapid Microbiol Methods Bethesda MD Parenter Drug Assoc. 2006;

- Premasiri WR, Moir DT, Klempner MS, Krieger N, Jones G, Ziegler LD. Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria. *J Phys Chem B*. 1 janv 2005;109(1):312-20.
- Puchkov EO. Computer image analysis of microbial colonies. *Microbiology*. 1 avr 2010;79(2):141-6.
- Qian N. On the momentum term in gradient descent learning algorithms. *Neural Netw*. 1 janv 1999;12(1):145-51.
- Raman CV, Krishnan KS. A New Type of Secondary Radiation. *Nature*. mars 1928;121(3048):501-2.
- Ranganathan N, Johnson R, Edwards AM. The general stress response of *Staphylococcus aureus* promotes tolerance of antibiotics and survival in whole human blood. *Microbiology*. nov 2020;166(11):1088-94.
- Rao CR. The Utilization of Multiple Measurements in Problems of Biological Classification. *J R Stat Soc Ser B Methodol*. 1948;10(2):159-203.
- Raschka S. Linear Discriminant Analysis [Internet]. Dr. Sebastian Raschka. 2014 [cité 21 juill 2021]. Disponible sur: https://sebastianraschka.com/Articles/2014_python_lda.html
- Reta N, Michelmore A, Saint CP, Prieto-Simon B, Voelcker NH. Label-Free Bacterial Toxin Detection in Water Supplies Using Porous Silicon Nanochannel Sensors. *ACS Sens*. 28 juin 2019;4(6):1515-23.
- Ribet I, Caes M, Derelle S, Bernhardt S, Jaeck J. Détecteurs matriciels pour l'infrarouge. *Opt Photonique* [Internet]. févr 2021 [cité 24 nov 2021]; Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v2/e4060>
- Riddle JW, Kabler PW, Kenner BA, Bordner RH, Rockwood SW, Stevenson HJ. Bacterial identification by infrared spectrophotometry. *J Bacteriol*. 1956;72(5):593-603.
- Riedl MJ. *Optical Design Fundamentals for Infrared Systems*. SPIE Press; 2001.
- Robert P, Curis C, Gravot V. A Thermalized Bias Circuit for Wider Operating Temperature Range in Bolometric Infrared Imagers. *IEEE Solid-State Circuits Lett*. 2020;3:542-5.
- Rogalski A. History of infrared detectors. *Opto-Electron Rev* [Internet]. 1 janv 2012 [cité 24 nov 2021];20(3). Disponible sur: <http://www.degruyter.com/view/j/oere.2012.20.issue-3/s11772-012-0037-7/s11772-012-0037-7.xml>
- Rönnerberg C, Mildh M, Ullberg M, Özenci V. Transport time for blood culture bottles: underlying factors and its consequences. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1 juill 2013;76(3):286-90.
- Rösch P, Harz M, Schmitt M, Peschke KD, Ronneberger O, Burkhardt H, et al. Rapid identification of single microbes by various Raman spectroscopic techniques. In: *Biomedical Vibrational Spectroscopy III: Advances in Research and Industry* [Internet]. SPIE; 2006 [cité 5 déc 2021]. p. 78-88. Disponible sur:

<https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/6093/60930D/Rapid-identification-of-single-microbes-by-various-Raman-spectroscopic-techniques/10.1117/12.645632.full>

- Rousseau AN, Faure N, Rol F, Sedaghat Z, Le Galudec J, Mallard F, et al. Fast Antibiotic Susceptibility Testing via Raman Microspectrometry on Single Bacteria: An MRSA Case Study. *ACS Omega* [Internet]. 15 juin 2021 [cité 16 juin 2021]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00170>
- Rouvière L. Chapitre 2 Analyse discriminante linéaire | Machine learning [Internet]. 2021 [cité 27 déc 2021]. Disponible sur: https://lrouviere.github.io/TUTO_ML/correction/lda.html
- Rumelhart DE, Hinton GE, Williams RJ. Learning representations by back-propagating errors. *Nature*. oct 1986;323(6088):533-6.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* [Internet]. 29 janv 1988 [cité 9 déc 2021]; Disponible sur: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.2448875>
- Saravanan A, Kumar PS, Hemavathy RV, Jeevanantham S, Kamalesh R, Sneha S, et al. Methods of detection of food-borne pathogens: a review. *Environ Chem Lett* [Internet]. 16 août 2020 [cité 25 août 2020]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01072-z>
- Scikit-image. Canny edge detector — skimage v0.20.0.dev0 docs [Internet]. scikit-image.org. [cité 24 déc 2021]. Disponible sur: https://scikit-image.org/docs/dev/auto_examples/edges/plot_canny.html
- scikit-learn developpers. 6.3. Preprocessing data [Internet]. scikit-learn.org. 2021a [cité 28 déc 2021]. Disponible sur: <https://scikit-learn.org/stable/modules/preprocessing.html>
- scikit-learn developpers. Compare the effect of different scalers on data with outliers [Internet]. scikit-learn.org. 2021b [cité 28 déc 2021]. Disponible sur: https://scikit-learn.org/stable/auto_examples/preprocessing/plot_all_scaling.html
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin Infect Dis*. 15 août 2009;49(4):543-51.
- Servant L, Le Bourdon G, Buffeteau T. Comprendre la spectroscopie infrarouge : principes et mise en oeuvre. *Photoniques*. 1 mai 2011;(53):68-73.
- Seth N. Is Gradient Descent Sufficient for Neural Network Models [Internet]. *Analytics Vidhya*. 2021 [cité 30 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.analyticsvidhya.com/blog/2021/04/is-gradient-descent-sufficient-for-neural-network/>
- SFHH. Gestion pré-opératoire du risque infectieux [Internet]. 2004 [cité 16 sept 2019]. Disponible sur:

http://www.cpias.fr/nosobase/recommandations/sfhh/2004_chirurgie_textecourt_SFH_H.pdf

- Shipp DW, Sinjab F, Notingher I. Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. *Adv Opt Photonics*. 30 juin 2017;9(2):315.
- Signoroni A, Savardi M, Pezzoni M, Guerrini F, Arrigoni S, Turra G. Combining the use of CNN classification and strength-driven compression for the robust identification of bacterial species on hyperspectral culture plate images. *IET Comput Vis*. 1 oct 2018;12(7):941-9.
- Silva L, Rodrigues C, Lira A, Leão M, Mota M, Lopes P, et al. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy typing: a real-time analysis of an outbreak by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. déc 2020;39(12):2471-5.
- Silver D, Schrittwieser J, Simonyan K, Antonoglou I, Huang A, Guez A, et al. Mastering the game of Go without human knowledge. *Nature*. oct 2017;550(7676):354-9.
- Sisodia D, Sisodia DS. Prediction of Diabetes using Classification Algorithms. *Procedia Comput Sci*. 1 janv 2018;132:1578-85.
- Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 1 janv 2009;67(1):6-20.
- Sofradir-EC. ATOM 80 - 80×80 Uncooled Microbolometer Core [Internet]. Pyramid Imaging. 2014 [cité 26 nov 2021]. Disponible sur: <https://pyramidimaging.com/specs/Sofradir-EC/Datasheets/SofEC-ATOM80-v04.pdf>
- Sousa AM, Machado I, Nicolau A, Pereira MO. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *J Microbiol Methods*. 2013;95(3):327-35.
- Spiro TG. Resonance Raman spectroscopy. New structure probe for biological chromophores. *Acc Chem Res*. 1974;7(10):339-44.
- Spyrelli ED, Doulgeraki AI, Argyri AA, Tassou CC, Panagou EZ, Nychas GJE. Implementation of Multispectral Imaging (MSI) for Microbiological Quality Assessment of Poultry Products. *Microorganisms*. 11 avr 2020;8(4):552.
- Stenholm T, Hakanen AJ, Hakanen E, Härmä H, Österblad M, Vuopio J, et al. High-throughput screening of colonization samples for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scand J Infect Dis*. 1 déc 2013;45(12):922-9.
- Stevenson HJ, Bolduan OE. Infrared spectrophotometry as a means for identification of bacteria. *Science*. 1952;116(3005):111-3.
- Stewart MP, Buriak JM. Chemical and Biological Applications of Porous Silicon Technology. *Adv Mater*. 2000;12(12):859-69.
- Strola SA, Marcoux PR, Schultz E, Perenon R, Simon AC, Espagnon I, et al. Differentiating the growth phases of single bacteria using Raman spectroscopy. In: *Biomedical Vibrational Spectroscopy VI: Advances in Research and Industry* [Internet].

- International Society for Optics and Photonics; 2014 [cité 2 mars 2020]. p. 893905. Disponible sur: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/8939/893905/Differentiating-the-growth-phases-of-single-bacteria-using-Raman-spectroscopy/10.1117/12.2041446.short>
- Suwandi RC. If Harry Potter Was Written by an AI [Internet]. Medium. 2020 [cité 18 juin 2021]. Disponible sur: <https://towardsdatascience.com/if-harry-potter-was-written-by-an-ai-8a86049e8a06>
- Tantawi KH, Berdiev B, Cerro R, Williams JD. Porous silicon membrane for investigation of transmembrane proteins. *Superlattices Microstruct.* 1 juin 2013;58:72-80.
- Tao Y, Wang Y, Huang S, Zhu P, Huang WE, Ling J, et al. Metabolic-Activity-Based Assessment of Antimicrobial Effects by D2O-Labeled Single-Cell Raman Microspectroscopy. *Anal Chem.* 4 avr 2017;89(7):4108-15.
- TensorFlow Developers. TensorFlow [Internet]. Zenodo; 2021 [cité 28 oct 2021]. Disponible sur: <https://zenodo.org/record/5593257#.YXqjC54zaUk>
- TensorFlow Developers. tf.keras.losses.CategoricalCrossentropy | TensorFlow Core v2.8.0 [Internet]. TensorFlow. [cité 12 mai 2022]. Disponible sur: https://www.tensorflow.org/api_docs/python/tf/keras/losses/CategoricalCrossentropy
- Tharwat A. Linear vs. quadratic discriminant analysis classifier: a tutorial. *Int J Appl Pattern Recognit.* 1 janv 2016;3(2):145-80.
- Tissot JL. Imagerie IR thermique à base de détecteurs non refroidis. 2010;
- Tsai C, Li K -H., Kinosky DS, Qian R -Z., Hsu T -C., Irby JT, et al. Correlation between silicon hydride species and the photoluminescence intensity of porous silicon. *Appl Phys Lett.* 6 avr 1992;60(14):1700-2.
- Turra G, Conti N, Signoroni A. Hyperspectral image acquisition and analysis of cultured bacteria for the discrimination of urinary tract infections. In: 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). IEEE; 2015. p. 759-62.
- Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* [Internet]. nov 1995 [cité 3 déc 2021]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jcm.33.11.2864-2867.1995>
- Vogt S, Löffler K, Dinkelacker AG, Bader B, Autenrieth IB, Peter S, et al. Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy for Typing of Clinical *Enterobacter cloacae* Complex Isolates. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cité 5 déc 2021];0. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02582/full>
- Walsh JD, Hyman JM, Borzhemskaya L, Bowen A, McKellar C, Ullery M, et al. Rapid Intrinsic Fluorescence Method for Direct Identification of Pathogens in Blood Cultures. *mBio.* 31 déc 2013;4(6).

- Weis CV, Jutzeler CR, Borgwardt K. Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 1 oct 2020;26(10):1310-7.
- Welker M, Belkum AV, Girard V, Charrier JP, Pincus D. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. *Expert Rev Proteomics.* 3 août 2019;16(8):695-710.
- Wenning M, Breitenwieser F, Konrad R, Huber I, Busch U, Scherer S. Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* août 2014;103:44-52.
- Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1 août 2013;97(16):7111-20.
- Werbos PJ. Applications of advances in nonlinear sensitivity analysis. In: Drenick RF, Kozin F, éditeurs. *System Modeling and Optimization.* Springer Berlin Heidelberg; 1982. p. 762-70. (Lecture Notes in Control and Information Sciences).
- WHO. OMS : Infections à Salmonella [Internet]. who.int. 2018 [cité 10 nov 2021]. Disponible sur: [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Willey J, Sherwood L, Woolverton C. Chapter 5 (Microbial Nutrition). In: Prescott, Harley, and Klein's *Microbiology.* 7th edition. McGraw-Hill; 2008.
- Williams PJ, Kammies TL, Gouws PA, Manley M. Effect of colony age on near infrared hyperspectral images of foodborne bacteria. *J Spectr Imaging.* 30 janv 2019;8:a5.
- Williams VZ. An Infrared Spectrophotometer for the Organic Chemist. *Appl Spectrosc.* 1 févr 1958;12(1):1-5.
- World Health Organization, éditeur. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance.* Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014.
- Wu W, Mallet Y, Walczak B, Penninckx W, Massart DL, Heuerding S, et al. Comparison of regularized discriminant analysis linear discriminant analysis and quadratic discriminant analysis applied to NIR data. *Anal Chim Acta.* 20 août 1996;329(3):257-65.
- Wysocki G, Curl RF, Tittel FK, Maulini R, Bulliard JM, Faist J. Widely tunable mode-hop free external cavity quantum cascade laser for high resolution spectroscopic applications. *Appl Phys B.* 1 oct 2005;81(6):769-77.
- Xu M, Qin X, Astion ML, Rutledge JC, Simpson J, Jerome KR, et al. Implementation of FilmArray Respiratory Viral Panel in a Core Laboratory Improves Testing Turnaround Time and Patient Care. *Am J Clin Pathol.* 1 janv 2013;139(1):118-23.
- Yeh K, Kenkel S, Liu JN, Bhargava R. Fast Infrared Chemical Imaging with a Quantum Cascade Laser. *Anal Chem.* 6 janv 2015;87(1):485-93.

Yon JJ, Dumont G, Goudon V, Becker S, Arnaud A, Cortial S, et al. Latest improvements in microbolometer thin film packaging: Paving the way for low-cost consumer applications. In 2014.

Yon JJ, Mottin E, Tissot JL. Latest amorphous silicon microbolometer developments at LETI-LIR. In 2008.

Zhou Y, Shen N, Hou HY, Lu Y, Yu J, Mao L, et al. Identification accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for clinical pathogenic bacteria and fungi diagnosis: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2017;10(2):4057-76.

Résumé - Français

L'industrie et le domaine de la santé sont demandeurs de moyens rapides et peu coûteux pour l'identification de microorganismes. Des avantages pratiques et un coût réduit font de la culture en boîte de Petri un outil omniprésent en microbiologie, mais l'observation des colonies microbiennes n'offre pas de diagnostic fiable sans validation par une analyse secondaire. Ces analyses, qu'il s'agisse de réactions chimiques, d'une PCR ou de spectrométrie de masse, demandent une préparation d'échantillon spécifique impliquant des coûts et des délais supplémentaires. C'est pourquoi plusieurs systèmes d'imagerie de boîte ont déjà été expérimentés pour automatiser l'observation des cultures et proposer une identification directement sur la boîte de Petri. Toutefois, ceux-ci se cantonnent jusqu'à présent au domaine du visible et du proche infrarouge (400 – 1000 nm), ce qui n'apporte des informations que sur le morphotype des colonies de micro-organismes et limite la précision d'identification.

Cette thèse est consacrée à l'exploration d'un système d'imagerie multispectrale dans l'infrarouge moyen. Cette gamme de longueurs d'onde apporte des informations à la fois sur le morphotype et sur la composition chimique des colonies observées. Cette imagerie non destructive et sans marquage pourrait fournir une identification à l'espèce des colonies cultivées sur agar, tout en ouvrant la voie à de nouvelles applications. Un système expérimental, combinant des lasers à cascade quantique comme source lumineuse et une matrice de microbolomètres comme imageur, a permis l'acquisition d'images de colonies à neuf longueurs d'ondes comprises entre 5 et 8 μm . 2253 colonies appartenant à huit espèces de microorganismes communs ont ainsi été imagées. Pour l'une des espèces, *Staphylococcus epidermidis*, trois souches différentes ont été analysées pour tester la capacité du système en matière de typage.

Après acquisition, plusieurs méthodes de classification d'image ont été testées pour aboutir à un taux d'identification correct moyen de 94.4 %.

Abstract - Anglais

Industry and health care are demanding rapid and inexpensive means for microbial identification. Thanks to its low cost and practical advantages, Petri dish culture is a ubiquitous tool in microbiology, but the sole observation of microbial colonies does not offer a reliable diagnosis. Identification in itself depends on secondary analysis, such as chemical reactions, PCR or mass spectrometry, which require specific sample preparation, which involves additional costs and delays. That is why several dish imaging systems have already been tested to automate the observation of cultures and to propose an identification directly on the Petri dish. However, these systems are generally limited to the visible and near infrared range (400 - 1000 nm), which only provides information on the morphotype of the microorganism colonies and therefore limits the identification accuracy.

This thesis focuses on the development of a multispectral imaging system in the mid-infrared. In this wavelength range, images provide information on both the morphotype and the chemical composition of the observed colonies. This non-destructive and label-free imaging could provide species identification of colonies grown on agar, while opening the way to new applications. An experimental system, combining quantum cascade lasers as a light source and a microbolometers array as an imager, allowed the acquisition of images of colonies at nine wavelengths between 5 and 8 μm . 2253 colonies belonging to eight species of common microorganisms were imaged. For one of the species, *Staphylococcus epidermidis*, three different strains were analyzed to test the typing capabilities of the system.

After acquisition, several image classification methods were tested to obtain an average correct identification rate of 94.4%.